
Identifizierung und Charakterisierung von niedermolekularen Inhibitoren des AKAP-Lbc- vermittelten Guaninnukleotidaustausches von RhoA

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jessica Tröger

Berlin, 2012

Diese Arbeit wurde von Oktober 2007 bis September 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie bzw. am Max-Delbrück-Centrum in Berlin unter Leitung von PD Dr. Enno Klussmann und Prof. Dr. Walter Rosenthal angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Enno Klussmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am: 02.07.2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jessica Träger, dass ich diese Arbeit eigenhändig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen geschrieben habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Ort, Datum

Unterschrift

Meiner Familie

I Zusammenfassung

Das A-kinase Ankerprotein AKAP-Lbc verankert die Proteinkinase A (PKA) und fungiert als Guaninnukleotid austauschfaktor (GEF) für die kleine GTPase RhoA. AKAP-Lbc vermittelt als Multienzymkomplex die α -Adrenozeptor-(AR)-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten. Um die Funktion des AKAP-Lbc/RhoA-Komplexes dabei näher zu charakterisieren, wurde eine Methode entwickelt, die als Hochdurchsatzverfahren zur Suche nach möglichen Inhibitoren der AKAP-Lbc-katalysierten Aktivierung von RhoA verwendet werden kann. Als Grundlage wurde die GEF-Aktivität des AKAP-Lbc, exakter der Nukleotid austausch von GDP zu GTP von RhoA, genutzt, welcher mittels dem fluoreszenzmarkierten GTP-Analogon 2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-Guanosintriphosphat (mGTP) visualisiert wurde. Die für ein High-throughput Screening benötigten Mengen an reinen, aktiven Proteinen wurden rekombinant in Bakterienzellen exprimiert, aus dem Bakterienlysat isoliert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Eine Bibliothek von 18.000 niedermolekularen Substanzen wurde in einem verlässlichen Hochdurchsatzverfahren nach potenziellen Inhibitoren durchsucht. Nach dem Validierungsprozess hemmten drei Substanzen (31413, 31864 und 31892) den Austausch von GDP-RhoA zu GTP-RhoA, und damit die Aktivierung von RhoA in vitro. Die ermittelten IC₅₀-Werte lagen bei 25 μ M (31413), 40 μ M (31864) und 79 μ M (31892). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit wurden auch bekannte Furocoumarine auf ihre Wirkung auf den AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotid austausch von RhoA untersucht. Keine von diesen Substanzen zeigte im verwendeten Konzentrationsbereich eine Hemmung. Untersuchungen der Verträglichkeit an Zellen wiesen darauf hin, dass die Substanzen in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch waren. Dafür hemmte die Substanz 31413 die Lysophosphatidsäure-induzierte Stressfaserbildung in 3T3-Zellen sowie die G α 12- aber nicht G α q-vermittelte RhoA-Aktivierung in HEK293-Zellen. Ferner zeigte die Substanz 31413 nur eine Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten, SRE-induzierten Luziferase-Aktivität. Diese Ergebnisse belegten, dass 31413 eine spezifische Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten Rho-Aktivierung hervorruft. Mit Blick auf die Wechselwirkung zwischen AKAP-Lbc und RhoA und deren Beteiligung an der α -adrenerg-induzierten Herzmuskelhypertrophie, wurden Experimente an isolierten, neonatalen Kardiomyozyten angeschlossen. Dabei wurde für die Substanz 31413 eine Hemmung der α -AR-induzierten, nicht jedoch der α -AR-stimulierten Erhöhung der Schlagfrequenz von neonatalen Kardiomyozyten ermittelt. Die Beobachtung, dass 31413 die Adrenalin-induzierte Kontraktion nicht hemmt, ist demnach ein weiterer Beleg für die spezifische Wirkung des Moleküls auf den α -AR-induzierten RhoA-Signalweg. Dies impliziert, dass auch die α -AR-angestörte Hypertrophie beeinflusst werden könnte. Damit stellt die identifizierte Substanz ein wegweisendes Werkzeug für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für Herzhypertrophie und der daraus hervorgehenden Herzinsuffizienz dar.

II Abstract

The A kinase anchoring protein AKAP-Lbc tethers protein kinase A (PKA) and possesses a guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity which stimulates the small GTP-binding protein RhoA. RhoA controls a plethora of cellular processes including gene expression, cellular growth and cytoskeletal dynamics. Pathological changes of its function, in particular with regard to cytoskeletal structures are often responses to chronic stress signals, a common characteristic of many diseases including chronic heart failure. In order to analyse the functional relevance of the AKAP-Lbc/RhoA signalling complex in such processes small molecule inhibitors of the AKAP-Lbc-induced RhoA activation should be identified. AKAP-Lbc catalyzes the exchange of GDP to GTP in RhoA promoting its activation. Thus a nucleotide exchange assay for screening a library of about 18,000 small molecules was established using recombinant proteins and the fluorescently-labelled GTP analogue 2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)-Guanosin triphosphat (mGTP). Three compounds (31413, 31864 and 31892) were found to inhibit the AKAP-Lbc-mediated nucleotide exchange from GDP-bound RhoA to GTP-bound RhoA and, consequently, RhoA activation *in vitro*. Measured IC₅₀ values were 25 µM (31413), 40 µM (31864) or 79 µM (31892). Compound 31413 inhibits stress fiber formation induced by lysophosphatidic acid in 3T3 cells. For 31413 an inhibition of G_{α12}-mediated, but not G_{αq}-induced activation of RhoA was observed in HEK293 cells. Further, 31413 seemed to specifically inhibit AKAP-Lbc-mediated SRE-induced luciferase activation. These results imply that 31413 specifically blocks AKAP-Lbc-mediated RhoA activation. Bearing in mind the participation of the interaction between AKAP-Lbc and RhoA in the development of cardiac hypertrophy, experiments with isolated neonatal cardiac myocytes were conducted. Compound 31413 inhibits α1-adrenergic increase in beating frequency of isolated neonatal cardiac myocytes. This observation implies that α1-adrenergic induced cardiac hypertrophy may be modulated by the compound.

This small molecule represents not only a valuable tool, but may pave the way to novel approaches for the treatment of diseases that involve AKAP-Lbc-mediated activation of RhoA such as chronic heart failure.

III Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	5
II	ABSTRACT	6
III	INHALTSVERZEICHNIS	7
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1	EINLEITUNG	11
1.1	CAMP SIGNALE UND PROTEINKINASE A	11
1.2	A-KINASEANKERPROTEINE (AKAP)	12
1.3	DAS KLEINE GTP-BINDENDE PROTEIN RHOA	13
1.3.1	RHO GTPASEN REGULIEREN DIE ZELLMORPHOLOGIE UND MUSKELKONTRAKTION	15
1.3.2	RHO GTPASEN REGULIEREN DIE GENEXPRESSION	17
1.4	DAS A-KINASEANKERPROTEIN UND DER GUANINNUKLEOTIDAUSTAUSCHFaktor AKAP-Lbc	17
1.4.1	DER AKAP-Lbc-SIGNALKOMPLEX	18
1.4.2	WEITERE VON AKAP-Lbc VERANKERTE SIGNALMOLEKÜLE	20
1.5	DIE PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER AKAP-Lbc-RHOA-WECHSELWIRKUNG	20
1.5.1	EINFLUSS AUF DIE ENTWICKLUNG EINER HERZHYPERTROPHIE	20
1.5.2	KREBSERKRANKUNGEN	22
1.6	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	MATERIALIEN	23
2.1.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	23
2.1.2	GERÄTE	24
2.1.3	SOFTWARE	26
2.1.4	BAKTERIENSTÄMME UND EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	26
2.1.5	DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN	27
2.2	METHODEN	28
2.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.2.2	BIOCHEMISCHE METHODEN	31
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	42
2.3.1	KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN	42
2.3.2	ZELLZÄHLUNG UND ZELLAUSSAAT VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN	42
2.3.3	GEFRIERKONSERVIERUNG VON ZELLEN	43
2.3.4	ALAMAR BLUE TEST	43
2.3.5	TRANSFEKTION VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN	43
2.3.6	KULTIVIERUNG PRIMÄRER NEONATALER KARDIOMYOZYTEN DER RATTE	44
2.4	MIKROSKOPISCHE ANALYSE AN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	44
2.4.1	IMMUNFLUORESCENZ DES ZYTOSKELETTS AN FIXIERTEN 3T3-ZELLEN	44
2.4.2	UNTERSUCHUNGEN AN KULTIVIERTEN KARDIOMYOZYTEN DER RATTE	45
3	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	46
3.1	IN VITRO-STUDIEN	46

3.1.1 Klonierung und Expression von rekombinanten RHOA und AKAP-Lbc	46
3.1.2 Funktionalität von RHOA und AKAP-Lbc DHPH	51
3.1.3 Der AKAP-Lbc-katalysierte Nukleotidaustausch von RHOA als Ausgangspunkt zur Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens	52
3.1.4 Durchmusterung einer Substanzbibliothek	54
3.2 Studien an Zellen	58
3.2.1 Zellgängigkeit der Substanzen 31413, 31864 und 31892	58
3.2.2 Toxizitätstest mit den Substanzen 31413, 31864 und 31892	60
3.2.3 Zytoskelett-Umstrukturierung nach RHOA Aktivierung	61
3.2.4 Untersuchung der Substanzwirkung auf die GEF-induzierte RHOA-Aktivierung	63
3.2.5 Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten	66
4 Diskussion	68
4.1 Kleine Moleküle als Werkzeuge	68
4.1.1 Die identifizierte Substanz 31413 hemmt den AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotidaustausch von RHOA	68
4.1.2 Erste Hinweise auf eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die potenziellen Inhibitoren des AKAP-Lbc katalysierten Nukleotidaustausches von RHOA	69
4.1.3 Die Substanz 31413 wirkt spezifisch auf die AKAP-Lbc-vermittelte RHOA-Aktivierung in eukarotischen Zellen	70
4.1.4 Die Wirkung der identifizierten Substanz 31413 auf die RHOA-Aktivierung in Kardiomyozyten	72
4.1.5 31413 als <i>Tool</i> zur Charakterisierung von Funktionen in anderen Zellsystemen	73
4.2 Rolle von AKAP-Lbc und RHOA bei verschiedenen Erkrankungen	74
4.2.1 Einfluss von AKAP-Lbc und RHOA bei Herzmuskelhypertrophie	74
4.2.2 Einfluss von AKAP-Lbc und RHOA bei Krebserkrankungen	75
4.3 Ausblick	76
5 Referenzen	77
6 Anhang	84
6.1 Ineffiziente Funktion der GST- und His ₆ -Fusionsproteine	84
6.2 Proteinsequenzen der Profinity EXACT-Konstrukte	85

IV Abkürzungsverzeichnis

λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
μ	micro
AKAP	A-kinase Ankerprotein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfate
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>circular dichroism</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> bzw. <i>copy-DNA</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
DPBS++	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein, stärker fluoreszierende Form des grünfluoreszierenden Proteins
FKS	Fötale Kälberserum
g	Normwert der Schwerebeschleunigung $g_n=9,80665$ (2,81m/s)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G protein coupled receptor</i>)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidine
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>

IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Typ: Lennox)
M	Molar
mGDP	2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-Guanosindiphosphats
mGTP	2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-Guanosintriphosphats
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PK	Proteinkinase
Rho	Ras homolog
RNA _i	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TAE	Tris-Essigsäure (<i>acetic acid</i>)-EDTA
Taq-Pol	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TBAB	Tetra-n-butylammoniumbromid
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline tween (0.1%)</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethan
UE	Untereinheit
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Zelluläre Signalkaskaden werden durch extrazelluläre Signale initiiert, die von Zelloberflächenrezeptoren erkannt und ins Innere der Zellen weitergeleitet werden. Intrazellulär sind sekundäre Botenstoffe, wie z.B. zyklische Monophosphate, Phospholipide oder Kalziumionen an der Weiterleitung der Signale beteiligt. Die größte Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), deren Grundstruktur aus sieben transmembranalen Helices besteht. Die extrazelluläre Bindung von Liganden an GPCR hat zur Folge, dass die Rezeptoren das intrazellulär gebundene, heterotrimere G-Protein aktivieren. Dieses besteht aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit (α -UE) die Bindedomäne für Guanosindiphosphat (GDP) bzw. -triphosphat (GTP) besitzt. Infolge der Aktivierung des G-Proteins durch den GPCR erfolgt der Austausch von GDP gegen GTP und damit die Dissoziation in die funktionelle α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer, die eigenständig verschiedene Effektoren regulieren können. Durch Hydrolyse des GTP zu GDP schließt sich der Zyklus und das G-Protein geht in seinen inaktiven, heterotrimeren Zustand zurück. Am besten charakterisiert sind die α -UE des G-Proteins, welche aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften in vier Familien gegliedert werden: die Familie der stimulatorischen ($G_{\alpha s}$), der inhibitorischen ($G_{\alpha i}$) G_{α} -Untereinheiten sowie die mit den G_{α} -Untereinheiten des Types q/11 ($G_{\alpha q/11}$) oder 12/13 ($G_{\alpha 12/13}$). Die $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten wirken beide auf die Adenylylzyklase (AC), wobei die AC von $G_{\alpha s}$ aktiviert und von $G_{\alpha i}$ inhibiert wird. $G_{\alpha q/11}$ bewirkt u.a. die Aktivierung der Phospholipase C (Offermanns, 2003). Für die $G_{\alpha 12/13}$ -Untereinheiten werden Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen beschrieben, z.B. binden $G_{\alpha 12/13}$ -UE Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Kurose, 2003).

1.1 cAMP Signale und Proteinkinase A

Die Aktivierung einer Gruppe von GPCR durch spezifische extrazelluläre Liganden führt über das stimulatorische G-Protein $G_{\alpha s}$ zu einer Aktivierung einer AC, die ihrerseits Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umsetzt. Der sekundäre Botenstoff cAMP kann nun wiederum cAMP-abhängige Proteine wie z.B. die zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanäle (CNGC; *cyclic nucleotide-gated channels*), die durch cAMP aktivierten Austauschfaktoren (EPAC; *exchange factor activated by cAMP*) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktivieren (Abb. 1.1). Die PKA gehört zur Gruppe der Serin/Threoninkinasen und phosphoryliert bevorzugt Proteine mit der Konsensussequenz R-R-X-S/T (Shabb, 2001). Das inaktive PKA Holoenzym ist ein Tetramer, bestehend aus einem Dimer aus regulatorischen Untereinheiten des Typs I oder des Typs II (RI bzw. RII) und aus zwei katalytischen Untereinheiten (C) (Kim *et al.*, 2006). Bei den RI- und RII-Untereinheiten unterscheidet man jeweils zwei Isoformen (α und β), für die C-Untereinheit drei (α , β oder γ). Die Bindung von je zwei Molekülen cAMP an eine regulatorische Untereinheit (R-UE) führt zu einer Konformationsänderung, welche die Dissoziation und damit die Aktivierung der katalytischen Untereinheiten bewirkt. Diese sind nun in der Lage nahegelegene Substrate zu phosphorylieren (Skalhegg *et al.*, 2000). Eines davon ist z.B. die kleine GTPase RhoA, deren Serinrest 188 durch die PKA phosphoryliert wird (Ellerbroek, 2003; Lang *et al.*, 1996).

Während die AC cAMP generiert, katalysieren sogenannte Phosphodiesterasen (PDE) den Abbau von cAMP zu AMP und limitieren damit die Halbwertszeit des Botenstoffes. Durch die zeitlich und lokal begrenzte Erhöhung des cAMP-Spiegels können unterschiedliche extrazelluläre Stimuli verschiedene zelluläre Reaktionen bewirken. Eine solche Spezifität kann nur mittels Kompartimentalisierung erreicht werden. Im Fall der PKA erfolgt diese lokale Regulation durch die Interaktion mit A-kinaseankerproteinen (AKAP) an bestimmten zelluläre Strukturen (*Dodge-Kafka et al., 2008; Pidoux et al., 2010; Skroblin et al., 2010; Welch et al., 2010*).

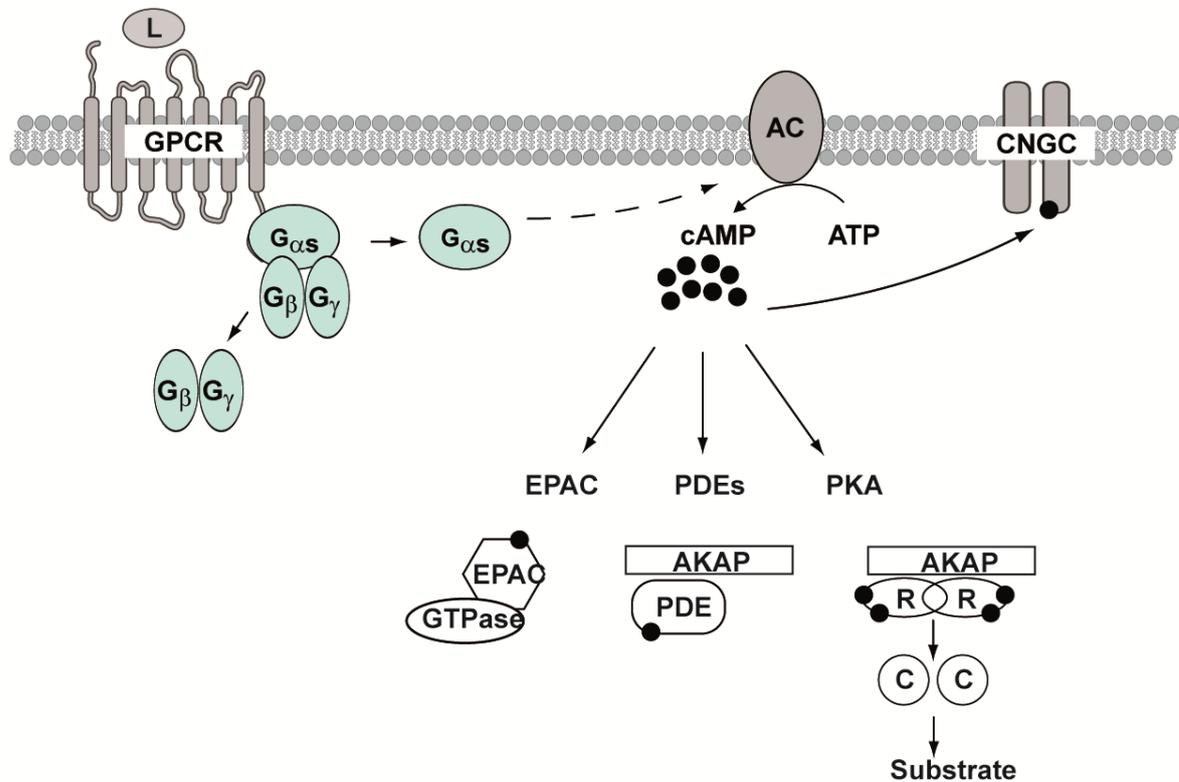


Abb. 1.1 cAMP-abhängige Signale: Die Bindung eines Liganden (L) an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche das gekoppelte heterotrimere G-Protein aktiviert. Dies erfolgt durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu -triphosphat (GTP) und die dadurch begünstigte Dissoziation des heterotrimeren Komplexes in die G α -Untereinheit und das Dimer aus den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die G α s-Untereinheit stimuliert die Adenylylzyklase (AC), welche dann die Zyklisierung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Der sekundäre Botenstoff cAMP ist Stimulus für diverse Signalproteine, u.a. für die zyklisch-Nukleotid gesteuerten Ionenkanälen (CNGC), die durch cAMP aktivierten Austauschfaktoren (EPAC) und die Proteinkinase A (PKA). A-Kinaseankerproteine (AKAP) dienen sowohl der PKA als auch anderen Signalproteinen wie Phosphodiesterasen (PDE) als Gerüstprotein. Die PKA dissoziiert infolge der cAMP-Bindung an die regulatorischen Untereinheiten (R) in das R-Dimer und in die beiden katalytischen Untereinheiten (C), die daraufhin nahegelegene Substrate phosphorylieren.

1.2 A-kinaseankerproteine (AKAP)

Die Familie der A-Kinaseankerproteine (AKAP) umfasst mehr als 50 Proteine (Skroblin et al., 2010). Ihr charakteristisches Merkmal ist eine PKA-Bindedomäne, über welche die Wechselwirkung mit den R-UE der PKA vermittelt wird. Die einzelnen AKAP unterscheiden sich in ihren Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen regulatorischen Untereinheiten der PKA. Einige AKAP binden spezifisch an RII-UE oder RI-UE, andere sind dual-spezifisch und können beide R-Subtypen binden.

Durch Bindung weiterer Proteinkinasen (PK), Proteinphosphatasen, PDEs, GTP-bindender Proteine oder Zelloberflächenrezeptoren koordinieren AKAP verschiedene Signalkaskaden.

Über eine Ankerdomäne können AKAP die PKA und andere gebundene Proteine an verschiedenen Kompartimenten verankern, z.B. an der Plasmamembran, den Mitochondrien, am Zytoskelett oder am sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dadurch wird die Modifikation von ausgewählten nachgeschalteten Zielproteinen ermöglicht. Die molekularen Grundlagen, die der Verteilung der AKAP zugrunde liegen, sind in den meisten Fällen noch ungeklärt. Allerdings scheint die Lokalisation von AKAP durch eine Kombination aus Lipid-Lipid- und Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen kontrolliert zu werden. Zum Beispiel interagiert das AKAP Yotiao mit dem Kaliumkanal $KCNQ_1$ an der Plasmamembran (Kurokawa *et al.*, 2004) oder das AKAP18 δ mit dem Phospholamban am sarkoplasmatischen Retikulum (Lygren *et al.*, 2007) von Herzmuskelzellen. Gravin (AKAP12/AKAP250) dagegen wird über Interaktionen mit Membranlipiden an die Plasmamembran rekrutiert (Malbon *et al.*, 2004).

Das AKAP-Lbc (AKAP13) bildet die Basis für einen Multienzymkomplex nahe des Aktinzytoskeletts (Diviani, 2011). Dabei verbindet AKAP-Lbc u.a. das cAMP/PKA-System mit dem RhoA- und dem MAP-Kinase-Signalweg (Cariolato *et al.*, 2011; Diviani *et al.*, 2001).

1.3 Das kleine GTP-bindende Protein RhoA

GTP-bindende Proteine dienen in der intrazellulären Signalweiterleitung als molekulare Schalter (Bourne *et al.*, 1990), da sie GTP zu GDP und freiem Phosphat hydrolysieren und so in einem aktiven, GTP-gebundenen oder inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vorliegen können (Bourne *et al.*, 1991). Zu dieser Proteinfamilie zählen neben den heterotrimeren G-Proteinen auch die kleinen GTPasen, welche in der Zelle als Monomere vorkommen und eine molare Masse von 20-30 kDa besitzen. Die An- und Abschaltung solcher Signalmoleküle ermöglicht eine kontrollierbare Weiterleitung von eingehenden Reizen. Die Aktivität von GTPasen wird durch Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEF), GTPase-aktivierende Proteine (GAP) und bei manchen GTPasen (Rab und Rho) durch GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) reguliert (Heasman *et al.*, 2008). Die intrinsische Enzymaktivität der kleinen GTPasen wird durch GAP um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert (Bos *et al.*, 2007). Der resultierende, inaktive GDP-gebundene Zustand stellt ein wichtiges Regulationselement dar und kann durch Bindung eines GDI, welcher die GTPasen durch Bindung an deren Prenylreste im C-Terminus im Zytosol hält, bewahrt werden. Farnesyl- oder Geranylgeranylreste sind posttranslational angehängte Lipidmodifikationen, über welche die GTPasen in Membranen verankert sind und sich somit in der Nähe von Effektoren und Regulatoren befinden (Heasman *et al.*, 2008).

GEF katalysieren die Dissoziation von GDP und fördern die Bindung von GTP. Da GTP im Vergleich zu GDP in 100-fach höherer Konzentration in der Zelle vorliegt, wird dieses bevorzugt von der Nukleotid-freien GTPase gebunden. Als Folge der Bindung geht die GTPase in ihre aktive Konformation über. Dabei werden die zwei variablen (*switch*-) Regionen im GTP-gebundenen Protein so positioniert, dass eine Wechselwirkung mit den Effektoren ermöglicht wird (Bos *et al.*, 2007; Rossman *et al.*, 2005). Durch Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat kehrt die GTPase zurück in den inaktiven Zustand und der Zyklus kann erneut beginnen (Abb. 1.2).

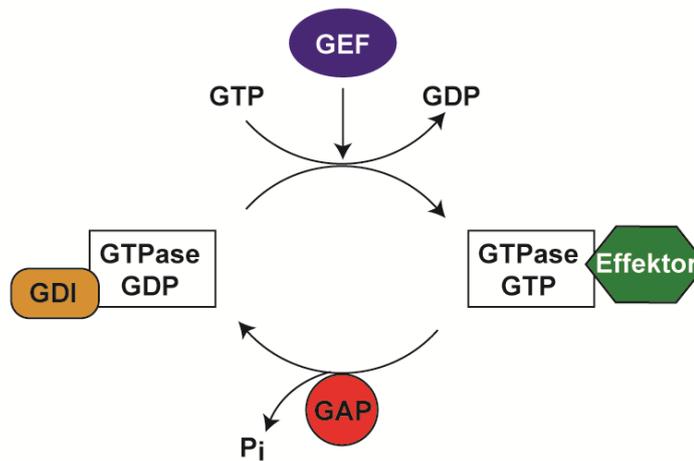


Abb. 1.2 Aktivierung und Inaktivierung von GTPasen: Die Regulation des Aktivitätszustandes einer GTPase erfolgt durch verschiedene Faktoren. Guaninnukleotid austauschenden Faktoren (GEF) katalysieren den Austausch des Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosin triphosphat (GTP). Die aktivierte Form der GTPase (GTP-gebunden) kann dann mit ihren Effektoren interagieren. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität und damit die Hydrolyse des GTP zu GDP. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) halten die GTPase im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand.

Es gibt über 100 verschiedene kleine GTPasen, die bezüglich ihrer phylogenetischen Eigenschaften in sechs Familien unterteilt werden können: Ras, Rho, Rad, Rab, Sar1/Arf und Ran. Die einzelnen Familien sind an unterschiedlichen zellulären Funktionen beteiligt, z.B. am Vesikeltransport (Rab und Sar1/Arf), an der Genexpression (Ras und Rho), an aktivem Kerntransport (Ran) sowie an Veränderungen des Zytoskeletts (Rho) (Takai *et al.*, 2001). Die Ras homologen GTPasen (Rho GTPasen) umfassen bisher acht Unterfamilien in Vertebraten, die bekanntesten sind Rho, Rac und Cdc42 sowie RhoUV, RhoBTB, RhoDF, RhoH und Rnd. Zur humanen Rho-Unterfamilie zählen die Isoformen RhoA, die ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit ist, sowie RhoB und RhoC (Boureux *et al.*, 2007). Rho GTPasen koordinieren neben der Organisation des Zytoskeletts auch Zellmigration, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und den Verlauf des Zellzyklus (Burrige *et al.*, 2004; Hall, 2005; Van Aelst *et al.*, 1997). Initiiert werden diese Vorgänge durch Aktivierung von Zytokin- und Adhäsionsrezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinase und GPCR (Hall, 1998; Kjoller *et al.*, 1999; Rolfe *et al.*, 2005)(Abb. 1.3).

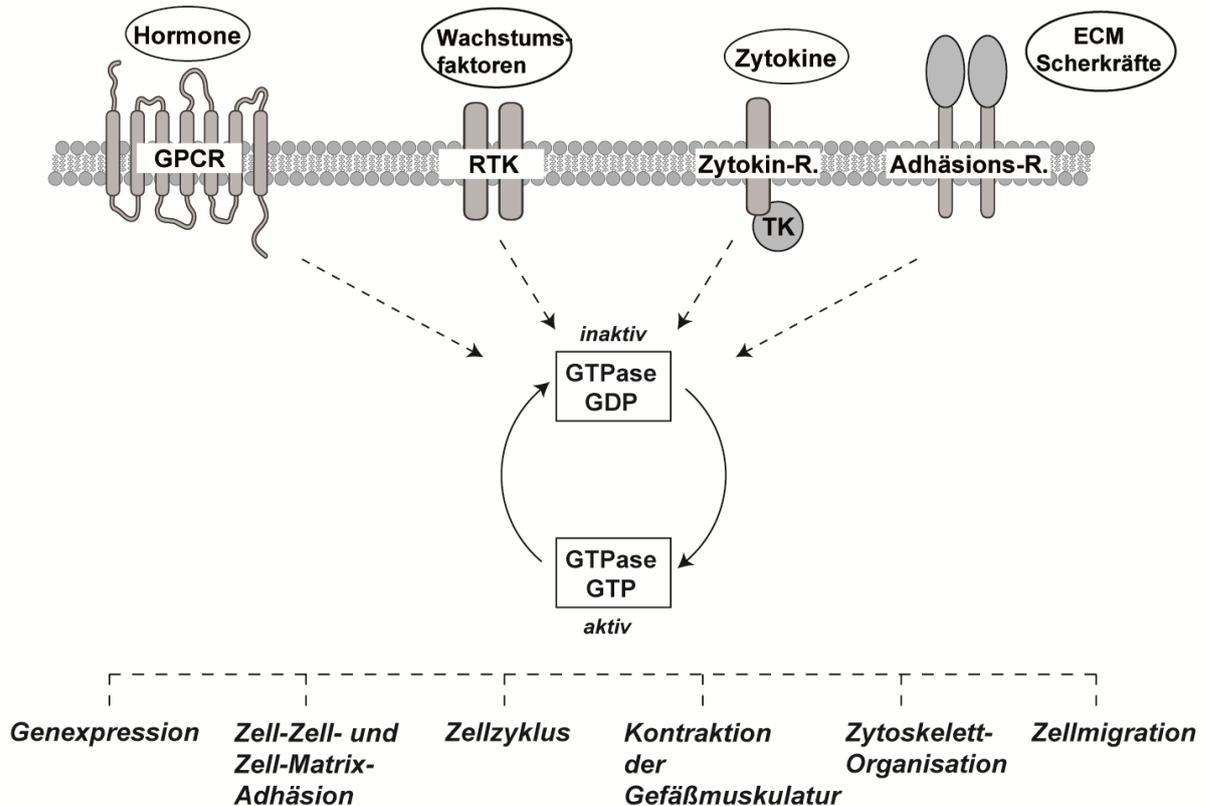


Abb. 1.3 Aktivierung Rho GTPase-gesteuerter Zellfunktionen: Kleine GTPasen der Rho-Familie können infolge der Stimulation von GPCR, Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), Zytokinrezeptoren (Zytokin-R.) und gekoppelten Tyrosinkinasen (TK) und Adhäsionsrezeptoren (Adhäsions-R.), die Kontakte zur extrazellulären Matrix (ECM) aufbauen, aktiviert werden. Über die Aktivierung ihrer Effektoren können Rho GTPasen verschiedene zelluläre Prozesse steuern, wie z.B. die Organisation der Zytoskeletts, die Anschaltung der Expression diverser Gene oder die Kontraktion der Gefäßmuskulatur. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Rolfe *et al.*, 2005)

1.3.1 Rho GTPasen regulieren die Zellmorphologie und Muskelkontraktion

Die Morphologie einer Zelle wird auf unterschiedliche Weisen durch RhoA beeinflusst. So werden z.B. die Expression bestimmter Genprodukte initiiert und Zytoskelettproteine modifiziert. Letzteres beeinflusst das Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau von Zellstrukturen.

Lysophosphatidsäure (LPA)-induzierte Aktivierung von RhoA führt in Fibroblasten zur Assoziation von Aktinfilamenten zu Stressfasern (Ridley *et al.*, 1992) und der Ausbildung von fokalen Kontakten (Van Aelst *et al.*, 1997). Rac-Aktivierung nach Stimulation mit dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Insulin resultiert in der Bildung eines Aktinnetzes nahe der Zellperipherie in Form von Lamellopodien. Im Falle von Cdc42-Aktivierung zeigen sich Aktin-reiche Membranausstülpungen, die als Filopodien bezeichnet werden (Hall, 1998) (Abb. 1.4). In 3T3 Zellen konnte zudem auch eine hierarchische Abfolge in der gemeinsamen Aktivierung der kleinen Rho GTPasen gezeigt werden. Nach dieser führt GTP-geladenes Cdc42 nicht nur zur Ausbildung von Filopodien, sondern auch zur Stimulation von Rac und damit neben der Bildung von Lamellopodien auch zur Aktivierung von RhoA und hiermit zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten (FAK) (Van Aelst *et al.*, 1997).

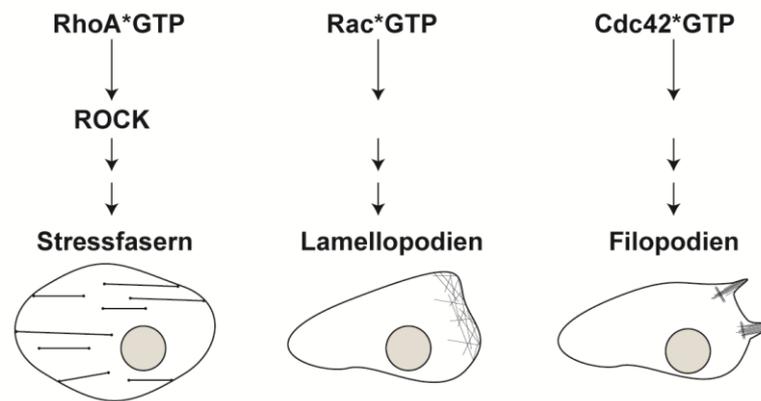


Abb. 1.4 Strukturen des Zytoskeletts nach Aktivierung der Rho GTPasen: Die schematische Darstellung zeigt nach RhoA-Aktivierung die Ausbildung sogenannter Stressfasern, bei Rac-GTP findet man Lamellopodien und bei Cdc42-GTP Filopodien.

Ein Haupteffektor von RhoA ist die Rho-assoziierte Kinase ROCK, welche sich bei Säugetieren aus einer Kinasedomäne, einer *coiled-coil* Region und einer PH-Domäne zusammensetzt. Letztere reduziert durch eine autoinhibitorische, intramolekulare Verschiebung in Abwesenheit von aktiviertem RhoA die Kinaseaktivität der Rho-Kinasen (Hahmann *et al.*, 2010; Riento *et al.*, 2003). GTP-gebundenes RhoA bindet an die *coiled-coil* Region von ROCK und vermittelt so deren Aktivierung. Über die Phosphorylierung der LIM-Kinase induziert ROCK die Ausbildung von Fokaladhäsionskontakten und Stressfasern (Maekawa *et al.*, 1999). Es gibt zwei Isoformen von ROCK, von denen ROCK1 hauptsächlich in Lunge, Leber, Milz, Niere und Hoden exprimiert wird, während ROCK2 vorwiegend in Gehirn und Herz zu finden ist (Hahmann *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 1996; Riento *et al.*, 2003).

