

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Professor Dr. med. U. Laufs

**Charakterisierung der Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 und ihrer
Interaktion mit der NAD(P)H-Oxidase durch Rho-regulierende Proteine
wie RhoGDI α im Rahmen der Myokardhypertrophie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2008

vorgelegt von Marcel Eberl

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
1.1. Summary.....	9
2. Einleitung	11
2.1. Myokardiale Hypertrophie	11
2.2. Bedeutung freier Sauerstoffradikale für den myokardialen Phänotyp	13
2.3. Die kleine GTPase Rac1	17
2.3.1. Interaktion der Rac1-GTPase mit ihren Kofaktoren.....	18
2.3.2. Aktivierung von Rac1 durch posttranslationale Isoprenylierung	20
2.4. Fragestellungen.....	23
3. Material und Methoden	25
3.1. Material.....	25
3.1.1. Verwendete Substanzen.....	25
3.1.2. Verwendete Puffer	28
3.2. Methoden	30
3.2.1. Zellkultur	30
3.2.2. Western Blot.....	30
3.2.3. Immunpräzipitation	31
3.2.4. Membranpräparation	31
3.2.5. siRNA Transfektion.....	32
3.2.6. Messung der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion mittels 2',7'- Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H ₂ DCFDA).....	33
3.2.7. Lipid Peroxidations Assay.....	33
3.2.8. Leucininkorporation	34
3.2.9. Statistische Auswertung	34

4. Ergebnisse.....	35
4.1. Effekt von Angiotensin II und Rosuvastatin auf die Expression der Rac1-GTPase sowie auf ihre Interaktion mit RhoGDI α in Kardiomyozyten.....	35
4.2. Bedeutung der PI3-Kinase und der posttranslationalen Isoprenylierung von Rac1 für die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α	38
4.3. Effekte einer chronischen Nachlasterrhöhung auf die Expression der Rac1-GTPase und ihre Assoziation mit RhoGDI α im Mausmodell.....	40
4.4. Effekte einer Transfektion von kultivierten Kardiomyozyten mit RhoGDI α spezifischer siRNA	42
4.4.1. Einfluss der spezifischen Hemmung von RhoGDI α durch siRNA-Transfektion auf die Freisetzung freier Sauerstoffradikale in kultivierten Kardiomyozyten	43
4.4.2. Einfluss der spezifischen Hemmung von RhoGDI α auf die Lipidperoxidation in Angiotensin II stimulierten Kardiomyozyten.....	45
4.5. Auswirkungen der spezifischen Hemmung von RhoGDI α auf die Inkorporation der Aminosäure Leucin in kultivierten Kardiomyozyten.....	47
5. Diskussion	49
5.1. Die kleine GTPase Rac1 ist maßgeblich an der Sauerstoffradikalbildung im Myokard beteiligt	49
5.2. Hypertrophe Stimuli induzieren eine vermehrte Bindung von Rac1 an RhoGDI α im Myokard	50
5.3. RhoGDI α hat eine essentielle Bedeutung für die Rac1 induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung in Kardiomyozyten und die Ausbildung eines hypertrophen myokardialen Phänotyps.....	51
5.4. Statine hemmen die Bindung von Rac1 an RhoGDI α und vermitteln einen anti-oxidativen Effekt in Kardiomyozyten	52
5.5. Potentielle klinische Bedeutung der Befunde.....	54
6. Literaturverzeichnis	57
7. Danksagung und Veröffentlichungen	64
8. Curriculum Vitae	66

1. Zusammenfassung

Hintergrund und Untersuchungen

Freie Sauerstoffradikale (ROS) tragen wesentlich zur Genese eines hypertrophen myokardialen Phänotyps als Vorstufe der chronischen Herzinsuffizienz bei. Eine wichtige Quelle freier Sauerstoffradikale ist die NAD(P)H-Oxidase. Die kleine GTPase Rac1 ist wesentlich an ihrer Aktivierung beteiligt und wird durch verschiedene Kofaktoren wie den Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor α (RhoGDI α) reguliert.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Charakterisierung potentieller Rac1-Effektoren und die Interaktion mit dem Kofaktor RhoGDI α im Rahmen der Myokardhypertrophie *in vitro* wie *in vivo*. Die grundlegende Hypothese der Arbeit war die Annahme, dass es durch hypertrophe Stimuli zu einer erleichterten Dissoziation von Rac1 und RhoGDI α und in der Folge zu einer verstärkten Aktivierung von Rac1 kommt.

Methoden und Ergebnisse

Die Behandlung kultivierter Kardiomyozyten der H9C2-Zellreihe mit Angiotensin II (AngII) als hypertrophen Stimulus führte zu einem signifikanten Anstieg der Rac1 Expression und zu einer wesentlichen Steigerung der Bindung von Rac1 an RhoGDI α (Immunpräzipitation). Diese Interaktion konnte sowohl durch den HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin, als auch in Gegenwart von Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase (Wortmannin und LY 294002) und einem Inhibitor der Geranylgeranyltransferase (GGTI-286) verhindert werden.

Mittels Aortenligatur wurde in C57/Bl6-Mäusen durch chronische Erhöhung der kardialen Nachlast eine Myokardhypertrophie induziert. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte myokardiale Gesamtexpression von Rac1 und eine wesentlich gesteigerte myokardiale Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes im Vergleich zu Kontrolltieren. Simultane Behandlung der Mäuse mit Rosuvastatin verhinderte diesen Effekt.

Um eine mögliche kausale Rolle von RhoGDI α im Rahmen der Ang II vermittelten Sauerstoffradikalfreisetzung zu untersuchen, wurde die Expression von RhoGDI α durch

Transfektion kultivierter H9C2-Zellen mit RhoGDI α spezifischer small interfering RNA (siRNA) selektiv gehemmt. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der Ang II induzierten Radikalfreisetzung (H₂DCFDA-Fluoreszenz Assays) und der Lipidperoxidation. Darüber hinaus zeigte sich nach spezifischer Hemmung von RhoGDI α eine Hemmung der Ang II induzierten Proteinsynthese (Leucininkorporation).

Bedeutung der Befunde

Die vorliegende Arbeit charakterisiert wesentliche Mechanismen der Rac1 abhängigen Sauerstoffradikalfreisetzung im hypertrophierten Myokard der Maus und in kultivierten Kardiomyozyten. Myokardhypertrophie im Tiermodell als auch in Zellkulturexperimenten ist durch eine verstärkte Assoziation von Rac1 und dem Kofaktor RhoGDI α sowie durch eine gesteigerte Gesamtexpression von Rac1 gekennzeichnet. Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin verhindert diese Effekte. Spezifische Hemmung von RhoGDI α inhibiert die Ang II induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung in Kardiomyozyten und identifiziert die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α als wesentlichen Schritt für die Rac1 vermittelte Radikalfreisetzung.

Die Experimente beschreiben myokardiale Effekte von HMG-CoA-Reduktase Hemmern, welche sich primär unabhängig von der Verminderung der Cholesterinbiosynthese manifestieren und durch eine Hemmung der Synthese von Intermediärprodukten des Cholesterinbiosyntheseweges, wie der Isoprenoide, erklärt werden. Die isoprenoidabhängige Bindung von Rac1 an seinen Kofaktor RhoGDI α trägt zur Entwicklung myokardialer Hypertrophie bei. Sie könnte somit ein mögliches Ziel antihypertropher pharmakologischer Interventionen darstellen.

1.1. Summary

Background

Failing human myocardium is characterized by increased oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) contribute essentially to the pathogenesis of myocardial hypertrophy. A major source for ROS production is the NAD(P)H-Oxidase. The small GTPase Rac1 mediates the activation of the NAD(P)H-Oxidase and is underlying the interaction with several co-factors, such as the Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor α (RhoGDI α).

The aim of the present study was to characterize mediators of Rac1 activation and the interaction of Rac1 with regulatory co-factors, especially RhoGDI α , during myocardial hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. The underlying hypothesis of the study was that hypertrophic stimulation would induce activation of Rac1 potentially by facilitating the release of Rac1 from RhoGDI α .

Methods and Results

Treatment of cultivated cardiomyocytes of the H9C2 type with angiotensin II as a hypertrophic stimulus led to a significant increase of Rac1 expression and an increase of Rac1-RhoGDI α complex formation (immunoprecipitation). This interaction was inhibited by treatment with the HMG-CoA-reductase inhibitor Rosuvastatin, as well as in the presence of phosphatidylinositol-3-(PI3)-kinase inhibitors (Wortmannin and LY 294002) and an inhibitor of the geranylgeranyl-transferase (GGTI).

In vivo studies using transaortic banding in C57/B16 mice showed a significant increase of myocardial Rac1 expression as well as an increase of myocardial Rac1-RhoGDI α binding. Simultaneous treatment with Rosuvastatin prevented these effects.

To clarify the role of RhoGDI α in ROS production RhoGDI α protein expression was suppressed selectively via transfection of cultivated H9C2 cardiomyocytes with RhoGDI α specific small interfering RNA (siRNA) constructs. It potently reduced angiotensin II induced production of intracellular reactive oxygen species (H₂DCFDA-fluorescence assays) and lipid peroxidation. Furthermore the angiotensin II induced protein synthesis was

significantly inhibited (leucine incorporation).

Conclusions

These data characterize basic mechanisms of Rac1 dependent ROS release in myocardial hypertrophy in mice and in cultured cardiomyocytes. Myocardial hypertrophy *in vivo* and *in vitro* is characterized by an increased binding of Rac1 to RhoGDI α as well as Rac1 expression. Treatment with Rosuvastatin inhibits these effects. Suppressed RhoGDI α expression reduces free radical release, which underlines the importance of RhoGDI α in this Rac1 dependent process.

The experiments describe myocardial effects of statin treatment, independent of the lowering of cholesterol biosynthesis, partly explained by the inhibition of intermediate products of cholesterol biosynthesis, such as isoprenoids. Rac1-RhoGDI α binding depends on isoprenylation and may represent a novel target for anti-hypertrophic pharmacologic interventions.

2. Einleitung

2.1. Myokardiale Hypertrophie

Die chronische Herzinsuffizienz ist die am häufigsten gestellte internistische Diagnose in Deutschland und eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Sterblichkeit. In der Altersklasse der 65- bis 75-jährigen liegt die Prävalenz bei 2-5 Prozent, bei über 80-jährigen bereits bei 10 Prozent. Männer sind etwa 1,5-fach häufiger betroffen als gleichaltrige Frauen. Eine Vorstufe der chronischen Herzinsuffizienz ist unter anderem die Myokardhypertrophie in Folge einer arteriellen Hypertonie. Studien zeigen, dass eine linksventrikuläre Hypertrophie einen bedeutsamen Risikofaktor für die Entstehung von Herzversagen darstellt (Böhm 2002, Lorell et al. 2000). Die molekulare Pathogenese der kardialen Hypertrophie ist bislang jedoch nur unzureichend verstanden, und die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt.

Ein anerkanntes und im Labor der Arbeitsgruppe etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen ist die Induktion einer Myokardhypertrophie durch chronische Erhöhung der kardialen Nachlast bei Mäusen. Im Rahmen von Voruntersuchungen wurde mittels Aortenligatur an Wildtyp Mäusen des Genotyps C57/B16 eine myokardiale Hypertrophie induziert und es kam zu einer Zunahme des Lungengewichtes im Sinne einer pulmonal-venösen Stauung. Es zeigte sich dass sowohl die Hypertrophie als auch das erhöhte Lungengewicht durch eine simultane Behandlung der Tiere mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin signifikant vermindert werden konnte (Abbildung 1).

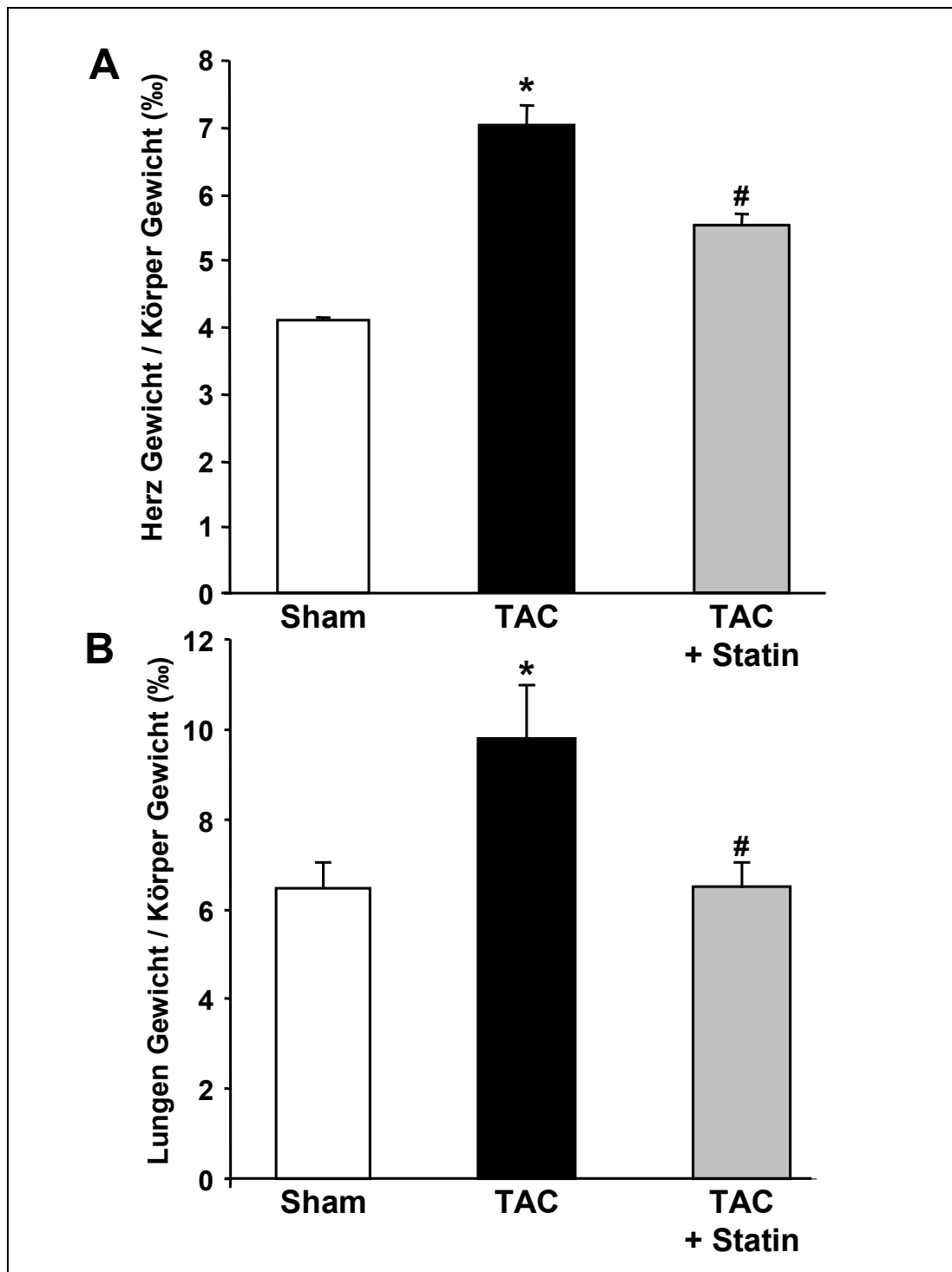


Abbildung 1: Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Laufs: Effekte einer Aortenligatur (TAC, 360 μ m, 21 d) und Behandlung mit Rosuvastatin (Statin, 2,0 mg/kg, s.c., 21 d) auf die Gewichte von Herz (**A**) und Lunge (**B**) in Relation zum Körpergewicht in C57/B16 Mäusen. Behandlung mit Rosuvastatin führt zu einer verminderten Zunahme des Herzgewichts (**A**) und des Lungengewichts (**B**) nach Aortenligatur (n=6 Tiere/Gruppe, *p<0,01 vs. sham, #p<0,05 vs. TAC).

2.2. Bedeutung freier Sauerstoffradikale für den myokardialen Phänotyp

Sauerstoff und seine reaktionsfähigen Radikale sind in der Lage fast alle in lebenden Organismen vorkommenden Verbindungen zu oxidieren, und damit funktionell zu modifizieren. Freie Sauerstoffradikale sind an verschiedenen physiologischen Funktionen wie der Immunabwehr beteiligt und fungieren als „second messenger“ verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege. Sie nehmen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression, die Zellproliferation und -migration. Neben den physiologischen Funktionen tragen freie Sauerstoffradikale maßgeblich zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie endothelialer Dysfunktion, Atherosklerose und myokardialer Hypertrophie bei (Bedard et al. 2007, Brandes et al. 2004, Abbildung 2).

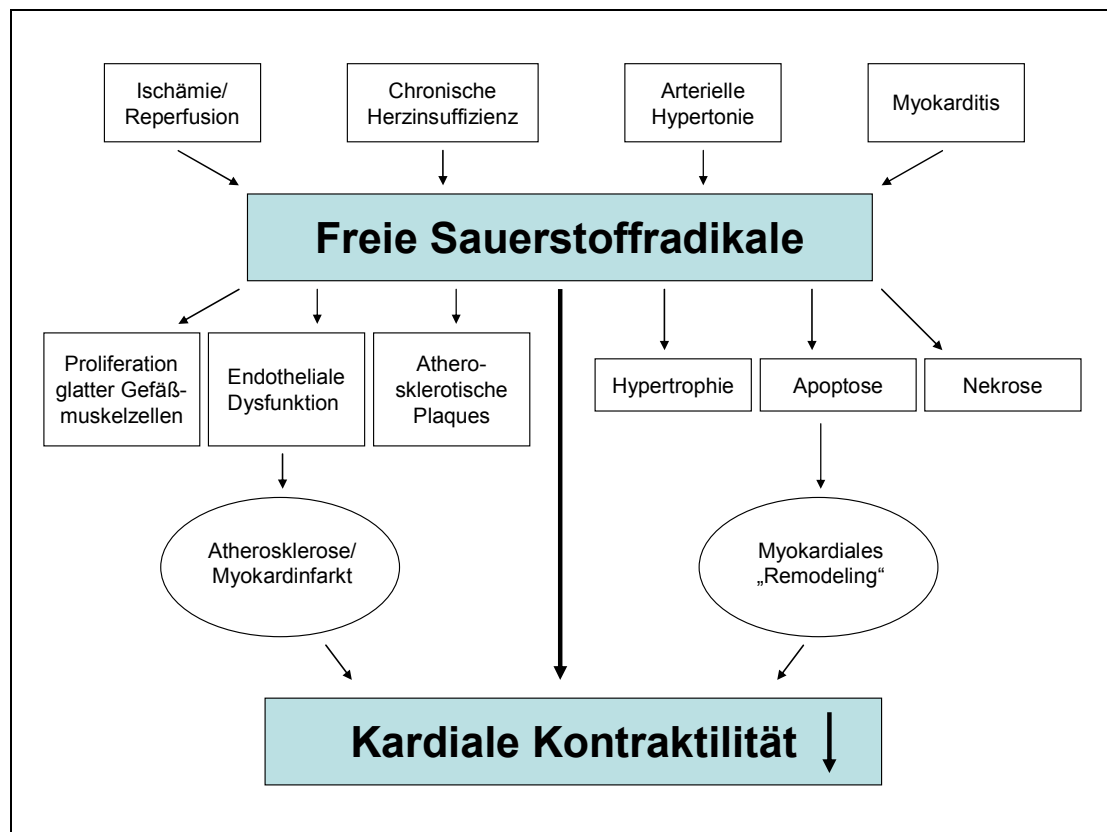


Abbildung 2: Freie Sauerstoffradikale tragen wesentlich zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie endothelialer Dysfunktion, Atherosklerose und myokardialer Hypertrophie bei.

Aktuelle Veröffentlichungen und Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass freie Sauerstoffradikale eine Schlüsselrolle im Rahmen der Pathogenese der Myokardhypertrophie spielen. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz sind freie Sauerstoffradikale mit einer herabgesetzten Auswurfleistung des Herzens assoziiert und korrelieren darüber hinaus mit dem Schweregrad der Erkrankung. Weitere Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass Myokardgewebe von Patienten mit dilatativer (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) durch vermehrten intrazellulären oxidativen Stress gekennzeichnet ist (Maack et al. 2003).

Eine bedeutsame Quelle für die Produktion freier Sauerstoffradikale in kultivierten Kardiomyozyten und in menschlichem Myokard ist die NAD(P)H-Oxidase, deren Familie nach heutigem Kenntnisstand mindestens 5 verschiedene Typen (NOX 1-5) umfasst, welche in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert werden (Li et al. 2002). Sie stellt einen Enzymkomplex dar, der sich aus dem der Zellmembran angelagerten Bestandteil Cytochrom b_{558} , sowie aus den im Zytoplasma befindlichen Untereinheiten Rac1, p47phox und p67phox zusammensetzt. Im inaktiven Zustand ruhen die einzelnen Bestandteile im Zytosol, erst bei Aktivierung translozieren sie an die Zellmembran und setzen sich zu dem eigentlichen Enzymkomplex zusammen. Dabei spielt das kleine GTP-bindende Protein Rac1 eine entscheidende Rolle (Abbildung 3).

Die Stimulation der NAD(P)H-Oxidase erfolgt über verschiedene Agonisten. Hierbei ist die Stimulation durch Angiotensin II, welche über den AT_1 -Rezeptor in Abhängigkeit von der Protein Kinase C (PKC) vermittelt wird, umfangreich charakterisiert. Weitere Stimulatoren sind im Wesentlichen Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine ($TNF\alpha$), Integrine, Hyperglykämie, sowie Scherstress (Brandes et al. 2004, Hordijk 2006, Knaus et al. 1995, Schmitz et al. 2001, Seshiah et al. 2002).

Für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie, die endotheliale Dysfunktion und die Atherosklerose konnte ein wesentlicher Einfluss von durch NAD(P)H-Oxidasen generierten freien Sauerstoffradikalen nachgewiesen werden. Obwohl auf zellulärer Ebene verschiedene Signaltransduktionswege der Aktivierung charakterisiert wurden, ist der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen der NAD(P)H-Oxidase und ihren Stimulatoren bisher nur unzureichend untersucht und verstanden.

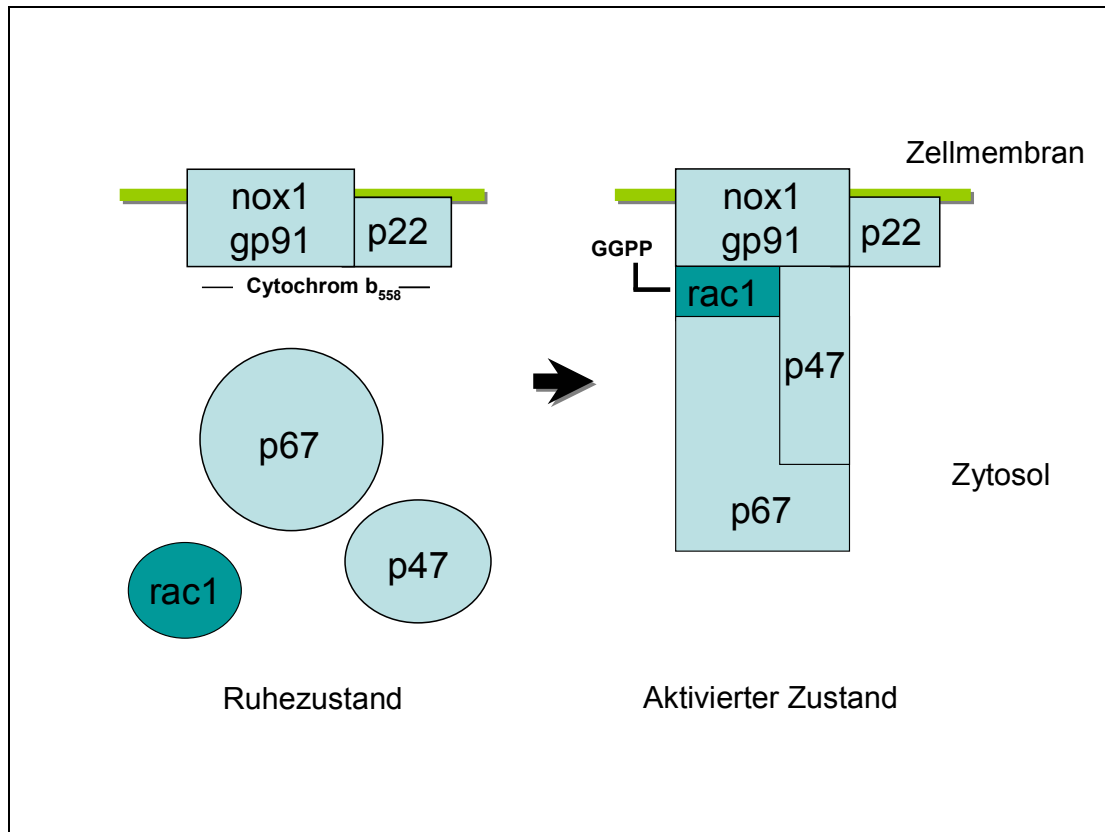


Abbildung 3: Enzymkomplex der NAD(P)H-Oxidase mit seinen Untereinheiten: Das kleine Protein Rac1 ist für die Zusammensetzung der Untereinheiten notwendig.

Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase im durch Aortenligatur hypertrophierten Myokard von C57/Bl6 Mäusen untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität im Vergleich zu sham-operierten Tieren (412 ± 137 %, $p < 0,05$). Eine simultane Behandlung der Mäuse mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin konnte den Anstieg der Aktivität verhindern (163 ± 52 %, Abbildung 4).

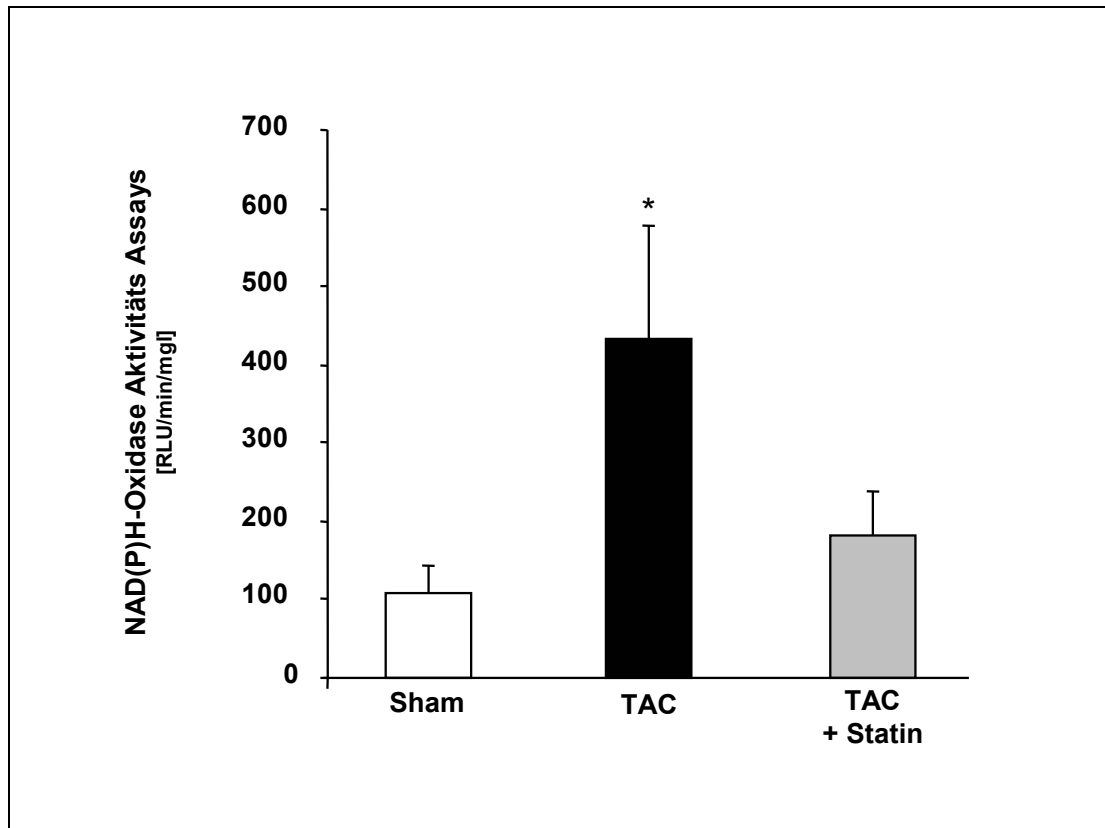


Abbildung 4: Vorarbeiten der Arbeitsgruppe: Effekte einer Aortenligatur (TAC, 360 μm , 21 d) und Behandlung mit Rosuvastatin auf die Aktivität der myokardialen NAD(P)H-Oxidase in C57/B16 Mäusen. Durch TAC kommt es zu einer im Vergleich zur Kontrolle (sham) deutlich gesteigerten Aktivität der NAD(P)H-Oxidase. Behandlung mit Rosuvastatin (Statin, 2,0 mg/kg, s.c., 21 d) führt zu einer wesentlich verminderten Aktivität des Enzymkomplexes (* $p < 0,05$ vs. sham).

2.3. Die kleine GTPase Rac1

Eine wesentliche Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase ist die kleine GTPase Rac1, die zur Familie der Rho-GTPasen gehört. Diese kleinen GTPasen, auch als Ras-related bezeichnet, umfassen eine Familie kleiner GTP bindender Proteine mit einer Größe zwischen 20 und 25 kD und sind von den heterotrimeren, regulatorischen G-Proteinen, welche zwei- bis dreifach größer sind als die monomeren kleinen GTPasen, abzugrenzen. Des Weiteren unterscheiden sie sich in ihrer GTPase Aktivität und ihrer Lokalisation in der Zelle. Ähnlich wie die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine wechseln kleine GTPasen zwischen einem GTP-gebundenen und einem GDP-gebundenen Zustand. Sie sind zentrale Regulatoren des Actin Zytoskelettes und fungieren in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form als molekulare Schalter und Vermittler zwischen Zellmembran und verschiedenen Signalwegen im Rahmen grundlegender zellulärer Funktionen wie Endozytose, Zellzyklus und Gentranskription (Aelst van und D'Souza-Schorey 1997, Hall 1998, Laufs und Liao 2000, Vatner und Kunze 2000).

Eine entscheidende Bedeutung kommt der Aktivität von Rac1 bei der Entstehung der Myokardhypertrophie zu. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Rac1-GTPase am Beginn einer Signalkaskade steht, die wesentlich zur Entstehung eines hypertrophen myokardialen Phänotyps beiträgt. Die Aktivierung von Rac1 setzt einen Signalweg in Gang, der Zielproteine wie die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), die p21-aktivierte Kinase (PAK), als auch die Focal Adhesion Kinase (FAK) umfasst. Darüber hinaus hängt auch die Aktivierung der freie Sauerstoffradikale generierenden NAD(P)H-Oxidase wesentlich von Rac1 ab. Im insuffizienten menschlichen Myokard zeigt sich neben dem vermehrten Auftreten von Sauerstoffradikalen eine Hochregulation der Aktivität von Rac1 (Brown et al. 2006, Ito et al. 2004, Laufs et al. 2002, Maack et al. 2003).