Das Rho-ROCK-System trägt wesentlich zur Blutdruckregulation und Kontraktion der glatten Muskulatur der Blutgefäße bei. Eine essenzielle Aufgabe von ROCK ist die Modulation des Phosphorylierungsstatus der leichten Ketten von Myosin II (Jalil *et al.*, 2005). Zum einen phosphoryliert ROCK die leichten Ketten von Myosin II, zum anderen hemmt es die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP). Bei steigendem Kalziumspiegel in der Zelle bindet das Kalziumbindeprotein Calmodulin Ca^{2+} -Ionen und aktiviert die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), welche ebenfalls die leichten Ketten des Myosin phosphoryliert. Die ATPase-Aktivität des Myosin II wird erhöht, was in einer gesteigerten Kontraktion resultiert. Die Stärke und Geschwindigkeit, mit denen die glatte Muskulatur kontrahiert, ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus der Myosinköpfe. So trägt das Rho/ROCK-System zur Agonist-vermittelten Ca^{2+} -Sensibilisierung während der Kontraktion der glatten Muskulatur bei.

1.3.1.1 RhoA in Herzmuskelzellen

RhoA ist eines der Proteine, die eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Herzens spielen (Kaarbo *et al.*, 2003). Es wird in neonatalen Kardiomyozyten exprimiert und steuert die Organisation der Myofilamente in Sarkomer-Einheiten, das Wachstum von Herzmuskelzellen und die Genexpression nach α 1-adrenerger Stimulation (Sah *et al.*, 1996). RhoA reguliert über ROCK die Aktivität der L-Typ-Kalziumkanäle in ventrikulären Kardiomyozyten (Yatani *et al.*, 2004). Neben ROCK

aktiviert RhoA auch die Proteinkinase N (PKN) (Morissette *et al.*, 2000) und die *stress-activated protein* (SAP-) Kinase (Charron *et al.*, 2001), welche die Expression von Genen beeinflusst, die an der Entwicklung der kardialen Hypertrophie beteiligt sind.

1.3.2 Rho GTPasen regulieren die Genexpression

Rho, Rac und Cdc42 aktivieren über den *serum response factor* (SRF) die Transkription des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) in Fibroblasten (Hill *et al.*, 1995). RhoA scheint sowohl die Phenylephrin-induzierte als auch die durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 1 (MEKK1)-stimulierte ANF-Expression in Herzmuskelzellen zu vermitteln (Thorburn *et al.*, 1997). Rho, Rac und Cdc42 steuern darüber hinaus auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB und fördern die Expression NFκB-abhängiger Gene (Perona *et al.*, 1997).

1.4 Das A-kinaseankerprotein und der Guaninnukleotidaustauschfaktor AKAP-Lbc

Der Genlocus des humanen Lbc (*Lymphoid blast crisis*)-Gens umfasst die Region q24-q25 auf Chromosom 15. Ein zehn Kilobasen langes Transkript wird hauptsächlich im Herzen exprimiert, konnte aber auch in geringeren Mengen in Lunge, Niere, Pankreas, Skelettmuskelgewebe und Leber nachgewiesen werden (Diviani *et al.*, 2001). Ein etwa fünf Kilobasen-Konstrukt wurde in Hoden und Gewebe von Brustkarzinomen nachgewiesen (Rubino *et al.*, 1998; Sterpetti *et al.*, 1999).

Vier Isoformen des humanen AKAP-Lbc sind beschrieben (Abb. 1.5), die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen generiert werden können. Bei der Durchsichtung einer humanen cDNA-Bibliothek aus Schilddrüsengewebe nach möglichen A-kinaseankerproteinen wurde ein cDNA-Fragment isoliert, welches für die Isoform 1 des AKAP-Lbc kodiert und entsprechend der Herkunft als humanes thyreoidales Ht31 bezeichnet wurde (Carr *et al.*, 1992). Nach Untersuchungen der Aminosäuresequenz und Sekundärstrukturvorhersage nach der Helixrad-Projektion weist Ht31 eine aus 14 Aminosäuren bestehende amphipathische Helix auf. Diese Domäne ist konserviert und Hauptcharakteristikum aller AKAP (Carr *et al.*, 1991). Das Ht31-Peptid, abgeleitet von der amphipathischen Helix des AKAP-Lbc, gilt als Prototyp eines Hemmstoffes von PKA-AKAP-Interaktionen und dient als Werkzeug zur Analyse der Funktion von AKAP-PKA-Wechselwirkungen (Hundsruker *et al.*, 2008; Skroblin *et al.*, 2010).

Die Isoformen 1 (Ht31), 2 (AKAP-Lbc) und 3 umfassen alle mit nahezu 2800 Aminosäuren eine PKA-Binderegion sowie das charakteristische Tandem aus *Dbl*-Homologie (DH)- und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, welches für die RhoGEF-Funktion notwendig ist. Damit gehört AKAP-Lbc, als Mitglied der *Dbl*-Familie von Rho-Austauschfaktoren, neben dem p110γ (Perino *et al.*, 2011) zu den wenigen AKAP mit intrinsischer katalytischer Domäne (Diviani *et al.*, 2001).

Das Onkogenprodukt *Dbl* wurde als erstes RhoGEF aus diffusen, humanen B-Zell-Lymphomgewebe identifiziert (Hart *et al.*, 1991). Derzeit schließt die *Dbl*-Familie der RhoGEFs ca. 70 Mitglieder ein, welche alle die etwa 200 Aminosäuren umfassende DH- Domäne und die C-terminal angrenzende PH-Domäne beinhalten. Die Struktur der DH-Domäne präsentiert sich vorwiegend helikal. Drei konservierte Bereiche (CR1-CR3) bilden die Kernregion, von denen CR1 und CR3 sowie die Helix α6 als Basis für die Wechselwirkung mit den *switch*-Regionen der GTPase dienen (Rossman *et al.*,

2005). Auch der nicht konservierte Teil der DH-Domäne scheint für die Bildung der spezifischen RhoGEF-GTPase-Paarungen eine wesentliche Rolle zu spielen, so führt z.B. eine Punktmutation des Leuzinrestes 766 zu Isoleuzin (L766I) im Dbs (*Dbl's big sister*), welches normalerweise mit den GTPasen Cdc42 und RhoA wechselwirkt, zu einer stabilen Bindung von Dbs zu Rac (Cheng *et al.*, 2002).

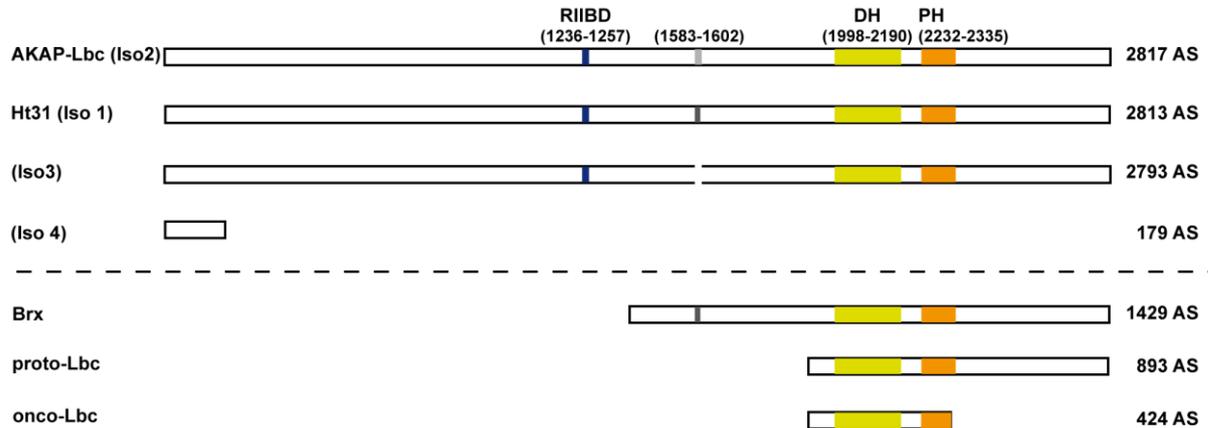


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Isoformen des AKAP-Lbc: Die Isoformen (Iso) 1, 2 und 3 umfassen alle etwa 2800 Aminosäuren (AS) und besitzen eine PKA-RII-Bindedomäne (RIIBD, blau) und ein Tandem aus Dbl-Homologie- (DH, gelb) und Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH, orange), welches für die GEF-Funktion notwendig ist. Die in Klammern angegebenen Aminosäuren entsprechen der Position im AKAP-Lbc. Ein Bereich zwischen der RII- und der DH-Domäne unterscheidet die Isoformen 1, 2 und 3. Isoform 4 hat die ersten 179 AS mit den anderen gemeinsam, besitzt aber weder die RII- noch die DHPH-Domäne. Auch Brx, proto- und onco-Lbc wurden als Produkte des Lbc-Gens beschrieben.

Auch das *breast cancer nuclear receptor-binding auxilliary protein* (Brx) mit 1429 Aminosäuren und das proto-Lbc bestehend aus 893 Aminosäuren gehen aus dem Lbc-Gen hervor. Brx und proto-Lbc sind im Vergleich mit der Isoform 1 (Ht31) N-terminal verkürzt und besitzen keine PKA-Binderegion. Brx fungiert als Cofaktor des Östrogenrezeptors (Rubino *et al.*, 1998; Sterpetti *et al.*, 1999).

Wie die meisten Mitglieder der Dbl-Familie von RhoGEF besitzt auch das AKAP-Lbc onkogenes Potential. Das onco-Lbc bezeichnet eine N- und C-terminal verkürzte Form des AKAP-Lbc (Toksoz *et al.*, 1994), welches eine konstitutive RhoGEF-Aktivität besitzt und Rho-abhängige Zelltransformation auslösen kann (Zheng *et al.*, 1995). Auf welche Weise die verkürzten Varianten Brx, proto-Lbc und onco-Lbc entstehen, ist noch ungeklärt.

Die Isoform 4 mit 179 Aminosäuren hingegen weist weder die PKA-RII-Bindedomäne noch die DHPH-Domäne auf, so dass ihre zelluläre Funktion bislang unklar ist.

1.4.1 Der AKAP-Lbc-Signalkomplex

Als Multienzymkomplex (Abb. 1.6) scheint das AKAP-Lbc viele Komponenten von Signalkaskaden und des Zytoskeletts miteinander zu verbinden und so eine gezielte Abfolge Zytoskelett-basierter Prozesse wie z.B. Zellmigration zu unterstützen. Über seine PKA-Bindedomäne, auch als RII-Bindedomäne bezeichnet, verankert AKAP-Lbc die PKA am Zytoskelett und sorgt für die Ausbildung eines PKA-Aktivitätsgradienten, um Hauptregulatoren des Zytoskeletts gezielt zu beeinflussen, eine Voraussetzung für die Zellmigration (Paulucci-Holthauzen *et al.*, 2008).

Die ersten Hinweise auf die Verknüpfung von AKAP-Lbc mit GPCR und Rho-Signalwegen ergaben sich aus Thrombin- und $G_{\alpha 12}$ -induzierten Veränderungen am Zytoskelett (Majumdar *et al.*, 1999).

Durch seine intrinsische Guaninnukleotidaustausch (GEF)-Aktivität begünstigt AKAP-Lbc die Aktivierung von RhoA und die Ausbildung von Stressfasern. Dieses Ergebnis indizierte erstmals eine Interaktion zwischen dem beiden Proteinen *in vivo* (Diviani *et al.*, 2001). Aus primären, renalen Hauptzellen des Sammelrohrs der Ratte konnte das Ht31-Homologe Rt31 mit der kleinen GTPase RhoA ko-präzipitiert werden (Klussmann *et al.*, 2001a). Durch Assoziation mit der G-Protein $G_{\alpha 12}$ -Untereinheit und dem Effektorprotein RhoA vermittelt AKAP-Lbc die Signalweiterleitung von GPCR (Dutt *et al.*, 2004) und verknüpft vorzugsweise im Herzen über seine GEF-Aktivität die $G_{\alpha 12}$ -Untereinheit mit der Rho-Aktivierung (Appert-Collin *et al.*, 2007).

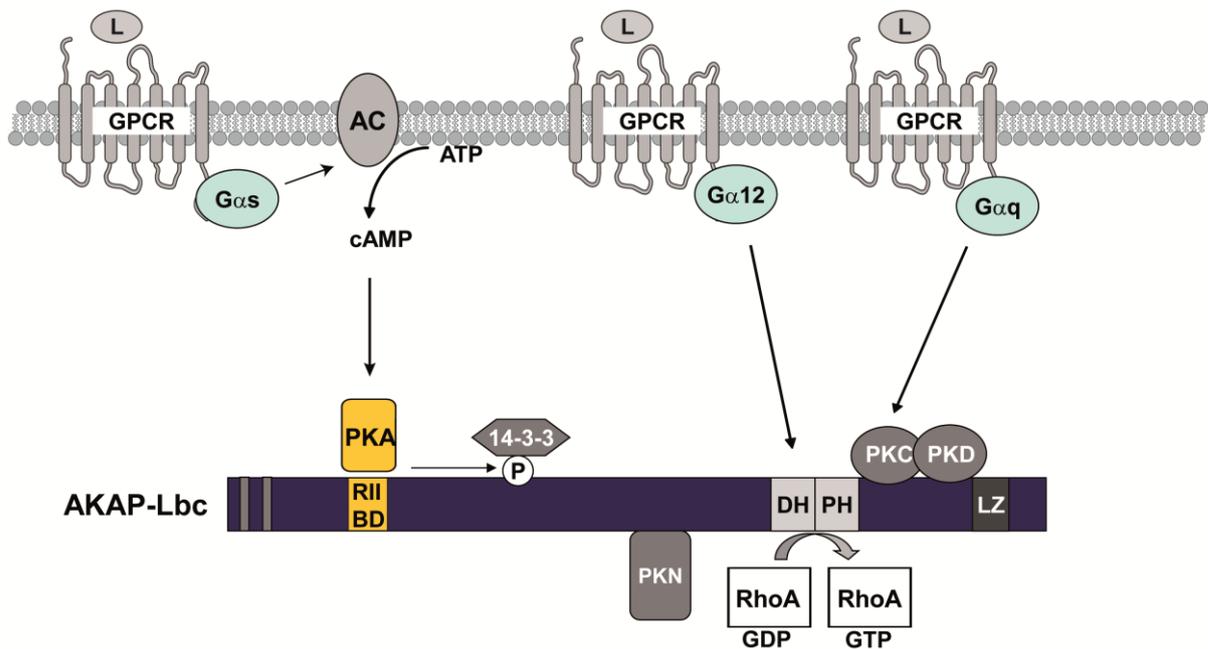


Abb. 1.6 Signalintegration durch AKAP-Lbc: AKAP-Lbc koordiniert Signale, ausgehend von GPCR, über die α -Untereinheiten von verschiedenen G-Proteinen ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha q}$). Über die PKA-RII-Bindedomäne (RIIBD) bindet AKAP-Lbc die PKA, welche infolge der GPCR/ $G_{\alpha s}$ -Stimulation das AKAP-Lbc phosphoryliert. Über den phosphorylierten Serinrest 1565 (P) wird ein Protein der 14-3-3-Familie rekrutiert. Die Aktivierung $G_{\alpha 12}$ -gekoppelter GPCR fördert die Guaninnukleotidaustausch-Aktivität über die DHPH-Domäne des AKAP-Lbc für die kleine GTPase RhoA, die durch eine Leuzin-Zipper-(LZ)-vermittelte Homooligomerisierung des AKAP-Lbc gehemmt werden kann. Neben der PKA verankert AKAP-Lbc die Kinasen PKC, PKD und PKN.

1.4.1.1 Regulation der GEF-Aktivität von AKAP-Lbc

Die basale GEF-Aktivität des AKAP-Lbc kann durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen moduliert werden. Durch Bindung von $G_{\alpha 12}$ -Untereinheiten wird die RhoGEF-Aktivität des AKAP-Lbc stimuliert und die Menge an aktiviertem RhoA verdoppelt. Die Deletion eines Bereiches N-terminal der DH-Domäne erhöhte die Austauschaktivität in Abwesenheit externer Stimuli sogar auf das Fünffache (Diviani *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung des Serinrestes 1565 im AKAP-Lbc durch die PKA führt zur Rekrutierung eines Proteins der 14-3-3-Familie und hat eine Inaktivierung der GEF-Funktion zur Folge (Diviani *et al.*, 2004). Für die Regulation durch PKA und 14-3-3 scheint eine Oligomerisierung des AKAP-Lbc notwendig zu sein. Über zwei nebeneinander liegende Leuzin-Zipper (LZ) im C-Terminus dimerisiert AKAP-Lbc in Zellen, wodurch die für die GEF-Aktivität relevanten Domänen blockiert und die Aktivität unterdrückt werden. Die Deletion dieses C-terminalen Bereichs erhöhte die Austauschaktivität in Abwesenheit externer Stimuli auf das Fünffache (Baisamy *et al.*, 2005). Eine

weitere Möglichkeit der Kontrolle der GEF-Aktivität bietet das Ubiquitin-ähnliche Protein LC3. Eine Überexpression von LC3 in NIH3T3-Zellen reduzierte die Assoziation von AKAP-Lbc mit RhoA um etwa 40% ohne Stimulation und 60% bei Stimulation mit Serum. Die RhoA-Aktivierung wurde unterdrückt und die Ausbildung von Stressfasern verhindert. Eine LC3-insensitive AKAP-Lbc-Variante wies eine höhere, basale GEF-Aktivität für RhoA auf als Wildtyp-AKAP-Lbc in Abwesenheit externer Stimuli (Baisamy *et al.*, 2009). AKAP-Lbc besitzt noch weitere Phosphorylierungsstellen, von denen bislang nicht bekannt ist, ob sie regulatorische Funktionen besitzen.

1.4.2 Weitere von AKAP-Lbc verankerte Signalmoleküle

Neben der PKA verankert AKAP-Lbc auch die Proteinkinasen PKC, PKD und PKN (Cariolato *et al.*, 2011; Carnegie *et al.*, 2004). Infolge $G_{\alpha q}$ -vermittelter Stimulation wird die PKC aktiviert, die wiederum die PKD phosphoryliert, worauf die aktivierte PKD aus dem AKAP-Lbc-Komplex dissoziiert und in den Kern transloziert. Dort phosphoryliert die PKD dann die Histondeacetylase 5 (HDAC5), welche aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert wird. Folglich begünstigt die Verminderung der Histondeacetylase-Aktivität im Kern die Expression von Genen der Embryonalentwicklung, die durch den Transkriptionsfaktor MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) kontrolliert werden (Carnegie *et al.*, 2008). Neue Erkenntnisse belegen eine Beteiligung von AKAP-Lbc an der $\alpha 1$ -adrenerg stimulierten Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38. AKAP-Lbc wechselwirkt mit dem RhoA-Effektor PKN, welcher die Aktivierung der p38 MAP-Kinase vermittelt. Über die Reste 1585 bis 1715 rekrutiert AKAP-Lbc die p38 MAPK sowie den in der Kaskade vorgeschalteten Kinasen, MLTK und MKK3 (Cariolato *et al.*, 2011).

1.5 Die physiologische Relevanz der AKAP-Lbc-RhoA-Wechselwirkung

1.5.1 Einfluss auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie

1.5.1.1 Physiologie und Pathophysiologie der Herzmuskelzellen

Eine Verbindung von Erregung und Kontraktion (*Excitation-contraction (EC) coupling*) beschreibt die Physiologie eines jeden Muskel, bei dem ein Aktionspotential zur Depolarisation der Zellmembran führt, die wiederum den Kalziumeinstrom in die Zelle beeinflusst. Eine steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert die kontraktile Proteine in der Muskelzelle.

In Herzmuskelzellen erfolgt die Kontraktion nach dem Prinzip der Ca^{2+} -abhängigen Kalziumausschüttung. Erreicht ein Aktionspotential die Membran einer Herzmuskelzelle, wird ein Influx von Ca^{2+} -Ionen über L-Typ Kalziumkanäle initiiert. Die Aktivität der L-Typ-Kalziumkanäle kann darüber hinaus durch die PKA infolge β -adrenerger Stimulation (Bers, 2002) bzw. durch das Rho/ROCK-System reguliert werden (Fernandez-Tenorio *et al.*, 2011; Yatani *et al.*, 2004).

Der Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} -Ionen führt zur Öffnung der Ryanodinrezeptoren (RyR) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulum (SR). RyR setzt weitere Ca^{2+} -Ionen aus dem intrazellulären Speicher in das Zytoplasma frei, so dass etwa drei Viertel des gesamten zellulären Ca^{2+} während der Kontraktion im Zytoplasma vorliegen. Dort werden die Ca^{2+} -Ionen von Troponin C gebunden, wodurch ein kardialer Troponinkomplex von seiner Aktin-Bindestelle abrückt. Der Myosinkopf bindet nun an das Aktinfilament. Infolge der ATP-Hydrolyse zieht der Myosinkopf das Aktinfilament zum

Zentrum des Sarkomers. Die Zelle kontrahiert. Für die Relaxation wird das intrazelluläre Ca^{2+} durch SERCA (sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase) zurück in das SR gepumpt bzw. über einen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher oder eine Ca^{2+} -ATPase in der Plasmamembran aus der Zelle ausgestoßen. Die Konzentration an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen sinkt und Troponin bindet wieder das aktive Zentrum des Aktinfilaments.

Die Hormone Adrenalin und Noradrenalin induzieren Signalwege über adrenerge GPCR (AR), welche die Kontraktionsfrequenz (Chronotropie) bzw. –Stärke (Inotropie) von Muskelzellen beeinflussen. Drei Familien, α_1 -, α_2 - und β -AR, werden anhand ihrer pharmakologischen und molekularbiologischen Eigenschaften unterschieden. Die gewebsspezifische Verteilung der Rezeptoren und die bevorzugte Aktivierung ausgewählter G-Proteine bestimmen die Effekte der Hormone. Während die α_2 -AR vorwiegend in neuronalen Geweben vorkommen und die Neurotransmitter-Ausschüttung beeinflussen, sind die β -AR wesentlich an der Regulation der Herzmuskelkontraktion und der Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt. Die α_1 -Adrenorezeptoren kommen hauptsächlich in Blutgefäßen vor, aber auch in geringerem Maße auf der Oberfläche von Kardiomyozyten. Der Einfluss der α_1 -AR auf die Kontraktilität des Herzens variiert abhängig von dem Entwicklungsstadium der Zellen. In neonatalen Kardiomyozyten erhöht die Aktivierung der α_1 -AR die Kontraktionsfrequenz (positiv chronotrop), in adulten ist die Wirkung eher negativ chronotrop und negativ inotrop (Barki-Harrington *et al.*, 2004).

Eine embryonale Expression von AKAP-Lbc ist bedeutend für die Differenzierung der Herzmuskelzellen und für die Morphogenese des Herzens. Homozygote AKAP-Lbc KO-Mäuse entwickelten sich bis zum 8. Embryonaltag normal. Ab Tag 10 wurden Entwicklungsverzögerungen und eine stagnierende Herzentwicklung beobachtet. AKAP-Lbc vermittelte die Expression des Transkriptionsfaktors MEF2C (*myocytes enhancer factor 2C*), welcher für die frühe Differenzierung von Herzmuskelzellen verantwortlich ist. AKAP-Lbc KO-Hezen wiesen dünne Herzwände auf, wodurch die Embryonen während der Tage 10 und 11 sterben. Die Sarkomere der AKAP-Lbc KO-Hezen besaßen unvollständige Myofilamente, die blind endeten und damit keine Z-Scheiben bildeten (Mayers *et al.*, 2010).

Übermäßige Stimulation adrenerger Rezeptoren kann zu einer Verdickung der Muskulatur der linken Herzkammer führen, die als linksventrikuläre Hypertrophie bezeichnet wird (Barki-Harrington *et al.*, 2004). AKAP-Lbc ist an der Entwicklung von Herzhypertrophie beteiligt. In Mäusen äußerte sich eine chronische Infusion mit dem α_1 -AR-Agonisten in einem erhöhten Herzgewichtsindex (Ventrikelgewicht/Körpergewicht) und einer gesteigerten Expression der AKAP-Lbc messenger RNA (mRNA) in ventrikulären Kardiomyozyten (Appert-Collin *et al.*, 2007). Die Rho-Effektoren ROCK, PKN und SAPK koordinieren die hypertrophen Effekte vom AKAP-Lbc, unter anderem durch Regulation der Transkription von prohypertrophen Genen wie ANF (Charron *et al.*, 2001; Morissette *et al.*, 2000; Thorburn *et al.*, 1997; Yanazume *et al.*, 2002). Die von AKAP-Lbc-gebundene PKD ist ebenfalls an der Weiterleitung hypertropher Antworten nach α_1 -adrenerger Stimulation beteiligt, in dem es über Phosphorylierung die Verminderung der Histondeacetylase-Aktivität im Kern bewirkt. Dadurch wird die Expression von Genen der Embryonalentwicklung, die durch den Transkriptionsfaktor MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) kontrolliert werden, angeschaltet (Carnegie *et al.*, 2008; Carnegie *et al.*, 2004).

Die AKAP-Lbc/RhoA- als auch die AKAP-Lbc/PKD-Wechselwirkungen könnten als potenzielle Zielstrukturen für die Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertrophie und Herzinsuffizienz dienen.

1.5.2 Krebserkrankungen

Rho GTPasen regulieren neben der Zellmorphologie und dem Aktinzytoskelett auch die Zellproliferation (Bishop *et al.*, 2000; Van Aelst *et al.*, 1997). Eine Hyperaktivität von Rho GTPasen ist häufig mit der Entstehung von Tumoren assoziiert, die sich als Krebs manifestieren. RhoA ist u.a. in Kolonkarzinomen, Brust-, Hoden- und Lungentumoren überexprimiert (Sahai *et al.*, 2002).

Ein onkogenes Potenzial wurde auch für das AKAP-Lbc gezeigt. Ähnlich wie bei anderen Dbl-RhoGEFs führen eine N- und C-terminale Verkürzung des Proteins zu einer konstitutiven RhoGEF-Aktivität (Zheng, 2001; Zheng *et al.*, 1995). Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) von AKAP-Lbc, K526Q, ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs assoziiert (Wirtenberger *et al.*, 2005). SNP sind genetische Veränderungen, die sich bei mindestens 1% der Population im Genpool durchgesetzt haben. Aufgrund der Beziehungen des AKAP-Lbc zum PKA- und RhoA-System liegt die Vermutung nahe, dass die identifizierte Variation des AKAP auch mit anderen Krebsformen in Verbindung stehen könnte. Kürzlich wurde eine Assoziation von AKAP-Lbc mit der Metastasierung von Schilddrüsenkrebs beschrieben (Feher *et al.*, 2011). Ob die GEF-Funktion dabei eine Rolle spielt, bleibt noch zu klären.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung kleiner Moleküle, welche die AKAP-Lbc-vermittelte Aktivierung von RhoA spezifisch hemmen. Weil solche Inhibitoren neue Therapien für α -adrenerg induzierte Hypertrophie ermöglichen könnten, sollte untersucht werden, ob die kleinen Moleküle einen Einfluss auf die adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten haben. Potente und spezifische Inhibitoren könnten zukünftig als Werkzeuge zur weiteren Charakterisierung der Interaktionen zwischen AKAP-Lbc und RhoA dienen. Unter anderem könnte damit der Mechanismus der Spezifität des AKAP-Lbc als RhoGEF untersucht werden (Diviani *et al.*, 2001). Ferner könnte die physiologische und pathophysiologische Wirkung der AKAP-Lbc-vermittelten RhoA-Aktivierung im Organismus analysiert werden, z.B. ob die GEF-Funktion die Assoziation von AKAP-Lbc und Tumorprogression bedingt.

Dazu sollte zunächst eine Methode entwickelt werden, mit der ein *Screening* von mehr als 18.000 niedermolekularen Substanzen nach potenziellen Inhibitoren der AKAP-Lbc-vermittelten Aktivierung von RhoA durchgeführt werden sollte. Die Basis des Versuchsaufbaus war die Guaninnukleotidaustausch-Aktivität des AKAP-Lbc für RhoA, die mithilfe von rekombinanten Proteinen und fluoreszenz-markierten Nukleotiden analysiert werden sollte. Die identifizierten niedermolekularen Stoffe sollten hinsichtlich ihrer Hemmung gegenüber der AKAP-Lbc-vermittelten RhoA-Aktivierung untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Reagenzien wurden, wenn nicht explizit erwähnt, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) oder Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligase und entsprechende Reaktionspuffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt a.M., D) erhalten. Die thermostabile OptiQa DNA Polymerase inklusive Reaktionspuffer und dNTPs für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde bei Roboklon (Berlin, D) erworben.

Wässrige Lösungen wurden mit Wasser aus dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem® (Millipore GmbH) bereitet, welches frei von organischen und ionischen Bestandteilen war und eine Leitfähigkeit von höchstens 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei Raumtemperatur besaß.

Beschreibung	Hersteller/Vertreiber
(R)-(-)-Phenylephrin hydrochlorid(PE)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
0,45 μm Membranspritzenfilter Minisart RC	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, F
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
<i>cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Coomassie-Brillantblau G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Corning 384-Lochplatte #3676 <i>low volume</i>	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Corning 384-Lochplatte #3657 <i>polypropylene</i>	
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay kit</i>	Promega, Mannheim, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D Biochrom AG, Berlin, D
Humanes hDbs-His-Protein DHPH Domäne (His ₆ -Dbs DHPH)	Cytoskeleton Inc. Über tebu-bio Germany, Offenbach, D
<i>HyperLadder™ I</i> (200 – 10037)	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
<i>HyperLadder™ II</i> (50 – 2000)	
<i>Immobilon-P</i> Transfermembran	Millipore GmbH, Schwalbach, D
<i>Immobilon Western</i> Chemiluminescence substrate	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Isopropyl-1-Thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
Kaninchen-anti-GFP-Serum	AG Schülein, FMP, Berlin, D
Amicon Ultra-4 Konzentratoren (MWCo 3k, 10k)	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Amicon Ultra-15 Konzentratoren (MWCo 3k, 10k)	
<i>Lipofectamine2000™ Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>LumiLight Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Maus-anti-GFP-IgG1 (monoclonal)	Clontech Laboratories Inc., Saint-Germain-en-Laye, F
Maus-anti-RhoA-IgG1 (monoclonal, sc-418)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA.
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
<i>NucleoBond Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D

<i>NucleoSpin Extract II Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Oleoyl-L- α -lysophosphatidylsäure Natriumsalz (LPA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
OptiPlate96 (Lumineszenzplatte, 96-Loch-Format)	PerkinElmer, Rodgau, D
Peroxidase-konjugiertes Esel-anti-Maus-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Dianova GmbH, Hamburg, D
pH-Fix 0-14 Teststäbchen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<i>QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
<i>RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution</i>	Intron Biotechnology, Seongnam, Korea
Rotiphorese®-Gel 30 (37,5:1), Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Shandon* Immu-Mount*	Thermo Scientific/Fisher Healthcare,
TRIZOL® Reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Vivaspin® 500 Centrifugal Concentrator	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, F

2.1.2 Geräte

Beschreibung	Gerät	Hersteller/Vertreiber
CD-Spektrometer	JASCO Corp., J-715, Rev. 1.00	JASCO Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Gross-Umstadt, D
Agarose Gelelektrophorese-Kammer	PerfectBlue Mini L	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Einfriergefäß	Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene über Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Geldokumentationssystem	Molecular Imager Gel Doc XR System Lumilimager F1™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
HPLC	Shimadzu UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatographie)	Shimadzu, Duisburg, D
Labormikroskop	Zeiss Axiovert 25,	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) und additive Komponenten	ConfoCor3, LSM 510 META,	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Mikroinjektionsspritze	700 series syringe	Hamilton Co., Bonaduz, CH
Mikrowelle	Micromat-Duo	AEG, Nürnberg, D
Multiwellplatten-Messgerät für Fluoreszenz, Absorption, und Lumineszenz	Safire Safire II EnSpire®,	Tecan, Durham, USA PerkinElmer, Rodgau, D

pH-Meter	Model MP220	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, D
Pipetten	research® 0,5 – 10 µl research® 2 – 20 µl research® 20 – 200 µl research® 100 – 1000 µl research® 500 – 5000 µl research pro 5-100 µl research pro 0,5-10 µl	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
Polyacryamidgelelektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Proteinaufreinigungssystem	Profinia	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus,	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Rotoren	3042 Festwinkelrotor 3757 Festwinkelrotor SLA3000 Festwinkelrotor SS34 Festwinkelrotor	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D DuPont Corp., Delaware, USA DuPont Corp., Delaware, USA
Schüttler	Thermomixer compact Duomax 1030	Eppendorf GmbH, Hamburg, D Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
UV-Vis Spectrophotometer	Ultraspec2000 NanoDrop	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, A ThermoScientific
Waage	SBC 52	Scaltec, Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
Wärmeschrank	Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Wasserbad	GFL 1072	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Western Blotkammern	Trans Blot SD Semi-Dry Western	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Zellhomogenisator/-aufschlussgerät	EmulsiFlex C3 Homogenisator	Avestin Europe GmbH, Mannheim, D
Zellzählgerät	Scepter™ <i>handheld</i> <i>automated cell counter</i>	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Zentrifugen	Biofuge 15 Biofuge 28RS MiniSpin Plus Sorval RC5C Plus Universal 320 R Ultrazentrifuge Beckman Optima XL100K	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D Heraeus Sepatech GmbH, Osterode am Harz, D Eppendorf GmbH, Hamburg, D DuPont Corp., Delaware, USA Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchleugern, D Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D

2.1.3 Software

Software name	Beschreibung	Hersteller
Adobe Creative Suite CS4	Bildbearbeitung, Illustration	Adobe Systems Inc (San Jose, USA)
NCBI BLAST	Sequenzanalysen	National Library of Medicine (NLM), http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ClustalW	Sequenzanalysen, -vergleiche	www.ebi.ac.uk/clustalw/
ExPASy Proteomics Server	Proteinanalysen	http://expasy.org/tools/
GraphPad Prism Version 5.0c für Mac OS X	Datenanalyse	GraphPad Software (San Diego, USA)
ImageJ 1.46d	Bildbearbeitung	Wayne Rasband http://imagej.nih.gov/ij
LSM-Software Release Version 3.2	konfokale Mikroskopie, Bildaufnahme und -analyse	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena, D)
Magellan Version	Datenaquise und -analyse	Tecan, Durham, USA
Marvin Beans 5.1.01	Visualisierung chemischer Strukturen	ChemAxon, Budapest, H
Microsoft Office 2010	Datenverarbeitung, -präsentation	Microsoft (Redmond, USA)
SerialCloner 2.1	Sequenzanalyse	SerialBasics, http://serialbasics.free.fr

2.1.4 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL1blue	<i>endA1 gyrA96(nal^r) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r^k m^k⁺)</i>	Stratagene über Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	F ⁻ ompT hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, D

Eukaryotische Zelllinien	Merkmale	Herkunft
3T3	Maus Fibroblasten	DSMZ GmbH, Braunschweig, D
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells</i> ; mit Adenovirus Typ 5 transformiert (DSMZ-Nr. ACC 305)	DSMZ GmbH, Braunschweig, D

2.1.5 Desoxyribonukleinsäuren

2.1.5.1 Vektoren

Für die Klonierung wurde der Expressionsvektor pPal7 (Biorad Laboratories) verwendet. Weiterhin kam der Vektor pEGFP-N1 (Takara Bio Europe/Clontech Inc., Saint-Germain-en-Laye, F) als Kontrollvektor in Rhotekin-Präzipitationsexperimenten zur Anwendung.