Um die Aktivität der Rac1-GTPase im Rahmen der Myokardhypertrophie zu untersuchen, wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe PAK Pull-Down Assays durchgeführt, welche den Aktivitätsgrad von Rac1 widerspiegeln. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Rac1-Aktivität nach Aortenligatur in C57/B16 Mäusen, verglichen mit sham-operierten Kontrolltieren. Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin führte zu einer deutlich verminderten Aktivität von Rac1 (Abbildung 5).

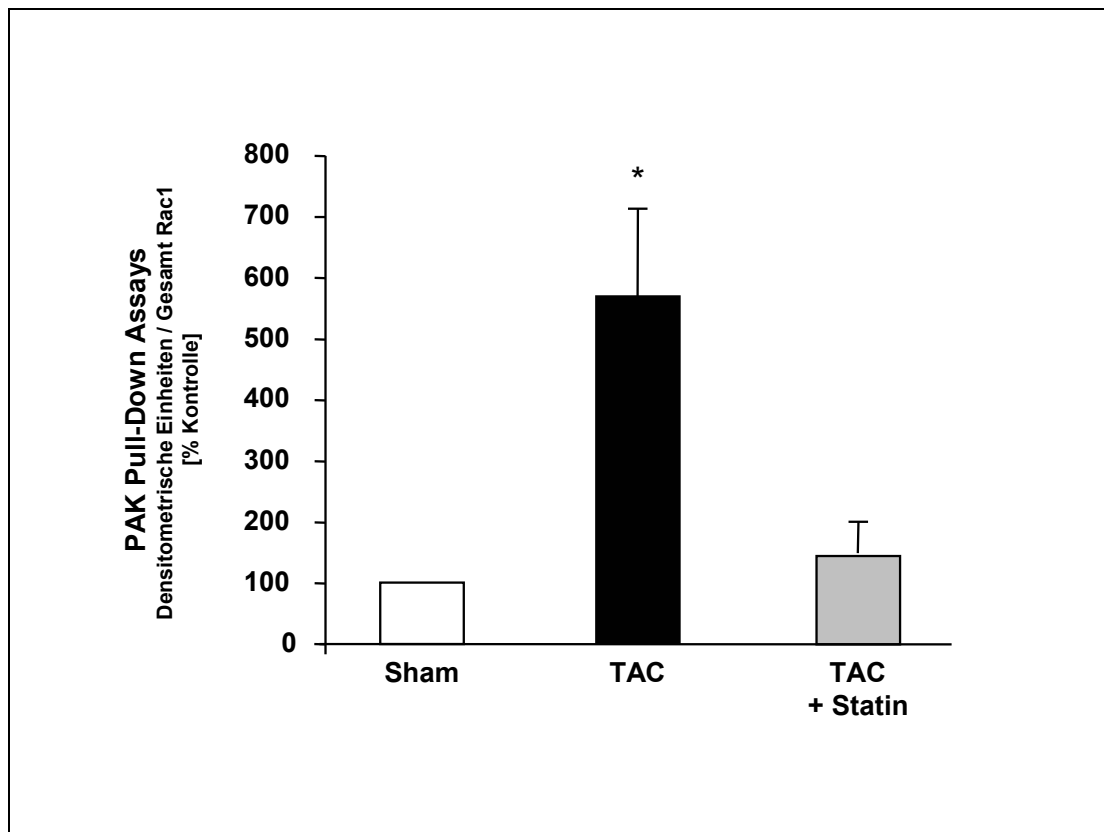


Abbildung 5: Vorarbeiten der Arbeitsgruppe: Effekte einer Aortenligatur (TAC, 360 μm , 21 d) auf die myokardiale Aktivität der Rac1-GTPase in C57/B16 Mäusen. Durch TAC kommt es zu einer im Vergleich zur Kontrolle (sham) wesentlich gesteigerten Aktivität der Rac1-GTPase. Simultane Behandlung mit Rosuvastatin (Statin, 2,0 mg/kg, s.c., 21d) führt zu einer deutlich verminderten Rac1-Aktivität (* $p < 0,05$ vs. sham).

2.3.1. Interaktion der Rac1-GTPase mit ihren Kofaktoren

Rho-Proteine wie Rac1 zirkulieren zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen, und einem aktiven, GTP-gebundenen, Zustand zwischen Zytosol und ihrem Wirkort der Zellmembran. Ein wichtiger Schritt des Aktivierungszyklus ist die posttranslationale Modifikation durch Isoprenoide (Geranylgeranylierung), welche ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese darstellen. Diese ermöglichen eine Translokation von Rho-GTPasen aus dem Zytosol an die Zellmembran. Dieser Zyklus wird durch eine Reihe von Kofaktoren kontrolliert. Hierzu zählen insbesondere „guanine nucleotide exchange factors“ (GEF), „GTPase activating proteins“ (GAP) und „Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (RhoGDI).

Nach Stimulation und Isoprenylierung transloziert Rac1 an die Zellmembran, wo es durch den GEF vermittelten Austausch von GDP durch GTP aktiviert wird. An der Zellmembran interagiert Rac1 mit seinen Effektor-Molekülen. Dazu zählen unter anderem die p21-aktivierte Kinase (PAK), sowie p47phox und p67phox, welche Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase darstellen. GAP führen dann zur Inaktivierung durch Abspaltung eines energiereichen Phosphatanteils im Sinne eines Austausches von GTP durch GDP. Die Translokation von Rac1 in das Zytosol beendet den Aktivierungszyklus (Abbildung 6). Der genaue molekulare Mechanismus der Aktivierung von Rac1 in Kardiomyozyten ist bislang nicht vollständig charakterisiert und nur unzureichend verstanden.

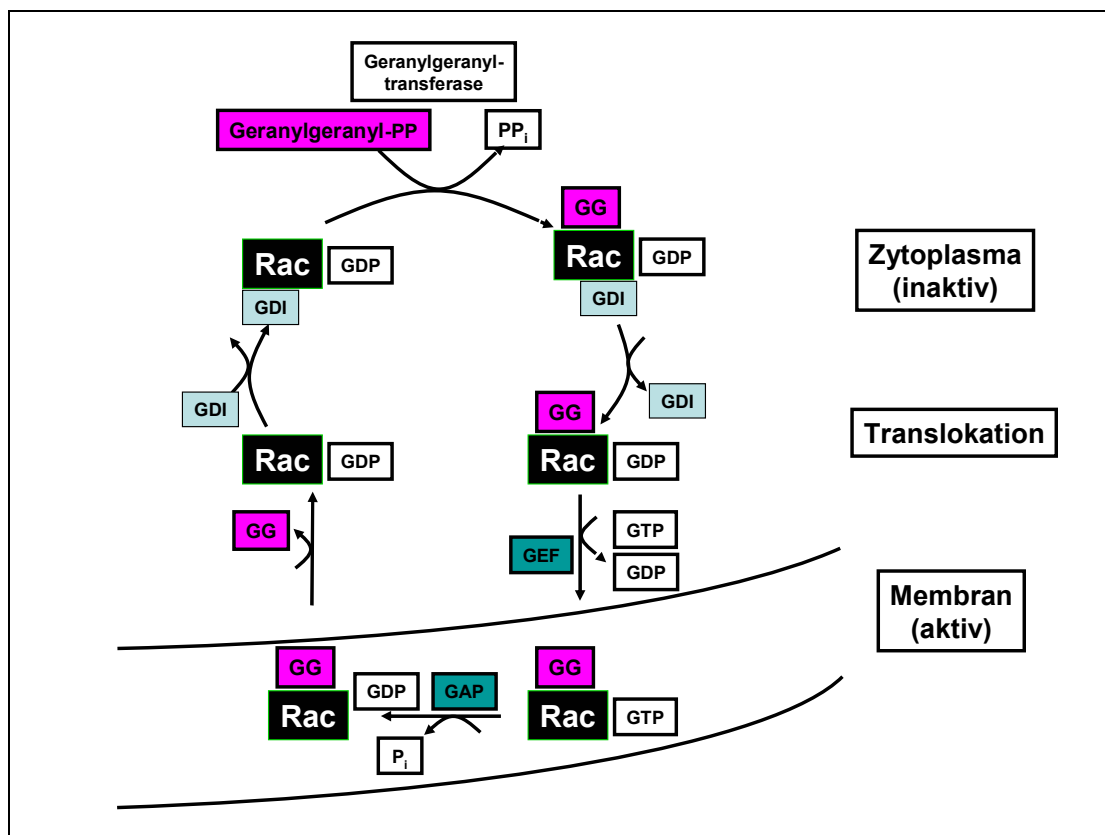


Abbildung 6: Aktivierungszyklus der Rac1 GTPase: Isoprenylierung (Geranylgeranylierung) und Kontrolle durch ihre Kofaktoren. GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) hemmt eine spontane Aktivierung der GTPase. GEF (guanine nucleotide exchange factor) vermittelt den Austausch von GDP durch GTP, GAP (GTPase activating protein) führt zur Abspaltung eines energiereichen Phosphatanteils.

Einen entscheidenden Einfluss auf den Aktivierungszyklus von Rho-GTPasen haben die „Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (RhoGDI), welche Gegenstand mehrerer

aktueller Untersuchungen sind und im Rahmen des Rac1-Aktivierungsweges als negative Regulatoren agieren. Die Familie der RhoGDI umfasst die 3 Subtypen RhoGDI α , RhoGDI β (Ly-RhoGDI) und RhoGDI γ . Während RhoGDI β vorwiegend in hämatopoetischem Gewebe und RhoGDI γ hauptsächlich in Pankreas und Lunge anzutreffen ist, scheint RhoGDI α ubiquitär exprimiert zu werden und Bindungen zu fast allen Rho-GTPasen einzugehen. Es stellt auch den wesentlichen GDI der Rac1-GTPase dar. Vor dem Hintergrund bisheriger Untersuchungen besteht die Funktion von RhoGDI darin, den spontanen Austausch von GDP durch GTP an Rho-GTPasen und damit deren Aktivierung zu verhindern. (Adra et al. 1997, Dovas et al. 2005, Dransart et al. 2005a, Olofsson 1999, Scherle et al. 1993).

Aus diesen Erkenntnissen resultierend ergibt sich ein bislang allgemein propagiertes und anerkanntes Konzept der Aktivierung von Rac1, sowie der NAD(P)H-Oxidase. Dieses beinhaltet als wichtigen Schritt die Dissoziation von Rac1 und RhoGDI α , welche wesentlich für den GEF vermittelten Austausch von GDP durch GTP und die Translokation an die Zellmembran ist. Die Dissoziation von Rac1 und RhoGDI α gilt daher als Voraussetzung für die Aktivierung von Rac1, der NAD(P)H-Oxidase, und somit der Produktion freier Sauerstoffradikale (Abo et al. 1991, Abo et al. 1994, Bokoch et al. 2002, Dovas et al. 2005, Dransart et al. 2005a).

2.3.2. Aktivierung von Rac1 durch posttranslationale Isoprenylierung

Ein wichtiger Schritt und eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung von Rho-GTPasen wie Rac1 ist ihre posttranslationale Modifikation durch Intermediate der Cholesterinbiosynthese, die Isoprenoide. Diese ist die Grundbedingung für die Translokation aus dem Zytosol an die Zellmembran, dem Wirkort der GTPasen. Isoprenoide sind Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese, an deren Anfang die durch die HMG-CoA-Reduktase katalysierte Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat steht. HMG-CoA-Reduktase Hemmer, die sogenannten Statine, hemmen die Cholesterinbiosynthese, indem sie die chemische Struktur des Substrates, HMG-CoA, imitieren und so kompetitiv die Synthese von Mevalonat reduzieren (Istvan und Deisenhofer 2001, Abbildung 7). So wird durch die Hemmung dieses initialen, geschwindigkeitslimitierenden Schrittes darüber hinaus die Bildung von Isoprenoiden unterbunden. Wenn die Isoprenylierung der Rho-GTPasen unterbleibt, wird ihre Translokation, ihre Aktivierung, und damit ihre Funktion gehemmt.

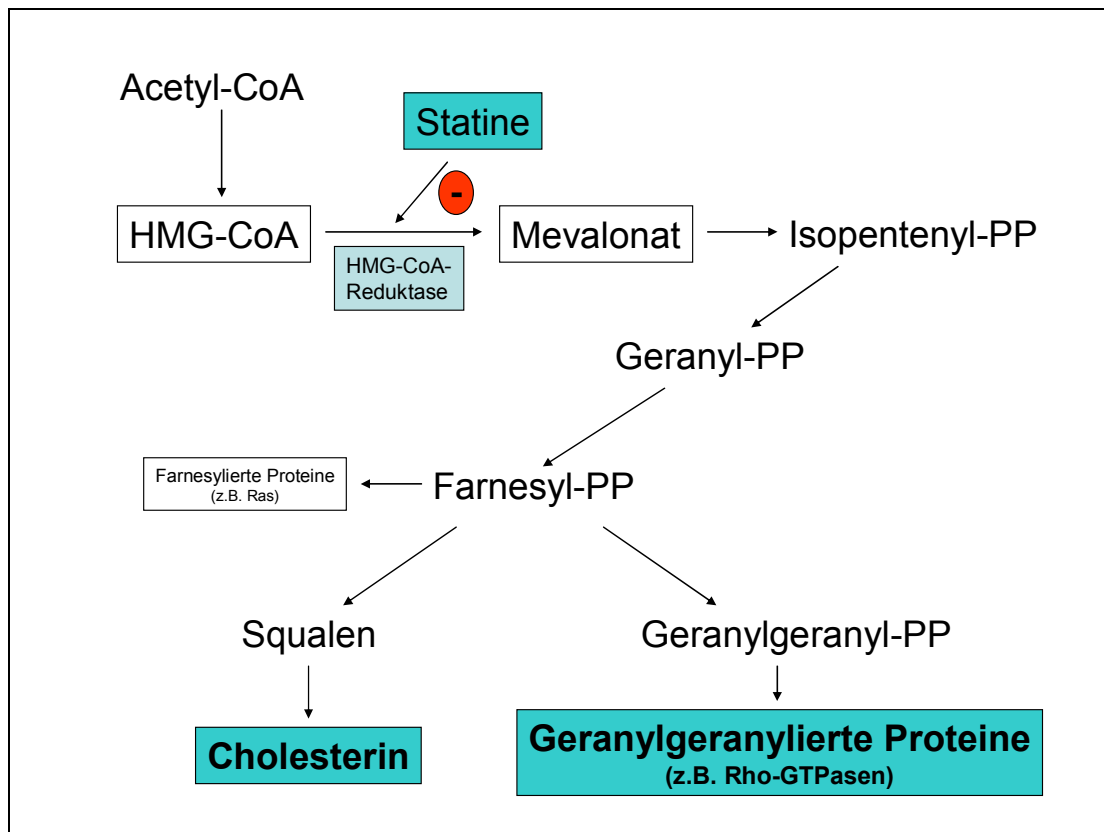


Abbildung 7: Cholesterinbiosynthese: Die kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine verhindert nicht nur die Synthese von Cholesterin, sondern auch von Isoprenoiden, wie Geranylgeranylpyrophosphat, welche für die post-transkriptionelle Modifikation von Rho-GTPasen von Bedeutung sind.