Nr.	Plasmid-name	Insertion	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
1	pET30a	Humanes RhoA wildtyp	Kan	Dario Diviani
2	pET30a	Humanes AKAP-Lbc (AS 1923-2336)	Kan	Dario Diviani
3	pGEX-4T1	Humanes RhoA wildtyp	Amp	Dario Diviani
4	pGEX-4T1	Humanes AKAP-Lbc (AS 1923-2336)	Amp	Dario Diviani
5	pPal7	Humanes RhoA wildtyp	Amp	Für diese Arbeit kloniert
6	pPal7	Humanes AKAP-Lbc (AS 1923-2336)	Amp	Für diese Arbeit kloniert
7	pEGFP-N1	Humanes AKAP-Lbc (inkl. N-term. Flag-tag)	Kan	John Scott
8	pCMV2B	p63RhoGEF	Kan	Thomas Wieland
9	pCMV3B	Duet kurz	Kan	Thomas Wieland
10	pCMV3B	Trio kurz	Kan	Thomas Wieland
11	pEF-Bos	Duet	Amp	Thomas Wieland
12	pEGFP	Trio	Kan	Thomas Wieland
13	pCMV3	ARHGEF10	Kan	Thomas Wieland
14	pCMV3	ARHGEF17	Kan	Thomas Wieland
15	pcDNA3.1	Larg	Amp	Thomas Wieland
16	pcDNA3.1	PDZ-RhoGEF	Amp	Thomas Wieland
17	pBluescript	LscRhoGEF	Amp	Thomas Wieland
18	pCMV5	Ost1	Kan	Thomas Wieland
19	pBluescript	ARHGEF15	Amp	Thomas Wieland
20	pCMV-	ARHGEF2	Kan	Thomas Wieland
21	pSRE_L	<i>Renilla</i> -Luziferase	Amp	Thomas Wieland
22	pRL_TK	<i>Firefly</i> -Luziferase	Amp	Thomas Wieland
23	pcDNA	G _{αq} RC (konstitutiv aktiv)	Amp	Thomas Wieland
24	pcDNA	G _{α12} QL (konstitutiv aktiv)	Amp	Thomas Wieland

2.1.5.2 Oligonukleotide

Angegeben sind die Oligonukleotide für die Mutagenese des wildtypischen RhoA in die konstitutiv aktive G14V- bzw. die dominant negative T19N- Variante.

Plasmidname	Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')
RhoA_pPal7	G14V <i>forward</i> (Fw)	GGTGATTGTTGGTGATGTGGCCTGTGGAAAG
	G14V <i>reverse</i> (Rev)	CTTCCACAGGCCACATCACCAACAATCACC
RhoA_pPal7	T19N <i>forward</i> (Fw)	GCCTGTGGAAAGAACTGCTTGCTCATAG
	T19N <i>reverse</i> (Rev)	CTATGAGCAAGCAGTTCTTCCACAGGC

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierung und Mutagenese

Die Ausgangsplasmide mit den Expressionskonstrukten für wildtypisches RhoA und für ein Fragment des AKAP-Lbc, welches die DHPH-Domäne des Proteins (AS 1923-2336) umfasst, sind von D. Diviani (Universität Lausanne) zur Verfügung gestellt worden. Über die Restriktionsschnittstellen *BamH I* und *Not I* wurden die kodierenden Bereiche von RhoA und AKAP-Lbc DHPH aus pET30a-Vektoren in die pPal7-Expressionsvektoren (Bio-Rad Laboratories) kloniert. Dazu wurden sowohl die Donorplasmide (Nr. 1 und 2 aus Tabelle siehe 2.1.5.1) als auch die Akzeptorplasmide pPal7 mit den Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.1.2), elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.6), extrahiert und ligiert (2.2.1.7).

Gerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese lassen sich gezielt einzelne Basen in der DNA austauschen, deletieren oder einführen. Nach Anleitung des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) wurden die T19N- und G14V- Mutationen von RhoA mittels den Fw- bzw. Rev-Oligonukleotide, welche die gewünschten Mutationen tragen (siehe 2.1.5.2), und der Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem RhoA-pPal-Konstrukt generiert (Nr. 5, Tabelle siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die folgenden Tabellen zeigen einen Standardreaktionsansatz:

Reaktionsansatz:	2,5 µl	10x Reaktionspuffer
	20 ng	RhoA-pPal (Plasmid-DNA)
	0,2 µM	Fw-Oligonukleotid (A) oder Rev-Oligonukleotid (B)
	0,5 mM	dNTP-Mix
	20 µl	H ₂ O
	2 U	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Die PCR für die Reaktionsansätze A (Fw-Oligonukleotid) und B (Rev-Oligonukleotid) wurde wie folgt durchgeführt.

Zyklen	Schritt	Dauer
1	95 °C	30 s
3	95 °C	30 s
	55 °C	1 min
	72 °C	16 min
3	95 °C	30 s
	45 °C	1 min
	72 °C	16 min
1	72 °C	7 min
	4 °C	∞

Anschließend wurden die Ansätze A und B vereint und die PCR nach Zugabe von 2 U *PfuTurbo* DNA Polymerase wie folgt fortgesetzt.

Zyklen	Schritt	Dauer
1	95 °C	30 s
18	95 °C	30 s
	50 °C	1 min
	72 °C	16 min
1	72 °C	7 min
	4 °C	∞

Wildtypische, methylierte wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 10 U der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Schließlich wurde die DNA mittels *NucleoSpin Extract II Kit* gereinigt und in *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert (siehe 2.2.1.2).

Alle hergestellten Vektoren wurden mittels Sequenzierung (siehe 2.2.1.8) auf Richtigkeit überprüft.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Chemisch kompetente *E. coli* Zellen XL1blue wurden zur Klonierung, Mutagenese und zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet, der *E. coli*-Stamm Rosetta DE3 zur Proteinexpression. Im Allgemeinen wurden die entsprechenden Zellen durch Hitzeschock mit 1 µl DNA (~1 µg) transformiert.

Luria Bertani (LB)-Medium Typ Lennox	LB-Agarplatten
10 g/l Pepton	15 g Agar
5 g/l Hefeextrakt	pro Liter LB-Medium
5 g/l NaCl	
pH 7,5	

Dem Kulturmedium bzw. den Agarplatten wurden zu Selektionszwecken die Antibiotika Ampicillin (Amp, 100 µg/ml) bzw. Kanamycin (Kann, 30 µg/ml) zugesetzt. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C

über Nacht wurden einzelne Kolonien zur DNA-Vermehrung (siehe 2.2.1.3.3) oder Proteinexpression (siehe 2.2.2.1) in Flüssigkulturmedium überführt.

2.2.1.3 DNA-Minipräparation bzw. DNA-Midipräparation

Zur Analyse der Transformation wurden mehrere Kolonien von der Agarplatte in je 4 ml Flüssigmedium plus Antibiotikum überführt und unter Schütteln (170 min^{-1} , Binder Brutschrank) ca. 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Hälfte dieser Übernachtskulturen (ÜNK) wurde in entsprechende Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation (13.000 rpm , 1 min) sedimentiert. Für die Präparation im größeren Maßstab wurde die oben beschriebene ÜNK zur Inokulation einer 100 ml Kultur benutzt. Nach einer Wachstumsperiode von ca. 16 h bei 37°C konnten die Zellen sedimentiert werden. Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden kommerziell erhältliche Reaktionssätze verwendet (*NucleoSpin Plasmid QuickPure* und *NucleoBond PC100*, beide von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Die eigentliche Analyse der Vektoren erfolgte über Restriktion (siehe 2.2.1.25) und Sequenzierung (siehe 2.2.1.8).

2.2.1.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration (DNA)

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem NanoDrop UV-Vis Spektrophotometer. Hierzu wurde die optische Dichte bei 260 nm ($\text{OD}_{260\text{nm}}$) der DNA ermittelt. Eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht dabei $50 \mu\text{g/ml}$ DNA. Der Quotient zwischen $\text{OD}_{260\text{nm}}$ und $\text{OD}_{280\text{nm}}$ diente der Analyse der Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.1.5 Restriktionsanalyse

Ein Restriktionsverdau mit den bereits zur Klonierung verwendeten Enzymen *BamHI* und *NotI* diente der Kontrolle. Der Standardrestriktionsansatz wurde wie folgt angesetzt.

Restriktionsansatz:	2 μl	10x <i>BamHI</i> Reaktionspuffer
	3 μl	Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation, siehe 2.2.1.3)
	2 μl	BSA (10 mg/ml)
	1 μl	<i>BamHI</i> (20 U/ μl)
	1 μl	<i>NotI</i> (50 U/ μl)
	11 μl	H_2O

Nach einstündiger Restriktion bei 37°C wurde der Ansatz mit 3 μl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.6) analysiert.

2.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels eines Agarosegels (1 % w/v Agarose in TAE-Puffer) in Elektrophoresekammern (PerfectBlue Gelsystem Mini L, PeqLab Biotechnologie GmbH) mit TAE-Puffer (40 mM Tris; 1 mM EDTA; 1,14% (v/v) Eisessig) bei ca. 100 V für 30 min Um die DNA

anzufärben, wurde außerdem 0,1 mg Ethidiumbromid oder 4 µl *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea) pro 100 ml Gel zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde) versetzt und aufgetragen. Zur späteren Analyse der Banden auf dem UV-Tisch diente ein DNA-Größenstandard (*Hyperladder I und II*).

2.2.1.7 Extraktion von DNA aus Agarose und Ligation

Die erforderlichen DNA wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mithilfe des *NucleoExtract II Kit* aus der Agarose isoliert. Die gereinigte DNA wurde zur Ligation verwendet. Die Ligation erfolgte in einer Stunde bei RT oder optional über Nacht bei 4 °C. Für alle Ligationsreaktionen wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet.

Ligationsansatz:	2 µl	10x Ligationspuffer
	0,5 µl	Vektor-DNA
	4 µl	<i>Insert</i> -DNA
	1 µl	T4 DNA Ligase

2.2.1.8 Sequenzierung

Die exakte Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung erreicht. Der Sequenzierservice *value read tube* von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) wurde dafür genutzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels Programmen zur Sequenzanalyse mit den theoretischen verglichen.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Expression rekombinanter Proteine in Bakterienzellen

Für die Proteinexpression wurde ein Aliquot *E. coli* Rosetta DE3 (ca. 40 µL) mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA (AKAP-Lbc DHPH, wt RhoA, G14V RhoA, T19N RhoA) transformiert (siehe 2.2.1.2). Vektoren für GST-, His₆- und *Profinity eXact*-Fusionproteine von RhoA bzw. AKAP-Lbc DHPH (siehe 2.1.5.3, Nr. 1 bis 6) wurden zur bakteriellen Expression verwendet. Der Vektor pGEX4T1 enthält zusätzlich einen kodierenden Bereich für die Glutathion-S-Transferase (GST), der während der Transkription N-terminal des zu untersuchenden Proteins angehängt wird. Der Vektor pET30a wurde für die Herstellung eines mit sechs zusätzlichen Histidin-Resten (His₆) fusionierten Proteins verwendet. Der pPal7-Vektor trägt die sogenannte *Profinity eXact*-Sequenz, die während der Aufreinigung des Proteins entfernt wird. Damit wird die Isolierung eines markierungsfreien Proteins ermöglicht. Alle Vektoren besitzen den T7 Laktose (*lac*)-Promotor zur Expression der jeweiligen Fusionsproteine (GST, His₆ und *Profinity eXact*), die durch den konstitutiv exprimierten *lacI*-Repressor unterdrückt wird, da dieser an die Operatoren bindet. Die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches den *lacI*-Repressor bindet, wird eine Transkription induziert.

In einer Testexpression wurden 4 ml Kulturmedium inkl. Antibiotikum mit einer Kolonie von der Agarplatte inokuliert. Die Zellen wuchsen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,4-

0,6 und wurden daraufhin mit 1 mM IPTG Endkonzentration (Stammlösung 1 M IPTG) induziert. Die Proteinproduktion erfolgte nun bei 37 °C über mehrere Stunden. Für die Analyse der Induktion wurde jeweils 1 ml Zellsuspension vor und zu jeder Stunde nach der Induktion entnommen, bei 5000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proteine der Zellsuspension wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Brillantblau-Färbung analysiert.

Als Vorbereitung der eigentlichen Expression wurden 100 ml Kulturmedium inkl. Antibiotikum mit einer Kolonie von der Agarplatte des entsprechenden Klons als Übernachtskultur (ÜNK) inokuliert. Pro Ansatz wurde in einem 2 l Schikanekolben ein Liter Expressionskultur mit 75 ml der Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 - 0,9 bei 37 °C und 180-200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde 1 mM IPTG zugesetzt. Die Expression der Proteine wurde nach 16-18 Stunden bei 16 °C beendet, indem die Bakterienzellen durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4 °C; Sorval RC5C Plus) sedimentiert und das getrocknete Sediment zur Vorbereitung des Zellaufschlusses bei -80 °C über Nacht eingefroren wurde.

2.2.2.2 Proteinisolierung und –reinigung aus Bakterienlysaten

Das bei -80 °C eingefrorenen Bakteriensediment wurde auf Eis aufgetaut und mit dem Bindepuffer B1 resuspendiert (50 ml pro Sediment einer 1 l-Expressionskultur). Mit dem Zellhomogenisator EmulsiFlex-C3 (Avestin) wurde die Zellsuspension unter einem Druck von 700-1000 bar aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer vom Lysat abzutrennen, wurde das Zellhomogenat zentrifugiert (40.000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde zur Vorbereitung für die Affinitätschromatographie im Proteinaufreinigungssystem (Profinia, BioRad) mittels einer 50 ml-Spritze und eines 0,45 µM-Membranspritzenfilters (Minisart RC, Sartorius) filtriert. Alle verwendeten Säulen für das Niederdruck-Chromatographiesystem Profinia wurden, wenn nicht benutzt, in 20% Ethanol im Kühlschrank gelagert. Vor dem Aufreinigungsprozess wurden die Säulen mit MilliQ-Wasser gespült und mit dem jeweiligen Bindepuffer B1 äquilibriert. Für die entsprechende Anwendung (GST, His₆, eXact) wurden Reinigungsprotokolle im Proteinaufreinigungssystem (Biorad) vorprogrammiert. Diese wurden für die Reinigung der GST-, His₆- und eXact-Fusionsproteine verwendet. Für die Zellsuspension von einem Liter Expressionskultur wurden zur Reinigung die 5 ml Affinitätssäulen und anschließend eine 50 ml Entsalzungssäule (Gelfiltrationssäule, Bio-Gel P-6, Biorad) benutzt.

Fusionsprotein	Affinitätssäule	Entsalzungssäule
	Bio-Scale™ Mini Cartridge (Biorad)	
GST-RhoA/GST-AKAP-Lbc DHPH	Profinity GST	Bio-Gel P-6
His ₆ -RhoA/ His ₆ -AKAP-Lbc DHPH	Profinity IMAC	Bio-Gel P-6
Profinity eXact RhoA/AKAP-Lbc	Profinity eXact Matrix	Bio-Gel P-6

GST-Fusionsproteine

Das natürliche Substrat der Glutathion-S-Transferase (GST) ist Glutathion (GSH). Die hohe Bindungsaffinität zwischen GST und GSH wurde zur Isolierung von GST-RhoA bzw. GST-AKAP-Lbc DHPH aus hergestelltem Bakterienlysat ausgenutzt. Eine GSH-gekoppelte Sepharose diente als Matrix für die Affinitätschromatographie. Die nachfolgende Tabelle fasst die verwendeten Puffer zusammen.

Puffer	Funktion	Zusammensetzung
B1	Lyse	150 mM NaCl
	Bindung	10 mM Na ₂ HPO ₄
	Wasch	5mM EDTA pH 7,4
B3	Elution	100 mM Tris
		20 mM Glutathione
		5mM EDTA pH 8,0
B4	Entsalzung	137 mM NaCl
		2,7 mM KCl
		4,3 mM Na ₂ HPO ₄
		8,1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
B5	<i>Cleaning solution 1</i>	500 mM NaCl
		50 mM Tris pH 8,0
B6	<i>Cleaning solution 2</i>	500 mM NaCl
		100 mM NaOAc pH 4,5
B7	Lagerung	2% Benzylalkohol

His₆-Fusionsproteine

Für die Isolierung von His₆-markiertem RhoA bzw. AKAP-Lbc DHPH wurden Säulen mit Iminodiessigsäure als Matrix verwendet, welche über Komplexierung von Metallionen eine Bindung zu den negativ geladenen Histidinen eingehen kann. Man bezeichnet die Chromatographie als *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC).

Puffer	Funktion	Zusammensetzung
B1	Lyse Bindung Wasch	300 mM KCl 50 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM Imidazol pH 8,0
B2	Wasch	300 mM KCl 50 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Imidazol pH 8,0
B3	Elution	300 mM KCl 50 mM KH ₂ PO ₄ 250 mM Imidazol pH 8,0
B4	Entsalzung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
B5	<i>Cleaning solution 1</i>	500 mM NaCl 50 mM Tris pH 8,0
B6	<i>Cleaning solution 2</i>	500 mM NaCl 100 mM NaOAc pH 4,5
B7	Lagerung	2% Benzylalkohol

eXact-Proteine

Die Profinity eXact Fusionsproteine RhoA und AKAP-Lbc DPH wurden über die eXact-Säule gereinigt, welche immobilisiert eine Subtilisin-Protease enthält. Die Fusionsproteine weisen am N-Terminus eine FKAL-Erkennungssequenz für die Protease auf. Durch die Fluorid-Ionen in den Elutionspuffer wird die Protease aktiviert und schneidet das Fusionsprotein unmittelbar hinter der Erkennungssequenz. Das eluierte Protein besitzt keine Affinitätsmarkierung mehr.

pH	1M Na₂HPO₄ Volumen [ml]	1M NaH₂PO₄ Volumen [ml]
7.2	68,4	31,6
7.4	77,4	22,6

Puffer	Funktion	Zusammensetzung
B1	Lyse Bindung Wasch	100 mM Natriumphosphat pH 7,2
B3	Elution	100 mM Natriumphosphat 100 mM Natriumfluorid pH 7,2
B4	Entsalzung	20 mM Natriumphosphat 50 mM Natriumchlorid pH 7,4
B5	<i>Cleaning solution 1</i>	500 mM NaCl 50 mM Tris pH 8,0
B6	Regeneration	100 mM Phosphorsäure
B7	Lagerung	100 mM Natriumphosphat 0,02% Natriumazid pH 7,2

Der Fluss für die Beladung der Säule und die Elution wurde auf 1 ml/min gesetzt. Die Inkubationsdauer für die Proteasereaktion auf der eXact-Säule betrug 15 Stunden.

Von den einzelnen Fraktionen der Proteinisolierung (Homogenat) und –aufreinigung (Säulendurchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktion) wurde jeweils eine Probe (20 µl) für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford

Das Coomassie Plus Reagenz (Pierce) ermöglicht eine schnelle und colorimetrische Methode zur Quantifizierung der gesamten Proteinkonzentration. Der Coomassie-Brillantblau Farbstoff (*Brilliant blue G250*) bindet an die Protein-Moleküle im sauren pH-Bereich. Die durch die Bindung hervorgerufene Farbveränderung kann als Absorptionsänderung detektiert werden. Eine Konzentrationsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) wurde zur Kalibrierung genutzt, da für BSA die Absorption des Coomassie Reagenzes linear zur Konzentration ansteigt. Anlehnend an das Protokoll (Pierce) konnte die Proteinkonzentration der zu testenden Proben im Mikrotiterplatten-Maßstab ermittelt werden. Um den Fehler zu minimieren, wurden alle Ansätze dreifach bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.2.2.4 GST-Präzipitationsexperiment

Zur Untersuchung der Bindung zwischen RhoA und AKAP-Lbc wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt. Die GST-Präzipitation erfolgte über die an GSH-Sepharose immobilisierten GST-Fusionsproteine (GST-RhoA bzw. GST-AKAP-Lbc DHPH). Dazu wurden 100 µl an GSH-Sepharosegekoppeltes GST-RhoA bzw. GST-AKAP-Lbc DHPH mit 6 µM His₆-AKAP-Lbc DHPH bzw. 25 µM His₆-RhoA über Nacht bei 4°C in Bindungspuffer (PBS pH 7.4, 1mM MgCl₂, 10 µM GDP oder GTPγS) inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose viermal mit Bindungspuffer gewaschen, zweimal in Gegenwart von Detergenz (0,1 % Ipegal) zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen bzw. zweimal ohne. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer vollständig entfernt. Die an die Sepharose-gebundenen Proteine wurden in SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 Minuten gekocht und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der gebundenen His₆-Fusionsproteine erfolgte im Immunoblot mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-His-Antikörper.

2.2.2.5 Enzymatische Entfernung der GST- bzw. His₆-Markierung

Thrombin-vermittelte Proteolyse Abspaltung von GST

Für die Proteolyse wurden 100 µg GST-RhoA bzw. AKAP-Lbc DHPH mit 1 U Thrombin (plus 0,1 % BSA) für bis zu drei Stunden bei RT bzw. 24 h bei 4 °C behandelt. Nach einer halben Stunde, einer Stunde und drei Stunden bzw. nach 24 h wurde der Proteolyse-Erfolg mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung verfolgt.

Enterokinase-Proteolyse zur Abspaltung der His₆-Markierung

Für die Proteolyse wurden 400 µg His₆-AKAP-Lbc DHPH bzw. His₆-RhoA wurden mit 1 µl *Tagoff High Activity* Enterokinase (Novagen) für bis zu drei Stunden bei RT bzw. 24 h bei 4 °C behandelt. Alle 30 min (bzw. bei der 4 °C Probe nach 24 h) wurde ein Aliquot (30 µl) entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Enterokinase zu inaktivieren. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung bzw. im Immunoblot mit dem anti-His-POD Antikörper analysiert.

2.2.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts und unabhängig von ihrer Ladung. Die SDS-Polyacrylamidgele (Gelgröße 8 x 10 x 0,1 cm) wurden wie folgt hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 30 min wurde Isopropanol entfernt und das Sammelgel mit den Probenaschen auf das Trenngel gegossen. Die folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung der verschiedenen Trenn- und Sammelgele an:

	Trenngel		Sammelgel
	6 %	15 %	
H ₂ O	3,25 ml	---	3,5 ml
Polyacrylamid (Rotiphorese®-Gel 30, Roth, Karlsruhe)	2,25 ml	5,625 ml	835 µl
0,75 M Tris-HCl, pH 8,8	5,625 ml	5,625 ml	---
0,625 M Tris-HCl, pH 6,8	---	---	625 µl
20 % SDS	56,5 µl	56,5 µl	25 µl
TEMED	5,65 µl	5,65 µl	5 µl
10% APS	79 µl	79 µl	25 µl

Die

Proben wurden je nach Proteinkonzentration im Verhältnis 1:1 mit 2xSDS-Ladepuffer bzw. im Verhältnis 3:1 mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei ca. 90°C aufgeköcht und danach kurz zentrifugiert und aufgetragen.

4 xSDS-PAGE-Ladepuffer (in 10 ml)

SDS	0,8 g
Glycerin	4 ml
DTT	0,308 g
Bromphenolblau	0,04 g
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5 ml

Schließlich wurden die Proben sowie 4 µl eines Größenmarkers (*Precision Prestained Protein Ladder*, Biorad) auf das Gel aufgetragen. Mithilfe der Mini-PROTEAN® 3 Apparaturen (Bio-Rad Laboratories GmbH) mit SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0.1% SDS) wurde die Elektrophorese bei 25 mA/Gel für eine Stunde durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch die Coomassie-Brillantblau-Färbung bzw. im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern.

2.2.2.7 Coomassie Brillantblau-Färbung

Nach Ende der 60 min dauernden Elektrophorese wurde das Gel entweder für zehn Minuten in Coomassie-Brillantblau gefärbt und anschließend im Entfärber bis zur gewünschten Farbe inkubiert bzw. für einen Western Blot vorbereitet.

Coomassie-Brillantblau-Färbelösung	Entfärber
45% Methanol	10% Ethanol
10% Essigsäure	10% Essigsäure
0,125% Brillant Blue R	5% Methanol
MilliQ-H ₂ O	MilliQ-H ₂ O

2.2.2.8 Proteintransfer und Immunoblot

Für den Transfer wurden das SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Gel) mit den aufgetrennten Proteinen sowie auf die Gelgröße zugeschnittene Filterpapierstücke (je 3 pro Seite) in *SemiDry*-Transfer-Puffer (4,8 mM Tris; 3,9 mM Glyzin; 0,13 mM SDS; 20% Methanol) für mindestens fünf Minuten äquilibriert. Eine Polyvinylidenfluorid-Membran (*Immobilon™-P Transfer*, Millipore) wurde zunächst kurz in Methanol getränkt, danach mit MilliQ-Wasser gespült und schließlich ebenfalls in *SemiDry* Transfer-Puffer äquilibriert. Die Komponenten wurden in der folgenden Reihenfolge übereinander geschichtet:

Anode → Filterpapier (3x) / Membran / SDS-Gel / Filterpapier (3x) ← Kathode

Der Transfer erfolgte im *Trans Blot SD*-System (Bio-Rad) nach dem *SemiDry* Verfahren (Transferpuffer nur in den Komponenten) bei 12 V für 60 min.

Nach Ende des Transfers wurde der Blot, d.h. die Membran mit den transferierten Proteinen, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in TBS-T (6,1 g/l Tris-HCl, 8,8 g/l NaCl, 0,05 % v/v Tween20, pH 7,4) plus 3% v/v BSA für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem verdünnten Primärantikörper (in TBS-T mit 3 % v/v BSA, Antikörperverdünnungen siehe Tabelle) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen des Blots mit TBS-T erfolgte Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörper (in TBS-T mit 3 % w/v BSA, Antikörperverdünnungen siehe Tabelle) ebenfalls für eine Stunde bei RT. Danach wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde ein Substrat für die am sekundären AK gekoppelte Meerrettich-Peroxidase zugegeben (*LumiLight Western Blotting Substrate*, Roche). Die Luminollösung wurde laut Anweisung angesetzt und über den Blot gegeben. Die Verarbeitung des Chemilumineszenz-Signals erfolgte über Exponierung und anschließender Entwicklung im Lumi-Imager.

Primäre Antikörper (Verdünnung)	Sekundäre Antikörper (Verdünnung)
Anti-His-POD (1:1000)	/
Anti-RhoA (1:250)	Anti-mouse-POD (1:2000)

2.2.2.9 Zirkulardichroismus

Als Zirkulardichroismus (CD, *circular dichroism*) bezeichnet man eine Eigenschaft von optisch aktiven (chiralen) Molekülen, die es unter Nutzung von zirkular polarisiertem Licht erlaubt, u.a. die Sekundärstruktur von Proteinen zu untersuchen. Anhand der CD-Spektren von Proteinen kann der Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente im Protein ermittelt werden, da sich der Dichroismus von "random coil"-Strukturen, α -Helix-, β -Faltblattbereichen unterscheidet. Die für diese Arbeit durchgeführten CD-Messungen wurden zur Überprüfung verwendet, ob die rekombinant hergestellten Proteine gefaltet waren. Dazu wurde 1 mg der Proteine mithilfe von Amicon Ultra-4 Filterzentrifugationsgefäßen mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgrenze von 3 kDa (MWCo 3 k) und dem CD-Puffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM Natriumfluorid) umgepuffert. Dazu wurde viermal mit je 4 ml CD-Puffer gewaschen. Die konzentrierte Proteinprobe wurde aus der Filtereinheit entfernt und in einer Konzentration von 5 μ M (in CD-Puffer) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 (d=0,1) am CD-Spektrometer (J-720, JASCO Corp.) untersucht. Die Spektren wurden im Bereich von 195 und 260 nm aufgenommen. Die gemessene Elliptizität wurde unter Einbeziehen der Anzahl der Aminosäuren auf die molare Elliptizität umgerechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Elliptizität ist ein Maß für die Drehung und Absorption von linear polarisiertem Licht durch chirale Moleküle. Dabei sind Signale im Bereich von 170 bis 250 nm vor allem auf die Peptidbindung zurückzuführen. Bei α -helikalen Strukturen ist das Spektrum in diesem Bereich stärker ausgeprägt als bei β -Faltblättern oder ungefalteten Proteinstrukturen (*random coil*). Somit wurde die Sekundärstruktur der rekombinanten Proteine analysiert.

2.2.2.10 Bestimmung der Nukleotidbeladung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Nukleotidbeladung des gereinigten, rekombinanten RhoA wurde mithilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (Shimadzu UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatographie)) analysiert. Eine C-18 Nucleodur 25/4 Kieselgel-Säule und Laufmittel (100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,4, 10 mM Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) mit 7,5 % Acetonitril) wurde zur Auftrennung der Nukleotide verwendet. Die durch das Laufmittel denaturierten Proteine wurden mit einer Vorsäule abgetrennt. Die Eichung der HPLC erfolgte mittels Standard-Lösungen für die Nukleotide.

Unter Ausnutzung der Hydrophobizität der Nukleotide, die von der Anzahl der Phosphatgruppen abhängig ist, konnten die Spezies GDP und GTP sowie auch GMP differenziert werden. TBAB ermöglicht durch Bindung der Phosphatgruppen eine verbesserte Auftrennung der Nukleotidspezies.

2.2.2.11 Nukleotidaustauschreaktion

Angelehnt an das Protokoll des *RhoGEF exchange assay Biochem KitTM* (Cytoskeleton, Inc.) wurde ein Nukleotidaustauschexperiment für AKAP-Lbc und RhoA etabliert. Um den Nukleotidaustausch zu verfolgen, wurden die fluoreszenzmarkierte Nukleotidanaloga 2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-Guanosindiphosphat und 2'(3')-O-(N-methylantraniloyl)-Guanosintriphosphat eingesetzt, die folgend als mGDP bzw. mGTP bezeichnet werden.

a) Nukleotidaustausch von mGDP gegen GTP γ S

Zunächst wurden zu 200 μ g des rekombinanten His₆-RhoA (25 μ l) das gleiche Volumen Depletionspuffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4; 5 mM EDTA; 200 mM Ammoniumsulfat) und einem Überschuss an mGDP (5 mM) zugefügt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) zugegeben. Durch Zentrifugation mit den Vivaspin® 500 Konzentrationsgefäßen (MWCo 5kDa) und Puffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 100 mM NaCl, Proteaseinhibitoren (*Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche)) wurde RhoA-mGDP zweimal gewaschen und auf 100 μ l eingengt (10 min, 10000rpm). Für den Nukleotidaustausch wurden 1 μ M RhoA-mGDP und 0,5 μ M AKAP-Lbc DHPH in Nukleotidaustauschpuffer (40 mM Tris pH 7.5; 100 mM NaCl; 20 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA) verwendet. Die Fluoreszenzmessungen für mGDP wurden im Mikrotiterplatten-Lesegerät (TECAN Safire) über eine Zeitspanne von 15 min durchgeführt. Dabei wurde das Fluorophor des mGDP bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und die Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals erfolgte bei 440 nm.

b) Nukleotidaustausch von GDP gegen mGTP

Mit einer Konzentration von 2 μ M je Protein und 1 μ M mGTP (Biolog, Bremen) wurde ein ideales Fluoreszenzsignal-Rausch-Verhältnis in Nukleotidaustauschpuffer (40 mM Tris pH7.5; 100 mM NaCl; 20 mM MgCl₂, 100 μ g/ml BSA) erreicht. Das Fluoreszenzsignal für mGTP wurde wie auch für mGDP (λ_{exc} =360 nm; λ_{em} =440 nm) im Mikrotiterplatten-Lesegerät (TECAN Safire) über eine Zeitspanne von 15 min gemessen. Der Versuch wurde im 384-Loch-Format durchgeführt, um eine *Adaptation* zum Hochdurchsatzverfahren zu erreichen.

2.2.2.12 Hochdurchsatzdurchmusterung von Substanzbibliotheken

Die Optimierung des experimentellen Aufbaus wurde mit Unterstützung von Dr. Martin Neuenschwander in der Screening Unit des FMP durchgeführt. Dies umfasste die Automatisierung des Versuchsprozesses sowie die Programmierung der Datenakquise und –auswertung. Nach erfolgter Datenakquise für das Kontrollexperiment wurden die erhaltenen Werte nach der interner Routine der *Screening Unit* des FMP der statistischen Analyse unterzogen (Malo *et al.*, 2006). Hierbei wurde die Eignung des experimentellen Versuchs zum Hochdurchsatzverfahren anhand eines statistischen Parameters entschieden. Der sogenannte z' -Faktor beschreibt die Verschiedenheit von Positiv- und Negativkontrolle. Das Erreichen eines z' -Faktor von größer 0,5 ermöglichte die Durchführung des *Screening*. Bei z' -Faktoren kleiner 0,5 wäre ein *Screening* nicht verlässlich (Zhang

et al., 1999). Dazu wurde eine Substanzbibliothek der *Screening Unit* des FMP verwendet. Folgende 384-Wellplatten mit kleinen Molekülen aus der ChEMBioNet-Bibliothek wurden auf drei Tage verteilt für die Hochdurchsatzsuche verwendet:

Screening Tag	Platten-Nr.
I	95-110
II	77-94
III	69-76
	111-116
	1002-1005

Die ermittelten Daten wurden automatisch analysiert (Lisurek *et al.*, 2010; Malo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1999). Der sogenannte *Z-score* betrachtet die Messwerte der Substanzen im Vergleich zum Mittelwert der Platte. Ein *Z-score* von ≤ -3 (Inhibitor) bzw. ≥ 3 (Aktivator) gilt mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9% als „Hit“. Potenzielle Inhibitor-kandidaten wurden in einem zweiten Verfahren konzentrationsabhängig getestet und ausgewertet. Zusätzlich wurden die erneut verwendeten Substanzen mittels Massenspektrometrie analysiert.

2.2.2.13 Bestimmung der GTPase-Aktivität von RhoA

Der Aktivierungszustand der GTPase RhoA kann auf unterschiedlichste Weise untersucht werden. Für aufgereinigte, rekombinante Proteine bietet sich ein chromatographischer Nachweis der von der GTPase gebundenen Nukleotide an. Um in Zellen die RhoA-Aktivierung zu untersuchen, wurden ein Luciferase-Reporter-Assay und ein Rhotekin-Präzipitations-Experiment durchgeführt.

Rhotekin-basierte Präzipitation

Die Rhotekin-Bindungsstudien wurden in Kooperation mit Thomas Wieland (Universität Heidelberg) in Mannheim durchgeführt. HEK293-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit folgender Plasmid-DNA transfiziert.

Vektor

pEGFP-N1	leer
pEGFP-N1	Humanes AKAP-Lbc (inkl. N-term. Flag-tag)
pCMV2B	p63RhoGEF
pcDNA	G _{αq} RC (konstitutiv aktiv)
pcDNA	G _{α12} QL (konstitutiv aktiv)

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit der Substanz 31413 (50 µM) bzw. mit DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Präzipitationspuffer (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 4 mM MgCl₂; 10 % v/v Glycerol, 1 % Ipegal) lysiert und bei 20000 x g für zwei Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. 40 µl des Lysats wurden zur Bestimmung des Gesamtgehalts an RhoA abgenommen. Der Rest des Lysats wurde mit 40 µg an GSH-Sepharose gekoppeltes GST-Rhotekin für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die GSH-Sepharose zweimal mit Präzipitationspuffer gewaschen und mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt fünf Minuten bei 90 °C erhitzt. Die Analyse des gefällten RhoA-GTP erfolgte mittels SDS-PAGE und

anschließendem Immunoblot mit anti-RhoA Antikörpern (sc-418, Santa Cruz). Das Verhältnis zwischen Gesamt-RhoA und RhoA-GTP wurde densitometrisch mit ImageJ bestimmt.

Luciferase-Reporter-Assay

Die Experimente mit dem Luciferase-Reporter wurden in Kooperation mit Thomas Wieland (Universität Heidelberg) in Mannheim anlehnend an das Protokoll des *Dual-luciferase reporter assay* (Promega) durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit der Plasmid-DNA zweier Luciferasen sowie mit Plasmiden von unterschiedlichen Austauschfaktoren transfiziert (siehe 2.1.5.2, Nr. 7-22; siehe 2.3.5.). Vor die kodierenden Sequenzen der *firefly*-Luciferase befindet sich ein *serum response element* (SRE-) Promotor. Aktiviertes RhoA aktiviert wiederum den *serum response factor* (SRF), der über das SRE die Expression der *firefly*-Luciferase ermöglicht. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit der Substanz 31413 behandelt.

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in *Passive Lysisbuffer* (Promega) lysiert. Die Luciferase-Aktivität im Zelllysate wurde nach Protokoll mittels 96-Lochplatte (*OptiPlate 96*, PerkinElmer) und den *LarII*- bzw. *Stop-&Glow*-Substratlösungen (PerkinElmer) im Mikrotiterplatten-Lesegerät durch Messung des Lumineszenzsignals ermittelt.

2.3 Zellbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde mit Zelllinien (siehe 2.1.4) und primären Kardiomyozyten der Ratte gearbeitet.

2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung der konfluenten Zellen in einer 75 cm²-Gewebekulturflasche (TPP, Clontech, D) wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurden das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA Lösung gewaschen. Darauf folgte die eine zehninminütige Inkubation mit 0,5 ml Trypsin-EDTA Lösung bei 37°C. Löste sich der Zellrasen vom Flaschenboden, wurde die Reaktion mit 10 ml serumhaltigem Medium (DMEM+10% FKS) abgestoppt. Von dieser Zellsuspension wurden dann je nach Zelldichte 1ml in neue Kulturflaschen (mit 20 ml frischen Medium) eingesät. Die Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.3.2 Zellzählung und Zellaussaat von eukaryotischen Zellen

Für die Experimente wurden 35 mm-Schalen oder 6-Lochplatten verwendet, in welche die Zellen mit einer definierten Zellzahl ausgesät wurden. Die Zellzahl wurde mittels Handzählgerät *Scepter Handheld Automated Cell Counter* (Millipore) bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension (siehe 2.3.1) in 990 µl PBS gegeben und durch Invertieren gemischt. Das Versuchsformat und die benötigte Zellzahl sind in der Tabelle zusammengefasst.

Experiment	Format	Zellzahl
<i>AlamarBlue</i> Test	96-Lochplatte	5x10 ³
Luciferase-Experiment	96-Lochplatte	2x10 ⁴
Pulldown-Experiment	6-Lochplatte	1x10 ⁶
Immunfluoreszenz	35 mm-Schalen	2x10 ⁵
Kardiomyozyten	35 mm-Schalen/6-Lochplatten	1x10 ⁶

2.3.3 Gefrierkonservierung von Zellen

Zum Erhalt der Zelllinien wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und bei 300 rpm für 2 min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Universal 320R). Das Zellsediment wurde in 3 ml Medium (DMEM+ 10 % FKS) aufgenommen. Langsam wurden zu dieser Zellsuspension 3 ml DMSO-haltiges Serum (80 % FKS+ 20 %DMSO) zugetropft. Die Suspension konnte nun auf drei vorbereitete Kryogefäße verteilt werden. Der Gefriervorgang erfolgte im *Cryo Freezing Container* mit einer Abkühlungsgeschwindigkeit von 1 °C/min über Nacht bei –80°C und letztlich wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

2.3.4 Alamar Blue Test

Die Zellvitalität wurde mittels AlamarBlue® Zellviabilitätsreagenz bestimmt. Dabei werden die Redoxeigenschaften der lebenden Zellen ausgenutzt, um quantitative die Proliferation von Zellen in Ab- und Anwesenheit von diversen chemischen Substanzen zu ermitteln. Das im AlamarBlue®-Reagenz enthaltene Resazurin ist eine blaue, nicht-toxische, zellpermeable Substanz, die nach Eintritt in die Zelle zu einer roten, fluoreszierenden Substanz, Resorufin, reduziert wird. Aufgrund der reduzierenden Umgebung im Zytosol lebender Zellen, konvertieren diese stetig Resazurin zu Resorufin und führen damit zu einem ansteigenden Fluoreszenzsignal und einer Färbung des Zellmediums. Die Änderung kann sowohl als Fluoreszenz- als auch als Absorptionssignal gemessen werden. In eine 96-Lochplatte wurden pro Loch 5.000 Zellen gesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit 0,1; 1; 10 und 100 µM der Substanzen 31413, 31864 und 31892 sowie 0,001; 0,01, 0,1 und 1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt.

Von dem AlamarBlue®-Reagenz wurden 10 % zum Probenvolumen gegeben (10 µl AlamarBlue®-Reagenz zu 100 µl Probe) und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 570 und 600 nm. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der Absorptionsänderung (Absorption 570 nm – Absorption Referenz 600 nm) gegen die Substanzkonzentration.

Eine Reihe der Platte war nur mit Zellkulturmedium gefüllt und diente der Bestimmung der Hintergrundabsorption des AlamarBlue®-Reagenz, die bei etwa 450 Absorptionseinheiten liegen sollte.

2.3.5 Transfektion von eukarotischen Zellen

Zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen wurde das *Lipofectamine2000™ Reagent* (Invitrogen GmbH) verwendet. Die Methode beruht auf der Bildung kationischer, zellpermeabler Komplexe aus Transfektionsreagenz mit der DNA. Die entsprechenden Mengen DNA, *Lipofectamine2000™ Reagent* und DMEM wurden gemischt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Das Transfektionsprotokoll ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Schalen	Zellzahl	Lipofectamine2000™ Reagent	Plasmid-DNA	Optimem
6-Lochplatte	1×10 ⁶	10 µl	2 µg	500 µl

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Zellaussaat transfiziert und weitere 24 Stunden später für die Versuche verwendet.

2.3.6 Kultivierung primärer neonataler Kardiomyozyten der Ratte

Zwei bis drei Tage alte Ratten (Wistar) wurden durch Dekapitation getötet. Die Tiere wurden dann auf einer Styroporplatte festgesteckt und der Brustkorb mit einem T-Schnitt geöffnet. Das Herz wurde entnommen und kurzzeitig in ADS-Puffer auf Eis gelagert. Unter der Laminarbox wurden die Herzen bestmöglich von Blut und Blutgefäßen befreit, mit Pinzetten zerkleinert und in Falcon-Röhrchen überführt. Der ADS-Puffer wurde gegen eine Enzymlösung (siehe Tabelle) getauscht. Durch 4 Zyklen je fünf Milliliter Enzymlösung, mit einem Enzymmix aus Collagenase und Pankreatin wurden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst (12 Min bei 37°C im Wasserbad mit ca. 220 U/min).

Tierzahl	Collagenase	Pankreatin	in ADS-Puffer	FKS	Plat. Med.
bis 20	12 mg	14 mg	18 ml (4 x 4 ml)	2,5 ml	5 ml

Der Überstand mit den isolierten Zellen wurde abgenommen, in Falconröhrchen in FKS überführt (je 2,5 ml vom Eis) und anschließend in FKS zentrifugiert (100 x g für 3 min bei 4°C, Hettich Zentrifuge Universal 320R). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml kaltem *Plating*-Medium (1. Tag) resuspendieren. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet 15 ml Medium (1. Tag) aufgenommen und in einer 10 cm-Schale für zwei Stunden in den Brutschrank bei 37°C gestellt, damit sich die Fibroblasten absetzen. Die Kardiomyozyten, die sich noch im Überstand befinden, wurden anschließend mittels *Scepter Handheld Automated Cell Counter* (Millipore) gezählt (2.3.2) und in mit Gelatine beschichtete 35er Schalen gegeben. Am Folgetag der Präparation wurde das Medium gewechselt.

2.4 Mikroskopische Analyse an eukaryotischen Zellen

Die mikroskopische Analyse fixierter und lebender Zellen wurde am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) in Kooperation mit J. Eichhorst und B. Wiesner am FMP durchgeführt.

2.4.1 Immunfluoreszenz des Zytoskeletts an fixierten 3T3-Zellen

3T3 Mausfibroblasten wurden auf 30 mm Deckgläser (in 6-Lochplatten) in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Nach einem Tag wurden die Zellen für 16 h serumfrei gesetzt, um die durch das Kälberserum induzierte Stressfaserausbildung zu minimieren. Am Folgetag wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit den Substanzen 31413, 31864 und 31892 in einer Konzentration von 30 µM behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Stressfaserausbildung mit dem Liganden Lysophosphatidsäure (LPA; 300 nM) für 10 min bei 37 °C.

Die Zellen wurden mit Phosphatpuffer (DPBS++, Invitrogen) gewaschen und für 15 min in 2.5 % Paraformaldehyd in Natriumcacodylat-Puffer (100 mM Natriumcacodylat, 100 mM Sucrose, pH 7.4) fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,5 % Triton X-100. Nach Inkubation in Blocklösung (0.3 ml 45 % *fish skin* Gelatine/100 ml PBS) für 30 min bei 37 °C wurden die Zellen mit TRITC-Phalloidin behandelt. Phalloidin bindet irreversibel an fibrilläres Aktin (F-Aktin) und dient, versehen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC), der Visualisierung Aktinzytoskeletts. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet an AT-reiche Regionen der DNA und

dient damit der Visualisierung der Zellkerne. Die gefärbten Präparate wurden in Immu-Mount eingebettet und bis zur mikroskopischen Analyse dunkel im Kühlschrank gelagert. Für die mikroskopischen Untersuchungen waren Bildaufnahmen mit zwei Kanälen (Messung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzen) erforderlich. Als Anregungslichtquellen standen am Mikroskop der Argonionen-Laser (364 nm) für DAPI und der Helium-Neon-Laser (543 nm) für TRITC-Phalloidin zur Verfügung. Die Experimente wurden in Kooperation mit J. Eichhorst und B. Wiesner (FMP) durchgeführt.

Alle konfokalen Bilder dieser Arbeit sind repräsentative Beispiele aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Quantifizierung der Stressfaser-Ausbildung erfolgte wie beschrieben (Millan *et al.*, 2010) über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenzintensität des TRITC-Phalloidin mit ImageJ.

2.4.2 Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten der Ratte

2.4.2.1 unter Nutzung der Lichtmikroskopie

Neonatale Kardiomyozyten wurden in 6-Lochplatten mit $\sim 1,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch gesät. Die Stimulation mit 100 μM Phenylephrin (PE) erfolgte für sechs oder 24 Stunden bei 37°C. Unbehandelte Zellen dienten der Kontrolle. Der Einfluss der Substanz 31413 auf die α -adrenerge Stimulation der Kardiomyozyten wurde nach der dreistündigen Inkubation mit dem kleinen Molekül analysiert. Hierfür wurden die Kontraktionen der Zellen in einer Minute ausgezählt und die unterschiedlichen Bedingungen miteinander verglichen.

2.4.2.2 Kalziummessungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Auf ähnliche Weise konnte mit dem Kalziumsensor (Fluo-4) die Schlagfrequenz der neonatalen Kardiomyozyten bestimmt werden. Am LSM 510 *Laser-Scanning*-Mikroskop (Zeiss GmbH, Jena, D) wurde Fluo-4 mit dem Argonlaser (488 nm) angeregt und die Emissionssignale bei 505 nm detektiert und gesammelt. Die Stärke des Fluoreszenzsignals repräsentiert die Konzentration intrazellulärer Kalziumionen. Für die Aufnahme wurde üblicherweise der *Line-scan*-Modus benutzt. *Line-scan*-Bilder wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 1,54 oder 1,92 ms pro Linie, entlang der longitudinalen Achse der Zelle, aufgenommen. Nach der sequenziellen Aufnahme wurde ein zweidimensionales Bild 512x1000 *lines* oder 512x2000 *lines* generiert und für die spätere Analyse gespeichert. Die Auswertung erfolgte nach der Gruppen-internen Routine durch Jenny Eichhorst und Dr. Burkhard Wiesner am FMP.

3 Ergebnisse und Auswertung

Um die Funktion des AKAP-Lbc/RhoA-Komplexes in physiologischen und pathophysiologischen Zuständen näher zu charakterisieren, sollte nach niedermolekularen Inhibitoren gesucht werden. Diese kleinen Moleküle könnten als Hilfsmittel dienen, um durch Hemmung der Wechselwirkung zwischen AKAP-Lbc und RhoA pathologische Zustände, wie z.B. die α 1-adrenerg-induzierte, AKAP-Lbc-vermittelte Herzmuskelhypertrophie zu untersuchen. RNA-Interferenz-Experimente, welche die Hypertrophie hemmten, inhibierten alle AKAP-Lbc-Funktionen (Appert-Collin *et al.*, 2007). Es bleibt zu überprüfen, ob die GEF-Funktion die Hypertrophie vermittelt.

Die GEF-Aktivität des AKAP-Lbc (Diviani *et al.*, 2001) diene als Ausgangspunkt für die Etablierung eines Hochdurchsatz-Screening (*High-throughput-Screening, HTS*).

3.1 *In vitro*-Studien

3.1.1 Klonierung und Expression von rekombinanten RhoA und AKAP-Lbc

Für die Durchführung eines HTS müssen adäquate Mengen reines, aktives Protein zur Verfügung stehen. Als Grundlage für die Herstellung und Reinigung von rekombinantem RhoA und AKAP-Lbc dienten Plasmide, die von D. Diviani (Universität Lausanne) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Vektoren kodieren wildtypisches RhoA bzw. die DHPH-Domäne des AKAP-Lbc, jeweils am N-Terminus fusioniert mit der Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST) bzw. sechs Histidinen (His_6). *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta DE3-Zellen wurden mit den Plasmiden transformiert und anschließend in LB-Medium kultiviert. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und nach 24 Stunden bei 18 °C beendet. Jeweils vor IPTG-Zugabe und nach der Expressionsphase wurde 1 ml Zellsuspension entnommen, mit Proteingel-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine des Bakterienlysats erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brillantblau-Färbung. Verglichen mit dem Proteinmuster des Bakterienlysats vor Zugabe von IPTG (0), war deutlich die mit IPTG induzierte Expression der rekombinanten Proteine (I) zu erkennen (Abb. 3.1, A). Anhand der durch den Proteinmarker definierten Proteingrößen ließen sich die exprimierten Fusionsproteine den jeweiligen Molekulargewichten (siehe Tabelle in Abb. 3.1) zuordnen. Die Reinigung der GST-Fusionen bzw. His_6 -Proteine aus den jeweiligen Bakterienlysaten erfolgte mittels Affinitätschromatographie im Profinia-Proteinaufreinigungssystem. Von den einzelnen Reinigungsschritten wurden Fraktionen entnommen. Die darin enthaltenen Proteine wurden über SDS-PAGE/Coomassie-Brillantblau-Färbung visualisiert. Im Säulendurchfluss sowie in den Waschfraktionen waren alle Proteine des Bakterienlysats, die von der Affinitätsmatrix nicht gebundenen wurden. Das Eluat zeigte die Proteine mit den erwarteten Molekulargewichten in einer Reinheit von mindestens 90 % (Abb. 3.1, B). GST-RhoA (48 kDa) als auch His_6 -RhoA (27 kDa) konnten in einer Menge von 20-30 mg pro Liter Expressionskultur, GST-AKAP-Lbc DHPH (75 kDa) und His_6 -AKAP-Lbc DHPH (55 kDa) mit ungefähr 10 mg aus einem Liter Bakteriensuspension isoliert werden.

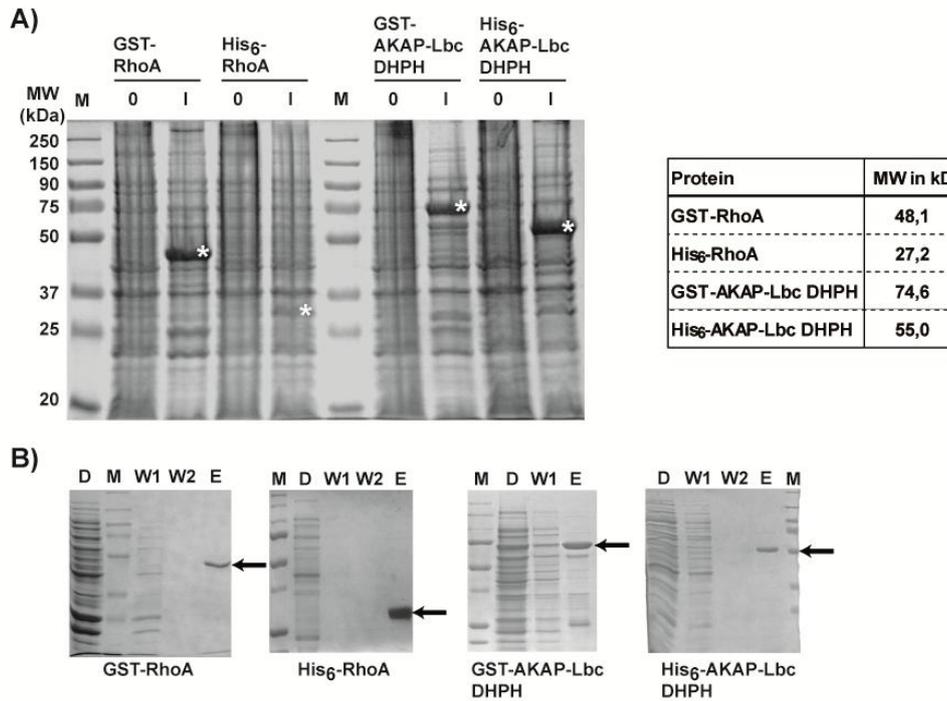


Abb. 3.1 Rekombinantes RhoA und AKAP-Lbc DHPH: *Escherichia coli* Rosetta DE3-Zellen wurden mit Vektoren transformiert, die für GST- und His₆-Fusionsproteine des wildtypischen RhoA und der DHPH-Domäne des AKAP-Lbc kodieren. A) Die Expression der Proteine wurde mit IPTG induziert. Nach 24 h bei 18 °C wurden die Zellen lysiert und für die SDS-PAGE vorbereitet (I). Zum Vergleich wurden auch Zellen vor der Zugabe von IPTG lysiert und in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (0). Die Coomassie-Färbung veranschaulichte die induzierte Expression der rekombinanten Fusionsproteine (*). Diese entsprachen, verglichen mit durch den Proteinmarker (M) definierten Größen, der in der eingesetzten Tabelle aufgelisteten Molekulargewichte. B) Die exprimierten Proteine (GST-RhoA, His₆-RhoA, GST-AKAP-Lbc DHPH oder His₆-AKAP-Lbc DHPH) wurden aus dem Bakterienlysat mittels Affinitätschromatographie isoliert. Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließender mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Der Säulendurchfluss (D) sowie die Waschfraktionen (W1 und W2) enthielten alle Proteine, die nicht von der Affinitätsmatrix gebunden wurden. Die Elutionsfraktion (E) enthielt die zu mindestens 90% reinen Proteine GST-RhoA, His₆-RhoA, GST-AKAP-Lbc DHPH oder His₆-AKAP-Lbc DHPH (Pfeile).

Die GEF-Aktivität von AKAP-Lbc beschleunigt den Austausch von GDP zu GTP in RhoA und sorgt damit für dessen Aktivierung (Diviani *et al.*, 2001). Basierend auf dieser Funktion sollte mit den gereinigten Fusionsproteinen ein Nukleotidaustauschexperiment aufgebaut werden. Die fluoreszenzmarkierten GDP- und GTP-Analoga, 2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)-substituiertes GDP bzw. GTP (mGDP bzw. mGTP), sollten zur Visualisierung der Austauschreaktion eingesetzt werden. Mit der Bindung an GDP/GTP-bindende Proteine steigt die Fluoreszenzintensität von mGDP bzw. mGTP.

Zunächst wurde His₆-RhoA-mGDP verwendet (Abb. 3.2 A). Aus dem gereinigten His₆-RhoA wurden GDP und GTP durch einstündige Inkubation in Depletionspuffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4; 5 mM EDTA; 200 mM Ammoniumsulfat) entfernt. In einem zweiten Schritt wurde das nukleotidfreie RhoA mit dem fluoreszenzmarkierten GDP (mGDP) durch Zugabe eines Überschusses an mGDP (5 mM) und 10 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) beladen. Mittels Gelfiltration wurden alle ungebundenen Nukleotide aus der Proteinlösung entfernt. Im Vergleich zur basalen Fluoreszenz des mGDP (Abb. 3.2 A, schwarz) war erwartungsgemäß ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz nach Bindung an RhoA (Abb. 3.2 A, blau) festzustellen. Dagegen war bei der Kombination aus His₆-RhoA plus mGDP, bei der GTPase und fluoreszierendes Nukleotid gemischt wurden, kein Unterschied zur basalen Fluoreszenz des mGDP zu ermitteln (Abb. 3.2 A, grau-schwarz gestreift). Die Zugabe von

AKAP-Lbc DHPH führte zu einer Reduktion der Intensität von His₆-RhoA-mGDP um etwa 30 %. Dies deutet auf den GEF-katalysierten Austausch von mGDP gegen GTPγS aus dem Reaktionspuffer, einer hydrolyse-insensitiven Variante des Triphosphats (Abb. 3.2 A, blau). Die Analyse nach SDS-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung zeigte auch, dass das beladene Protein schnell degradierte (Abb. 3.2 A). Daher wurde der Versuchsaufbau verändert, d.h. RhoA-mGDP getauscht gegen RhoA-GDP und Zugabe von mGTP. Dargestellt in Abb. 3.2 B ist die Kinetik der Fluoreszenzintensität als Maß für den Austausch von GDP gegen mGTP, katalysiert durch His₆-Dbs DHPH (grau) als Kontrolle und His₆-AKAP-Lbc DHPH (schwarz). Die erhaltenen Steigungen der Kurven sind im Diagramm rechts daneben gezeigt. Die Anstiege der basalen Fluoreszenzintensität ($m=0,04$) waren in Gegenwart von His₆-AKAP-Lbc ($m=0,17$; schwarz) nicht signifikant verändert. Nur in Anwesenheit von His₆-Dbs DHPH (grau) war eine signifikante Erhöhung auf $m=1,52$ zu detektieren.

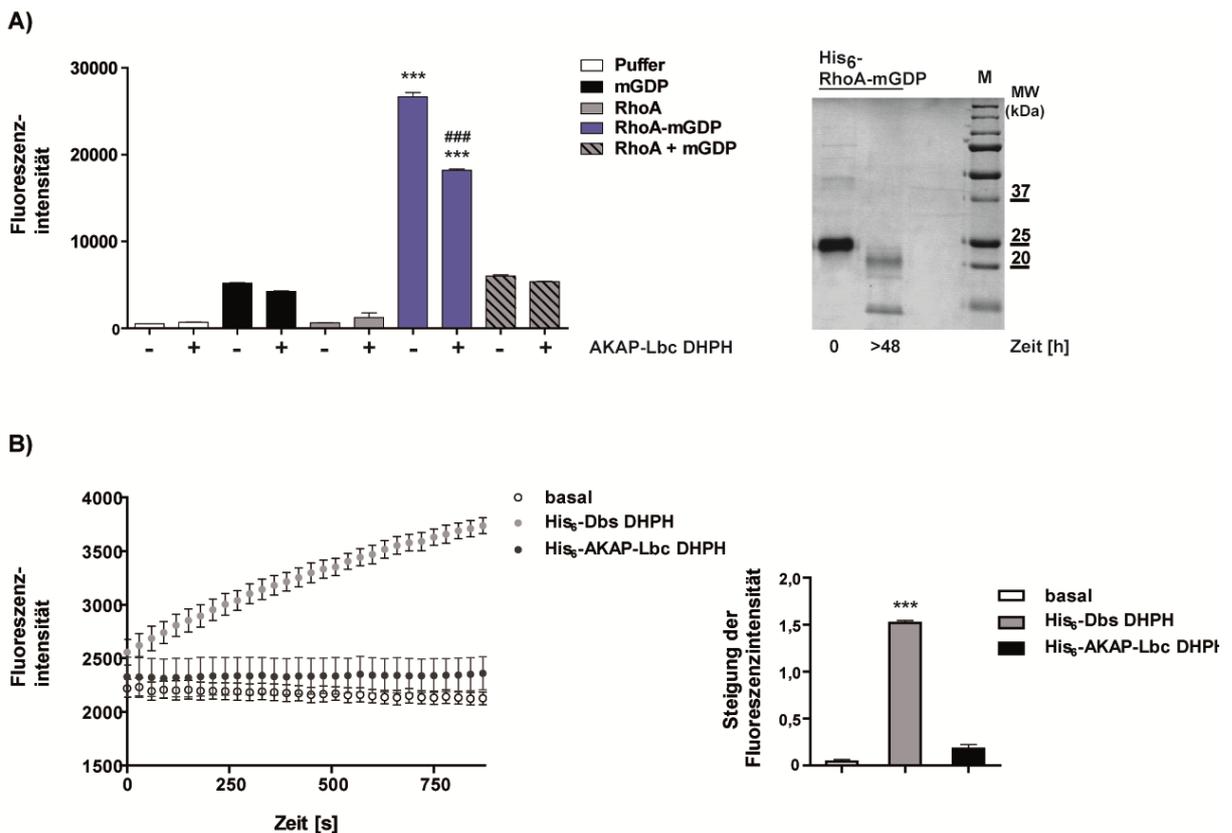


Abb. 3.2 Ineffizienter Nukleotidaustausch mit His₆-Proteinen: A) Das rekombinante His₆-RhoA wurde durch Entzug von Magnesium von gebundenen Nukleotiden befreit und anschließend mit fluoreszierendem GDP (mGDP) beladen. Die Fluoreszenzintensitäten des mGDP (schwarz) sowie des von His₆-RhoA gebundenen mGDP (blau) bzw. die Kombination aus His₆-RhoA und mGDP (grau-schwarz gestreift) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) des AKAP-Lbc DHPH sind dargestellt. Die Beladung von RhoA mit mGDP (blau) resultiert in einer signifikanten Erhöhung des Fluoreszenzsignals (***). In Gegenwart des GEFs war für RhoA-mGDP (###) eine Reduktion um etwa 30 % zu beobachten. Das beladene Protein war instabil. Nach etwa zwei Tagen (>48 h) waren verglichen mit RhoA-mGDP von Tag 0 Degradationsbanden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brillantblau-Färbung zu erkennen. B) Bei RhoA-GDP in Gegenwart von mGTP und der GEFs His₆-Dbs DHPH (grau) bzw. His₆-AKAP-Lbc DHPH (schwarz) wurde nur eine starke GEF-Aktivität für His₆-Dbs DHPH (grau, Steigung des Fluoreszenzsignals von 1,52) beobachtet, während für His₆-AKAP-Lbc DHPH (schwarz) die Steigung 0,17 betrug. Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA. Der signifikante Unterschied zur unbehandelten Kontrolle: ***, $p < 0.001$. Die Signifikanzen zwischen der Gruppe ohne GEF und mit GEF: ###, $p < 0,001$

Aufgrund des ineffizienten Nukleotidaustausches wurde die Funktion der rekombinanten Proteine (GST-RhoA, His₆-RhoA, GST-AKAP-Lbc DHPH und His₆-AKAP-Lbc DHPH) in einem Präzipitationsexperiment untersucht. Die Ergebnisse sind im Anhang (siehe Abb. S1) dargestellt. Demnach scheint das GST am N-Terminus des Fusionsproteins (GST-RhoA bzw. GST-AKAP-Lbc

DHPH) zu stören. Mittels gerichteter Proteolyse sollten das GST von GST-RhoA oder GST-AKAP-Lbc DHPH DHPH bzw. alternativ die sechs Histidine von His₆-RhoA oder His₆-AKAP-Lbc DHPH entfernt werden. Die Proteolyse blieb erfolglos, wie im Anhang dargestellt (siehe Abb. S2).

Aufgrund der für ein *Screening* ungeeigneten Ergebnisse mit den GST- und His₆-Fusionsproteinen von RhoA und AKAP-Lbc DHPH wurde auf eine Methode umgestiegen, mit der die Affinitätsmarkierung der Proteine direkt während der Isolation aus den Bakterienzellen entfernt werden konnte (Abb.3.3).

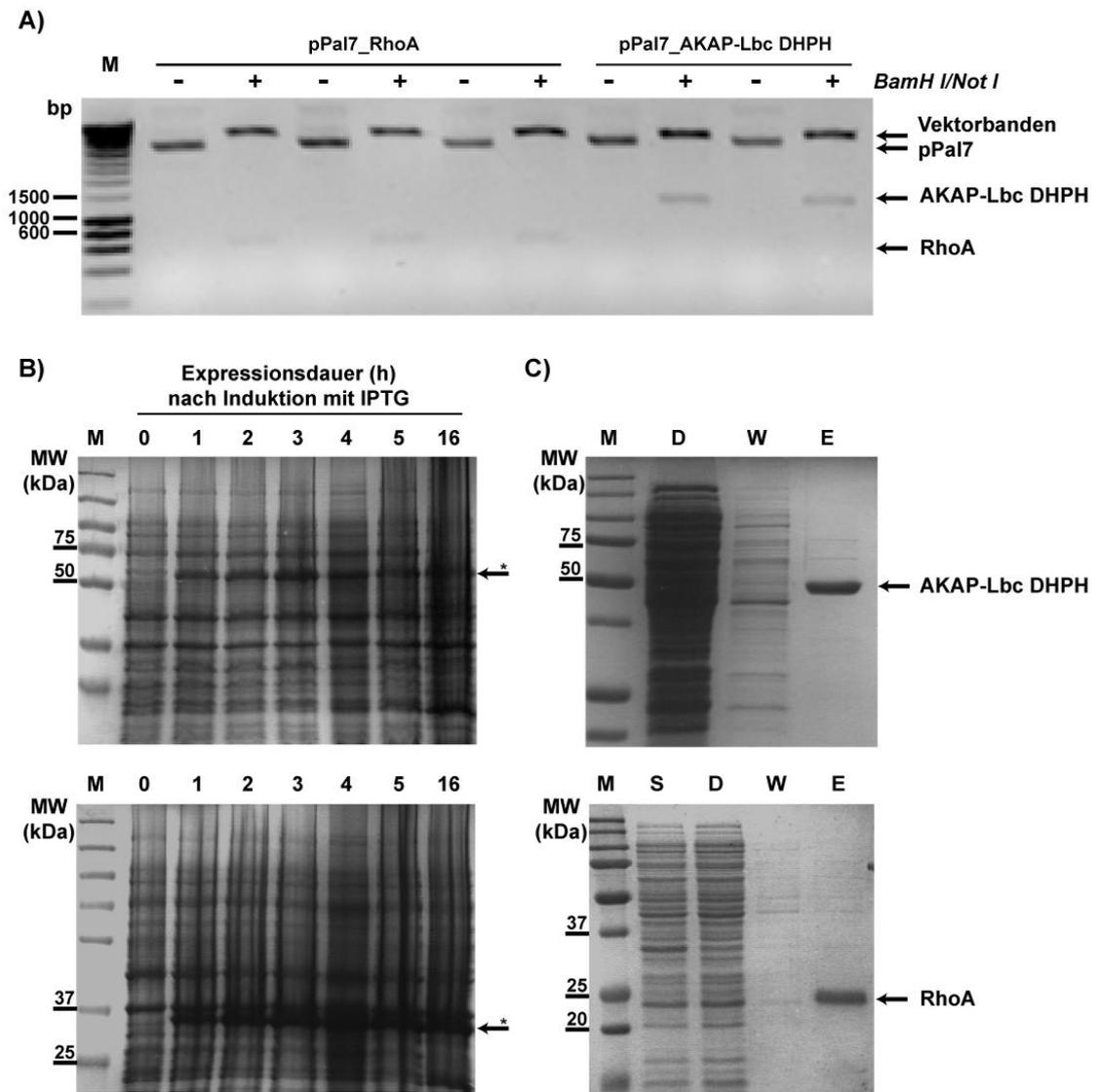


Abb. 3.3 Klonierung und Expression von markierungsfreiem AKAP-Lbc DHPH und RhoA: **A)** Ein Restriktionsprodukt von 557 bp für RhoA bzw. 1218 bp für AKAP-Lbc wurde über die Restriktionsendonukleasen *BamH I* und *Not I* in den Expressionsvektor pPal7 kloniert (Pfeile). **B)** *E. coli* Rosetta DE3 wurden transformiert. Die Expression der rekombinanten Proteine RhoA und AKAP-Lbc DHPH wurde mit IPTG induziert. Das Gesamtzelllysate vor (0) und in einem Intervall von einer Stunde (1, 2, 3,..., 16 Stunden) nach der Induktion mit IPTG wurden mittels SDS-PAGE/Coomassie-Brillantblau-Färbung analysiert. Die Pfeile markieren die rekombinanten Proteine AKAP-Lbc DHPH (57 kDa) bzw. RhoA (30 kDa). **C)** Nach der Profina-eXact-Methode wurden die markierungsfreien AKAP-Lbc DHPH (49 kDa) und RhoA (22 kDa) aus den Bakterienzellen eluiert (E). Alle Proteine aus dem Bakterienlysate, die nicht an die Chromatographie-Matrix gebunden haben, waren im Säulendurchfluss (D) und den Waschfraktionen (W) nachweisbar. Für RhoA wurde auch das für die Reinigung verwendete Bakterienlysate vor Säulenauftrag im Gel aufgetragen (S), das noch das 30 kDa große RhoA enthielt.

Dafür wurden die kodierenden Bereiche von RhoA und AKAP-Lbc DHPH über die Restriktionsstellen *BamH I* und *Not I* aus dem Vektor pET30a in den Vektor pPal7 kloniert. Der Reaktionsansatz nach der Restriktion wurde in einem Agarosegel aufgetrennt. Die erwarteten Fragmente für RhoA (557 bp) und AKAP-Lbc DHPH (1218 bp) wurden aus dem Gel isoliert, gereinigt und anschließend in den mit denselben Restriktionsendonukleasen vorbereiteten Vektor pPal7 ligiert (Abb. 3.3 A). Die mit den pPal7-Vektoren (pPal7_RhoA und pPal7_AKAP-Lbc DHPH) transformierten *E. coli* Rosetta DE3 wurden in LB-Medium kultiviert. Die Expression von RhoA und AKAP-Lbc DHPH wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach einer, zwei, drei, vier oder fünf Stunden bei 30 °C bzw. 16 Stunde bei 18 °C beendet. Stündlich wurden Proben des Gesamtlysats entnommen und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE/Coomassie-Brillantblau-Färbung analysiert. Die mit IPTG induzierten Expression von rekombinanten AKAP-Lbc DHPH (57 kDa) und RhoA (30 kDa) war deutlich zu erkennen (Abb. 3.3, B Pfeile). Die exprimierten Proteine enthielten N-terminal die Erkennungssequenz für die Protease Subtilisin (etwa 8 kDa). Mittels des Profinia eXact-Systems wurde über die auf der Chromatographie-Matrix immobilisierte Protease, ein Anhang-freies Protein eluiert. Dies wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brillantblau-Färbung geprüft (Abb 3.3, C). RhoA (22 kDa) und AKAP-Lbc DHPH (49 kDa) konnten in Mengen von 20-30 mg aus einem Liter Kulturansatz isoliert werden.