Im klinischen Kontext werden Statine als cholesterinsenkende Medikamente im Rahmen der kardiovaskulären Primär- und Sekundärprävention eingesetzt. In großen Endpunktstudien konnte sowohl für den Bereich der Primärprävention als auch im Rahmen der Sekundärprävention gezeigt werden, dass die Senkung des LDL-Cholesterins durch Statine zu einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität führt (Baigent et al. 2005). Das anti-atherogene Potential hängt, wie durch zahlreiche Untersuchungen belegt, nicht nur von den lipidsenkenden Eigenschaften der Statine ab. Vielmehr hat sich gezeigt, dass sie so genannte cholesterinunabhängige (pleiotrope) Effekte auf Gefäß- und Herzmuskelzellen ausüben. Statine greifen unter anderem in den Zellzyklus ein, reduzieren die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, schwächen Entzündungsprozesse ab und aktivieren die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen (Essig et al. 1998, Kothe et al. 2000, Laufs et al. 1998 und 1999, Vaughan et al. 1996, Wassmann et al. 2002).

Der Einsatz von Statinen stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt für die pharmakologische Beeinflussung der Aktivität der kleinen GTPase Rac1 und der damit verbundenen Bildung freier Sauerstoffradikale und deren Folgen dar.

2.4. Fragestellungen

Freie Sauerstoffradikale spielen eine Schlüsselrolle für die Pathogenese der Myokardhypertrophie. Eine wesentliche Quelle für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im insuffizienten Myokard ist die myokardiale NAD(P)H-Oxidase, deren Funktion wesentlich durch das kleine GTP-bindende Protein Rac1 reguliert wird. Trotz seiner Bedeutung für die Sauerstoffradikalfreisetzung ist der molekulare Mechanismus der Regulation von Rac1 durch hypertrophe Stimuli nur teilweise bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, den Mechanismus der Aktivierung von Rac1 und die Interaktion mit Rho-regulierenden Proteinen wie RhoGDI α im Rahmen der Myokardhypertrophie zu charakterisieren.

Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Welchen Effekt hat ein hypertropher Stimulus wie Angiotensin II sowie eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statinbehandlung auf die Gesamtexpression und die Interaktion der Rac1-GTPase und ihres Kofaktors RhoGDI α in Kardiomyozyten? Gibt es Unterschiede in der Expression und Interaktion zwischen Rac1 und RhoGDI α in verschiedenen zellulären Fraktionen wie Membran und Zytosol? Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten der H9C2-Reihe sowie neonatale Kardiomyozyten der Ratte mit Angiotensin II und Rosuvastatin behandelt. Die Auswirkungen auf die Proteinexpression wurden mittels Western Blot, die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α mittels Immunpräzipitation charakterisiert. Die Separation der zytosolischen und membranären Proteinfractionen erfolgte durch Membranpräparation.
2. Inwiefern sind „upstream“ von Rac1 gelegene Faktoren wie die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase an einer Vermittlung der Assoziation von Rac1 und RhoGDI α beteiligt? Welche Rolle spielt eine Isoprenylierung für die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α ? Hierzu wurden die Effekte der PI3-Kinase-Inhibitoren LY 294002 und Wortmannin sowie der Inhibitoren der Geranylgeranyltransferase und Farnesyltransferase (GGTI-286 und FTI-276) auf die Bindung der GTPase an den Kofaktor in H9C2 Zellen untersucht.
3. Um zu untersuchen, ob die im Rahmen der Zellkultur erhobenen Befunde auch *in vivo* bestätigt werden können, wurde in Wildtyp Mäusen vom Genotyp C57/B16 mittels

Aortenligatur eine myokardiale Hypertrophie induziert. Eine Gruppe der untersuchten Tiere wurde mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin behandelt. Es erfolgte die Untersuchung der Gesamtexpression von Rac1 mittels Western Blot sowie der Bindung von Rac1 an RhoGDI α mittels Immunpräzipitation.

4. Welche mögliche kausale Rolle spielt der Kofaktor RhoGDI α im Rahmen der Angiotensin II induzierten Freisetzung freier Sauerstoffradikale? Zur Klärung dieser Frage wurden H9C2-Zellen mit RhoGDI α spezifischen siRNA Konstrukten transfiziert um eine selektive Hemmung der Expression von RhoGDI α zu erreichen. Mittels Western Blot erfolgte die Kontrolle der Expression von RhoGDI α . Der Nachweis der Produktion freier Sauerstoffradikale erfolgte über Messung der H₂DCFDA-Fluoreszenz. Darüber hinaus wurde die Lipidperoxidation als ein globaler Parameter und Marker für eine gesteigerte Sauerstoffradikalfreisetzung gemessen.

5. Wesentliches Merkmal eines hypertrophen myokardialen Phänotyps ist ein erhöhter intrazellulärer Proteinbedarf und eine gesteigerte Proteinsynthese. Wie wirkt sich eine selektive Hemmung von RhoGDI α durch Transfektion mit spezifischer siRNA auf die zelluläre Aufnahme der Aminosäure Leucin aus? Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte eine Transfektion von H9C2-Zellen mit RhoGDI α siRNA Konstrukten und der Nachweis des in die Zellen inkorporierten Leucins mittels „liquid scintillation counting“.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Substanzen

Acrylamide 30%, Bio Rad Laboratories, München

Ammonium Persulfate (APS), E. Merck, Darmstadt

Ampuwa, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Angiotensin II, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Aprotinin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

BioRad Dc Protein Assay, Reagent A, B, BioRad Laboratories, München

Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt

2',7'- Dichlorodihydrofluoresceindiaceat (H₂DCFDA), GIBCO invitrogen corporation, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid minimum 99,5% (DMSO), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dinatriumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dulbeccos mod. Eagle Medium, GIBCO invitrogen corporation, Karlsruhe

Geranylgeranyltransferase Inhibitor (GGTI-286), Calbiochem, San Diego, USA

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glycin, Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Farnesyltransferase Inhibitor (FTI-276), Calbiochem, San Diego, USA

Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

L-4,5-[³H]-Leucin (9,25 MBq), Amersham Bio Sciences, München

Leupeptin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

LY 294002, Calbiochem, San Diego, USA

Magnesiumchlorid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumchlorid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS), Serva Feinbiochemika, Heidelberg

N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamine (TEMED), Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (TWEEN), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen

Protein-A-Agarose, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Protein-G-Agarose, Roche Diagnostics, Mannheim

Rosuvastatin, Astra Zeneca, Wedel

Rotiszint ECU Plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

RPMI Medium 1640, L-Glutamine, GIBCO invitrogen corporation, Karlsruhe

Trispuffer (Tris(hydroxymethyl)-amino-methan), Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen

Türks Lösung, E. Merck, Darmstadt

Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Trypsin EDTA (10x), Boehringer, Mannheim

Western Blocking Reagent, Roche Diagnostics, Mannheim

Wortmannin, Calbiochem, San Diego, USA

Antikörper:

Anti-mouse IgG (Perox): A-5278, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anti-rabbit IgG (Perox): A-6154, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anti-β-Tubulin (H-235): sc-9104, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-Calsequestrin: C0743, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anti-GAPDH: G9545, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Rac Ak: clone 23A8 (Nr. 05-389), Upstate (Millipore), Billerica, USA

RhoGDIα Ak (A 20): sc-360, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

siRNA:

Arhgdia-1: sense 5'GGA ACU GGA CAA GGA CCG AU tt 3'
antisense 5'AUC GUC CUU GUC CAG UU CC tg 3'
Ambion Inc, Austin, Texas

Arhgdia-2: sense 5'GGA CGA UGA AAG CCU CC GA tt 3'
antisense 5'UCG GAG GCU UUC AUC GU CC tt 3'
Ambion Inc, Austin, Texas

Filter und Membranen:

Bio Rad Extra Thick Filter Paper, Bio Rad Laboratories, München

Hyperfilm, Amersham Bio Sciences, München

Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell Bio Science Protran®, Dassel

Molekularbiologische Kits:

Amaxa HCAEC Nucleofector Kit, Amaxa Biosystems, Köln

Enhanced Chemiluminiscence (ECL) Kit, Amersham Bio Sciences, München

Lipid Peroxidation Assay Kit II, Calbiochem, San Diego, USA

Protein-Molekulargewichts-Standards:

Prestained SDS-Page Standards, Low Range, BioRad Laboratories, München

3.1.2. Verwendete Puffer

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben der Pufferbestandteile auf ein Endvolumen von 1000 ml.

E-1 Puffer:	135 mmol/l NaCl 5,4 mmol/l KCl 1,8 mmol/l CaCl ₂ 1 mmol/l MgCl ₂ 10 mmol/l Glukose 20 mmol/l NaHEPES pH 7,5
Elektrophoresepuffer:	720 g Glycin 151,5g Tris 50 g SDS ad 5000 ml Ampuwa
Inkubationspuffer:	25 mmol/l Tris 1 mmol/l EDTA 20 mmol/l MgCl ₂
Ladepuffer (Western Blot):	2,0 ml Glycerol 2,0 ml SDS (10%) 0,25 mg Bromphenolblau 2,5 ml Stacking Gel Puffer ad 9,5 ml Ampuwa
Protein-Lysepuffer (Gesamtprotein):	5 ml Tris (1M) 20 ml SDS (10%) 10 ml Glycerol ad 15 ml Ampuwa

Protein-Lysepuffer (Immunpräzipitation): 400 µl Hepes (pH 7,4)
40 µl EGTA
20 µl DTT
20 µl Na₃VO₄ (pH 7,4)
2 ml Triton X-100
4 ml Glycerol
4 ml PMSF
4 µl Leupeptin
100 µl Aprotinin
3,8 µl E 64
40 µl Microcystin
216 mg β-Glycerophosphat
ad 20 ml Ampuwa

Stacking Gel Puffer: 6,06 g Tris
4 ml SDS (10%)
ad 100 ml Ampuwa, pH 6,8

Transferpuffer (Western Blot): 2,9 g Tris
14,5 g Glycin
200 ml Methanol

PBS (phosphate buffered saline) 10x: 80 g NaCl
2 g KCl
2,4 g KH₂PO₄
14,4 g Na₂HPO₄
pH 7,4

PBS Tween: 1 l PBS + 10 ml Tween

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Kardiomyozyten der H9C2-Zellreihe wurden nach vorsichtigem Auftauen in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM), enthaltend 10 % fetales Kälberserum, Glutamin (2 mM) sowie 100 U/ml Streptomycin, resuspendiert und nach Zentrifugation in Schalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. Die Zellen wurden in einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre bei 37° C in Kultur gebracht, wobei das Medium alle 2 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt wurde. Konfluente Zellen von weniger als 50 Passagen wurden zur Behandlung benutzt.

3.2.2. Western Blot

Zur Herstellung des Trenngels wurden 4 ml H₂O (Ampuwa), 3,3 ml Acrylamid (30 %), 2,5 ml 1,5 M Trispuffer (pH 8.8), 0,1 ml SDS (10 %), 0,1 ml Ammonium Persulfate (10 %), sowie 4 µl Temed verwendet. Das Sammelgel setzte sich aus 2,7 ml Ampuwa, 0,67 ml Acrylamid (30 %), 0,5 ml 1 M Trispuffer (pH 6.8), 0,04 ml SDS (10 %), 0,04 ml Ammonium Persulfate und 4 µl Temed zusammen. Die tiefgefrorenen Zellysate wurden auf Eis aufgetaut und 25 µg Protein mit 15 µl Ladepuffer versetzt. Proben mit Gesamtprotein wurden für 7 Minuten bei 70° C erhitzt, Proben nach Immunpräzipitation 2 Minuten bei 100° C, auf das Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde ein prestained SDS-Page Standards Low Range Marker von Biorad verwendet. Eine Nitrozellulosemembran wurde in 20 % Methanol gewaschen. Das Gel, die Membran, sowie das Filterpapier wurden vor dem Transfer für 10 Minuten in Transferpuffer gebadet, und anschließend bei 0,2 Ampere für 45 Minuten in einer Semi-Dry Blotkammer auf die Membran geblottet. Diese wurde über Nacht bei 4° C in Western Blocking Reagent auf niedriger Stufe geschüttelt. Die Membranen wurden für eine Stunde bei 37° C mit dem primären Antikörper (RhoGDI α , Rac1, β -Tubulin, je 1:250) in einer Thermo-Glasröhre (Electron) im Ofen (Hybaid) inkubiert, mehrfach mit PBS-Tween gewaschen und im Anschluß mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG bzw. anti-mouse IgG, je 1:4000) eine halbe Stunde unter langsamen Schütteln inkubiert. 10 ml ECL Reagenz (Amersham) wurden auf die Membranen aufgebracht. Nach einer Minute erfolgte der Nachweis der Chemiluminiszenz auf Hyperfilm (Amersham) mittels einer

Entwicklungsmaschine (Agfa Crurix 60).

3.2.3. Immunpräzipitation

Die Bindung von Rac1 an RhoGDI α wurde mit Hilfe von Immunpräzipitation nachgewiesen. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Protein Lysepuffer (50 mM β -Glycerophosphat, 1mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Na₃VO₄, Proteaseinhibitoren-Mix) geerntet. Nach vortexen und 10-minütiger Lagerung auf Eis, wurde das Zellysat für 15 Minuten bei 4° C und 14.000 rpm zentrifugiert. 250 μ g Protein wurden für 3 h bei 4° C mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Es wurden hierfür 15 μ l RhoGDI α (A 20) Antikörper (Santa Cruz) bzw. 4 μ l Anti-Rac1 (Upstate) verwendet. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Immunkomplexe mit 30 μ l Protein-A-Agarose (Santa Cruz) für RhoGDI α , bzw. 30 μ l Protein-G-Agarose (Roche) für Rac1, über 2 h bei 4° C. Nach kurzer Zentrifugation (30 s, 12.000 rpm) wurden die Pellets, welche die immunpräzipitierten Proteine enthielten, 3 mal mit Lysepuffer gewaschen, dann in 30 μ l Western-Ladepuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 100° C erhitzt. Die so entstandenen Lysate wurden mit Hilfe von Western Blots ausgewertet.

3.2.4. Membranpräparation

Zur Trennung der Zellmembranfraktion von der Zytosolfraction wurden die vorbehandelten Zellen mit eisgekühlter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit einem Zellschaber abgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 4° C kaltem Lysepuffer gelöst und für 15 Minuten darin belassen. Zum Homogenisieren wurden die Proben bei 4° C und 700 rpm mit einem Glas-Teflon-Homogenisator gepottet. Die anschließende Zentrifugation (1100 rpm) und Homogenisierung wurden zweimal wiederholt. Der Überstand der Proben wurde nun bei 4° C und 25.000 rpm für 20 Minuten ultrazentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Zytosols verblieb nun die Membranfraktion als Pellet am Boden und wurde in Inkubationspuffer resuspendiert. Die Membranfraktion wurde bei -80° C eingefroren und vor Versuchsbeginn langsam auf Eis aufgetaut. Alle Präparationsschritte fanden auf Eis oder bei 4° C im Kühlraum statt.

3.2.5. siRNA Transfektion

Um eine mögliche kausale Rolle der Angiotensin II induzierten Assoziation von RhoGDI α mit Rac1 für die Superoxid Produktion in H9C2 Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von RhoGDI α gehemmt. Dies wurde durch die Methode der siRNA (small interfering RNA) Transfektion erreicht. Diese erlaubt die spezifische Inhibition eines Zielproteins durch die Degradation (silencing) der entsprechenden mRNA. Verwendet wurden folgende RhoGDI α spezifische Sequenzen: Arhgdia-1 sense 5'GGA ACU GGA CAA GGA CCG AU tt 3', antisense 5'AUC GUC CUU GUC CAG UU CC tg 3', sowie Arhgdia-2 sense 5'GGA CGA UGA AAG CCU CC GA tt 3', antisense 5'UCG GAG GCU UUC AUC GU CC tt 3' (Ambion Inc.). Zur Kontrolle wurde unspezifische siRNA (scrambled RNA) eingesetzt.