Mittels gerichteter Mutagenese wurde aus dem wildtypischen RhoA (im pPal7-Vektor) konstitutiv aktives G14V- und dominant negatives T19N-RhoA generiert. Die Sequenzierung der erhaltenen Konstrukte (Abb. 3.4, A) verdeutlichte den Austausch der Nukleotide: Für den Aminosäureaustausch Glyzin (G) zu für Valin (V) an Position 14 (G14V-RhoA) wurde das Nukleotidtriplett GGA anstelle von GTG eingeführt. Für die Aminosäure Threonin (T) anstelle von Asparagin (N) an Position 19 im RhoA (T19N-RhoA) wurde das Nukleotidtriplett ACA gegen AAC getauscht.

E. coli Rosetta DE3-Zellen wurden mit den mutierten Vektoren transformiert und die Proteinexpression von G14V- und T19N-RhoA mit 1 mM IPTG induziert. Die Reinigung und Analyse mittels SDS-PAGE erfolgte auf identische Weise wie für das wildtypische RhoA. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, welches RhoA entsprach, wurde eluiert (Abb. 3.4, B).

A)

```

wt-RhoA:   GATCCATGGCTGCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAGACATGCTTGCT 70
G14V-RhoA: GATCCATGGCTGCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGTGGCCTGTGGAAGACATGCTTGCT 70
T19N-RhoA: GATCCATGGCTGCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAGAACTGCTTGCT 70
*****
  
```

B)

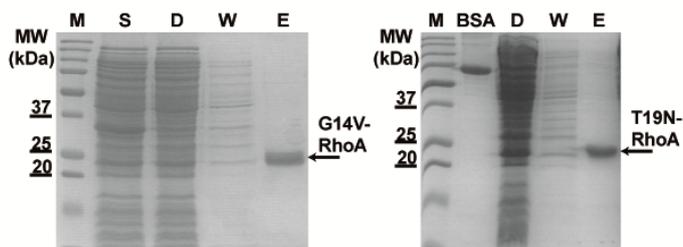


Abb. 3.4 Generierung und Expression von konstitutiv aktivem G14V- und dominant negativem T19N-RhoA: Mittels gerichteter Mutagenese wurden aus dem wildtypischen RhoA (pPal7-Vektor) die Mutanten G14V- und T19N-RhoA hergestellt. A) Die Sequenzierung der bei der PCR entstandenen Konstrukte zeigte die ausgetauschten Nukleotidtripletts (gelb hinterlegt), GTG (für V) anstelle von GGA (für G) sowie AAC (für N) anstelle von ACA (für T). Das Startkodon (ATG) repräsentiert die erste Aminosäure im RhoA. B) Nach der Profinia eXact Methode wurden auch G14V- und T19N-RhoA (beide 22 kDa) aus Bakterienlysaten eluiert (E). Diejenigen Proteine aus dem Bakterienlysats, die nicht an die Chromatographie-Matrix gebunden

hatten, waren im Säulendurchfluss (D) und den Waschfraktionen (W) zu sehen. Für G14V-RhoA wurde auch das für die Reinigung verwendete Bakterienlysat vor Säulenauftrag im SDS-Gel aufgetrennt (S). Zum Zwecke der Konzentrationsbestimmung wurde bei T19N-RhoA BSA (0,75 mg/ml) verwendet.

Die folgenden Experimente wurden ausschließlich mit den markierungsfreien Proteinen, RhoA (22 kDa) und AKAP-Lbc DHPH (49 kDa), durchgeführt.

3.1.2 Funktionalität von RhoA und AKAP-Lbc DHPH

3.1.2.1 Zirkulardichroismus

Da die Faltung eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität von Proteinen ist, wurde zunächst die Sekundärstruktur der rekombinant hergestellten, markierungsfreien Proteine, RhoA (22 kDa) und AKAP-Lbc DHPH (49 kDa), mittels Zirkulardichroismus (CD) untersucht.

Hierfür wurden die aus den Messungen erhaltenen Elliptizitätswerte auf die Anzahl der im Protein enthaltenen Aminosäuren umgerechnet und die resultierende molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abb. 3.5). Die Elliptizität ist ein Maß für die Drehung und Absorption von linear polarisiertem Licht durch chirale Moleküle. Dabei sind Signale im Bereich von 170 bis 250 nm vor allem auf die Peptidbindung zurückzuführen. Bei α -helikalen Strukturen ist das Spektrum in diesem Bereich stärker ausgeprägt als bei β -Faltblättern oder ungefalteten Proteinstrukturen (*random coil*). Die CD-Spektren von RhoA (rot) und AKAP-Lbc DHPH (schwarz) wiesen wie erwartet auf α -helikale Strukturen hin. Mit der korrekten Faltung von RhoA und AKAP-Lbc DHPH ist eine Grundvoraussetzung für die katalytische Aktivität der beiden Proteine gegeben.

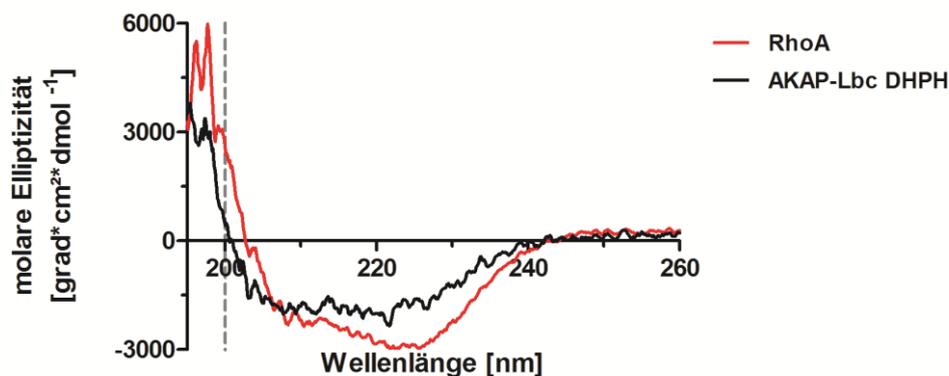


Abb. 3.5 Die markierungsfreien Proteine RhoA (22 kDa) und AKAP-Lbc DHPH (49 kDa) sind gefaltet: Die aus Bakterienzellen isolierten Proteine RhoA (rot) und AKAP-Lbc DHPH (schwarz) wurden mittels Zirkulardichroismus auf ihre Sekundärstrukturmerkmale überprüft. Die Spektren wiesen für RhoA und AKAP-Lbc DHPH auf helikale Strukturen hin.

3.1.2.2 Analyse der Nukleotidbeladung von RhoA mittels HPLC

Zusätzlich wurde die Nukleotid-Beladung der GTPase RhoA analysiert. Über die unterschiedliche Hydrophobizität der Nukleotidspezies GMP, GDP und GTP und die daraus resultierende unterschiedliche Retentionszeit auf der verwendeten Kieselgel-Säule können die Guanosinphosphate getrennt werden. Das von RhoA gebundene Nukleotid wurde mit den Nukleotidstandards GDP und GTP verglichen. Im Absorptionsspektrum bei 252 nm ergab sich für GDP (Abb. 3.6, schwarz) eine Retentionszeit von 2,6 min und für GTP (Abb. 3.6, blau) mit drei Phosphatgruppen eine von 3,3 min.

Das von RhoA gebundene Nukleotid (Abb. 3.6, rot) wies eine Retentionszeit vergleichbar mit der von GDP auf (2,6 min). Demnach war das aus den Bakterienzellen isolierte RhoA mit GDP geladen. RhoA-GDP war der Ausgangspunkt für die Untersuchung der Austauschreaktion.

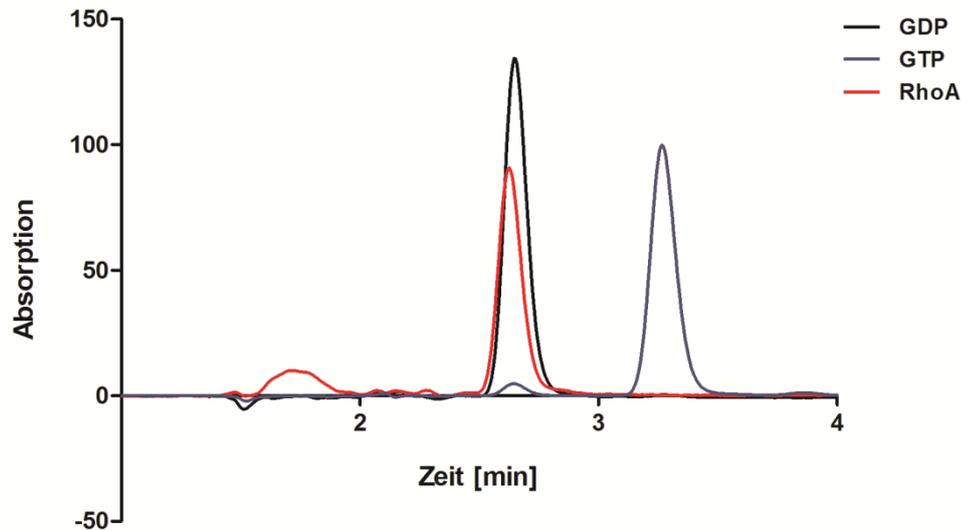


Abb. 3.6 Rekombinantes RhoA war beladen mit GDP: Mittels HPLC wurden 100 μM des aus Bakterienzellen isolierten und gereinigten RhoA gegen entsprechende Mengen an GDP und GTP analysiert. Das Absorptionsspektrum bei 252 nm zeigte eine Retentionszeit von 2,6 min für GDP (schwarz) und von 3,3 min für GTP (blau). Das Spektrum der Proteinprobe (rot) überlagerte sich mit dem für GDP bei 2,6 min.

3.1.3 Der AKAP-Lbc-katalysierte Nukleotidaustausch von RhoA als Ausgangspunkt zur Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens

Mit den Proteinen RhoA und AKAP-Lbc DHPH sowie dem fluoreszenzmarkierten mGTP wurde das Nukleotidaustauschexperiment aufgebaut. Dazu wurden sowohl wildtypisches RhoA als auch konstitutiv aktives G14V- und dominant negatives T19N-RhoA verwendet.

In Gegenwart eines GEF (hier AKAP-Lbc DHPH und Dbs DHPH) wird der Anstieg des Fluoreszenzsignals von mGTP signifikant beschleunigt, da heißt mGTP wird von der GTPase (hier RhoA) vermehrt gebunden.

Der Anstieg des Fluoreszenzsignals von mGTP über eine Zeitspanne von 15 min ist in Abb. 3.7 dargestellt. Eine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals über die Zeit wurde nach Zugabe von AKAP-Lbc DHPH (Abb. 3.7, A) oder Dbs DHPH als Kontrolle (Abb. 3.7, C) detektiert. Der Anstieg der Kurven (m) lag nach Zufügen von AKAP-Lbc bei 1,76 (Abb. 3.7, B) und von Dbs bei 1,78 (Abb. 3.7, D) im Vergleich zur Steigung von RhoA allein mit mGTP ($m = 0,05$). Wie zu erwarten wurde kein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet, wenn statt wildtypischen RhoA die mutierten Varianten T19N- ($m = -0,4$) oder G14V-RhoA ($m = 0,03$) in Gegenwart von AKAP-Lbc DHPH (Abb. 3.8, A und B) oder Dbs DHPH (Abb. 3.8, C und D) benutzt wurden. Die konstitutiv aktive Mutante G14V-RhoA sollte als Negativkontrolle benutzt werden, da AKAP-Lbc nicht an G14V-RhoA bindet (Diviani et al., 2001).

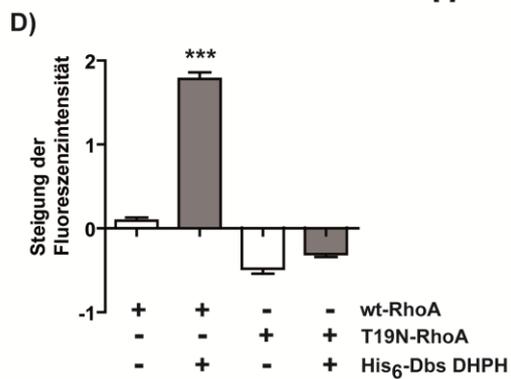
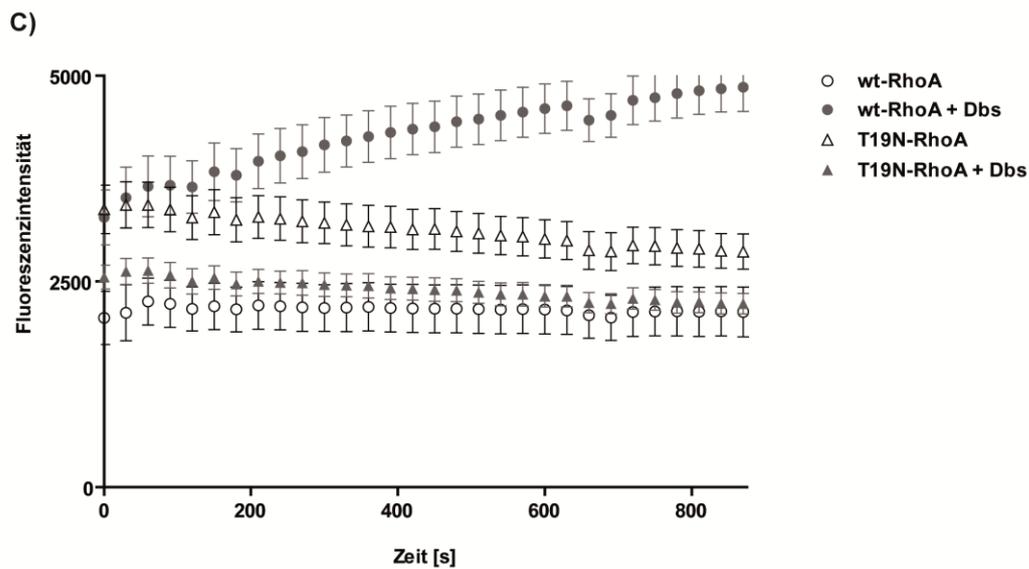
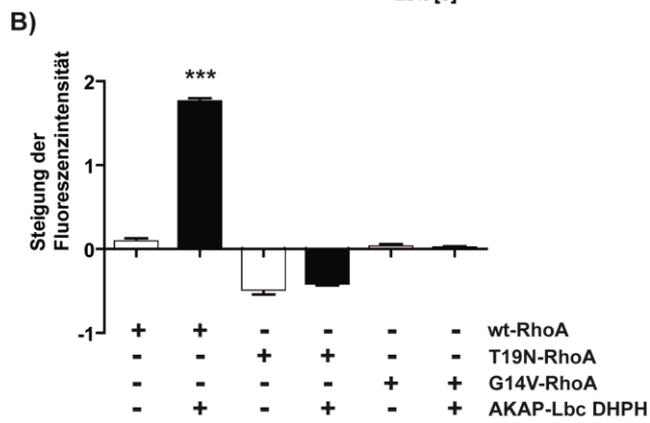
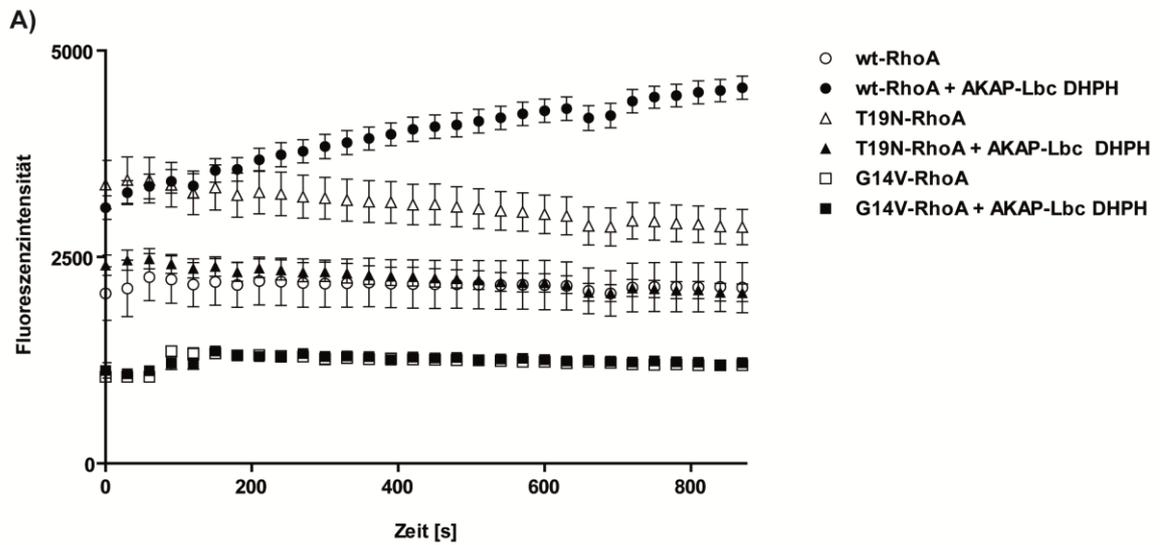


Abb. 3.7 Die DHPH-Domäne von AKAP-Lbc katalysiert den Austausch von GDP zu mGTP an RhoA: In einem *in vitro* durchgeführten Nukleotidaustauschexperiment mit dem fluoreszenzmarkierten GTP (mGTP) sollten die rekombinanten Proteine auf ihre Funktion untersucht werden. Die Zugabe der DHPH-Domäne von AKAP-Lbc (schwarz; A und B) bzw. His₆-Dbs als Kontrolle (grau; C und D) beschleunigte den Nukleotidaustausch von wt-RhoA (○). Dies konnte anhand der Steigung des Fluoreszenzsignals des mGTP über die Zeit ermittelt werden. Die Steigungen der Kurven aus A bzw. C sind in B bzw. D dargestellt. So wurde nach Zugabe von AKAP-Lbc eine Steigung von 1,76 und für Dbs von 1,78 detektiert, im Vergleich zur Negativkontrolle (RhoA ohne GEF, Steigung=0,05). Für die Mutanten T19N-RhoA (Dreieck) und G14V-RhoA (Quadrat) unterscheiden sich die Kurven in Ab- und Anwesenheit der GEFs nicht. Die Steigungen mit $m = -0,4$ (T19N-RhoA) bzw. $m = 0,03$ (G14V-RhoA) unterschieden sich auch nicht von der von RhoA. Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA. Der signifikante Unterschied zur unbehandelten Kontrolle: ***, $p < 0.001$

Für die Verwendung des Versuchsaufbaus als Hochdurchsatzverfahren wurde der Prozess in Kooperation mit M. Neuenschwander und J.-P. von Kries in der *Screening Unit* des FMP an die Hochdurchsatzbedingungen angepasst. Mithilfe der Robotersysteme wurde ein Versuchsprotokoll entwickelt und nach z' -Faktor-Bestimmung analysiert (siehe 2.2.2.12). Der z' -Faktor beschreibt die Verschiedenheit von positiven und negativen Signalen unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Signale. Das Signal der Negativkontrolle (G14V-RhoA plus AKAP-Lbc DHPH) im Vergleich zur Positivkontrolle (wt-RhoA plus AKAP-Lbc DHPH) ergab nicht den für ein *Screening* erforderlichen z' -Faktor von $\geq 0,5$. Aus diesem Grund wurde G14V-RhoA plus AKAP-Lbc DHPH durch wt-RhoA plus Wasser als Negativkontrolle ersetzt. Der z' -Faktor betrug damit 0,55, woraufhin das *Screening* durchgeführt werden konnte (siehe Tabelle 3.1).

Positivkontrolle	Negativkontrolle	z' -Faktor	
		Mittelwert	Standardabweichung
wt-RhoA + AKAP-Lbc DHPH	G14V-RhoA + AKAP-Lbc DHPH	0,3487	0,1643
wt-RhoA + AKAP-Lbc DHPH	wt-RhoA + H ₂ O	0,5575	0,0535

Tabelle 3.1: z' -Faktoren der Versuchsansätze in der *Screening Unit*

3.1.4 Durchmusterung einer Substanzbibliothek

Mit dem etablierten Versuchsansatz wurde eine Bibliothek von niedermolekularen Substanzen nach möglichen Inhibitoren der AKAP-Lbc-induzierten Aktivierung von RhoA durchsucht. 18.431 kleine Moleküle wurden hinsichtlich ihres Hemmpotenzials überprüft.

Die z' -Faktor-Analyse für das gesamte Hochdurchsatzverfahren lag im Durchschnitt bei 0,51. Die Einzelwerte der z' -Faktoren (weiß) sowie die durchschnittlichen Steigungen des Fluoreszenzsignals von mGTP in den Positivkontrollen (rot) und den Negativkontrollen sind für jede Platte in Abb. 3.8 (A, weiße Balken) dargestellt. Die Schwankungen in den Fluoreszenzintensitätswerten waren aufgrund der Temperaturänderung im Robotersystem zu erklären, der durchschnittliche z' -Faktor des gesamten *Screening* betrug 0,51, so dass das *Screening* verlässlich war.

Die Auswertung des *Screening* nach der *Screening Unit*-internen Routine wurde als Verteilung der prozentualen Inhibition der getesteten Substanzen dargestellt (Abb. 3.8, B). Die Moleküle wurden nach ihrem relativen Inhibitions Potenzial charakterisiert, wobei nur solche für die Validierung gewählt wurden, die eine Hemmung von mindestens 60% aufwiesen.

A)

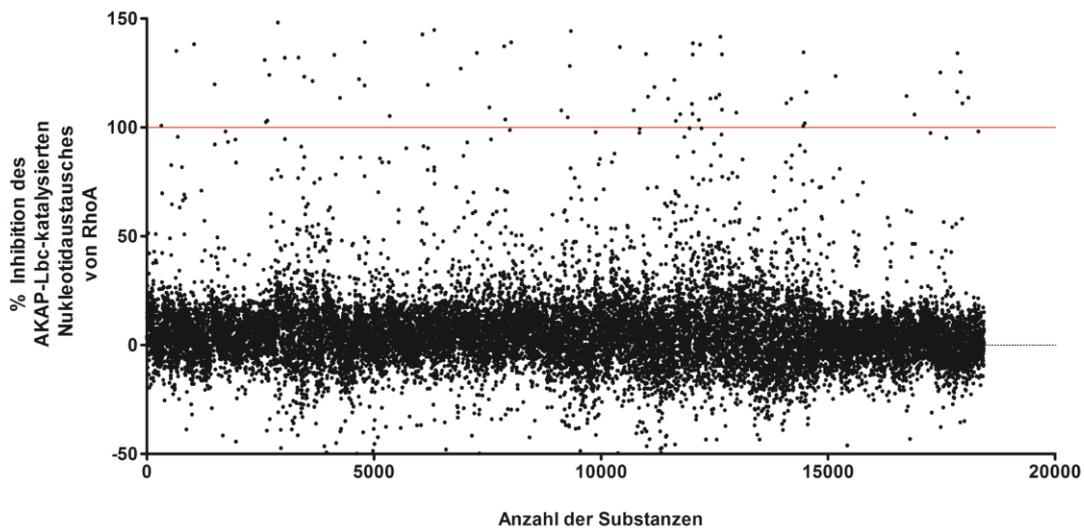
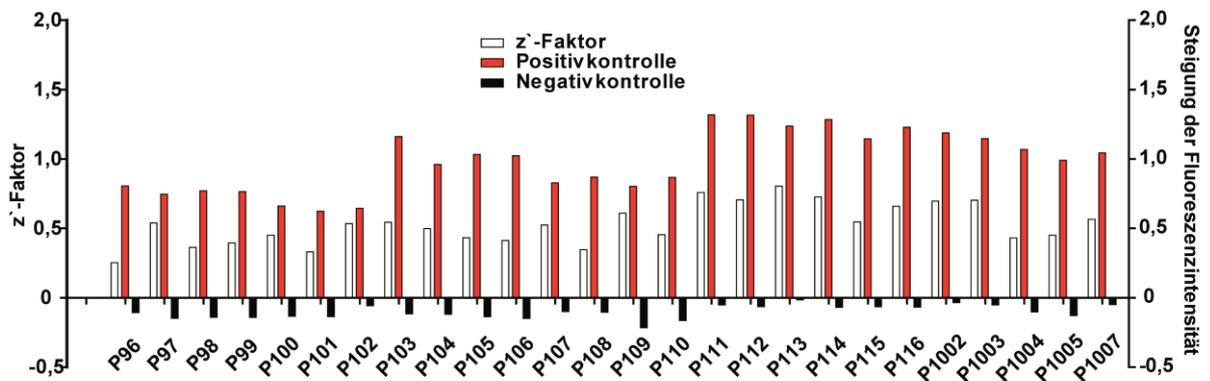
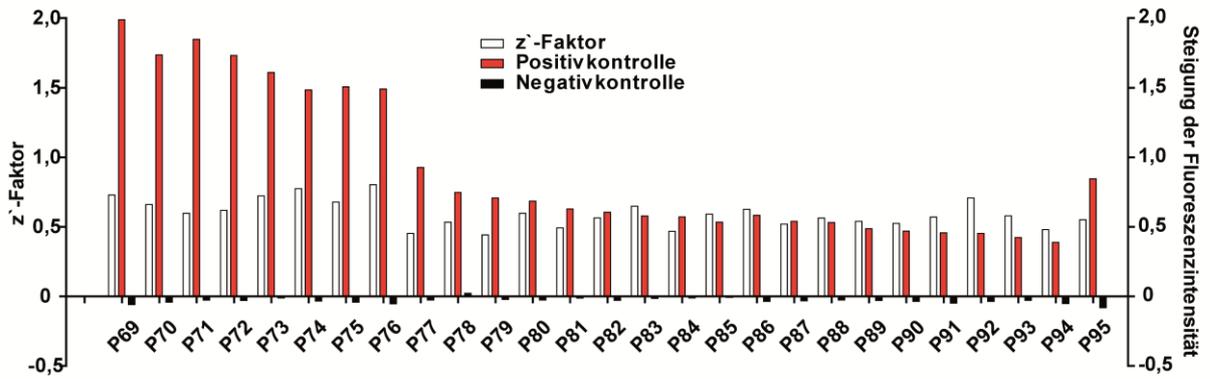


Abb. 3.8 Das durchgeführte Screening war verlässlich: A) Die z' -Faktoren und die zugrundeliegenden Steigungen der Fluoreszenzintensität von mGTP in den Positiv- und Negativkontrollen der einzelnen Platten schwankten zwar, der z' -Faktor des gesamten Hochdurchsatzverfahrens lag jedoch bei 0,51 und war damit stabil für die Auswertung. B) Die Auswertung des Screening wurde als Verteilung der prozentualen Inhibition der getesteten Substanzen dargestellt.

Diese wurden erneut konzentrationsabhängig getestet. Hinzu kamen auch etwa 200 strukturell ähnliche Substanzen, die im primären Screening bisher keine Hemmung zeigten. Von den 115 potenziellen Inhibitoren konnten 46 validiert werden. In Kooperation mit J. Milic aus unserer Arbeitsgruppe wurden alle Substanzen analysiert und verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Die vielversprechendste Gruppe war die der 4-Methoxyphenylfluorochromenone. Die besten Vertreter konnten käuflich erworben werden. Als weitere Negativkontrolle wurden auch Substanzen gekauft, die keine Hemmung des Nukleotidaustausches zeigten. Um Stabilitäts- und Reinheitsdefizite der Substanzen in der Bibliothek auszuschließen, wurden auch die gekauften Moleküle auf ihr Inhibitions Potenzial geprüft.

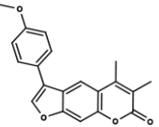
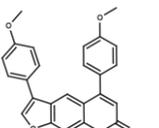
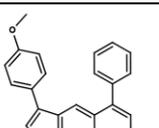
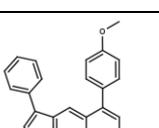
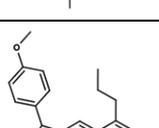
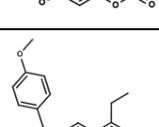
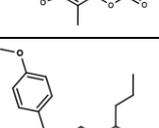
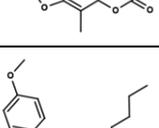
Struktur	Compound-ID	ChemBridge ID	MW	IC50 (Screening Unit)	IC50 (ChemBridge)
	31413	7358142	320,35	12 μM	25,9 μM
	31620	6945843	412,45	/	/
	31776	7353553	368,39	/	/
	31802	6945054	398,42	/	/
	31864	7353403	334,38	17,3 μM	39,9 μM
	31872	6943943	334,38	14 μM	/
	31890	6946449	348,40	/	/
	31892	6945294	348,40	10,9 μM	78,9 μM

Tabelle 3.2: Vergleich der Substanzen aus der Bibliothek der *Screening Unit* mit den gekauften anhand ihrer Hemmung des AKAP-Lbc-katalysierten Nukleotidaustausches von RhoA.

Von den vier Hemmstoffkandidaten aus dem Screening (Tabelle: 31413, 31864, 31872 und 31892) zeigten drei (31413, 31864 und 31892) weiterhin eine fünfzigprozentige Hemmung des Nukleotidaustausches in Konzentrationen zwischen 25,9 μM und 78,9 μM (Abb. 3.9).

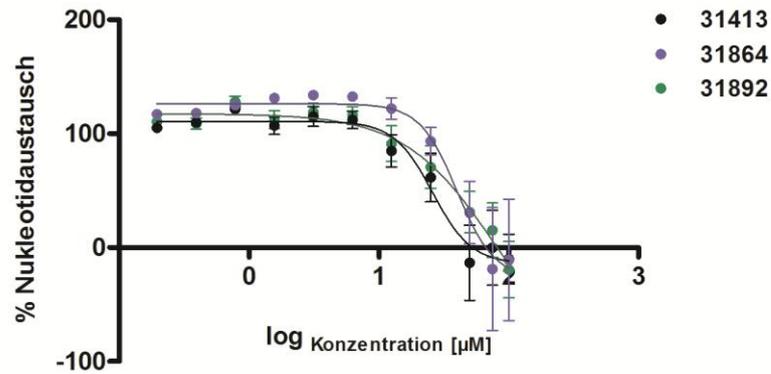


Abb. 3.9 Inhibition des Nukleotidaustausches durch die Substanzen 31413, 31864 und 31892: Der AKAP-Lbc-vermittelte Nukleotidaustausch von RhoA wurde durch die Substanzen 31413, 31864 und 31892 in Konzentrationen von 25,9 μM (31413, schwarz), 39,9 μM (31864, blau) und 78,9 μM (31892, grün) zu 50 % gehemmt.

Um tiefere Einsicht in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Substanzen 31413, 31864 und 31892 zu erlangen, wurden auch einige bekannte Furocoumarine, wie Imperatorin, Bergamottin, Psoralen und 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen sowie das Grundgerüst Coumarin selbst im Nukleotidaustauschexperiment getestet.

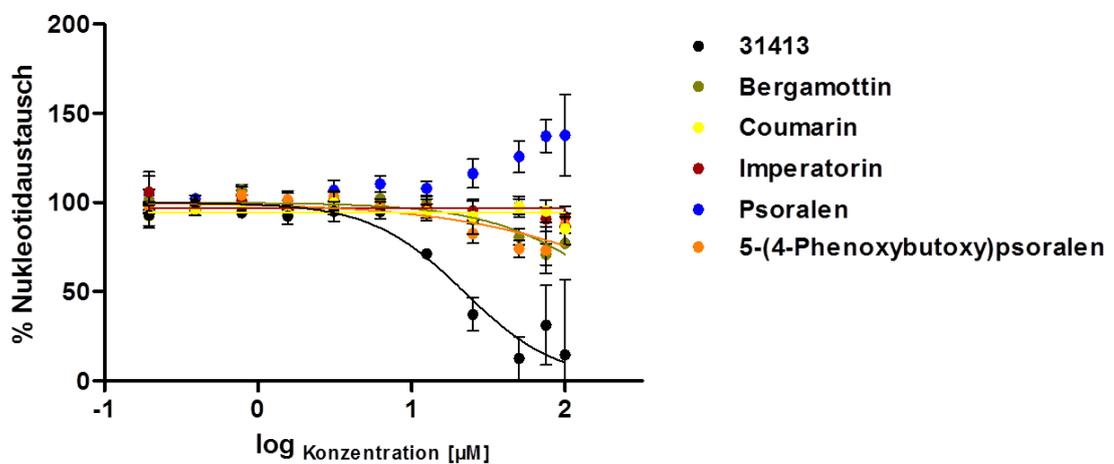
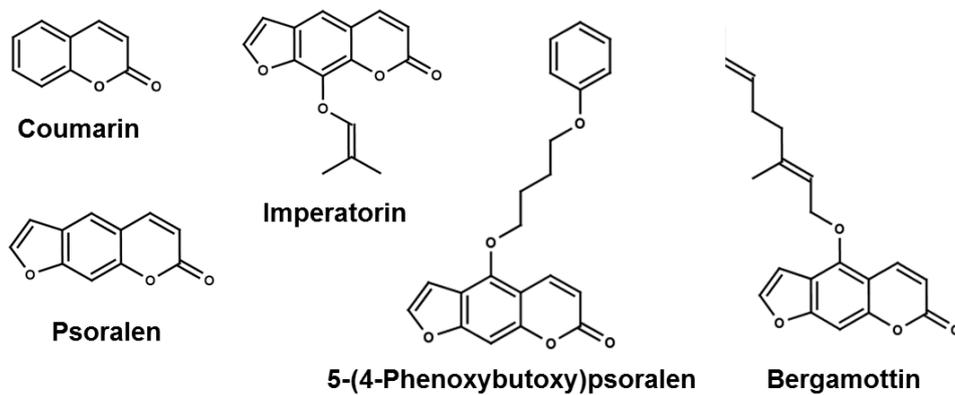


Abb. 3.10 Bekannte Furocoumarine zeigten im verwendeten Konzentrationsbereich keine Hemmung des AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotidaustausches von RhoA: Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit wurden die bekannten Furocoumarinen Bergamottin (grün), Imperatorin (rot), Psoralen (blau) und 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen (orange) sowie Coumarin (gelb) getestet. Die Substanz 31413 hemmte den Nukleotidaustausch. Bei Bergamottin und 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen könnte man eventuell eine Hemmung der Aktivierung von RhoA beobachten, allerdings in deutlich höheren Konzentrationsbereichen. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen bei 229,5 μ M für Bergamottin und 546,2 μ M für das Psoralenderivat

Keine der Grundbausteine, nur Bergamottin und 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen, welche am mittleren Ring eine deutlich längere Alkylkette ausweisen, hemmten den AKAP-Lbc-abhängigen Nukleotidaustausch von RhoA im getesteten Konzentrationsbereich von 0 bis 100 μ M (Abb. 3.12). Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen allerdings mit 229,5 μ M für Bergamottin und 546,2 μ M für das Psoralenderivat zehn- bis 25-mal höher als der der Substanz 31413.