Konfluente Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und mit jeweils 2,5 ml Trypsin pro Schale trypsiniert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm wurde das Pellet in 5 ml Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) resuspendiert. 20 μ l Resuspendat wurde mit 20 μ l Türkscher Lösung vermischt und davon wiederum 20 μ l auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und gezählt. Die pro Transfektion benötigte Zielmenge entspricht 1×10^6 Zellen. Das entsprechende Volumen an Resuspendat wurde erneut zentrifugiert (8 min, 800 rpm), und anschließend in 100 μ l Nucleofectorlösung (Amaxa HCAEC Nucleofector Kit, Amaxa Biosystems, Köln) resuspendiert. In speziell zur Transfektion bestimmten Küvetten wurden 100 μ l der Nucleofectorlösung mit den enthaltenden Zellen mit 1 μ l siRNA (100 nM) versetzt und mit Hilfe des Amaxa Nucleofectors transfiziert (Programm U25). Die transfizierten Zellen wurden unmittelbar in 1,5 ml vorgewärmtes RPMI überführt und im Brutschrank aufbewahrt. Nach Durchführung aller Transfektionen wurden die Zellen in 5 cm Schalen mit 5 ml DMEM überführt und für 48 h bei 37° C im Brutschrank kultiviert. Im Anschluß wurden sie für 3 h mit 1 μ M Angiotensin II behandelt, geerntet und der Auswertung mittels H₂DCFDA Messung bzw. Western Blot zugeführt.

3.2.6. Messung der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA)

Die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion in H9C2 Zellen wurde mit Hilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat Fluoreszenz (H₂DCFDA) gemessen. Die Zellen wurden zunächst mit E1-Puffer (135 mmol/l NaCl, 5,4 mmol/l KCl, 1,8 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Glukose, 20 mmol/l Na-HEPES, pH 7,5) gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 10 mmol/l 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges H₂DCFDA wurde mit E1-Puffer abgewaschen. Die Zellkulturschalen wurden auf ein Nikon inverted microscope (Eclipse TS 100/TS 100-F), ausgestattet mit einer Digitalkamera von Nikon (DXM 1200), übertragen. Die Sauerstoffradikalproduktion wurde als Ergebnis der Oxidation von H₂DCFDA (Extinktion: 488 nm; Emission long pass LP 515-nm Filterset) gemessen. Die Bilder mit einer Auflösung von 512x512 pixel wurden durch Einzel-Schnell-Abtastung bei identischen Parametern für alle Untersuchungen, wie Helligkeit und Kontrast, ausgesucht. Pro Versuchsbedingung wurden jeweils 5 Bilder aufgenommen, von denen jeweils 20 Zellen randomisiert ausgesucht und die Intensität der Fluoreszenz gemessen wurde. Die relative Intensität der Fluoreszenz ist der Durchschnittswert aller Experimente. Die H₂DCFDA-Fluoreszenz wurde mit Hilfe von Confocal Assistant™ (Version 4.02) und Carl Zeiss LSM Beta (Version 3.92) Software quantifiziert und wurde in Relation zur Basis-Fluoreszenz (Kontrolle) in einzelnen Zellen ausgedrückt.

3.2.7. Lipid Peroxidations Assay

Freie Sauerstoffradikale führen zur Lipidperoxidation. Die Lipidperoxide und ihre Nebenprodukte führen zu einem Verlust der zellulären Membranintegrität. Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenale sind Endprodukte der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Ihre Messung dient als Index für das Ausmaß der Lipidperoxidation.

Myokardiales Gewebe wurde in PBS (pH=7,4), welches butyliertes Hydroxytoluene (4 mmol/l) enthielt, homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Pellet verworfen. Zur Messung der Lipidperoxidation wurde das Lipid Peroxidations Assay Kit II von Calbiochem verwendet. Dazu wurden 10 µl Enzym (Katalase in PBS), 90 µl Probe und 10 µl Ampuwa in ein Eppendorfgefäß pipettiert,

gevortext und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 90 µl Working Reagent hinzugefügt, nochmals gevortext und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Absorption des Überstandes wurde bei 560 nm im Photometer gemessen. Zuvor wurde das Photometer mit Aqua bidest auf einen Nullwert geeicht.

3.2.8. Leucininkorporation

Die zelluläre Inkorporation der Aminosäure Leucin stellt einen Marker für den im Rahmen myokardialer Hypertrophie intensivierten Proteinmetabolismus dar. Konfluente H9C2 Zellen wurden nach RhoGDI α spezifischer siRNA Transfektion für 3 h mit Angiotensin II (1µM) behandelt. 6 h vor der Ernte wurde den Zellen L-4,5- ^3H -Leucin (1 µCi/ml) zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mehrfach mit PBS gewaschen, und mit 500 µl Gesamtprotein Lysepuffer pro Zellkulturschale geerntet. Die geernteten Zellen wurden zusammen mit Rotiszint ECU Plus Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsröhren der Firma Carl Roth GmbH überführt. Mittels des „liquid scintillation counting“ wurde das inkorporierte Leucin quantifiziert.

3.2.9. Statistische Auswertung

Bandenintensitäten von Western Blots wurden mit Hilfe eines Densitometrieprogrammes (LabWorksTM) ausgewertet. Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für 2 Stichproben, sowie mittels ANOVA-Test gefolgt von Bonferroni post-hoc Analysen bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Effekt von Angiotensin II und Rosuvastatin auf die Expression der Rac1-GTPase sowie auf ihre Interaktion mit RhoGDI α in Kardiomyozyten

Es ist bekannt, dass die kleine GTPase Rac1 eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Angiotensin II induzierten Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Myokard, und der damit einhergehenden myokardialen Hypertrophie spielt. Eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von Rac1 ist die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren, wie dem „Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor“ α (RhoGDI α). Aus diesem Grund war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α in kultivierten Kardiomyozyten zu untersuchen. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Dissoziation von RhoGDI und Rac1 eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der Rac1-GTPase darstellt (Abo et al. 1991 und 1994, Bokoch et al. 2002, Laufs et al. 2002, Takemoto et al. 2001). Entsprechend den aktuell vorliegenden Konzepten gingen wir davon aus, dass hypertrophe Stimuli wie Angiotensin II die Trennung von Rac1 von RhoGDI α erleichtern.

Zunächst wurde die Gesamtexpression von Rac1 und RhoGDI α in kultivierten Kardiomyozyten der H9C2 Zellreihe unter Stimulation mit Angiotensin II (Ang II, 1 μ M, 3 h) und Rosuvastatin (1 μ M, 16 h) untersucht. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression von Rac1 unter Behandlung mit Ang II ($159\pm 28\%$, $p < 0,05$). Die Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktase Hemmer Rosuvastatin allein zeigte keinen Effekt auf die Gesamtexpression von Rac1. Präinkubation mit Rosuvastatin (16 h) verhinderte jedoch die Ang II induzierte Hochregulation von Rac1. Die Expression von RhoGDI α hingegen blieb unter beiden Behandlungsbedingungen unverändert (Abbildung 8 A).

Um die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α zu untersuchen wurden sowohl H9C2 Zellen als auch neonatale Kardiomyozyten mit Angiotensin II (Ang II, 1 μ M, 3 h) und Rosuvastatin (1 μ M, 16 h) behandelt. Die Lysate wurden mit Rac1 bzw. RhoGDI α immunpräzipitiert, und die so entstandenen Immunkomplexe mit Hilfe von Western Blots analysiert.

In den mit Ang II behandelten H9C2 bzw. neonatalen Zellen kam es zu einer deutlich gesteigerten Expression des Rac1-RhoGDI α -Komplexes ($279\pm 40\%$, $p < 0,05$, $n=6$).

Zusätzliche Behandlung mit Rosuvastatin vermochte die Hochregulierung der Komplexbildung zu unterbinden ($116\pm 30\%$). Die isolierte Behandlung mit Rosuvastatin beeinflusste die Rac1-RhoGDI α Bindung nicht signifikant (Abbildung 8 A).

Um zu untersuchen ob eine Behandlung der Zellen mit Angiotensin II auch am Wirkort von Rac1, der Zellmembran, zu einer vermehrten Assoziation von Rac1 und RhoGDI α führt, wurden die oben beschriebenen Untersuchungen in gleicher Weise an isolierten Zellmembranen durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine vermehrte Expression der Rac1-RhoGDI α Komplexe ($251\pm 35\%$, $p < 0,05$, $n=6$), wohingegen die Rac1-RhoGDI α Bindung im Zytosol unter hypertrophem Stimulus unverändert blieb ($133\pm 22\%$, $n=4$, Abbildung 8 B).

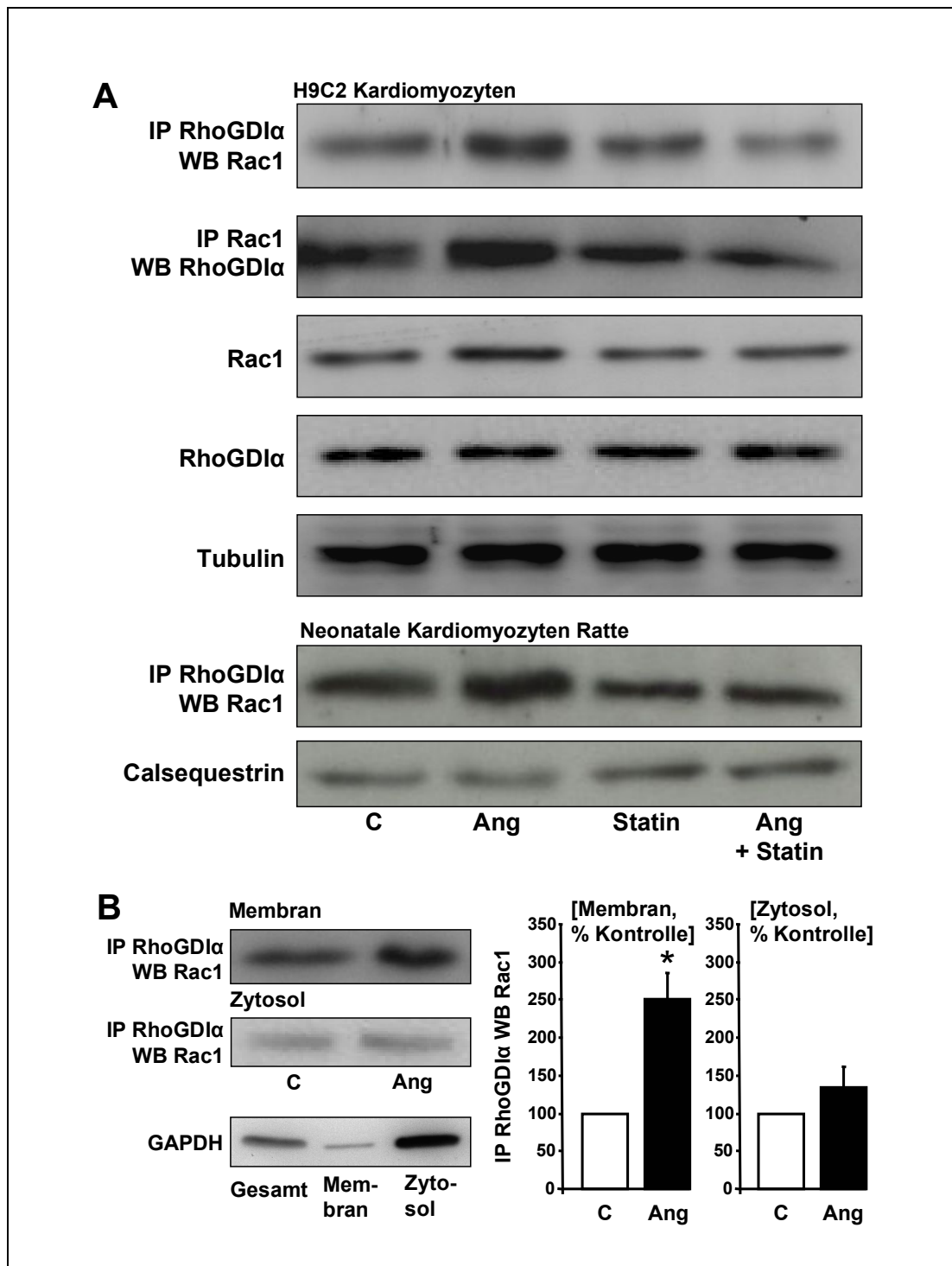


Abbildung 8: (A) Effekte von Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h) und Rosuvastatin (Statin, 1 μ M, 16 h) auf die Proteinexpression von Rac1 und RhoGDI α sowie des Rac1-RhoGDI α Komplexes in kultivierten Kardiomyozyten (H9C2) und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte. Proteinauftrennung mittels Western Blot. (B) Expression und Quantifizierung des Rac1-RhoGDI α Komplexes in Zellmembran und Zytosol unter Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h, n=4-6, *p<0,05, IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot).

4.2. Bedeutung der PI3-Kinase und der posttranslationalen Isoprenylierung von Rac1 für die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α

Voruntersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen haben gezeigt, dass die „upstream“ von Rac1 liegende Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase einen wesentlichen Faktor im Rahmen der Angiotensin II vermittelten Aktivierung von Rac und der damit verbundenen Stimulation der NAD(P)H-Oxidase darstellt (Seshiah et al. 2002).

Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte, dass das membranständige Produkt der PI3-Kinase, Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), eine regulierende Funktion auf verschiedene „Guanine nucleotide exchange factors“ (GEF) ausübt, und auch auf diesem Wege den Aktivierungszyklus von Rac1 und der NAD(P)H-Oxidase beeinflusst (Bae et al. 2000, Han et al. 1998, Kanai et al. 2001).

Vor diesem Hintergrund wurden die Effekte zweier bekannter Inhibitoren der PI3-Kinase auf die Bindung von Rac1 an RhoGDI α untersucht. Kardiomyozyten der H9C2-Zellreihe wurden sowohl mit Angiotensin II (Ang II, 1 μ M, 3 h) allein, als auch nach Vorinkubation mit Wortmannin (0,1 nM, 16 h), bzw. LY 294002 (LY, 10 nM, 16 h) mit Angiotensin II behandelt. Nach Immunpräzipitation mit RhoGDI α wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die unter Angiotensin II Stimulation zu beobachtende Verstärkung der Bindung von Rac1 an RhoGDI α bei gleichzeitiger Inhibition der PI3-Kinase durch Wortmannin bzw. LY verhindert wurde. Die Gesamtexpression von RhoGDI α wurde hiervon nicht beeinflusst (Abbildung 9).

Ein wesentlicher Schritt für die Aktivierung von Rho-GTPasen ist ihre postrtranslationale Isoprenylierung (Geranylgeranylierung). Um zu untersuchen ob auch die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α durch Isoprenylierung beeinflusst oder vermittelt wird wurden H9C2 Zellen nach Vorinkubation mit Rosuvastatin (Statin, 1 μ M, 16 h), einem Inhibitor der Geranylgeranyltransferase (GGTI-286, 50 μ M, 16 h) sowie einem Inhibitor der Farnesyltransferase (FTI-276, 10 nM, 16 h) mit Angiotensin II (Ang II, 1 μ M, 3 h) stimuliert. Die Statinbehandlung und Behandlung mit GGTI-286 nach Vorinkubation mit Rosuvastatin führte zu einem deutlichen Rückgang der unter Angiotensin II verstärkten Ausbildung des Rac1-RhoGDI α Komplexes, wohingegen es unter Behandlung mit FTI-276 nicht zu einer

Reduktion der Komplexbildung kam. Die Gesamtexpression von RhoGDI α wurde von keiner der Behandlungsbedingungen beeinflusst (Abbildung 9).