Im Folgenden wurde die Wirkung der identifizierten Substanzen 31413, 31864 und 31892 auf die AKAP-Lbc-vermittelten Aktivierung von RhoA in Zellen untersucht. Hierfür war es wichtig, dass die Substanzen zellgängig und nicht toxisch für die Zellen sind.

3.2 Studien an Zellen

3.2.1 Zellgängigkeit der Substanzen 31413, 31864 und 31892

Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen 31413, 31864 und 31892 könnte gut für die Untersuchung der Zellpenetration genutzt werden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden ein Absorptions- und ein Fluoreszenzspektrum der drei Kandidaten ermittelt.

Das Absorptionsverhalten der Substanzen 31413 (schwarz), 31864 (blau) und 31892 (grün) wurde analysiert, woraus drei Maxima für die Wellenlängen 231, 250 und 305 nm erhalten wurden (Abb. 3.11, A), bei denen die Hemmstoffkandidaten Licht absorbieren. Mit diesen Wellenlängen und der relevanten Anregungswellenlänge des Nukleotidaustauschexperiments wurden sie auf ihre Fluoreszenzeigenschaften überprüft. Exemplarisch für die Substanz 31413 in Abb. 3.11, B dargestellt, konnte bei den Wellenlängen 231 und 250 nm kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Signale für 10 μ M (grau) bzw. 18 μ M 31413 (schwarz) waren mit dem Pufferwerten (blank, rot gestrichelt) vergleichbar. Die Anregung mit der Wellenlänge von 305 nm allerdings resultierte zeit- und konzentrationsabhängig in einem Fluoreszenzemissionsspektrum, während die Pufferprobe (blank, rot gestrichelt) über die Zeit unverändert blieb. Auch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm fluoreszierten die Substanzen, allerdings schwächer als bei 305 nm.

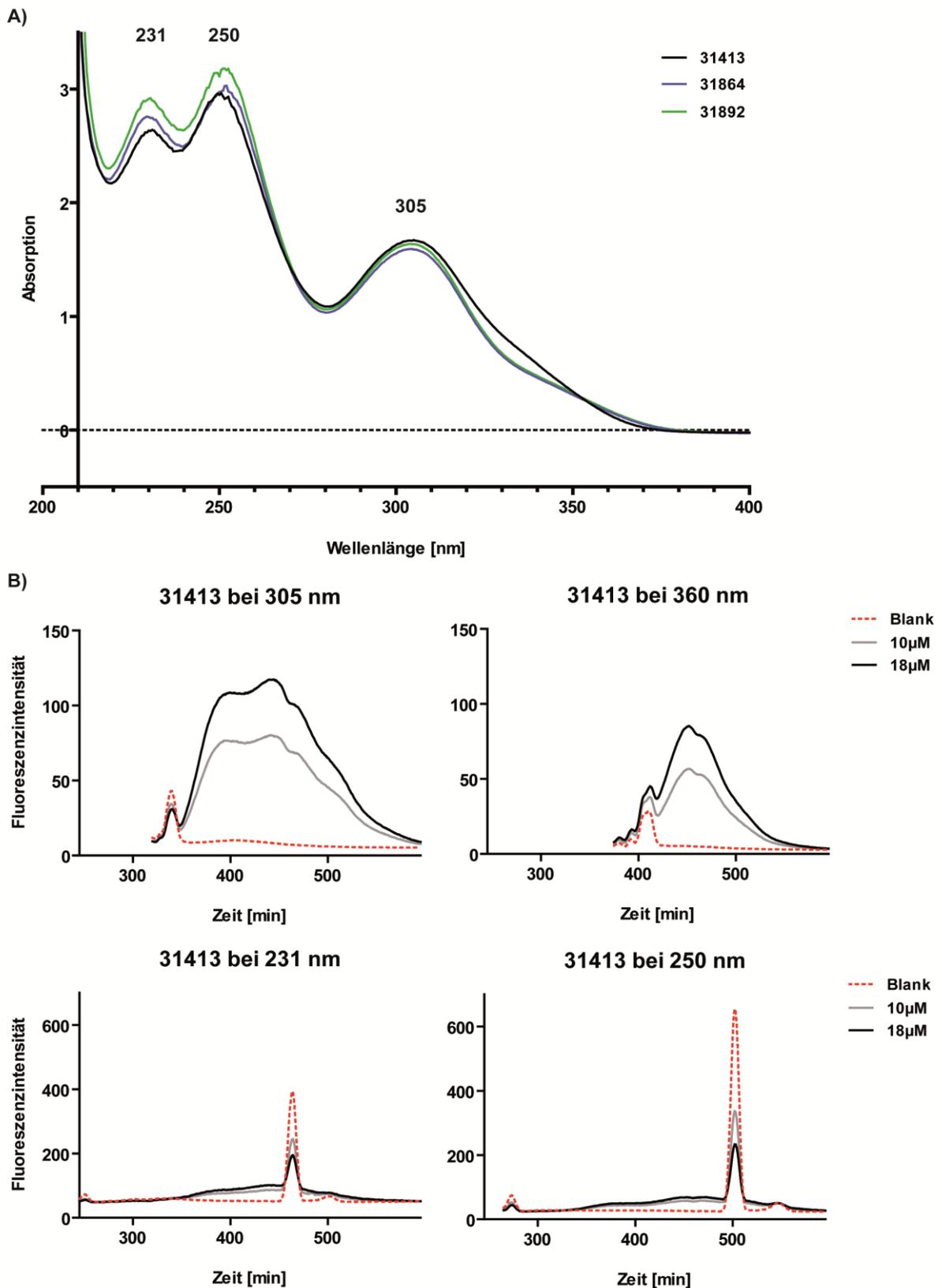


Abb. 3.11 Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Substanzen 31413, 31864 und 31892: Die Analyse des Absorptionsverhaltens (A) der Substanzen 31413 (schwarz), 31864 (blau) und 31892 (grün) veranschaulicht drei Maxima bei den Wellenlängen 231, 250 und 305 nm. Anhand derer wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Bei den Wellenlängen 231 und 250 nm konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden, in B exemplarisch für die Substanz 31413 dargestellt. Die Signale für 10 (grau) bzw. 18 μM (schwarz) von 31413 waren mit dem Pufferwerten (blank, gestrichelt) vergleichbar. Die Anregung mit der Wellenlänge von 305 nm allerdings resultierte zeitabhängig in einem Fluoreszenzemissionsspektrum, welches abhängig von der Substanzkonzentration eine höhere Intensität zeigte, während die Pufferprobe (blank, rot gestrichelt) über die

Zeit nahe Null verblieb. Auch bei der für die mant-Nukleotide relevanten Anregungswellenlänge von 360 nm wurde ein Fluoreszenzsignal erhalten.

Diese Eigenschaft konnte nun zur mikroskopischen Analyse genutzt werden. Mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop sollte die Aufnahme der Substanz von Zellen untersucht werden. Mausfibroblasten (3T3-Zellen) wurden für 30 Minuten mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle bzw. mit 30 μM der Substanz inkubiert. Am Mikroskop wurden geeignete Wellenlängen definiert, so erfolgte eine Anregung mit dem Argonionen-Laser (364 nm) und eine Detektion über einen Bandpass-Filter (385-470 nm). Abb. 3.12 zeigt exemplarisch mit der Substanz 31864 behandelte und unbehandelte 3T3-Zellen in 40-facher Vergrößerung. Bei den Substanz-behandelten (+) Zellen war ein Signal detektierbar, welches bei gleicher Laserintensität bei DMSO-behandelten (-) Zellen fehlte (Abb. 3.12). Das Fluoreszenzsignal der Substanz 31864 war schwach und nach einer Aufnahme nahezu erloschen, so dass die Untersuchungen nicht weiter fortgeführt wurden.

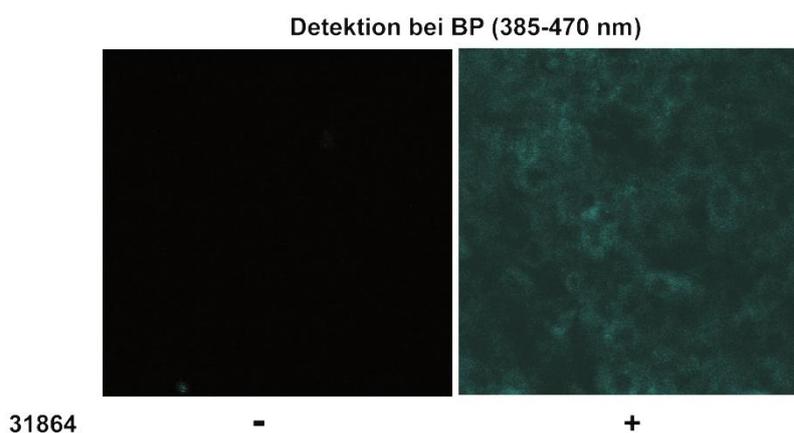


Abb. 3.12 Die Substanz 31864 war in 3T3-Mausfibroblasten darstellbar: 3T3 Zellen wurden mit 30 μM 31864 oder mit DMSO behandelt. Am *Laser-Scanning*-Mikroskop konnte nach Anregung mit dem Argonionen-Laser (364 nm) im Bereich von 385-470 nm ein Signale in den mit der Substanz 31864 behandelten Zellen (+) detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die DMSO-behandelten Zellen (-) bei gleicher Laserintensität kein Signal.

Prinzipiell waren Zellumrisse erkennbar, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Substanz nicht auf der Zelloberfläche auflagerte. Somit ließ sich folgern, dass die kleinen Moleküle die Zellbarriere überwinden können, um an ihren Wirkort zu gelangen.

3.2.2 Toxizitätstest mit den Substanzen 31413, 31864 und 31892

Als nächstes sollte eine mögliche Toxizität der Substanzen auf die Zellen ausgeschlossen werden. Dazu wurde der sogenannte *AlamarBlue*[®]-Assay angewendet. Das *AlamarBlue*[®] Zellviabilitätsreagenz nutzt die Redoxeigenschaften der lebenden Zellen, um quantitative die Proliferation von Zellen in Ab- und Anwesenheit von chemischen Substanzen zu ermitteln. Das im *AlamarBlue*[®]-Reagenz enthaltene blaue Resazurin wird in lebenden Zellen zum roten Resorufin reduziert. Der Unterschied in den Absorptionen der beiden Farbstoffe (570 nm und 600 nm) ist ein Maß für die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin und damit für die Proliferation der Zellen. Es wurden 5.000 3T3-Zellen pro Kammer einer 96-Lochplatte gesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen für 30 min bei 37 °C behandelt. Zur Detektion wurde das *AlamarBlue*-Reagenz für vier Stunden hinzugegeben. Die Absorptionen bei 570 nm und 600 nm wurden mittels Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt. Die Hintergrundabsorption des Reagenzes im

Zellkulturmedium wurde als Maß für die maximal mögliche Toxizität ermittelt und in Abb. 3.13 dargestellt (weißer Balken, - Zellen).

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.13, weißer Balken, + Zellen) und den DMSO-behandelten Zellen (Abb. 3.13, grau) war nach der Inkubation mit den Substanzen 31413 (schwarz), 31864 (blau) und 31892 (grün) kein signifikanter Unterschied in der Zellvitalität detektierbar. Folglich waren die Substanzen 31413, 31864 und 31892 in Konzentrationen bis 100 µM nicht toxisch und für Untersuchungen im Zellkulturmodell geeignet. Eine mittlere, letale Dosis (LD₅₀) konnte nicht ermittelt werden, da die Substanzen bereits bei einer Konzentration von 100 µM in wässriger Lösung beginnen auszufallen.

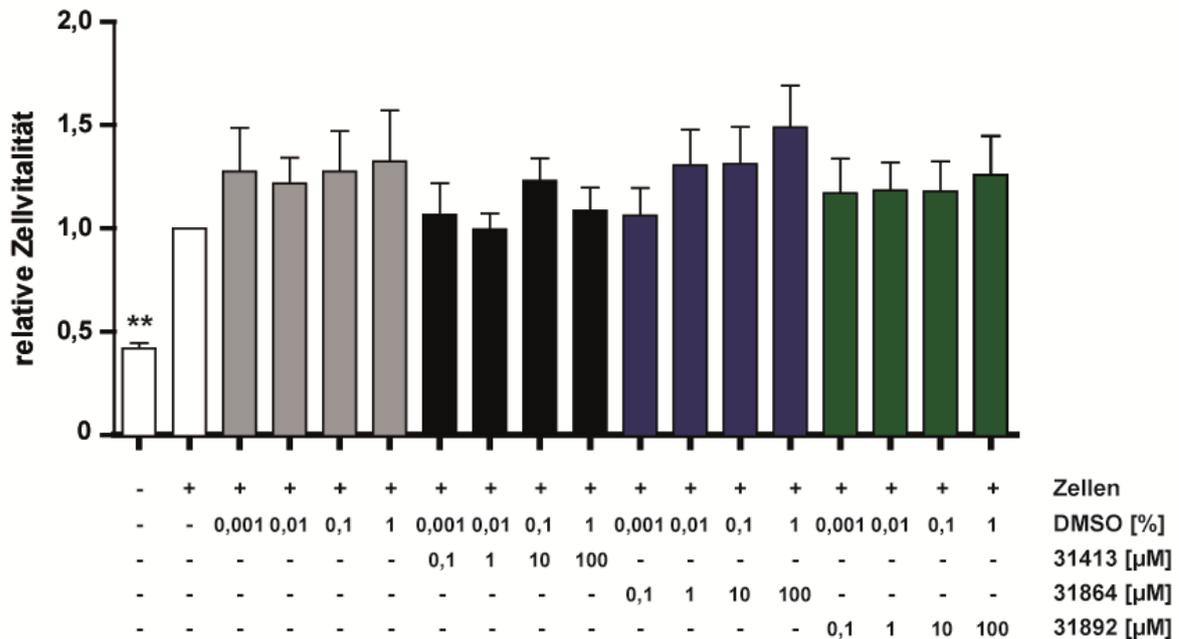


Abb. 3.13 Die Substanzen waren in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch: Der Unterschied in den Absorptionen von Resazurin und Resorufin (570 nm und 600 nm) des *AlamarBlue*-Reagenzes wurde die Redoxfähigkeit lebender 3T3-Zellen ermittelt. Die Hintergrundabsorption der Substanzen im Zellkulturmedium wurde als Maß für die maximal mögliche Toxizität bestimmt (weiß, - Zellen). Die Behandlung mit den Substanzen 31413 (schwarz), 31864 (blau) und 31892 (grün) zeigte keine toxische Wirkungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 µM. Zum Vergleich wurden unbehandelte (weiß, + Zellen) und DMSO-behandelte Zellen (grau) verwendet.

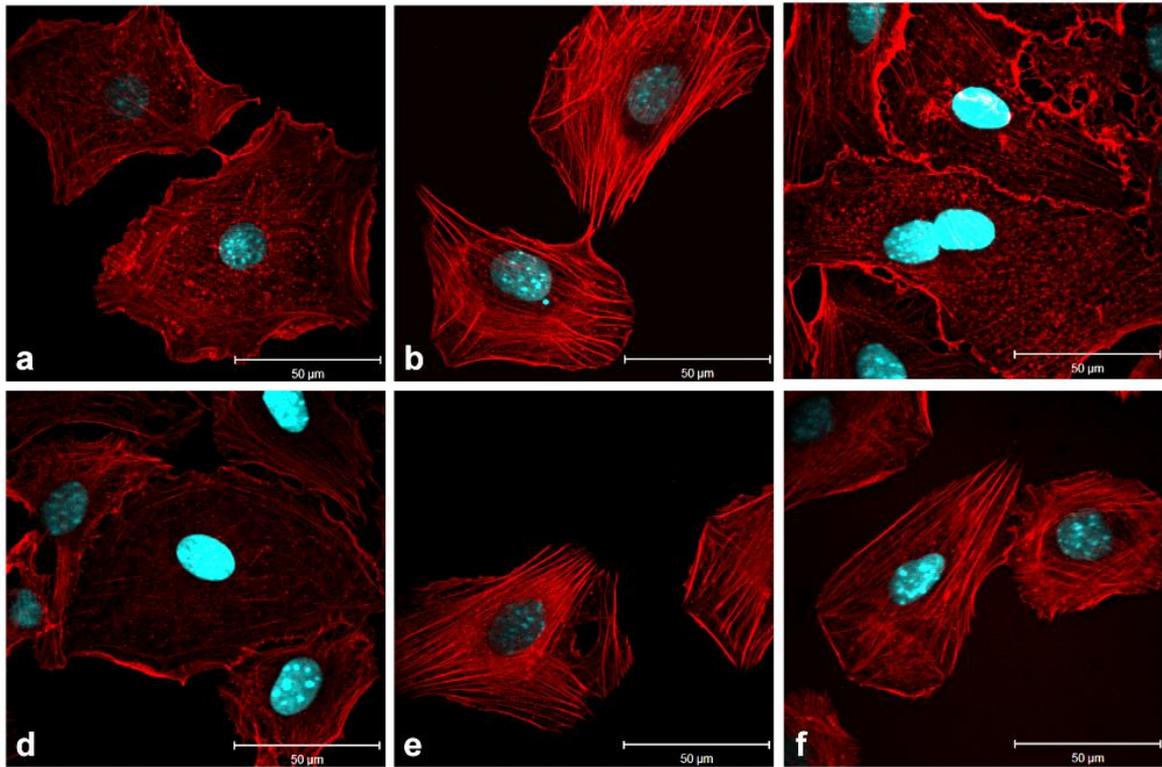
3.2.3 Zytoskelett-Umstrukturierung nach RhoA Aktivierung

Zur initialen Analyse der zellulären Effekte der Substanzen wurden 3T3-Zellen genutzt. Damit können sehr anschaulich durch GTPasen-Aktivierung auftretende Veränderungen des Zytoskeletts beobachtet werden. Die Zellen besitzen GPCR für den Liganden Lysophosphatidsäure (LPA). Eine Stimulation der Zellen mit LPA führt zur Aktivierung von RhoA und damit zur Ausbildung von fibrillären Aktinfilamenten (F-Aktin, Stressfasern). Innerhalb der Signaltransduktion über ein G-Protein der G $\alpha_{12/13}$ -Familie wurde die Beteiligung des AKAP-Lbc als Austauschfaktor für RhoA gezeigt (Diviani *et al.*, 2001).

3T3-Zellen wurden zunächst für 30 Minuten mit der Substanz 31413, 31864 oder 31892 (30 µM) behandelt und anschließend für zehn Minuten mit LPA stimuliert (300 nM). Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und für die Mikroskopie vorbereitet. Um die Stressfaserausbildung mikroskopisch darzustellen, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (TRITC-

Phalloidin) inkubiert, welches vorwiegend an oligo- und polymerisiertes Aktin bindet. Am *Laser-Scanning*-Mikroskop wurden die Präparate ausgewertet.

A)



B)

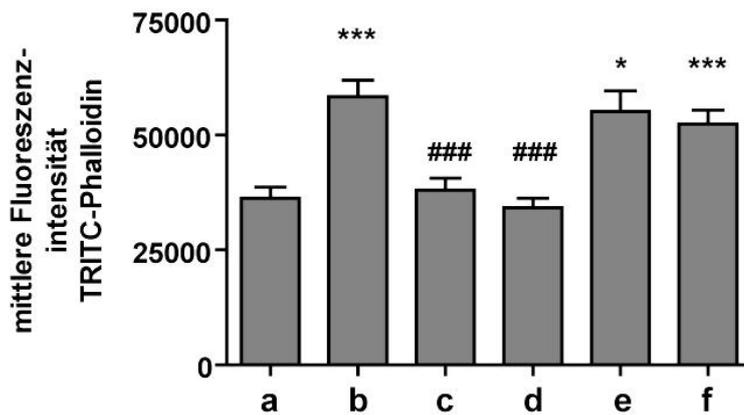


Abb. 3.14 Die Substanz 31413 hemmt die Lysophosphatidsäure-induzierte Stressfaserbildung in 3T3-Zellen: 3T3-Zellen wurden für 30 min mit der Substanz 31413, 31864 oder 31892 behandelt (30 µM) und anschließend für 10 min mit 300 nM Lysophosphatidsäure (LPA) stimuliert. Die Anfärbung des Aktin in den fixierten Zellen erfolgte mit TRITC-Phalloidin. Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (a) zeigte die Stimulation mit LPA (b) eine deutliche Ausbildung von Stressfasern als Folge der RhoA-Aktivierung. Behandlung mit dem C3_{lim}-Toxin (c) hemmte die LPA-induzierte RhoA-Aktivierung, keine Stressfasern waren zu erkennen. Von den Substanzen 31413 (d), 31892 (e) und 31864 (f) inhibierte nur 31413 in einer Konzentration von 30 µM die Stressfaserbildung. Quantifiziert nach der mittleren Fluoreszenzintensität des TRITC-Phalloidin bestätigte den optischen Eindruck, nach dem nur C3_{lim}-Toxin (c) und 31413 (d) die Fluoreszenzintensität signifikant (#) im Vergleich zur DMSO-LPA-Kontrolle (b) verringerten. Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA. Der signifikante Unterschied zur unbehandelten Kontrolle: ***, $p < 0.001$, *, $p < 0.05$. Die Signifikanzen zwischen der Gruppe DMSO+LPA (b) und C3_{lim} + LPA (c) bzw. 31413 + LPA (d) ###, $p < 0,001$

Unter Lösungsmittelkontrollbedingungen, d. h. nach Zugabe von DMSO anstelle von Substanz und ohne LPA-Stimulation, waren keine Stressfasern zu identifizieren (Abb. 3.14, a). Nach Behandlung mit

LPA war eine deutliche Ausbildung von Stressfasern (b) zu detektieren. Als Negativkontrolle wurde die *Clostridium limosum* C3-ADP-Ribosyltransferase (C3_{lim}) verwendet, welche durch ADP-Ribosylierung am Asparaginrest 41 des RhoA zu dessen Inhibierung führt. Die Polymerisation des Aktins wurde auch in Gegenwart von LPA gehemmt und demnach waren keine Stressfasern zu beobachten (Abb. 3.14, c). Von den drei gewählten Substanzen 31413, 31864 und 31892 zeigte lediglich 31413 die Unterdrückung der Stressfaserausbildung (d). Für 31864 (f) und 31892 (e) war die Ausbildung der Stressfasern vergleichbar mit der Kontrollbedingung DMSO+LPA (b). Das Diagramm (Abb. 3.14, B) veranschaulicht das Ergebnis der Immunfluoreszenzmessung nach Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität und bestätigte damit den optischen Eindruck. Es war eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Substanz 31413 (d) erkennbar, während sich keine Änderung nach Behandlung mit 31864 (f) und 31892 (e) zeigte.

3.2.4 Untersuchung der Substanzwirkung auf die GEF-induzierte RhoA-Aktivierung

Um den Mechanismus der Hemmung näher zu charakterisieren, wurde die Wirkung der Substanz 31413 auf verschiedene GEF untersucht. Zuerst erfolgten Untersuchungen mit an der RhoA-Aktivierung beteiligten G-Proteinen.

3.2.4.1 Rhotekin-Präzipitation

Mit einer Rho-Binderegion des Rhotekin-Proteins, eines Rho-Effektors, immobilisiert an Sepharose-Kügelchen sollte der Aktivierungszustand von RhoA in Ab- und Anwesenheit der Substanz 31413 ermittelt werden. Rhotekin bindet nur die aktivierte Form von RhoA, RhoA-GTP. Um die Wirkung der Substanz auf G-Protein-gekoppelte Rezeptorsignale zu überprüfen, die zur RhoA Aktivierung führen, wurden HEK293-Zellen zum einen mit einer konstitutiv aktiven Form der G_{α12}-Untereinheit (G_{α12}QL) bzw. mit AKAP-Lbc (für die G_{α12}-vermittelte RhoA-Aktivierung (Appert-Collin *et al.*, 2007)) und zum anderen mit einer konstitutiv aktiven G_{αq}-Untereinheit (G_{αq}RC) bzw. mit p63RhoGEF transfiziert. Das p63RhoGEF ist ein RhoA-selektiver Austauschfaktor und verknüpft die G_{αq}-gekoppelte Rezeptorsignale mit der Aktivierung von RhoA (Lutz *et al.*, 2005). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit der Substanz 31413 (50 μM) behandelt.

Mittels Rhotekin-Präzipitation und Western Blot wurde GTP-gebundenes RhoA nachgewiesen (Abb. 3.15). Im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen wurde in 31413-behandelten Zellen deutlich weniger aktiviertes, GTP-gebundenes RhoA detektiert (Abb. 3.15, A). Das präzipitierte RhoA-GTP wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit einem spezifischen RhoA-Antikörper detektiert.

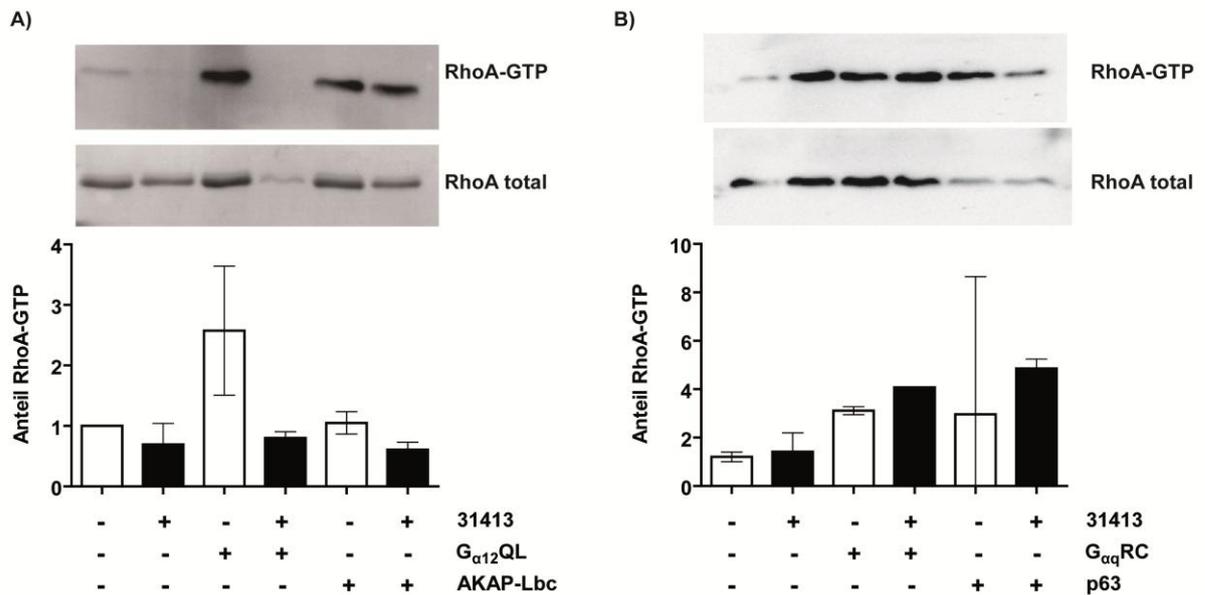


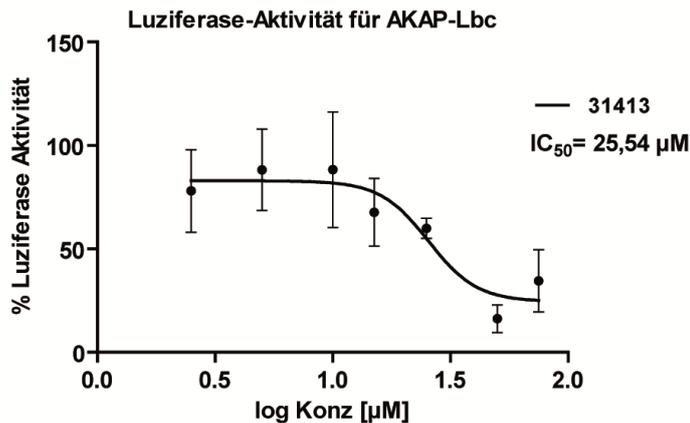
Abb. 3.15 Die Substanz 31413 hemmt G_{α12}- aber nicht G_{αq}-vermittelte RhoA-Aktivierung: Die Präzipitation von RhoA-GTP aus transfizierten HEK293-Zellen wurde mittels Rhotekin-Sepharose durchgeführt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit dem RhoA-spezifischen Antikörper (anti-RhoA) analysiert. A) In Gegenwart der Substanz 31413 (50 μM) war eine Reduktion der präzipitierten Menge an RhoA-GTP für G_{α12}-gekoppelte und AKAP-Lbc-vermittelte Aktivierung zu detektieren. B) Für G_{αq}RC bzw. für das p63RhoGEF war keine Reduktion der präzipitierten Menge an RhoA-GTP in Anwesenheit von 31413 im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne 31413 zu beobachten. Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA, ergab aber keine statistische Signifikanz.

Für G_{α12}-gekoppelte und AKAP-Lbc-vermittelte Aktivierung von RhoA wurde weniger RhoA-GTP in Gegenwart der Substanz 31413 (schwarze Balken) präzipitiert als in Gegenwart von DMSO (weiße Balken). Für G_{αq}RC bzw. für p63RhoGEF war kein Unterschied zwischen An- und Abwesenheit von 50 μM 31413 in der präzipitierten Menge an RhoA-GTP zu ermitteln. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Substanz 31413 die G_{α12}-, nicht aber G_{αq}-gekoppelte Aktivierung von RhoA beeinflusst.

3.2.4.2 Luziferase-basierte Detektion der RhoA-Aktivierung

Um auszuschließen, dass auch weitere RhoGEFs durch die Substanz in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wurden HEK293-Zellen mit verschiedenen RhoGEF-Konstrukten transfiziert. Zusätzlich wurden zwei Luziferase-Plasmide hinzugefügt, die für die *serum response element*- (SRE-) gekoppelten *firefly*-Luziferase bzw. für die *Renilla*-Luziferase als Normierungskontrolle kodieren. Die GEF-vermittelte Aktivierung von RhoA führt zur Stimulation des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF), welcher dann die Expression der SRE-gekoppelten Luziferase anschaltet. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit der Substanz 31413 behandelt und nach 24 h lysiert. Im Lysat wurden die Luziferase-Aktivitäten gemessen. Als erstes wurde die Wirkung von 31413 auf die AKAP-Lbc-vermittelte RhoA/SRF-Aktivierung konzentrationsabhängig untersucht (Abb. 3.16, A). Die Luziferase-Aktivität wurde in Abhängigkeit der Konzentration von 31413 gehemmt und ein IC₅₀-Wert von ca. 25 μM, vergleichbar mit dem aus dem Nukleotidaustauschexperiment, ermittelt.

A)



B)

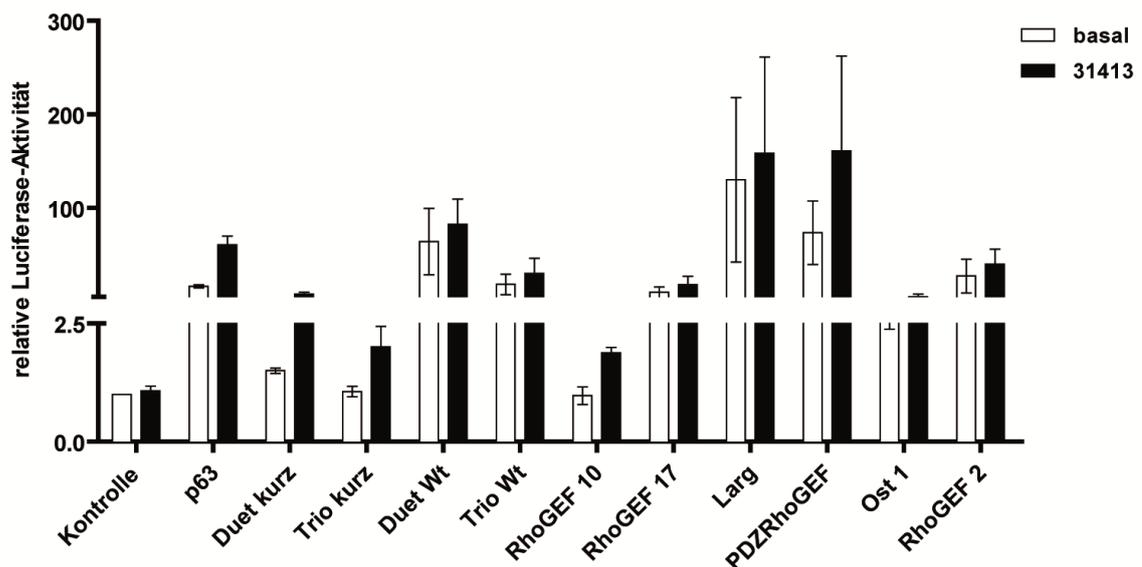


Abb. 3.16 Die Substanz 31413 hemmt die AKAP-Lbc-vermittelte SRE-induzierte Luziferase-Aktivität: Es wurde die Luziferase-Aktivität im Lysat von mit den jeweiligen GEF transfizierten HEK293-Zellen gemessen. A) Eine konzentrationsabhängige Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten Luziferase-Aktivierung durch die Substanz 31413 wurde beobachtet. Der ermittelte IC₅₀ (25,54 µM) war vergleichbar mit dem aus dem Nukleotidaustauschexperiment B) Alle anderen RhoGEFs schienen völlig unbeeinflusst durch die Anwesenheit der Substanz (50 µM). Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA, ergab aber keine statistische Signifikanz.

Darüber hinaus wurde die Luziferase-Aktivität vermittelt durch die in Abb. 3.16 (B) angegebenen RhoGEFs in An- bzw. Abwesenheit von 50 µM 31413 analysiert. Keines dieser GEF zeigte eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität nach Behandlung mit der Substanz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Diese Daten lassen auf spezifische Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten Aktivierung von RhoA schließen.

Mit Blick auf die Wechselwirkung zwischen AKAP-Lbc und RhoA und deren Beteiligung an der α -adrenerg-induzierten Herzmuskelhypertrophie (Appert-Collin *et al.*, 2007) wurden Untersuchungen des Inhibitor-kandidaten 31413 an neonatalen Kardiomyozyten angeschlossen.

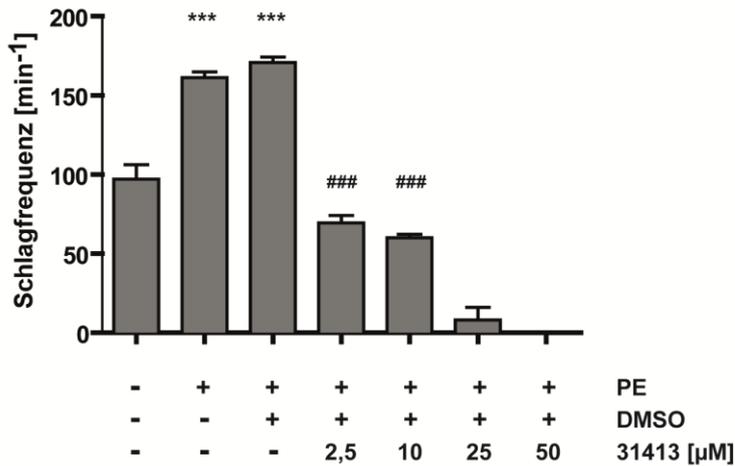
3.2.5 Untersuchungen an kultivierten Kardiomyozyten

3.2.5.1 Der Einfluß der Substanz 31413 auf die Schlagfrequenz von kultivierten Kardiomyozyten

Um den Zusammenhang zwischen der AKAP-Lbc-induzierten RhoA-Aktivierung und der Kontraktilität des Herzen zu untersuchen, wurden isolierte neonatale Kardiomyozyten aus der Ratte verwendet. Nach einer chronischen Stimulation der α 1-Adrenorezeptoren (AR) mit dem spezifischen Agonist Phenylephrin (PE) über sechs Stunden wurden die Schläge der Kardiomyozyten über 15 Sekunden ausgezählt und auf eine Minute berechnet. Es wurde eine Erhöhung der Schlagfrequenz der Kardiomyozyten von 100 Schlägen/Minute auf ungefähr 160 Schlägen/Minute beobachtet. Die Behandlung der Zellen mit 2,5 μ M der Substanz 31413 führte zur Normalisierung der Herzrate. Mit deutlich höheren Konzentrationen (25 und 50 μ M) war ein Stillstand erreicht (Abb. 3.17, A).

In Kooperation mit J. Eichhorst und B. Wiesner am FMP wurden zusätzlich Kalziummessungen durchgeführt. Hierfür wurden die Kardiomyozyten mit 2,5 μ M der Substanz für 30 Minuten präinkubiert. Nach 20 Minuten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 zugegeben. Fluo-4 ist ein Kalziumsensor, der zur Untersuchung von Kalziumanstiegen in der Zelle verwendet wird. In Herzzellen diente er der Untersuchung der Kontraktilität. Während der Kontraktion und anschließender Relaxation treten Konzentrationsunterschiede an Ca^{2+} -Ionen im Zytosol der Herzzellen auf. Mit einem Anstieg an zytosolischen Ca^{2+} steigt die Fluoreszenzintensität des Fluo-4, eine Reduktion an Ca^{2+} schlägt sich in einer verminderten Fluo-4-Fluoreszenz nieder. Aus der Oszillation der Fluo-4-Fluoreszenz lässt sich dann durch zeitabhängige Analyse eine Frequenz ermitteln. Gemessen wurden die Zellen jeweils über einen Zeitraum von ca. zwei Minuten. Ausgewertet wurde der Grundzustand zum Zeitpunkt vor Applikation (schwarz) sowie die Zeitabschnitte 10-30 sec (grau) und 70-110 sec nach der Applikation (weiß). Applikation bezeichnet die Zugabe von Puffer (Kontrollzellen und den 31413-behandelten Zellen) bzw die Zugabe von PE oder Adrenalin. Die Stimulation mit PE und Adrenalin führte zu einem Anstieg der Frequenz von 100 auf 150 Schläge/Minute für PE bzw. 200 Schläge/Minute für Adrenalin. Die Vorinkubation mit 2,5 μ M der Substanz 31413 hemmte nur die PE-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz, nicht die Adrenalin-vermittelte. Dies deutet auf eine Beeinflussung von α -AR-induzierten Signalen hin, da durch Adrenalin zum größten Teil β -Adrenorezeptoren beeinflusst werden. Die Ergebnisse der manuellen Bestimmung der Schlagfrequenz (Abb. 3.19, A) und die Ermittlung derselben aus den Kalziummessungen (Abb. 3.19, B) stimmten gut überein und zeigten eine negativ chronotrope Wirkung der Substanz 31413 nach α -adrenerger Stimulation.

A)



B)

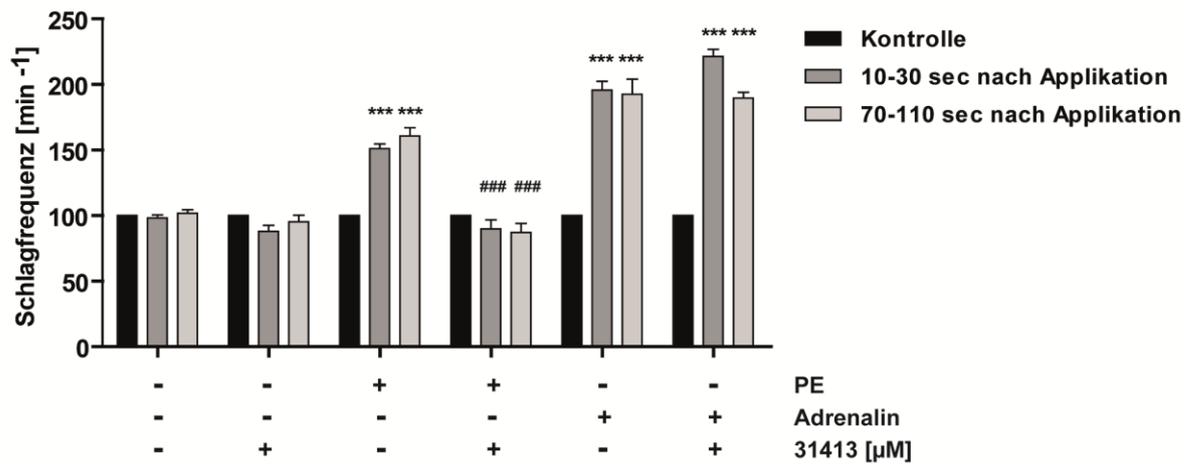


Abb. 3.17 31413 hemmt die α -AR-induzierte Schlagfrequenz von neonatalen Kardiomyozyten: A) Die Schlagfrequenz von neonatalen Kardiomyozyten wurde am Lichtmikroskop ausgezählt. Prästimulation mit dem α -Agonisten Phenylephrin (PE) erhöhte die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten von 100 Schlägen pro Minute auf 160 Schläge pro Minute. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO+ PE) zeigte das gleiche Resultat. In Gegenwart von 2,5 μM und 10 μM 31413 wurde der Normalwert von ca. 100 Schlägen pro Minute auch in Gegenwart von PE erreicht. Bei 25 und 50 μM schlugen die Zellen nicht mehr. B) Zusätzlich wurden Kalziummessungen durchgeführt. Anhand der zeitlichen Änderung der Fluoreszenzintensität des Kalziumsensors Fluo-4 konnte eine Schlagfrequenz ermittelt werden. Es wurde jeweils die Schlagfrequenz der Zellen im Grundzustand analysiert (schwarze Balken), zehn bis 30 Sekunden (grau) und 70 bis 110 Sekunden nach Applikation von Puffer (Kontrolle, 31413) bzw. nach Zugabe der Hormone Phenylephrin (PE) und Adrenalin mit oder ohne Vorbehandlung mit der Substanz 31413. Es wurde eine Erhöhung der Frequenz von 100 Schlägen/Minute auf 150 (für PE) bzw. 200 Schläge/Minute (für Adrenalin) beobachtet. Eine Präinkubation mit 2,5 μM der Substanz 31413 hemmte nur die PE-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz. Die statistische Auswertung erfolgte nach ANOVA. Der signifikante Unterschied zur unbehandelten Kontrolle: ***, $p < 0.001$. Die Signifikanzen zwischen der Gruppe PE und PE+ 31413: ###, $p < 0,001$.

4 Diskussion

4.1 Kleine Moleküle als Werkzeuge

Neben Peptiden und Peptidomimetika, die häufig zur Hemmung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden, rücken auch niedermolekulare, organische Substanzen immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. Im Vergleich zu Peptiden besitzen kleine Moleküle eine deutlich geringere Größe und sie sind gegenüber proteolytischem Abbau meist stabiler als Peptide. Durch die bessere Membranpermeabilität und größere Stabilität sind niedermolekulare Substanzen für zell-basierte Versuchsansätze und Anwendungen im Tierversuch häufig geeigneter als peptid-basierte Wirkstoffe (Arkin *et al.*, 2004; Arkin *et al.*, 2009). Sie sind generell billiger und wirken schneller und spezifischer als RNA-Interferenz-basierte Strukturen (RNA_i), die durch Hemmung der mRNA den gesamten Proteinkomplex beeinflussen. Niedermolekulare Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zu erhalten ist allerdings eine enorme Herausforderung, da die Kontaktfläche von PPI (~1,500–3,000 Å²) deutlich größer als die zwischen Protein und kleinem Molekül (~300–1,000 Å²) ist. Dem kommt zugute, dass kleine Moleküle eine spezifische Region der Proteinoberfläche besetzen können, die sogenannten *hotspots*, welche den Hauptanteil der Bindungsenergie der PPI ausmachen (Arkin *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2007). Allerdings sind niedermolekulare, organische Wirkstoffe häufig das Ergebnis von Hochdurchsatzsuchen großer Substanzbibliotheken, während Peptide und auch Peptidomimetika ausgehend von der Primärstruktur eines der zu inhibierenden Proteine i.d.R. rational entwickelt werden. Für die struktur-basierte Generierung eines niedermolekularen Inhibitors fehlt oftmals eine Struktur der untersuchten Protein-Protein-Wechselwirkung. Eine Ausnahme ist z.B. die Substanz NSC23766, die anhand der GEF-Bindungsfläche der kleinen GTPase Rac entwickelt wurde, um die Wechselwirkungen von Rac mit seinen Austauschfaktoren TrioN und Tiam zu unterbinden (Gao *et al.*, 2004).

Um neu entdeckte Substanzen trotzdem als Hilfsmittel zur spezifischen Inhibition benutzen zu können, sollten Effektorproteine sowie ihr Wirkmechanismus zuvor gut untersucht werden.

4.1.1 Die identifizierte Substanz 31413 hemmt den AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotidaustausch von RhoA

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen ein Nukleotidaustauschexperiment für die Identifizierung von Inhibitoren der AKAP-Lbc-katalysierten Aktivierung von RhoA zu etablieren. Um den Zeit- und Materialaufwand für das eigentliche *Screening* so gering wie möglich zu halten, wurde das Experiment an das 384-Lochformat adaptiert. Die Katalyse der Dissoziation von GDP und RhoA durch AKAP-Lbc, sowie die anschließende Bindung von GTP konnten mithilfe eines fluoreszenzmarkierten Analogons von GTP, mGTP, beobachtet werden. Die Anregung dieses Fluorophors erfolgt mit Licht einer Wellenlänge aus dem blauen Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Hieraus resultiert die Möglichkeit im *Screening* auch solche Moleküle als potenzielle Inhibitoren zu erhalten, welche Licht im blauen Wellenlängenbereich absorbieren. Um solche Moleküle mit konstanter Eigenabsorption auszuschließen, wurde im Hochdurchsatzexperiment dieser Arbeit die Steigerung der Fluoreszenz über einen definierten Zeitabschnitt von elf Minuten analysiert. Die detektierte Steigerung entspricht

somit der Bindung des Triphosphats an die GTPase in Gegenwart des GEF. Aus der getesteten Substanzbibliothek konnten drei potenzielle Hemmstoffkandidaten (31413, 31864 und 31892) identifiziert werden, die den Fluoreszenzanstieg unterdrückten. In einem Folgeexperiment konnte die Wirkung der drei Kandidaten validiert werden, wobei die Substanz 31413 mit 25 μM die beste mittlere, inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) aufwies (Tabelle 3.2; Abb. 3.9)

Ein Nachteil des durchgeführten *Screenings* ist, dass es keine Rückschlüsse auf das Zielprotein oder den Wirkungsmechanismus der potenziellen Hemmstoffkandidaten erlaubt. Mögliche Mechanismen könnten sein, dass ein Molekül den AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotidaustausch von RhoA durch (1) Bindung der AKAP-Lbc-Bindestelle im RhoA, durch (2) Bindung der RhoA-Bindestelle im AKAP-Lbc, durch (3) allosterische Bindung und Auslösung einer Konformationsänderung in RhoA oder AKAP-Lbc, durch (4) Bindung an beide Proteine oder durch (5) kovalente Modifikation eines der beiden Proteine inhibiert. Um den tatsächlichen Mechanismus des Moleküls 31413 aufzudecken, erfolgten in der vorliegenden Arbeit weitere Schritte zur näheren Charakterisierung dieser Substanz (siehe Abb. 3.10 bzw. 4.1.2).

4.1.2 Erste Hinweise auf eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung für die potenziellen Inhibitoren des AKAP-Lbc-katalysierten Nukleotidaustausches von RhoA

Aus Experimenten mit strukturell ähnlichen Substanzen konnten erste Ansätze zur Rolle bestimmter Seitenketten oder Ringsysteme der Substanzen 31413, 31864 und 31892 abgeleitet werden, welche für eine Wechselwirkung mit AKAP-Lbc oder RhoA von Bedeutung sein könnten.

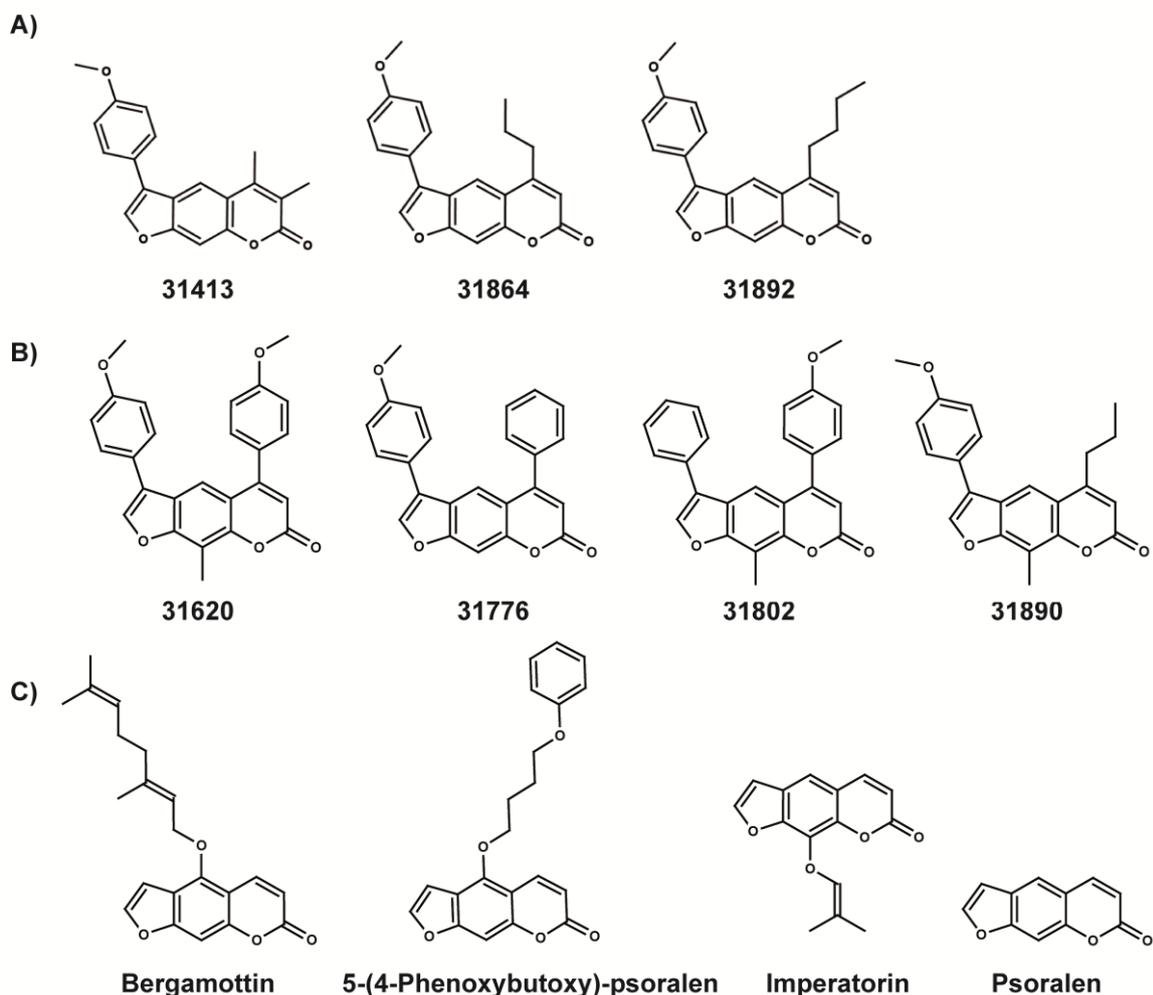


Abb. 4.1: Eine Methoxyphenylgruppe am Fünfring scheint wichtig für die Hemmung des Nukleotidaustausches von RhoA: A) 31413, 31864 und 31892 inhibierten den durch AKAP-Lbc katalysierten Nukleotidaustausch von RhoA. B) Die den Substanzen unter A) strukturell ähnlichen Verbindungen aus der *Screening*-Bibliothek zeigten keine Hemmung. C) Die dargestellten Naturstoffe hemmten den Nukleotidaustausch im Konzentrationsbereich bis 100 μM nicht.

Alle getesteten Substanzen (Abb. 4.1, A, B und C) sind Derivate von Psoralen (Abb. 4.1, C), einem Furocoumarin, bestehend aus einem Coumarin-Grundgerüst mit einem Furanring. Zwei bereits als Wirkstoffe beschriebene Moleküle sind Bergamottin, ein Inhibitor der Cytochrom-P450-Enzyme, der den oxidativen Abbau von Medikamenten oder Giftstoffen blockieren kann (Bailey *et al.*, 2003), sowie Imperatorin, dessen hemmende Wirkung auf Herzmuskelhypertrophie gezeigt, der Mechanismus jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010).

Die chemischen Grundbausteine Coumarin und Psoralen zeigten keine Hemmung des AKAP-Lbc-vermittelten Nukleotidaustausches von RhoA (siehe Abb. 3.10). Dieses Ergebnis impliziert, dass eine etwas längere Seitenkette am Grundgerüst für die Bindung an das Zielprotein notwendig sein könnte. Der Vergleich der den Nukleotidaustausch hemmenden Substanzen (Abb. 4.1, A) mit strukturell ähnlichen, nicht-inhibierenden Molekülen (Abb. 4.1, B) legt die Vermutung nahe, dass ein zusätzlicher Phenylrest am äußeren Sechsring des Grundgerüsts bzw. eine Methylgruppe am mittleren Ring die inhibierende Wirkung negativ beeinflussen. Für Imperatorin, 5-(4-Phenoxybutoxy)-psoralen und Bergamottin konnte für den AKAP-Lbc-katalysierten Nukleotidaustausch von RhoA im Konzentrationsbereich bis maximal 100 μM , der durch die Löslichkeit der getesteten Substanzen bedingt war, kein IC_{50} ermittelt werden. Allerdings war für hohe Konzentrationen (75 bzw. 100 μM) eine Tendenz zur Hemmung zu vermuten, so dass eine mögliche Inhibition durch Imperatorin, 5-(4-Phenoxybutoxy)-psoralen und Bergamottin nicht gezeigt aber auch nicht ausgeschlossen werden kann.

Derzeit sind das Zielprotein und der Hemmmechanismus von 31413 (sowie auch für 31864 und 31892) noch unbekannt. In Kooperation mit der Gruppe von S. Knapp (*University of Oxford*) wird derzeit mittels Isothermer Titrationskalorimetrie und kristallographischen Methoden an der Identifikation der Bindestelle von 31413 gearbeitet. Der Erhalt und die Untersuchung des Komplexes von Protein und Substanz wäre ein wichtiger Schritt um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen besser zu verstehen. 3-Dimensionale Aufnahmen des Komplexes könnten wichtige Hinweise auf den *hotspot* der Wechselwirkung zwischen 31413 und Zielprotein geben, um so auch den Mechanismus der spezifischen Interaktion zwischen AKAP-Lbc und RhoA näher zu charakterisieren.

4.1.3 Die Substanz 31413 wirkt spezifisch auf die AKAP-Lbc-vermittelte RhoA-Aktivierung in eukarotischen Zellen

Nach den *in vitro*-Untersuchungen (siehe 3.1.4) zur Inhibition der RhoA-Aktivierung sollte die Wirkung der Substanzen 31413, 31864 und 31892 auf zellulärer Ebene untersucht werden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Moleküle in wässrigen Lösungen nur sehr begrenzt löslich sind (siehe 3.2.2). Da die Substanzen bei Konzentrationen von 100 μM in wässriger Lösung bereits präzipitierten, wurde davon ausgegangen, dass eine Endkonzentration von 90 μM einer gesättigten wässrigen Lösung entspricht. Bei Zellexperimenten sollte der Gehalt an DMSO im Medium nicht über 2 % (v/v) liegen, wodurch der testbare Konzentrationsbereich der Substanzen auf bis zu 90 μM limitiert war.

Als Nachweis für den Einfluss auf die RhoA-Aktivierung wurde die Wirkung der drei Substanzen auf das zelluläre Zytoskeletts, spezieller die Ausbildung von Stressfasern in 3T3-Zellen nach RhoA-Aktivierung mittels LPA, mikroskopisch untersucht. Die Substanz 31413 inhibierte signifikant die Ausbildung von Stressfasern (Abb. 3.14, d). Im getesteten Konzentrationsbereich von bis zu 90 μM wurde für die Substanzen 31864 und 31892 jedoch kein Effekt beobachtet (Abb. 3.14, e und f). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die untersuchten Konzentrationen für eine deutlich nachweisbare Wirkung von 31864 und 31892 zu gering waren. Diese Annahme wird durch die gemessenen IC_{50} -Werte der Substanzen im *in vitro*-Assay (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.9) gestützt, der für 31413 einen Wert von 25 μM ergab, wohingegen für 31864 und 31892 Werte von 40 bzw. 79 μM ermittelt wurden. Eine Inhibierung der RhoA-Aktivierung durch 31864 und 31892 kann demnach zwar nicht ausgeschlossen werden, aufgrund der zumindest deutlich schwächeren Wirkung von 31864 und 31892 wurden nachfolgende Zellexperimente jedoch nur mit der Substanz 31413 durchgeführt.

Nach dem grundsätzlichen Nachweis der Hemmung durch 31413 in Zellen wurde anschließend seine Spezifität genauer untersucht. Um die Wirkung der Substanz auf $G_{\alpha_{12}}$ -gekoppelte Rezeptorsignale zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form der $G_{\alpha_{12}}$ -Untereinheit ($G_{\alpha_{12}}\text{QL}$) bzw. mit AKAP-Lbc (für die $G_{\alpha_{12}}$ -vermittelte RhoA-Aktivierung (Appert-Collin *et al.*, 2007)) transfiziert. Mittels Rhotekin-Präzipitation und Western Blot wurde GTP-gebundenes RhoA nachgewiesen (Abb. 3.15). Im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen wurde in 31413-behandelten Zellen deutlich weniger aktiviertes, GTP-gebundenes RhoA detektiert (Abb. 3.15, A). Bei Zellen in denen die konstitutiv aktive G_{α_q} -Untereinheit ($G_{\alpha_q}\text{RC}$) oder der G_{α_q} -vermittelnde RhoA-Aktivator p63RhoGEF überexprimiert wurde, zeigte die Substanz keinen Effekt auf die RhoA-Aktivierung. Das p63RhoGEF ist ein RhoA-selektiver Austauschfaktor und verknüpft die G_{α_q} -gekoppelte Rezeptorsignale mit der Aktivierung von RhoA (Lutz *et al.*, 2005). Abschließend kann festgestellt werden, dass die $G_{\alpha_{12}}$ -vermittelte und nicht G_{α_q} -gekoppelte Aktivierung von RhoA durch die Substanz 31413 gehemmt wird. Um statistische Signifikanzen zu ermitteln, muss das Experiment jedoch erneut durchgeführt werden. Ferner wurde die Wirkung der Substanz 31413 auf die GEF/RhoA-vermittelte, SRE-gesteuerte Luziferase-Expression analysiert. In diesem Experiment konnten neben AKAP-Lbc weitere RhoGEF auf ihre RhoA-Aktivierung in Gegenwart des Inhibitors 31413 untersucht. 31413 hemmte hierbei die AKAP-Lbc-induzierte RhoA-Aktivierung. Der IC_{50} -Wert betrug 25 μM (RhoA-vermittelte SRE-Aktivierung; Abb. 3.16, A). Dieser Wert bestätigte den im Nukleotidaustauschexperiment mit den rekombinanten Proteinen ermittelten IC_{50} -Wert (Tab. 3.2, Abb. 3.9). Für die anderen RhoGEF wurde durch die Zugabe von 31413 keine Beeinflussung der RhoA/SRF-stimulierten Luziferase-Aktivitäten detektiert (Abb. 3.16, B). Die Vermutung liegt nahe, dass das Zielprotein der Substanz auf Seiten des AKAP-Lbc zu suchen ist, wenn die RhoA-Aktivierung durch andere RhoGEF in Gegenwart der Substanz 31413 nicht beeinflusst ist. Die getesteten RhoGEF gehören alle der Dbl-Familie an und besitzen eine DH-Domäne und ein C-terminal angrenzende PH-Domäne (Zheng, 2001). Die katalytischen Domänen von anderen GTPase-Austauschfaktoren wie RasGEFs (Vigil *et al.*, 2010) oder auch EPAC (Bos, 2006) weisen keine signifikante Sequenzhomologie zur DH-Domäne von RhoGEF auf (Zheng, 2001). Die Struktur der DH-Domäne besteht aus drei konservierten Bereichen (CR1-CR3), von denen CR1 und CR3 sowie die Helix α_6 die Interaktion mit der GTPase vermitteln

(Rossman *et al.*, 2005). Für die Bildung der spezifischen RhoGEF-GTPase-Paarungen scheinen allerdings auch Aminosäuren des nicht-konservierten Teils der DH-Domäne eine wesentliche Rolle zu spielen (Cheng *et al.*, 2002). Das Ergebnis des Luziferase-basierten Experiments belegt, dass 31413 eine spezifische Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten Rho-Aktivierung hervorruft. Für die Hochdurchsatzsuche wurde ein Fragment (AKAP-Lbc DHPH, Aminosäuren 1923-2336) verwendet, was im Wesentlichen die DHPH-Domäne des AKAP-Lbc plus 40 Aminosäuren N-terminal der GEF-Domäne umfasst. Es sollte untersucht werden, ob es sich um eine allosterische Wechselwirkung zwischen der Substanz 31413 und dem Zielprotein (vermutlich AKAP-Lbc) handelt. Wichtige Hinweise sollen die Untersuchungen bringen, die gegenwärtig in Kooperation mit der Gruppe von S. Knapp (*University of Oxford*) durchgeführt werden.

Darüber hinaus könnte im Zuge der Untersuchungen der Spezifität ein möglicher Einfluss auf andere GTPasen oder Isoformen von Rho überprüft werden, wobei ein AKAP-Lbc-vermittelter Nukleotidaustausch für RhoA, nicht aber für Rac oder Cdc42 gezeigt wurde (Diviani *et al.*, 2001).

4.1.4 Die Wirkung der identifizierte Substanz 31413 auf die RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten

Die Aktivierung der GTPase RhoA wird mit der durch α_1 -AR (Maruyama *et al.*, 2002), Endothelin-1 (ET-1)- oder Angiotensin-Rezeptoren induzierten Hypertrophie von Kardiomyozyten in Verbindung gebracht (Charron *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 2005). AKAP-Lbc stimuliert hierbei die Aktivierung von RhoA und ist folglich direkt an der Vermittlung der Signale beteiligt (Appert-Collin *et al.*, 2007).

Um den Einfluss der Substanz 31413 auf den α -adrenergen Signalweg näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche an neonatalen Kardiomyozyten der Ratte durchgeführt, für die eine Expression des α_1 -Adrenorezeptors bekannt ist (Barki-Harrington *et al.*, 2004)

Durch Zugabe von Phenylephrin, welches spezifisch die α_1 -AR-Signalkaskade aktiviert, wurde die Kontraktilität der Kardiomyozyten um 60 % gesteigert (Abb. 3.17). Dies entspricht der chronotropen Reaktion von Herzmuskelzellen nach α_1 -adrenerger Stimulation (Steinberg *et al.*, 1985). In Anwesenheit von Phenylephrin und 2,5 μ M 31413 wurde im Vergleich zu Phenylephrin-behandelten Kontrollzellen bereits eine deutliche Reduktion der Kontraktionsfrequenz beobachtet (Abb. 3.19, A). Die Ergebnisse der observativen Kontraktilitätsuntersuchungen wurde durch Analysen der Ca^{2+} -Konzentrationen in den Kardiomyozyten bestätigt (siehe Abb. 3.17, B).

Die Behandlung der Kardiomyozyten mit der Substanz in einer Konzentration 25 bzw. 50 μ M führte zum Verlust der α -AR-induzierten Kontraktion, was möglicherweise damit einhergeht, dass der Anteil der α -AR einem Zehntel der Menge von β -AR in Kardiomyozyten entspricht und damit den Effekt auf die kontraktile Funktion der Muskelzellen limitiert (Barki-Harrington *et al.*, 2004; Rockman *et al.*, 2002). Auf die Adrenalin-induzierte Erhöhung der Schlagfrequenz hatte die Substanz 31413 hingegen keinen Einfluss (Abb. 3.17, B). Dies ist dadurch zu erklären, dass Adrenalin neben α - als auch β -AR bindet und die dadurch erzielte Kontraktilitätssteigerung folglich nicht nur über die RhoA-Signalkaskade sondern hauptsächlich über das cAMP/PKA-System (Rockman *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass 31413 die Adrenalin-induzierte Kontraktion nicht hemmt, ist demnach ein weiterer Beleg für die spezifische Wirkung des Moleküls auf den α -AR-induzierten RhoA-Signalweg. Dies impliziert, dass auch die α -AR-ausgelöste Hypertrophie beeinflusst werden könnte.

Eine kardiale Hypertrophie geht einher mit der Hyperregulation fetalen Genprogramms, genauer mit den Genen, die u.a. für den atrial natriuretischen Faktor (ANF), *beta-myosin heavy chain* (β -MHC) und α -Skelettmuskelaktin (SKA) kodieren, kontraktile Proteine, die normalerweise in embryonalen Kardiomyozyten vorkommen (Carreno *et al.*, 2006). Die Genprodukte sind 6 bis 12 Stunden nach der Stimulation nachzuweisen. Um die potentielle Eignung der Substanz 31413 als Wirkstoff gegen Herzhypertrophie näher zu untersuchen, sollte zukünftig mittels quantitativer *Realtime-PCR* die Wirkung der Substanz auf die α -adrenerg-induzierte, AKAP-Lbc-vermittelte Hypertrophie von Kardiomyozyten getestet werden. Hemmt die Substanz den Anstieg von Hypertrophie-Markern wie ANF oder SKA in diesem Zell-Modell, wäre eine Applikation im Tierversuch denkbar. Ein geeignetes und etabliertes Modell für solche Untersuchungen am Tier wäre das *transaortic constriction*-(TAC)-Modell in Ratten. Infolge einer operativen Konstriktion der Aorta entwickeln die Tiere eine Herzhypertrophie. Mithilfe dieses Modells könnte getestet werden, welche Beeinflussung eine präventive Gabe von 31413 auf die Entwicklung der Herzhypertrophie oder eine therapeutische Anwendung von 31413 auf die bestehende Hypertrophie hat.

Ferner ist die AKAP-Lbc-vermittelte RhoA-Aktivierung beteiligt an der ET-1- und Angiotensin-stimulierten Entwicklung der Herzhypertrophie (Appert-Collin *et al.*, 2007). Daher wäre ein Einfluss der Substanz 31413 auf die Expression von Hypertrophie-Markern auch nach ET-1- und Angiotensin-Stimulation zu erwarten.

4.1.5 31413 als *Tool* zur Charakterisierung von Funktionen in anderen Zellsystemen

Die, soweit getestet, spezifische Hemmung der AKAP-Lbc-vermittelten RhoA-Aktivierung ermöglicht es die Substanz als Hilfsmittel für Untersuchungen zur Funktion von AKAP-Lbc/RhoA-Signalwegen in verschiedenen Zellsystemen einzusetzen.

Eine interessante Anwendung wäre der Test der Substanz in Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere, Hauptort der Vasopressin (AVP)-induzierten Wasserrückresorption. AVP induziert durch Bindung an den Vasopressin-2-Rezeptor (V2R) die Aktivierung des $G_{\alpha s}$ /AC/PKA-Systems. Die cAMP-aktivierte PKA phosphoryliert den Wasserkanal Aquaporin 2 (AQP2) und fördert dadurch die Translokation von AQP2 von intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran. In der Plasmamembran vermittelt AQP2 die Wasserrückresorption aus dem Sammelrohr (Klussmann *et al.*, 1999; Nedvetsky *et al.*, 2009). Die Behandlung von renalen Hauptzellen mit dem Ht31-Peptid, welches die Bindung der PKA an AKAPs verhindert, erhöht die Menge an AQP2 in der Plasmamembran (Klussmann *et al.*, 1999), was für eine Beteiligung eines AKAPs am Prozess der AQP2-Translokation spricht.

Eine Inhibition von RhoA und damit eine verminderte Stressfaserausbildung induziert unabhängig von AVP eine Umverteilung von AQP2 zur Plasmamembran (Klussmann *et al.*, 2001b; Tamma *et al.*, 2003). Die Behandlung der renalen Hauptzellen mit Fluvastatin, ein HMG-Co-A-Reduktase-Hemmer, der infolge der Inhibition der Cholesterolsynthese die Lipidmodifikation von RhoA und damit dessen Aktivität unterdrücken kann, führte zu einer deutlich erhöhten Menge an AQP2 in der apikalen Plasmamembran (Procino *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse implizierten, dass RhoA an der AQP2-Umverteilung beteiligt ist. Die Substanz 31413 könnte als spezifischer Inhibitor dazu benutzt werden, zu testen, ob AKAP-Lbc an der RhoA-Aktivierung und der dadurch bedingten Stressfaserausbildung in

renalen Hauptzellen beteiligt ist, welche die AVP-vermittelte Translokation des Wasserkanals zur Plasmamembran inhibiert.

4.2 Rolle von AKAP-Lbc und RhoA bei verschiedenen Erkrankungen

AKAP-Lbc- und RhoA-vermittelte Signale haben in zahlreichen zellulären Prozessen eine besondere Bedeutung. Eine Fehlfunktion ist häufig assoziiert mit der Entwicklung von Erkrankungen. Beispiele sind nicht nur im kardiovaskulären Bereich zu finden, auch in neurologischen Störungen und im Verlauf von Krebserkrankungen. Welchen Einfluss die identifizierte Substanz auf die Therapie haben könnte, soll im Folgenden erläutert werden.

4.2.1 Einfluss von AKAP-Lbc und RhoA bei Herzmuskelhypertrophie

Das Herz reagiert auf Verletzungen und Stress durch erhöhte neurohormonelle Stimulation mit der Aktivierung von einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege, welche die Wiederanschaltung des fetalen Genprogramms, die Muskelzellhypertrophie und eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix im adulten Organismus hervorrufen (Carnegie *et al.*, 2011; Negro *et al.*, 2008). Herzhypertrophie tritt häufig assoziiert mit verschiedenen Herzerkrankungen, einschließlich Bluthochdruck und Herzinsuffizienz, auf (Carreno *et al.*, 2006).