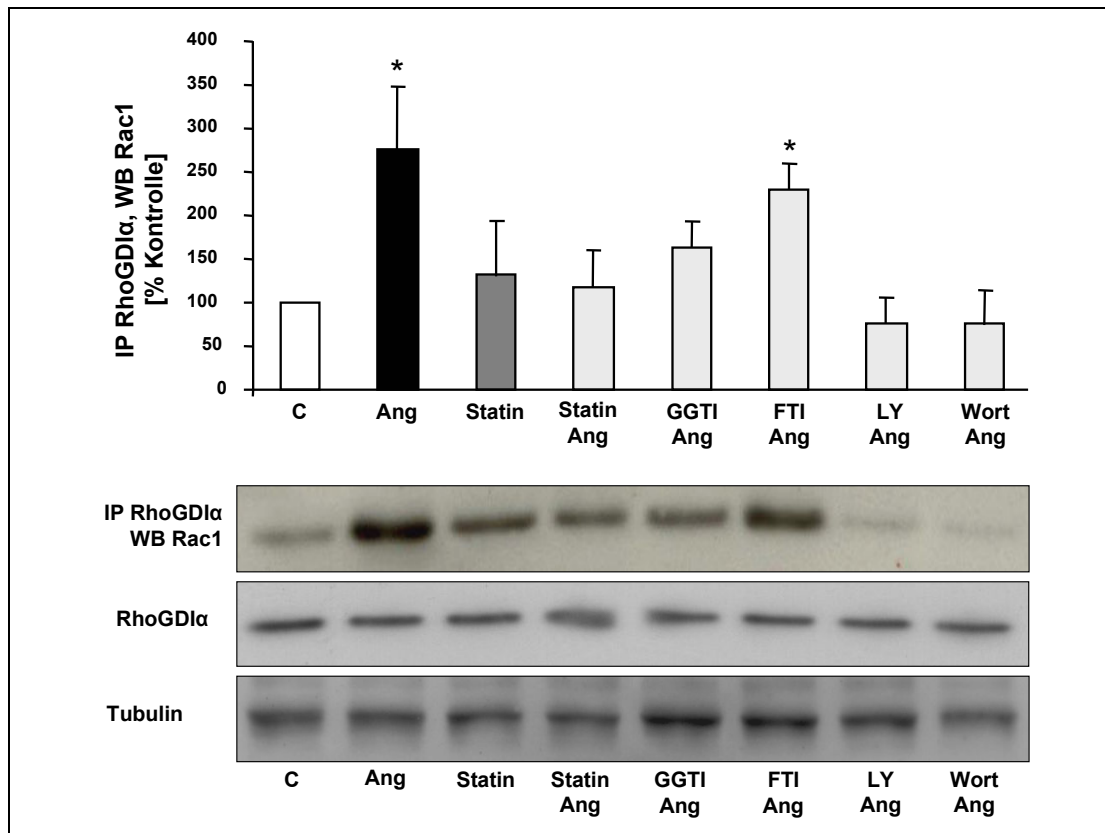


Abbildung 9: Auswirkung einer Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h), Rosuvastatin (Statin, 1 μ M, 16 h), GGPP-Transferase-Inhibitor (GGTI, 50 μ M, 16 h), FPP-Transferase-Inhibitor (FTI, 10 nM, 16 h), LY 294002 (LY, 10 nM, 16 h) und Wortmannin (Wort, 0,1 nM, 16 h) auf die Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes sowie auf die Gesamtexpression von RhoGDI α in kultivierten Kardiomyozten (H9C2). Proteinauftrennung mittels Westernblot (IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot, n=4-12, *p<0,05 vs. Kontrolle).

4.3. Effekte einer chronischen Nachlasterrhöhung auf die Expression der Rac1-GTPase und ihre Assoziation mit RhoGDI α im Mausmodell

Um die im Rahmen der Zellkulturexperimente erhobenen Befunde auch *in vivo* zu untersuchen, wurde die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α in hypertrophiertem Myokard von C57/B16 Mäusen mittels Immunpräzipitation und Western Blot bestimmt. Die Hypertrophie wurde bereits im Vorfeld der Arbeit durch Aortenligatur (TAC) induziert.

Hypertrophiertes Myokard wies einen deutlichen Anstieg der Rac1 Gesamtexpression im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen (sham) auf ($130\pm 14\%$, $p < 0,05$, $n=5$, Abbildung 10), wohingegen die Gesamtexpression von RhoGDI α auch *in vivo* durch chronische Nachlasterrhöhung nicht reguliert wurde (ohne Abbildung). Es zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrollgruppe (sham) signifikanter Anstieg der Assoziation von Rac1 an RhoGDI α nach Aortenligatur ($246\pm 39\%$, $p < 0,05$, $n=5$). Behandlung mit Rosuvastatin (2,0 mg/kg, s.c., 21 d) im Anschluss an die Operation führte zu einer deutlich verminderten Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes ($95\pm 16\%$, $p < 0,05$, $n=5$, Abbildung 10).

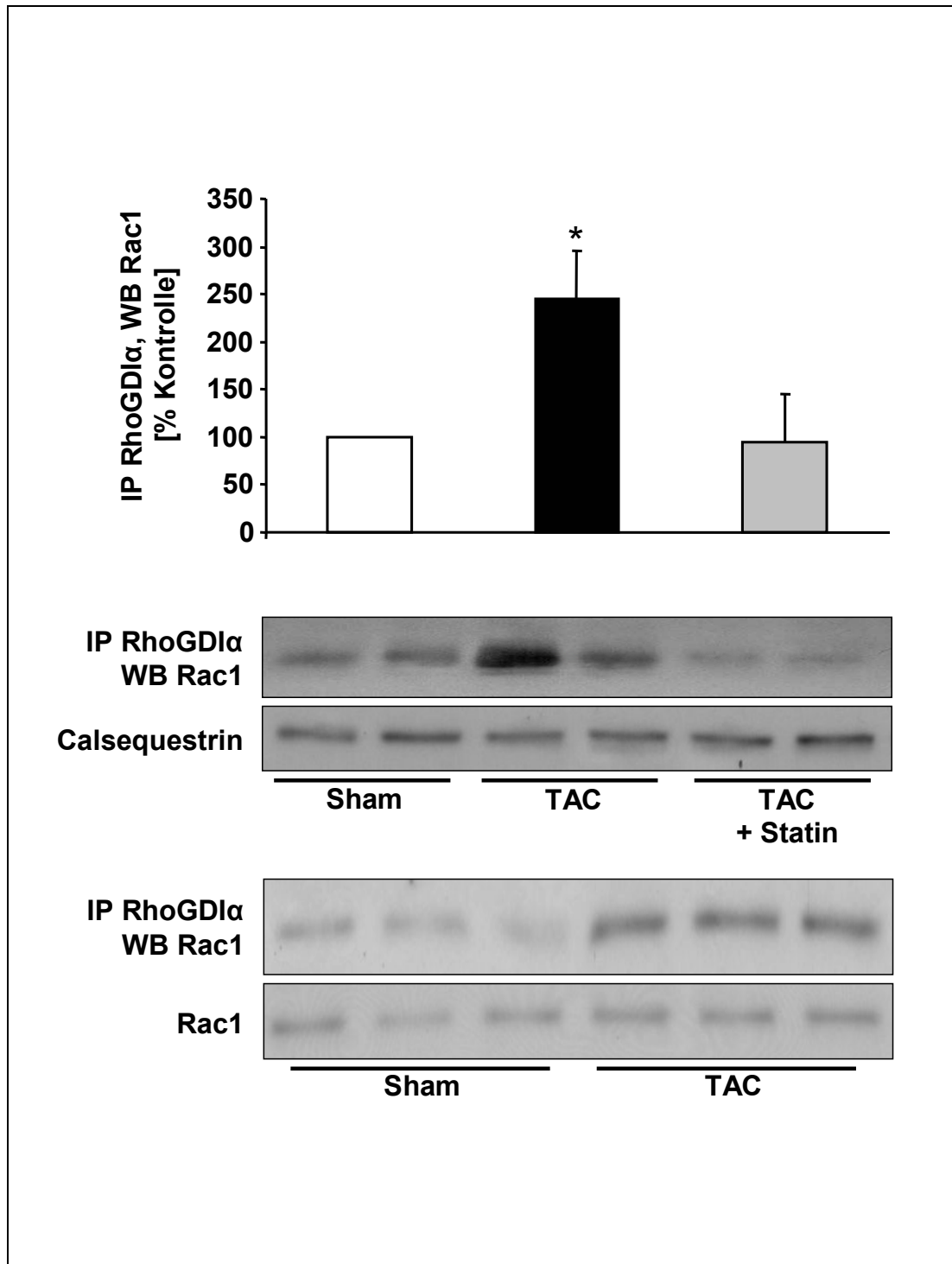


Abbildung 10: Effekte einer Aortenligatur (TAC, 360 μ m, 21 d) und simultane Behandlung mit Rosuvastatin (Statin, 2,0 mg/kg, s.c., 21 d) auf die Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes und die Gesamtexpression von Rac1 im Myokard von C57/B16 Mäusen. Proteinauftrennung mittels Western Blot (IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot, Calsequestrin als Ladekontrolle, n=5, *p<0,05 vs. sham).

4.4. Effekte einer Transfektion von kultivierten Kardiomyozyten mit RhoGDI α spezifischer siRNA

Um eine mögliche kausale Rolle von RhoGDI α im Rahmen der Angiotensin II induzierten Freisetzung freier Sauerstoffradikale zu untersuchen, wurden H9C2 Kardiomyozyten mit RhoGDI α siRNA Konstrukten transfiziert und so eine spezifische Inhibition von RhoGDI α durch Degradation der komplementären RNA induziert. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden zwei unterschiedliche RhoGDI α spezifische siRNA Sequenzen eingesetzt (S1 + S2). Transfektion mit spezifischer siRNA führte zu einer deutlichen Verringerung der Gesamtexpression von RhoGDI α in H9C2 Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit unspezifischer siRNA (scrambled RNA) transfiziert wurden ($65\pm 12\%$, $p < 0,01$, $n=5$).

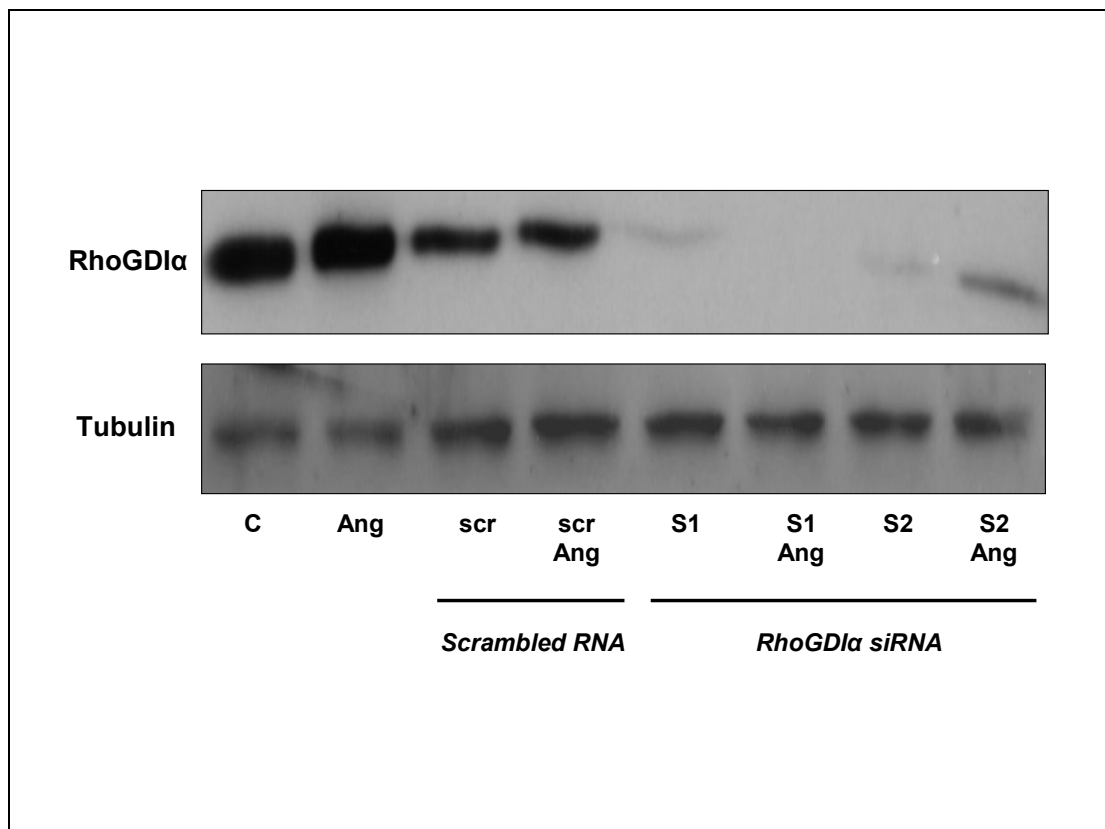


Abbildung 11: Western Blot Analyse der RhoGDI α Expression nach Transfektion von H9C2 Zellen mit RhoGDI α spezifischer siRNA (S1 und S2), scrambled RNA (scr) und nach Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h).

4.4.1. Einfluss der spezifischen Hemmung von RhoGDI α durch siRNA-Transfektion auf die Freisetzung freier Sauerstoffradikale in kultivierten Kardiomyozyten

Um die Auswirkungen einer selektiven Inhibition von RhoGDI α auf die Produktion freier Sauerstoffradikale zu untersuchen, wurden H9C2 Zellen nach Transfektion mit RhoGDI α spezifischer siRNA und Stimulation mit Angiotensin II (Ang II, 1 μ M, 3 h) mit 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) inkubiert und die jeweilige DCF-induzierte Fluoreszenz gemessen.

Sowohl die Zellen der Kontrollgruppe, als auch die mit unspezifischer siRNA (scrRNA) transfizierten Zellen zeigten eine im Vergleich zum Ausgangswert deutlich höhere H₂DCFDA-Fluoreszenz unter Stimulation mit Angiotensin II. Zellen, die mit RhoGDI α spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigten auch nach Behandlung mit Angiotensin II keinen relevanten Anstieg der Fluoreszenz (Abbildungen 12 und 13).

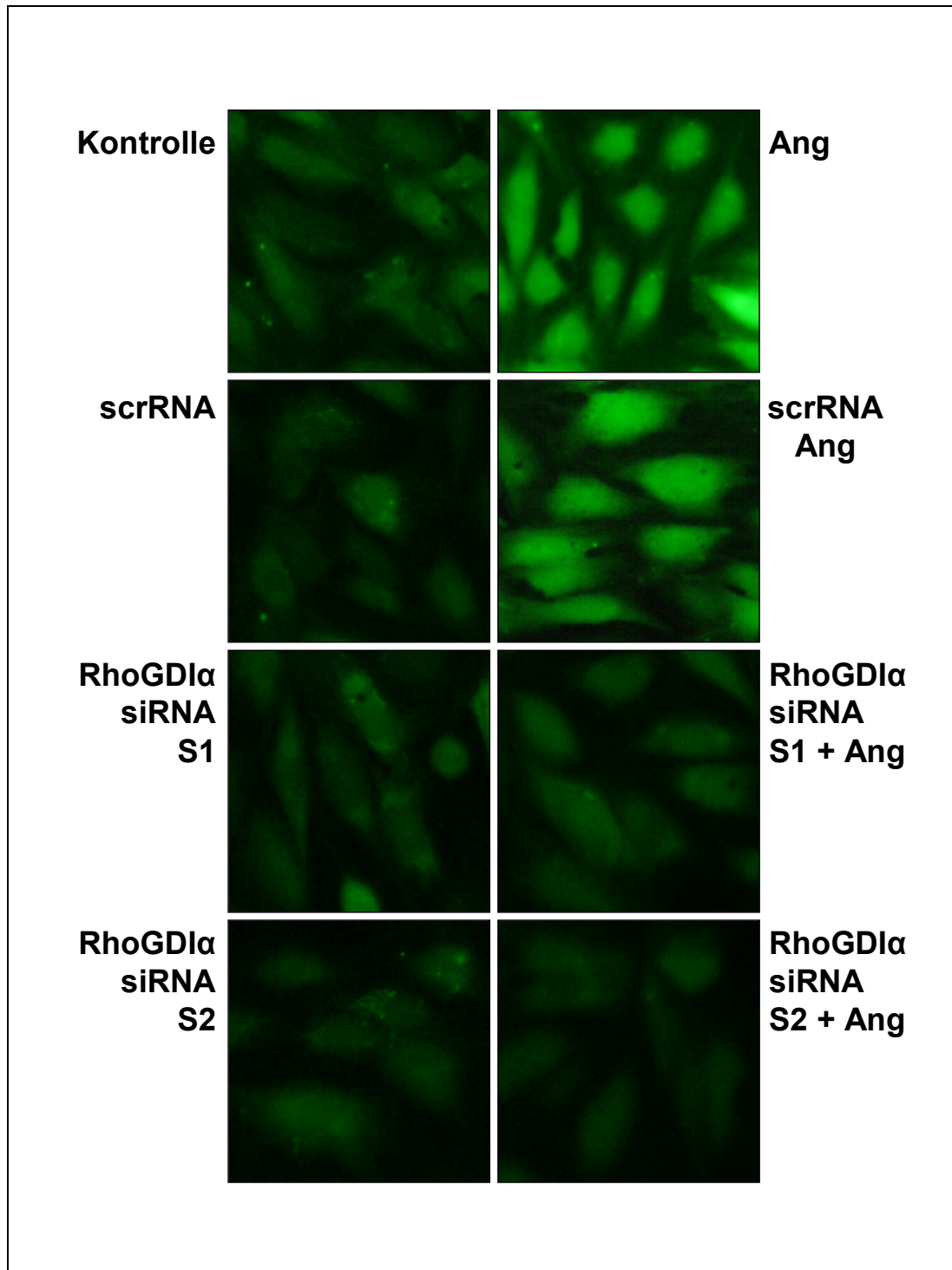


Abbildung 12: H₂DCFDA-Fluoreszenz in H9C2 Zellen nach Transfektion mit RhoGDIα spezifischer siRNA (S1 und S2), scrambled RNA (scr) und Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μM, 3 h, n=5).

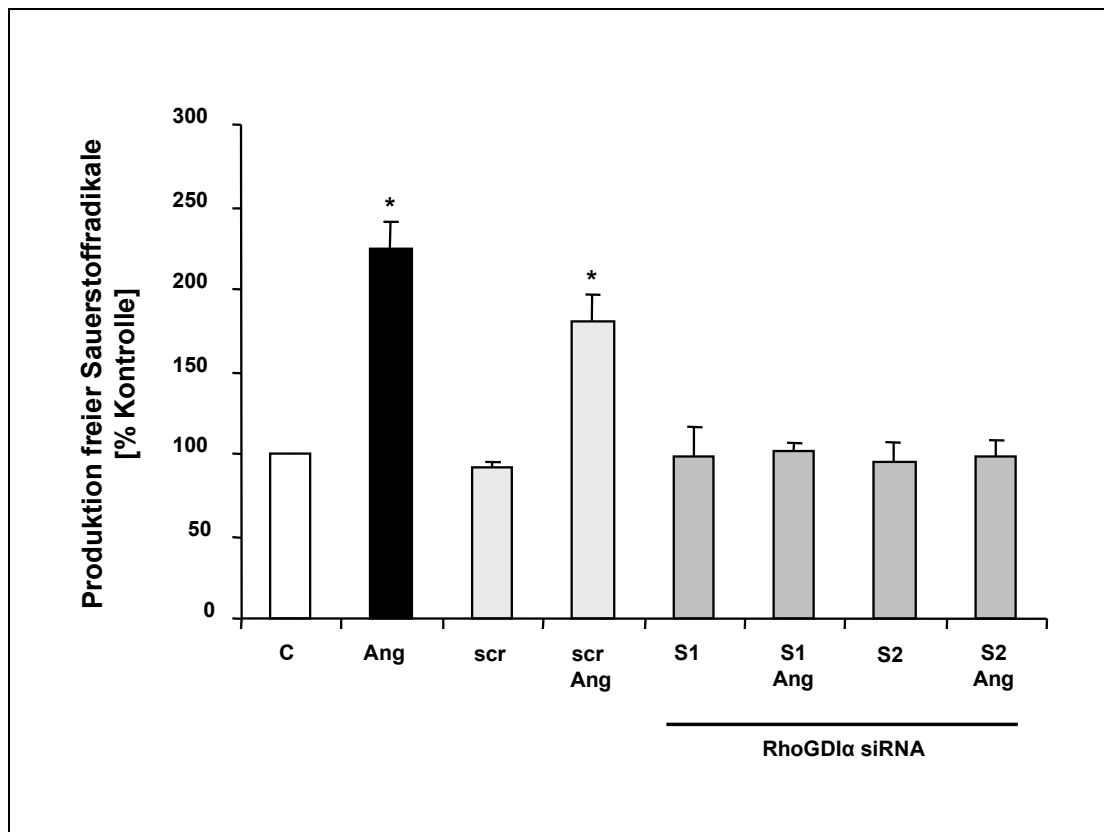


Abbildung 13: Quantitative Analyse der intrazellulären Sauerstoffradikalbildung in kultivierten Kardiomyozyten nach Transfektion von H9C2 Zellen mit RhoGDI α spezifischer siRNA (S1 und S2), scrambled RNA (scr) und Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h, n=5, *p<0,05 vs. Kontrolle).

4.4.2. Einfluss der spezifischen Hemmung von RhoGDI α auf die Lipidperoxidation in Angiotensin II stimulierten Kardiomyozyten

Freie Sauerstoffradikale führen zur Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, insbesondere in Zellmembranen. Das Reaktionsprodukt dieser Lipidperoxidation sind Lipid-Hydroperoxide, wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenale, welche die Integrität der Zellmembran und damit ihre Funktion zerstören. Die Messung dieser Hydroperoxide gilt als ein globaler Marker für oxidativen Stress.

Um eine mögliche kausale Rolle von RhoGDI α für die Angiotensin II induzierte Lipidperoxidation in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden H9C2 Zellen mit RhoGDI α spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, welche mit unspezifischer (scrambled) siRNA transfiziert (scrRNA) wurden.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Lipidperoxidation nach Angiotensin II Stimulation (Ang II, 1 μ M, 3 h, $p < 0,05$, $n=5$). In den mit RhoGDI α spezifischer siRNA transfizierten Zellen ließ sich kein Anstieg der Lipidperoxide beobachten (Abbildung 14).

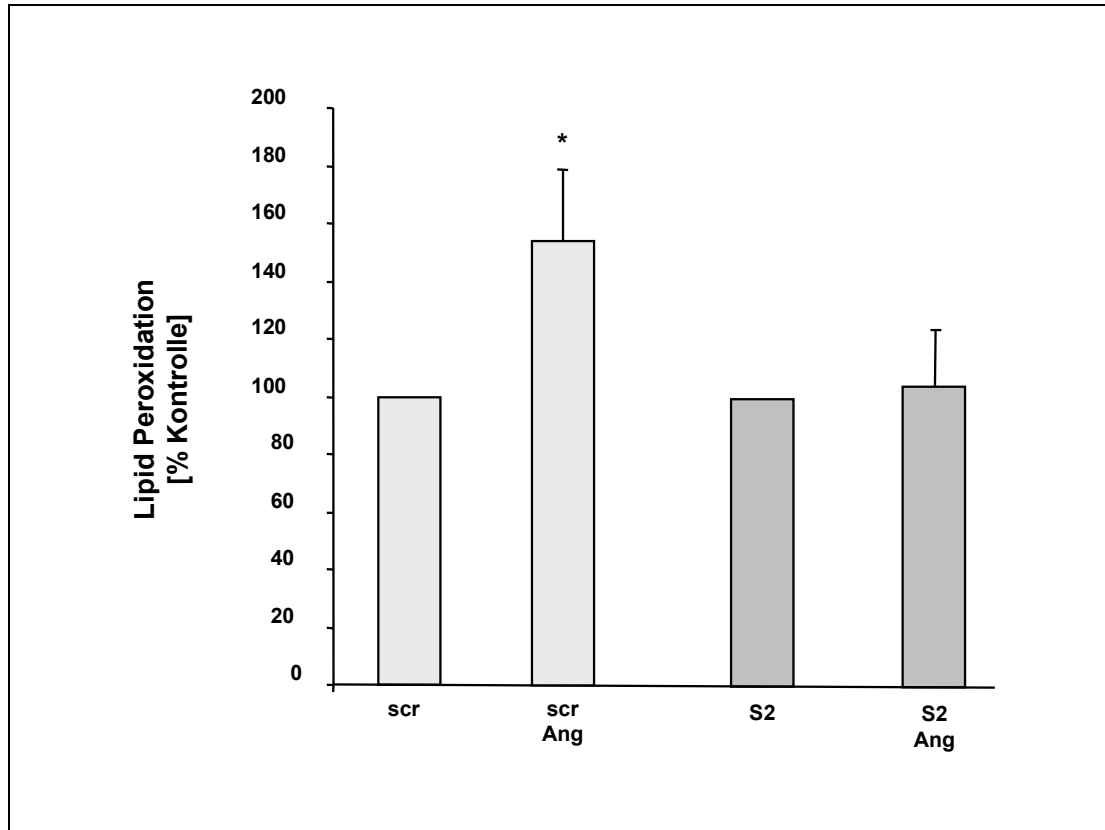


Abbildung 14: Einfluss der selektiven Hemmung von RhoGDI α durch Transfektion mit spezifischer siRNA (S2) und Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h) auf die Lipidperoxidation in H9C2 Kardiomyozyten ($n=5$, $*p < 0,05$ vs. scr).

4.5. Auswirkungen der spezifischen Hemmung von RhoGDI α auf die Inkorporation der Aminosäure Leucin in kultivierten Kardiomyozyten

Myokardiale Hypertrophie geht mit einem erhöhten Bedarf an Proteinen und einer damit verbundenen Steigerung der myozytären Proteinsynthese einher. Einen wichtigen Indikator für den gesteigerten Proteinbedarf stellt die Detektion der Inkorporation der Aminosäure Leucin in Kardiomyozyten dar. Um die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung von RhoGDI α auf die Leucininkorporation zu untersuchen, wurden Zellen der H9C2 Reihe mit RhoGDI α spezifischen siRNA Konstrukten und unspezifischer scrRNA transfiziert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h). 6 h nach Zugabe von radioaktivem Leucin ($[^3\text{H}]$ Leucin (1 μ Ci/ml)) erfolgte die Detektion des intrazellulären Leucin mittels „liquid scintillation counting“.

Unter Stimulation mit Angiotensin II zeigten unspezifisch transfizierte Kontrollzellen eine wesentliche Steigerung der Leucin-Aufnahme ($197\pm 64\%$, $p < 0,05$, $n=10$). Im Gegensatz zur Kontrolle zeigten Zellen nach Transfektion mit RhoGDI α spezifischer siRNA keine Änderung der Leucininkorporation durch Stimulation mit Angiotensin II (Abbildung 15). Diese Befunde weisen auf eine fundamentale Rolle von RhoGDI α für die Vermittlung der gesteigerten Proteinsynthese im Rahmen der Myokardhypertrophie hin.

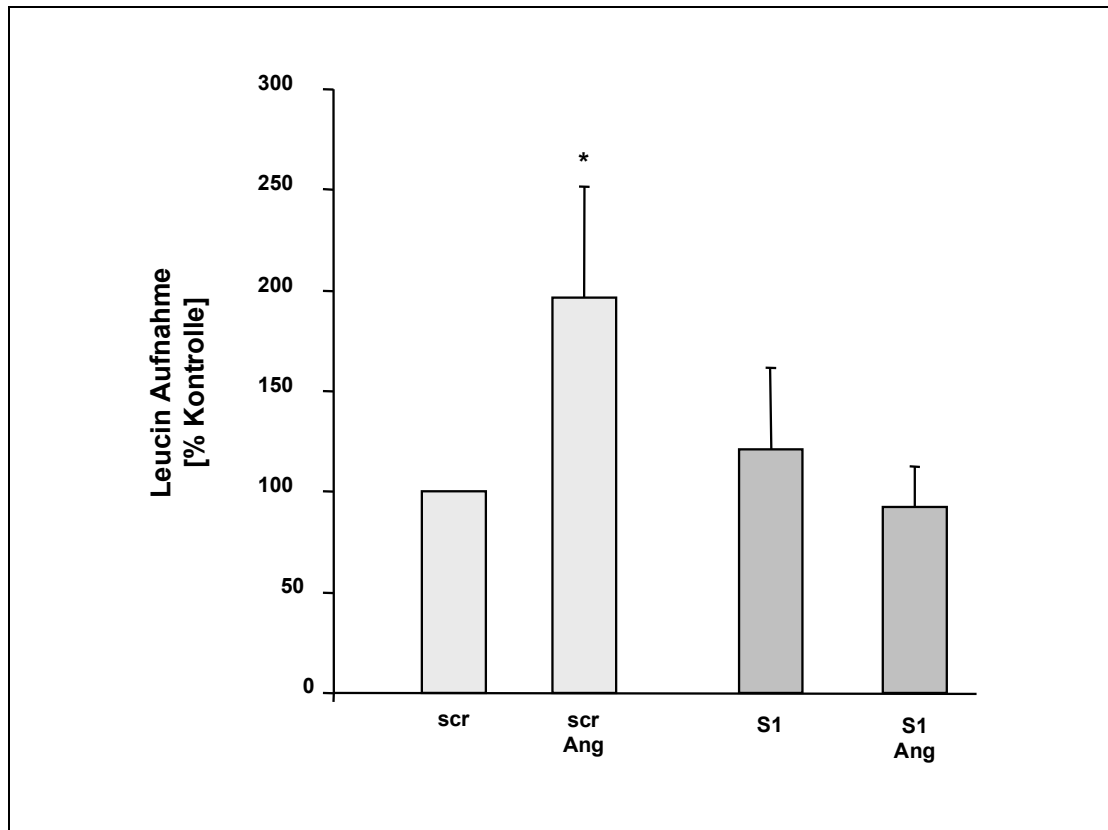


Abbildung 15: Effekt der spezifischen Hemmung von RhoGDI α durch Transfektion von H9C2 Zellen mit RhoGDI α spezifischer siRNA (S1) und Behandlung mit Angiotensin II (Ang, 1 μ M, 3 h) auf die zelluläre Leucininkorporation (n=10, *p<0,05 vs. scr).