In vitro-Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozyten mit α 1-AR-Antagonisten implizierten einen Zusammenhang zwischen der Stimulation α 1-adrenerger Rezeptoren und den molekularen und morphologischen Charakteristika einer Herzmuskelhypertrophie (Knowlton *et al.*, 1993). Die Auswirkungen des sympathischen Nervensystems auf die Kontrolle der Herzfunktion sind weitgehend bekannt. Die Hormone Adrenalin und Noradrenalin induzieren Signalwege über adrenerge GPCR (AR), welche die Kontraktionsfrequenz (Chronotropie) bzw. -Stärke (Inotropie) von Muskelzellen beeinflussen. Die β -AR sind wesentlich an der Regulation der Herzmuskelkontraktion über G α s/AC/PKA-vermittelte Signalkaskaden beteiligt. Sowohl β - als auch α -AR haben einen enormen Einfluss auf die Entwicklung von linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) (Barki-Harrington *et al.*, 2004). Alpha1-blocker, welche α -AR binden und seine Aktivierung verhindern, werden zur Therapie von arterieller Hypertonie (Bluthochdruck) angewandt, welche sich bei 20 % bis 60 % der Patienten als LVH manifestiert (Savage *et al.* 1979; Hammond *et al.* 1986). Die Behandlung von LVH-Patienten mit bluthochdrucksenkenden Mitteln wurde mit einer geringeren kardiovaskulären Morbidität und Sterblichkeit assoziiert (Okin *et al.*, 2004).

Die Anwendung von β -Blockern, um eine Erniedrigung der Herzkraft zu erhalten, ist gegenwärtig die Methode der Wahl, um eine Herzinsuffizienz zu behandeln und Folgen zu verzögern. Ein spezifischerer Ansatz wäre möglicherweise effizienter in der Wiederherstellung der Herzfunktion. Die GPCR-induzierten, hypertrophen Signale im Herzen werden über G-Proteine der Typen G α _{12/13} (Maruyama *et al.*, 2002) oder G α _{q/11} weitergeleitet. AKAP-Lbc vermittelt die α ₁-AR (Maruyama *et al.*, 2002), Endothelin-1 (ET-1)- oder Angiotensin-Rezeptor- (Charron *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 2005) induzierte RhoA-Aktivierung, welche mit einer Hypertrophie von Kardiomyozyten in Verbindung gebracht wird (Appert-Collin *et al.*, 2007), über G α ₁₂ (Appert-Collin *et al.*, 2007; Diviani *et al.*, 2001).

Die Aktivierung von RhoA hat einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie Bluthochdruck, pulmonarer Hypertonie, Atherosklerose, erektile

Dysfunktion, Ischämie oder Herzmuskelhypertrophie (Noma *et al.*, 2006). Die Inhibierung des Rho-Effektors ROCK zeigten *in vivo* eine deutliche Hemmung der Angiotensin-induzierten Herzhypertrophie bei Ratten (Higashi *et al.*, 2003). Beeindruckende Ergebnisse präsentierten sich bei Anwendung des ROCK-Inhibitors GSK-576371 auf ein Rattenmodell der Bluthochdruck-induzierten Herzhypertrophie. Eine Verminderung der druckbedingten Verdickung des linken Ventrikels und eine verringerte Kollagenablagerung konnten gezeigt werden. GSK-576371 hemmt die ROCK selektiv im niederen nanomolaren Bereich und ist damit effizienter als andere Inhibitoren (Phrommintikul *et al.*, 2008). Ein Nachteil dieser Inhibitoren ist jedoch, dass sie auf beide Isoformen der ROCK wirken und somit zum Teil ungewollte Effekte auf die Funktion von Lunge, Leber, Milz, Niere, Hoden, Gehirn und Herz haben (Nakagawa *et al.*, 1996). Aus diesem Grund passierte bislang keiner dieser Inhibitoren die klinischen Phasen. Eine selektive Inhibition eines bestimmten GEF, z.B. AKAP-Lbc, welches die Aktivierung von RhoA vermittelt, wäre folglich eine attraktivere Strategie zur Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen wie Herzmuskelhypertrophie oder Herzinsuffizienz.

4.2.2 Einfluss von AKAP-Lbc und RhoA bei Krebserkrankungen

Effektoren von RhoGTPasen beeinflussen u.a. die Zytoskelettorganisation, eine wichtige Eigenschaft auch für das Wachstum von Tumoren (Lazer *et al.*, 2011). RhoA ist in verschiedenen Tumoren wie z.B. Kolonkarzinomen, Brust-, Hoden- und Lungenkrebs überexprimiert (Fritz *et al.*, 1999) und wird mit dem Verlust der Zellpolarität, dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und der Metastasierung von Krebszellen in Zusammenhang gebracht (Sahai *et al.*, 2002).

Ein Polymorphismus im AKAP-Lbc, K526Q, wird mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs assoziiert (Wirtenberger *et al.*, 2005). Die molekularen Auswirkungen dieser Variante sind bislang jedoch noch nicht verstanden. Mit der in dieser Arbeit identifizierten Substanz 31413 zur Hemmung AKAP-Lbc-vermittelter RhoA-Aktivierung könnte nun die Rolle AKAP-Lbc/RhoA-Wechselwirkung bei der Entwicklung von Brustkrebs näher untersucht werden. Es könnte analysiert werden, ob der Polymorphismus mit einer erhöhten GEF-Aktivität des AKAP-Lbc assoziiert ist. Anderen substituierten Furocoumarinen, die z.T. bereits patentiert sind, werden anti-kanzerogene und anti-proliferative Eigenschaften zugesprochen (Balakrishnan *et al.*, 2003). Durch welche Zielproteine die Wirkung dieser Substanzen vermittelt wird, ist jedoch bislang nicht bekannt. Die weitere Charakterisierung des in dieser Arbeit identifizierten Furocoumarins 31413 und möglicher synthetischer Derivate von 31413 könnte hierbei neue Erkenntnisse bringen.

4.3 Ausblick

Die in einer Hochdrucksatzsuche nach potenziellen Inhibitoren des Nukleotidaustausches von RhoA identifizierte Substanz 31413 hemmt die AKAP-Lbc-vermittelte Aktivierung von RhoA *in vitro* und in Zellen. Nach der Beobachtung des chronotropen Einflusses der Substanz 31413 auf die α 1-AR-induzierte Steigerung der Kontraktionsfrequenz, befassen sich gegenwärtige Untersuchungen mit der Wirkung von 31413 auf die α - und β -adrenerg- induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten. Es soll geklärt werden, ob eine Behandlung mit der Substanz die Phenylephrin- stimulierte Hypertrophie unterdrücken kann und die Isoproterenol-vermittelte nicht. Das Ergebnis soll die bisherige These, der spezifischen Hemmung von α -AR-vermittelten Signalwegen, untermauern. Gelingt eine Verminderung der Hypertrophie im Zellmodell, sollte dann der Einfluss von 31413 bzw. eventuellen Derivaten in einem *transaortic constriction*-(TAC)- Rattenmodell für Hypertrophie und Herzinsuffizienz getestet werden, um einen präventiven oder therapeutischen Nutzen der Substanz zu untersuchen. Grundsätzlich wären diese Ergebnisse dann der Grundstein für die Entwicklung neuer Leitstrukturen, um die Pathologie verschiedener Erkrankungen wie Herzinsuffizienz besser zu verstehen und geeignete Therapien zu entwickeln. Für die Behandlung von Herzinsuffizienz herrscht ein ungedecktes medizinisches Bedürfnis. Derzeitige Therapien ermöglichen nur eine Verzögerung der Folgen einer Herzinsuffizienz. Die einzige vorhandene und effektive Methode zur Behandlung von Herzinsuffizienz im Endstadium ist eine Herztransplantation (Barnett *et al.*, 2011). Aufgrund des Missverhältnisses zwischen Kosten, die in die Entwicklung neuer Therapien für kardiovaskuläre Erkrankungen gesteckt werden, und dem Nutzen, der sich aus neuen, erfolgversprechenden Ansätzen ergibt, lohnt sich die Erforschung von spezifisch wirkenden Substanzen.

Zum genaueren Verständnis der Effekte des in dieser Arbeit identifizierten, niedermolekularen Stoffes soll der Mechanismus analysiert werden, der zur Inhibierung der AKAP-Lbc-vermittelten Aktivierung von RhoA führt. Dazu ist es zunächst erforderlich den Angriffspunkt des kleinen Moleküls zu identifizieren. Gegenwärtig wird daher der Bindungspartner der Substanz 31413 biochemisch über Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelt. Anhand der Ergebnisse aus dem RhoGEF/RhoA-basierten Luziferase-Experiment könnte davon ausgegangen werden, dass die Regulation von 31413 auf Seiten des AKAP-Lbc zu suchen ist. Um dies zu belegen, soll der Komplex aus Substanz und Bindungspartner in Form eines Kristalls hergestellt werden. Die kristallographische Analyse könnte zur Aufklärung einerseits des Hemmmechanismus der Substanz 31413 und andererseits des Mechanismus der AKAP-Lbc-vermittelten Aktivierung von RhoA dienen. Darüber hinaus bietet die Struktur auch ein Potenzial für die Optimierung des Inhibitors. Die komplexeren Strukturanalysen und daraus resultierende chemische Synthese neuer Derivate stellen den Grundstein für den Prozess der patentwirksamen Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten dar. Abgesehen von therapeutischen Einsatzmöglichkeiten dienen kleine Moleküle auch zur detaillierteren Untersuchung von Signalkaskaden. Am Beispiel der AVP-vermittelten Translokation des Wasserkanals Aquaporin 2 (AQP2) in der Niere könnte der gefundene Inhibitor zur Aufklärung einer Beteiligung des AKAP-Lbc an der RhoA-vermittelten Stressfaserbildung und damit an der Hemmung des Transports von AQP2-tragenden Vesikel zur Plasmamembran dienen.

5 Referenzen

- Appert-Collin A, Cotecchia S, Nenniger-Tosato M, Pedrazzini T, Diviani D (2007). The A-kinase anchoring protein (AKAP)-Lbc-signaling complex mediates α_1 adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(24): 10140-10145.
- Arkin MR, Wells JA (2004). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nature reviews. Drug discovery* **3**(4): 301-317.
- Arkin MR, Whitty A (2009). The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**(3): 284-290.
- Bailey DG, Dresser GK, Bend JR (2003). Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* **73**(6): 529-537.
- Baisamy L, Cavin S, Jurisch N, Diviani D (2009). The Ubiquitin-like Protein LC3 Regulates the Rho-GEF Activity of AKAP-Lbc. *Journal of Biological Chemistry* **284**(41): 28232-28242.
- Baisamy L, Jurisch N, Diviani D (2005). Leucine zipper-mediated homo-oligomerization regulates the Rho-GEF activity of AKAP-Lbc. *J Biol Chem* **280**(15): 15405-15412.
- Balakrishnan A, Giridharan P, Vishwakarma R, Nallankandy P (2003). A SUBSTITUTED FUROCHROMENONE DERIVATIVE EXHIBITING ANTI-CANCER AND ANTI-PROLIFERATIVE PROPERTIES SAKTHI SUGARS LTD (180 Race Course Road Coimbatore 8 Tamil Nadu, 641 01, IN); CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY (Anna University Chennai 5 Tamil Nadu, 600 02, IN). <http://www.sumobrain.com/patents/WO2003022854.html>
- Barki-Harrington L, Perrino C, Rockman HA (2004). Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* **63**(3): 391-402.
- Barnett P, van den Hoff MJ (2011). Cardiac regeneration: different cells same goal. *Med Biol Eng Comput* **49**(7): 723-732.
- Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**(6868): 198-205.
- Bishop AL, Hall A (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-255.
- Bos J, Rehmann H, Wittinghofer A (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* **129**(5): 865-877.
- Bos JL (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in biochemical sciences* **31**(12): 680-686.
- Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**(1): 203-216.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**(6297): 125-132.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**(6305): 117-127.
- Burrige K, Wennerberg K (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**(2): 167-179.
- Cariolato L, Cavin S, Diviani D (2011). AKAP-LBC anchors a PKN-based signaling complex involved in α_1 -adrenergic receptor-induced p38 activation. *J Biol Chem*.
- Carnegie G, Soughayer J, Smith F, Pedroja B, Zhang F, Diviani D, et al. (2008). AKAP-Lbc Mobilizes a Cardiac Hypertrophy Signaling Pathway. *Molecular Cell* **32**(2): 169-179.

- Carnegie GK, Burmeister BT (2011). AKAPs that regulate cardiac remodeling. *Journal of cardiovascular pharmacology*: 1.
- Carnegie GK, Smith FD, McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD (2004). AKAP-Lbc Nucleates a Protein Kinase D Activation Scaffold. *Molecular Cell* **15**(6): 889-899.
- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE, Scott JD (1992). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *The Journal of biological chemistry* **267**(19): 13376-13382.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, *et al.* (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *The Journal of biological chemistry* **266**(22): 14188-14192.
- Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE (2006). [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Revista Espanola de Cardiologia* **59**(5): 473-486.
- Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, Robitaille L, Liang Q, Molkenstein JD, *et al.* (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes & Development* **15**(20): 2702-2719.
- Cheng L, Rossman KL, Mahon GM, Worthylake DK, Korus M, Sondek J, *et al.* (2002). RhoGEF specificity mutants implicate RhoA as a target for Dbs transforming activity. *Molecular and Cellular Biology* **22**(19): 6895-6905.
- Diviani D, Abuin L, Cotecchia S, Pansier L (2004). Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *EMBO J* **23**(14): 2811-2820.
- Diviani D, Sonderling J, Scott JD (2001). AKAP-Lbc Anchors Protein Kinase A and Nucleates Galpha 12-selective Rho-mediated Stress Fiber Formation. *Journal of Biological Chemistry* **276**(47): 44247-44257.
- Dodge-Kafka KL, Bauman A, Kapiloff MS (2008). A-kinase anchoring proteins as the basis for cAMP signaling. *Handb Exp Pharmacol*(186): 3-14.
- Dutt P, Nguyen N, Toksoz D (2004). Role of Lbc RhoGEF in Galpha12/13-induced signals to Rho GTPase. *Cell Signal* **16**(2): 201-209.
- Ellerbroek SM (2003). Serine Phosphorylation Negatively Regulates RhoA in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **278**(21): 19023-19031.
- Fehér LZ, Pocsay G, Krenacs L, Zvara A, Bagdi E, Pocsay R, *et al.* (2011). Amplification of Thymosin Beta 10 and AKAP13 Genes in Metastatic and Aggressive Papillary Thyroid Carcinomas. *Pathol Oncol Res.*
- Fernandez-Tenorio M, Porrás-González C, Castellano A, Del Valle-Rodríguez A, López-Barneo J, Urena J (2011). Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. *Circulation Research* **108**(11): 1348-1357.
- Fritz G, Just I, Kaina B (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**(5): 682-687.
- Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(20): 7618-7623.
- Hahmann C, Schroeter T (2010). Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**(2): 171-177.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* **279**(5350): 509-514.

- Hall A (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society transactions* **33**(Pt 5): 891-895.
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**(6351): 311-314.
- Heasman SJ, Ridley AJ (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(9): 690-701.
- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, *et al.* (2003). Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circulation Research* **93**(8): 767-775.
- Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**(7): 1159-1170.
- Hundsrucker C, Klusmann E (2008). Direct AKAP-mediated protein-protein interactions as potential drug targets. *Handbook of experimental pharmacology*(186): 483-503.
- Jalil J, Lavandero S, Chiong M, Pazocaranza M (2005). Rho/Rho Kinase Signal Transduction Pathway in Cardiovascular Disease and Cardiovascular Remodeling. *Revista Espanola de Cardiologia* **58**(8): 951-961.
- Kaarbo M, Crane DI, Murrell WG (2003). RhoA is highly up-regulated in the process of early heart development of the chick and important for normal embryogenesis. *Developmental Dynamics* **227**(1): 35-47.
- Kim C, Vigil D, Anand G, Taylor SS (2006). Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *European Journal of Cell Biology* **85**(7): 651-654.
- Kjoller L, Hall A (1999). Signaling to Rho GTPases. *Experimental Cell Research* **253**(1): 166-179.
- Klusmann E, Edemir B, Pepperle B, Tamma G, Henn V, Klauschenz E, *et al.* (2001a). Ht31: the first protein kinase A anchoring protein to integrate protein kinase A and Rho signaling. *FEBS Lett* **507**(3): 264-268.
- Klusmann E, Maric K, Wiesner B, Beyermann M, Rosenthal W (1999). Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *The Journal of biological chemistry* **274**(8): 4934-4938.
- Klusmann E, Tamma G, Lorenz D, Wiesner B, Maric K, Hofmann F, *et al.* (2001b). An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* **276**(23): 20451-20457.
- Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, *et al.* (1993). The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* **268**(21): 15374-15380.
- Kurokawa J, Motoike HK, Rao J, Kass RS (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(46): 16374-16378.
- Kurose H (2003). Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sciences* **74**(2-3): 155-161.
- Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* **15**(3): 510-519.
- Lazer G, Katzav S (2011). Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy? *Cellular Signalling* **23**(6): 969-979.

- Lisurek M, Rupp B, Wichard J, Neuenschwander M, von Kries JP, Frank R, *et al.* (2010). Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Mol Divers* **14**(2): 401-408.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rümenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, *et al.* (2005). The Guanine Nucleotide Exchange Factor p63RhoGEF, a Specific Link between Gq/11-coupled Receptor Signaling and RhoA. *Journal of Biological Chemistry* **280**(12): 11134-11139.
- Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, *et al.* (2007). AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Reports* **8**(11): 1061-1067.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, *et al.* (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**(5429): 895-898.
- Majumdar M, Seasholtz TM, Buckmaster C, Toksoz D, Brown JH (1999). A Rho Exchange Factor Mediates Thrombin and G α 12-induced Cytoskeletal Responses. *Journal of Biological Chemistry* **274**(38): 26815-26821.
- Malbon CC, Tao J, Shumay E, Wang HY (2004). AKAP (A-kinase anchoring protein) domains: beads of structure-function on the necklace of G-protein signalling. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 861-864.
- Malo N, Hanley JA, Cerquozzi S, Pelletier J, Nadon R (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nature Biotechnology* **24**(2): 167-175.
- Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, *et al.* (2002). G α 12/13 Mediates α 1-Adrenergic Receptor-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* **91**(10): 961-969.
- Mayers CM, Wadell J, McLean K, Venere M, Malik M, Shibata T, *et al.* (2010). The Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor AKAP13 (BRX) Is Essential for Cardiac Development in Mice. *Journal of Biological Chemistry* **285**(16): 12344-12354.
- Millan J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, *et al.* (2010). Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol* **8**: 11.
- Morissette MR, Sah VP, Glembotski CC, Brown JH (2000). The Rho effector, PKN, regulates ANF gene transcription in cardiomyocytes through a serum response element. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **278**(6): H1769-1774.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters* **392**(2): 189-193.
- Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E (2009). Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb Exp Pharmacol*(190): 133-157.
- Negro A, Dodge-Kafka K, Kapiloff MS (2008). Signalosomes as Therapeutic Targets. *Prog Pediatr Cardiol* **25**(1): 51-56.
- Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, *et al.* (2005). G α 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**(18): 18434-18441.
- Noma K, Oyama N, Liao JK (2006). Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology* **290**(3): C661-668.
- Offermanns S (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **83**(2): 101-130.

- Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, *et al.* (2004). Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *Jama* **292**(19): 2343-2349.
- Paulucci-Holthauzen AA, Vergara LA, Bellot LJ, Canton D, Scott JD, O'Connor KL (2008). Spatial Distribution of Protein Kinase A Activity during Cell Migration Is Mediated by A-kinase Anchoring Protein AKAP Lbc. *Journal of Biological Chemistry* **284**(9): 5956-5967.
- Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, *et al.* (2011). Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Molecular Cell* **42**(1): 84-95.
- Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes & Development* **11**(4): 463-475.
- Phrommintikul A, Tran L, Kompa A, Wang B, Adrahtas A, Cantwell D, *et al.* (2008). Effects of a Rho kinase inhibitor on pressure overload induced cardiac hypertrophy and associated diastolic dysfunction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**(4): H1804-1814.
- Pidoux G, Tasken K (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* **44**(5): 271-284.
- Procino G, Barbieri C, Carmosino M, Tamma G, Milano S, De Benedictis L, *et al.* (2011). Fluvastatin modulates renal water reabsorption in vivo through increased AQP2 availability at the apical plasma membrane of collecting duct cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **462**(5): 753-766.
- Ridley AJ, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-399.
- Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Molecular and Cellular Biology* **23**(12): 4219-4229.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**(6868): 206-212.
- Rolfe B, Worth N, World C, Campbell J, Campbell G (2005). Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* **183**(1): 1-16.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**(2): 167-180.
- Rubino D, Driggers P, Arbit D, Kemp L, Miller B, Coso O, *et al.* (1998). Characterization of Brx, a novel Dbl family member that modulates estrogen receptor action. *Oncogene* **16**(19): 2513-2526.
- Sah VP, Hoshijima M, Chien KR, Brown JH (1996). Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem* **271**(49): 31185-31190.
- Sahai E, Marshall CJ (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(2): 133-142.
- Shabb JB (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* **101**(8): 2381-2411.
- Skalhegg BS, Tasken K (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* **5**: D678-693.
- Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klussmann E (2010). Mechanisms of protein kinase a anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol* **283**: 235-330.
- Steinberg SF, Drugge ED, Bilezikian JP, Robinson RB (1985). Acquisition by innervated cardiac myocytes of a pertussis toxin-specific regulatory protein linked to the alpha 1-receptor. *Science* **230**(4722): 186-188.

- Sterpetti P, Hack AA, Bashar MP, Park B, Cheng SD, Knoll JH, *et al.* (1999). Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1334-1345.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Tamma G, Klussmann E, Procino G, Svelto M, Rosenthal W, Valenti G (2003). cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI. *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1519-1525.
- Thorburn J, Xu S, Thorburn A (1997). MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *The EMBO journal* **16**(8): 1888-1900.
- Toksoz D, Williams DA (1994). Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. *Oncogene* **9**(2): 621-628.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* **11**(18): 2295-2322.
- Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* **10**(12): 842-857.
- Welch EJ, Jones BW, Scott JD (2010). Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv* **10**(2): 86-97.
- Wells JA, McClendon CL (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**(7172): 1001-1009.
- Wirtenberger M, Tchatchou S, Hemminki K, Klaes R, Schmutzler RK, Bermejo JL, *et al.* (2005). Association of genetic variants in the Rho guanine nucleotide exchange factor AKAP13 with familial breast cancer. *Carcinogenesis* **27**(3): 593-598.
- Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, *et al.* (2002). Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* **277**(10): 8618-8625.
- Yatani A, Irie K, Otani T, Abdellatif M, Wei L (2004). RhoA GTPase regulates L-type Ca²⁺ currents in cardiac myocytes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **288**(2): H650-H659.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **4**(2): 67-73.
- Zhang Y, Cao Y, Duan H, Wang H, He L (2012). Imperatorin prevents cardiac hypertrophy and the transition to heart failure via NO-dependent mechanisms in mice. *Fitoterapia* **83**(1): 60-66.
- Zhang Y, Cao Y, Zhan Y, Duan H, He L (2010). Furanocoumarins-imperatorin inhibits myocardial hypertrophy both in vitro and in vivo. *Fitoterapia* **81**(8): 1188-1195.
- Zheng Y (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in biochemical sciences* **26**(12): 724-732.
- Zheng Y, Olson MF, Hall A, Cerione RA, Toksoz D (1995). Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in lbc oncogene function. *J Biol Chem* **270**(16): 9031-9034.

Danksagung

Hiermit danke ich Prof. Dr. Rosenthal für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. V. Haucke von der Freien Universität Berlin für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. E. Klussmann für die intensive Betreuung, die täglichen Herausforderungen und vorwärtsweisenden Ratschläge während meiner Doktorarbeit. Zudem danke ich Dir für das angenehme und entspannte Klima in der Arbeitsgruppe.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern und Mitstreitern der AGs Klussmann, Schülein und Wiesner, insbesondere Philipp Skroblin, Christian Hundsrucker, Frank Christian, Solveig Grossmann, Marie Moutty, Dörte Faust, Kerstin Zühlke, Jana Bogum, Frank Götz sowie Antje Schmidt, Susanne Vogelbein, Anke Teichmann und Ingrid Ridelis für Ratschläge, Geduld und Freundschaft.

Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst möchte ich für die Hilfe bei allen mikroskopischen Problemen, die zahlreichen Stunden der Auswertung von Daten und für die exzellente Pflege der Mikroskope danken.

Ins besonders danke ich Andrea Geelhaar und Beate Eisermann für die Unterstützung und Geduld im Labor und die Disziplin in der Zellkultur.

Der Arbeitsgruppe um Jens-Peter von Kries, insbesondere Martin Neuenschwander, danke ich ebenfalls sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung des Screening.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sebastian Tröger fürs Unterstützen, Dasein und Aushalten.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und Liebe - DANKE

6 Anhang

6.1 Ineffiziente Funktion der GST- und His₆-Fusionsproteine

Aufgrund des ineffizienten Nukleotidaustausches wurde die Funktion der rekombinanten Proteine (GST-RhoA, His₆-RhoA, GST-AKAP-Lbc DHPH und His₆-AKAP-Lbc DHPH) untersucht. Das in Abb. S1 dargestellte Präzipitationsexperiment diente der Untersuchung der Bindung zwischen den His₆-markierten Proteinen und ihrem an GSH-Sepharose gekoppelten Partner. Dazu wurde GST bzw. GST-RhoA oder GST-AKAP-Lbc DHPH an GSH-Sepharose immobilisiert. Mit der GST-RhoA gekoppelten Matrix sollte dann freies His₆-AKAP-Lbc DHPH bzw. mit der GST-AKAP-Lbc DHPH gekoppelten Sepharose freies His₆-RhoA aus der Pufferlösung mit GDP bzw. GTPγS (GTP*) präzipitiert werden. GSH-Sepharose gekoppeltes GST wurde zum Ausschluss von unspezifischen Wechselwirkungen eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die Sepharose gewaschen und das gebundenen His₆-AKAP-Lbc DHPH (Abb. 3.3, A) bzw. das His₆-RhoA (Abb. 3.3, B) mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit einem anti-His-POD Antikörper nachgewiesen. Beide His₆-markierten Proteine zeigten eine Wechselwirkung mit der Negativkontrolle GST, so dass das System in der Form nicht geeignet war.

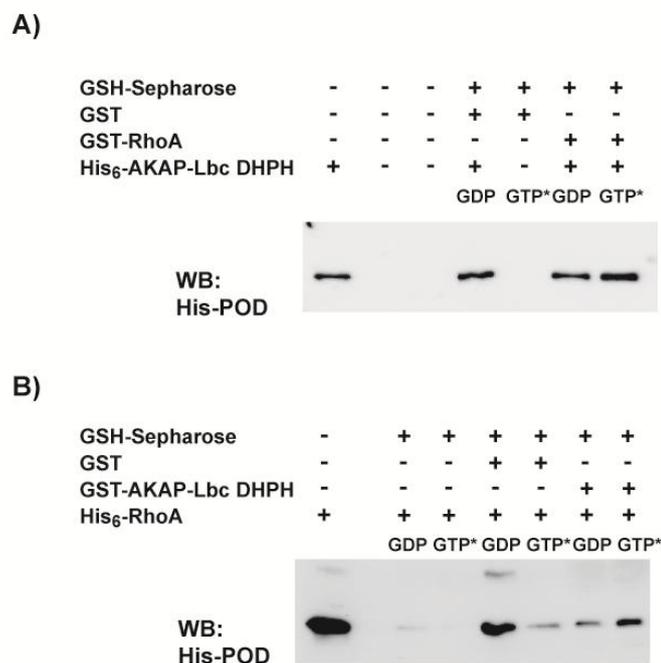


Abb. S1 Unspezifische Bindung der His₆-Proteine an die Negativkontrolle GST: In einem Präzipitationsexperiment sollte die Bindung der His₆-Proteine an den an die GSH-Sepharose gekoppelten GST-Partner untersucht werden. Nach einer Inkubation mit His₆-Proteinen wurde die GSH-Sepharose gewaschen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Die noch an der Matrix gebundenen Proteine wurden im Immunoblot mit einem anti-His-Antikörper detektiert. A) GST-RhoA wurde an die Matrix gekoppelt und die Bindung von His₆-AKAP-Lbc analysiert, in Gegenwart von GDP oder des nicht-hydrolysierbaren GTPγS (GTP*). His₆-AKAP-Lbc bindet sowohl an immobilisiertes GST-RhoA (Spuren 6 und 7) als auch an GST (Spur 4). B) His₆-RhoA zeigte neben der Bindung an immobilisiertes GST-AKAP-Lbc in Gegenwart von GDP oder des nicht-hydrolysierbaren GTPγS (GTP*) ebenfalls eine unspezifische Bindung an GST gekoppelte GSH-Sepharose.

Weil der GST-Anhang zu stören schien, wurde versucht diesen über eine Thrombinschnittstelle zu entfernen. Alternativ sollte die His₆-Markierung mittels Enterokinase abgeschnitten werden. In S2 sind exemplarisch die Resultate für GST-RhoA (A) und His₆-AKAP-Lbc DHPH (B) dargestellt.

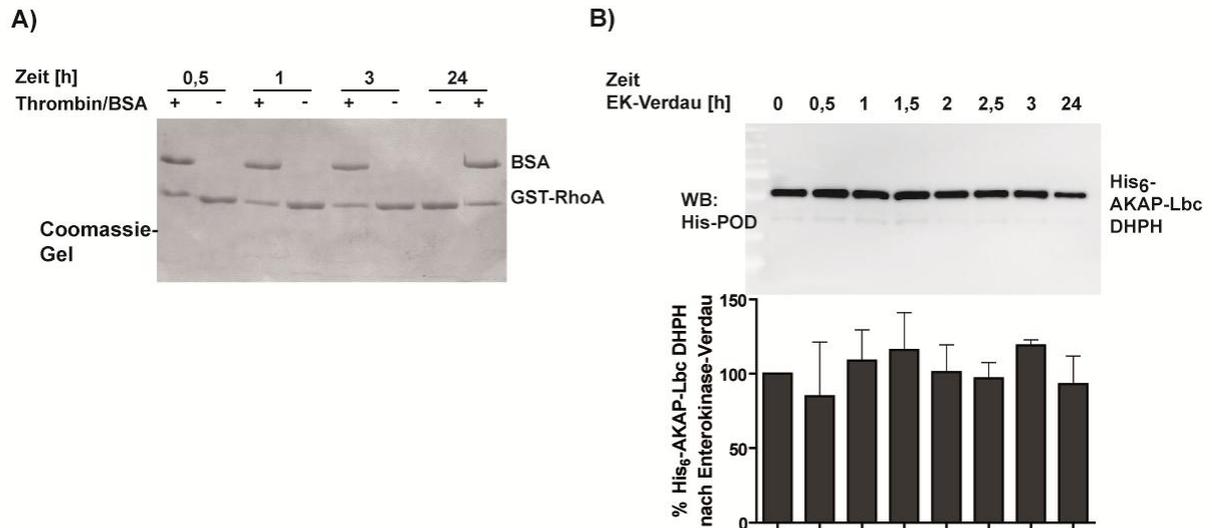


Abb. S2 Die Abspaltung der Affinitätsmarkierungen war ineffizient: A) Die Behandlung von GST-RhoA mit Thrombin für 0,5; 1, 3 h bei Raumtemperatur bzw. 24 h bei 4 °C zeigte im Coomassie-gefärbten Gel keine zeitabhängige Veränderung der Proteinsignale. Es waren auch keine Proteine mit Molekulargewichten von 22 kDa für RhoA und 26 kDa für GST zu detektieren, die nach erfolgten Verdau erwartet waren. B) Auch bei der Behandlung von His₆-AKAP-Lbc DHPH war keine signifikante Reduktion des Signals für His₆-AKAP-Lbc im Immunoblot zu erkennen, wie densitometrisch ausgewertet im Diagramm dargestellt.

GST-RhoA wurde für eine halbe bis drei Stunden bei Raumtemperatur bzw. für 24 h bei 4 °C mit Thrombin behandelt. Im Coomassie-gefärbten Gel nach Behandlung mit Thrombin ist zeitabhängig keine Reduktion der Menge an GST-RhoA bzw. keine Proteine mit Molekulargewichten von 22 kDa für RhoA und 26 kDa für GST zu detektieren, was nach dem Verdau mit Thrombin zu erwarten gewesen wäre. Auch die Proteinrestriktion mit der Enterokinase resultierte nicht in einer signifikanten Reduktion des Signals für His₆-AKAP-Lbc im Immunoblot mit dem anti-His-POD Antikörper.

6.2 Proteinsequenzen der Profinity eXact-Konstrukte

Profinity AKAP-Lbc (1923-2336) pPal7:

```

TSTM AGSGTMSNTW KFLSHSTDSL NKISKVNEST ESLTDEGVGT
DMNEGQLLGD FEIESKQLEA ESWSRIIDSK FLKQQKDVV KRQEVIYELM
QTEFHHVRTL KIMSGVYSQG MMADLLFEQQ MVEKLFPCLD ELISIHSQFF
QRILERKKES LVDKSEKNFL IKRIGDVLVN QFSGENAERL KKTYGKFCGQ
HNQSVNYFKD LYAKDKRFQA FVKKKMSSSV VRRLGIPECI LLVTQRITKY
PVLFQRILQC TKDNEVEQED LAQSLSLVKD VIGAVDSKVA SYEKKVRLNE
IYTKTDSKSI MRMKSGQMFA KEDLKRKKLV RDGSVFLKNA AGRLKEVQAV
LLTDILVFLQ EKDQKYIFAS LDQKSTVISL KKLIVREVAH EEKGLFLLISM
GMTDPEMVEV HASSKEERNS WIQIIQDTIA AA

```

Profinity RhoA pPal7:

```

TSTM AGSMAAIRKK LVIVGDGACG KTCLLIVFSK QFPEVYVPT
VFENYVADIE VDGKQVELAL WDTAGQEDYD RLRPLSYPDT VILMCFSID
SPDSLENIPE KWTPEVKHFC PNVPIILVGN KKDLRNDEHT RELAKMKQE
PVKPEEGRDM ANRIGAFGYM ECSAKTKDGV REVFEMATRA LQARRGKKK
SGCLVL

```

Wissenschaftliche Artikel:

Review

Tröger J, Moutty MC, Skroblin P, Klussmann E (2012). A-kinase anchoring proteins as potential drug targets. *British Journal of Pharmacology* 166(2): 420-433.

Vorträge und Poster-Präsentationen:

- DGPT 2011; Frankfurt/Main (Vortrag und Poster-Präsentation)

“Small molecules interfering with the interaction of AKAP13 and RhoA – implications for the treatment of chronic heart failure”

Jessica Tröger, Martin Neuenschwander, Adeeb El-Dahshan, Jelena Milic, Jens-Peter von Kries, Walter Rosenthal, Enno Klussmann

- BSP Meeting 2011; London (Poster-Präsentation)

“Small molecule inhibitors of the AKAP-Lbc-induced RhoA activation”

Jessica Tröger, Martin Neuenschwander, Jelena Milic, Jens-Peter von Kries, Walter Rosenthal, Enno Klussmann