5. Diskussion

5.1. Die kleine GTPase Rac1 ist maßgeblich an der Sauerstoffradikalbildung im Myokard beteiligt

Die linksventrikuläre Hypertrophie stellt einen bedeutsamen Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz dar (Böhm et al. 2002, Lorell et al. 2000). Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass freie Sauerstoffradikale eine wesentliche Rolle bei der Entstehung eines hypertrophen myokardialen Phänotyps und der Ausbildung einer kontraktiven myokardialen Funktionseinschränkung spielen (Dhalla et al. 2000, Kinugawa et al. 2000, Siwik et al. 1999). Auch klinische Untersuchungen zeigten, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöhten oxidativen Stress aufweisen. Dieser korreliert sowohl mit dem Schweregrad der Erkrankung als auch mit dem Ausmaß der linksventrikulären Funktionseinschränkung (Belch et al 1991, Mallat et al 1998).

Eine bedeutsame Quelle freier Sauerstoffradikale im Myokard ist die NAD(P)H-Oxidase, mit ihren Untereinheiten Cytochrom b_{558} , p47phox, p67phox, sowie der kleinen GTPase Rac1. Vorbefunde der Arbeitsgruppe zeigen, dass es im Rahmen einer chronischen Nachlasterhöhung bei Mäusen zur Ausbildung myokardialer Hypertrophie und zu einer verstärkten Aktivierung von Rac1 und der NAD(P)H-Oxidase im Myokard kommt. Weitere Vorarbeiten belegen, dass das Myokard herzinsuffizienter Patienten (dilatative und ischämische Kardiomyopathie) durch eine Hochregulation der NAD(P)H-Oxidase vermittelten Sauerstoffradikalfreisetzung und durch eine verstärkte Aktivität der Rac1-GTPase gekennzeichnet ist (Maack et al. 2003). Zusammenfassend unterstreichen sowohl die experimentellen als auch die klinischen Daten die fundamentale Rolle von Rac1 für die Regulation und die Zusammensetzung der NAD(P)H-Oxidase und die Freisetzung freier Sauerstoffradikale im Myokard.

Eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von Rac1 spielt neben einer postrationalen Lipidmodifikation durch Intermediärprodukte des Cholesterinbiosyntheseweges die Interaktion der GTPase mit verschiedenen Kofaktoren, so genannten Rho-regulierenden Proteinen. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Interaktion ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht und verstanden. Ebenso unbekannt ist ob Kofaktoren wie RhoGDI α unter dem Einfluss Rac1 aktivierender hypertropher Stimuli selbst reguliert werden.

5.2. Hypertrophe Stimuli induzieren eine vermehrte Bindung von Rac1 an RhoGDI α im Myokard

Neben „guanine nucleotide exchange factors“ (GEF) und „GTPase activating proteins“ (GAP) spielen „Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (RhoGDI) eine wichtige Rolle als Rho-regulierende Proteine im Aktivierungszyklus der Rac1-GTPase. Abo und Kollegen demonstrierten durch Experimente mit rekonstituierten Rac1-RhoGDI Komplexen, dass die Dissoziation von Rac1 und RhoGDI eine wesentliche Voraussetzung für die Translokation von Rac1 an die Zellmembran und einen Austausch von GDP durch GTP darstellt (Abo et al. 1994). Diese Befunde werden durch weitere Untersuchungen untermauert, die eine vermehrte zytosolische Lokalisation von GFP-markiertem Rac1 bei Überexpression von RhoGDI α zeigen (Michaelson et al. 2001). Vor dem Hintergrund der bislang existierenden Daten liegt der grundlegenden Hypothese der vorliegenden Arbeit daher die Annahme zugrunde, dass ein hypertropher Stimulus, wie die Behandlung kultivierter Kardiomyozyten mit Angiotensin II oder eine chronische Nachlasterrhöhung *in vivo*, eine Dissoziation von Rac1 und RhoGDI α erleichtert respektive induziert.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde die Interaktion von Rac1 und dem Kofaktor RhoGDI α unter Einfluss von Angiotensin II im Zellkulturmodell untersucht. Im Gegensatz zur Ausgangshypothese zeigte sich jedoch sowohl in Kardiomyozyten (H9C2) als auch in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte eine verstärkte Bindung von Rac1 an RhoGDI α unter Behandlung mit Angiotensin II. Dieser Befund ließ sich auch im Mausmodell erheben. Hier induzierte eine chronische Nachlasterrhöhung durch aortale Konstriktion eine verstärkte Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes in C57/Bl6-Mäusen. Diese Daten stellen den zentralen und neuen Befund der vorliegenden Arbeit dar und weisen auf eine fundamentale Bedeutung der Interaktion von Rac1 und RhoGDI α für die Rac1 abhängige myokardiale Signaltransduktion hin.

Wie aus verschiedenen Vorarbeiten bekannt, führt die Stimulation kultivierter Kardiomyozyten mit Angiotensin II zu einer erhöhten Gesamtexpression von Rac1 (Laufs et al. 2002, Maack et al. 2003). Die Gesamtexpression von RhoGDI α zeigt sich sowohl in H9C2 Zellen und neonatalen Kardiomyozyten, als auch *in vivo* im hypertrophierten Myokard der Maus unter allen Untersuchungsbedingungen unverändert. Die erhöhte Expression von Rac1 könnte zumindest partiell eine gesteigerte Assoziation von Rac1 und RhoGDI α durch

hypertrophe Stimuli erleichtern, und den im Gegensatz zu bisher erhobenen Daten stehenden Befund erklären. Quantitativ übersteigt die vermehrte Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes jedoch deutlich die Expression von Rac1 und macht einen wesentlichen Anteil der Gesamtexpression von Rac1 an der vermehrten Bindung an RhoGDI α unwahrscheinlich.

Diese Befunde legen nahe, dass für die Rac1 abhängige myokardiale Signaltransduktion neben der Gesamtexpression von Rac1 auch der Interaktion mit dem Kofaktor RhoGDI α eine entscheidende Rolle beigemessen werden muss. Sie korrespondieren darüber hinaus mit Arbeiten von Bromberg und Di Poi und Kollegen. Diese wiesen eine durch einen Rac1-RhoGDI α Komplex hervorgerufene Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in Makrophagen nach. Mechanistisch wird eine direkte Interaktion des aus Rac1 und RhoGDI α bestehenden Komplexes mit Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase diskutiert (Bromberg et al. 1994, Di Poi et al. 2001).

5.3. RhoGDI α hat eine essentielle Bedeutung für die Rac1 induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung in Kardiomyozyten und die Ausbildung eines hypertrophen myokardialen Phänotyps

Um eine mögliche kausale Rolle von RhoGDI α im Rahmen der Rac1 vermittelten Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen zu untersuchen erfolgte eine selektive Inhibition der RhoGDI α Expression durch siRNA Transfektion. Hemmung von RhoGDI α verhinderte die Angiotensin II induzierte Radikalfreisetzung in Kardiomyoblasten. Auch ein durch Angiotensin II vermittelter Anstieg der Lipidperoxidation blieb in den mit RhoGDI α spezifischen Konstrukten transfizierten Zellen aus.

Eine vermehrte Proteinsynthese ist ein wesentliches Merkmal des hypertrophen myokardialen Phänotyps. Inhibition von RhoGDI α durch siRNA Transfektion verhinderte eine durch Angiotensin II induzierte Proteinsynthese in Kardiomyozyten.

Zusammenfassend demonstrieren auch diese Untersuchungen, konträr zur ursprünglichen Arbeitshypothese, eine zentrale Rolle von RhoGDI α sowohl für die Rac1 regulierte Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen als auch für die Vermittlung hypertropher Stimuli in Kardiomyozyten.

5.4. Statine hemmen die Bindung von Rac1 an RhoGDI α und vermitteln einen antioxidativen Effekt in Kardiomyozyten

Arbeiten verschiedener Autoren demonstrieren antihypertrophe myokardiale Effekte von HMG-CoA-Reduktase Hemmern im Tiermodell (Dechend et al. 2001, Laufs et al. 2002, Maack et al. 2003, Takemoto et al. 2001, Wassmann et al. 2001). Korrespondierend hierzu konnte im Rahmen von Vorarbeiten zu den vorliegenden Experimenten das Ausmaß einer durch transaortale Konstriktion in Mäusen hervorgerufenen Myokardhypertrophie durch Behandlung mit Rosuvastatin verringert werden. Darüber hinaus zeigte sich unter Statinbehandlung eine verminderte Aktivität der Rac1-GTPase und der NAD(P)H-Oxidase.

Da Statine keinen Einfluss auf den Serumcholesterolspiegel von Mäusen haben ist davon auszugehen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um cholesterinunabhängige Effekte der Statinbehandlung handelt. Auch die antiatherosklerotischen Effekte einer Statinbehandlung sind in diesem Kontext nicht von Bedeutung, da die im Modell der transaortalen Konstriktion verwendeten Wildtypmäuse keinerlei atherosklerotische Manifestationen aufweisen.

Die posttranslationale Modifikation durch Isoprenoide, Intermediate der Cholesterinbiosynthese, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung von Rho-GTPasen. Rho-GTPasen, so auch Rac1, werden durch Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) geranylgeranyliert. Durch die Hemmung des initialen, geschwindigkeitslimitierenden Schrittes der Cholesterinbiosynthese durch HMG-CoA-Reduktase Hemmer (Statine), wird auch die Synthese von Isoprenoiden und konsekutiv auch die Lipidmodifikation von kleinen G-Proteinen wie Rac1 unterbunden (Endo et al. 1977, Istvan und Deisenhofer 2001). So können Statine experimentell gezielt zur Funktionshemmung von Rho-GTPasen eingesetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch die Assoziation von Rac1 und RhoGDI α durch Isoprenylierung vermittelt wird. Die Behandlung von H9C2 Zellen und neonatalen Kardiomyozyten mit Rosuvastatin inhibierte die Angiotensin II induzierte Assoziation von Rac1 und RhoGDI α . Im Hypertrophiemodell der Maus führte die Behandlung mit Rosuvastatin ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition der Expression des Rac1-RhoGDI α Komplexes.

Behandlung von Kardiomyozyten mit dem Inhibitor der Geranylgeranyl-Transferase (GGTI-286) sowie den Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase Wortmannin und LY 294002 führte, im Gegensatz zu einer Hemmung der Farnesyl-Transferase (FTI-276), zu einer nahezu kompletten Inhibition der Assoziation von Rac1 und RhoGDI α . Diese Befunde demonstrieren, dass die Assoziation von Rac1 und RhoGDI α durch die Phosphatidylinositol-3-(PI3)-Kinase vermittelt wird. Die Interaktion der Rho-GTPase Rac1 und ihrem Kofaktor RhoGDI α ist unmittelbar abhängig von einer Geranylgeranylierung durch GGPP.

Die strukturellen und molekularen Grundvoraussetzungen der Bindung von Rho-GTPasen an ihre „guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (GDIs) sind bislang nur rudimentär charakterisiert. Daten von Dransart und Olofsson demonstrieren jedoch, dass RhoGDIs bimodular an Rho-Proteine binden und im Wesentlichen zwei Bindungsstellen aufweisen, die eine Beteiligung von Isoprenoiden an der Interaktion mit Rho-GTPasen grundsätzlich ermöglichen. Eine Bindungsstelle befindet sich im N-terminalen Helix-Loop-Helix Anteil. Der C-terminale Sandwich Anteil besitzt eine zweite, hydrophobe Bindungsstelle, die mit der Geranylgeranylgruppe von Rho-Proteinen interagiert (Dransart et al. 2005b, Olofsson et al. 1999).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell erhobenen Daten identifizieren die Isoprenylierung mit Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) als eine wesentliche Grundvoraussetzung für die Bindung von Rac1 an RhoGDI α und demonstrieren eine kausale Rolle von RhoGDI α im Rahmen der Angiotensin II vermittelten Freisetzung freier Sauerstoffradikale in Kardiomyozyten. Eine Hemmung der Isoprenylierung durch Statinbehandlung inhibiert die Interaktion von Rac1 und RhoGDI α . Darüber hinaus kommt es unter Behandlung mit Rosuvastatin zu einer Aktivitätsminderung der NAD(P)H-Oxidase im Hypertrophiemodell. Diese Ergebnisse charakterisieren einen wesentlichen antioxidativen Mechanismus von Statinen und tragen zum Verständnis antihypertropher Effekte dieser Substanzen am Myokard bei (Abbildung 16).

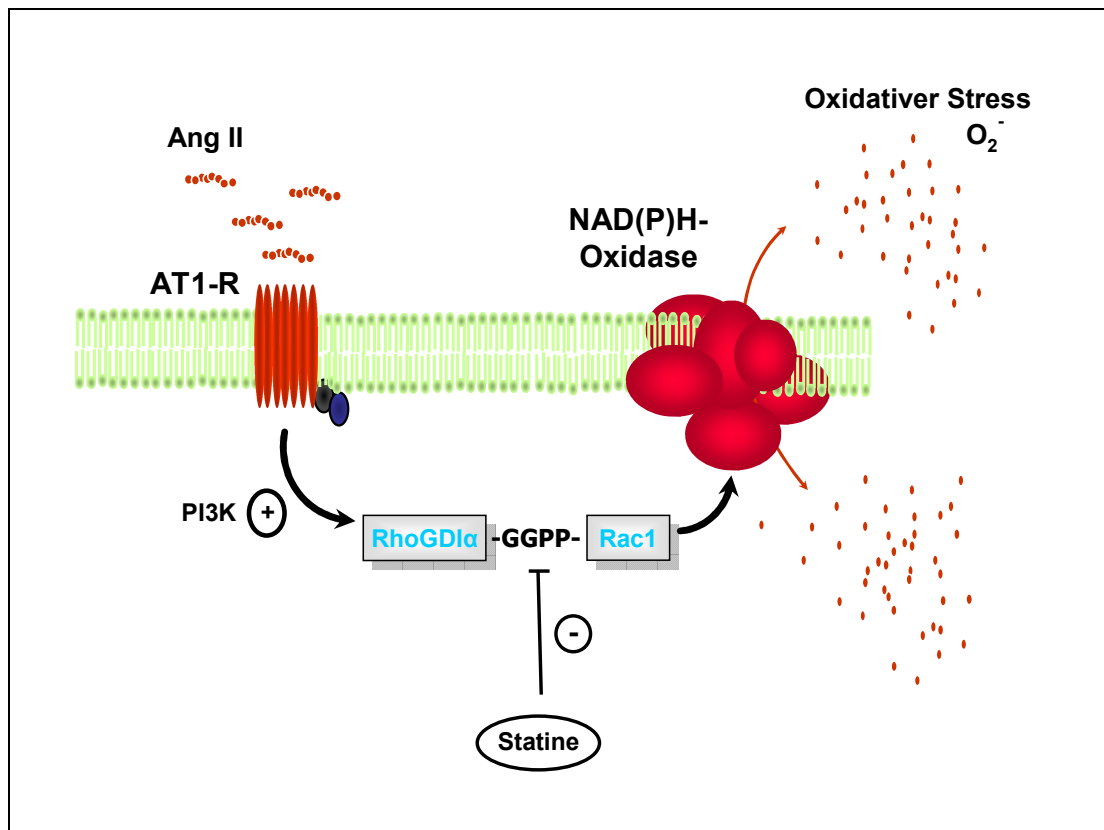


Abbildung 16: Zusammenfassung: Die Interaktion von RhoGDI α und Rac1 über ein Isoprenoid (GGPP) ist essentiell für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und der damit verbundenen Sauerstoffradikalfreisetzung am Myokard. Hemmung der Isoprenylierung durch Statine vermindert die Angiotensin II induzierte Freisetzung freier Sauerstoffradikale.

5.5. Potentielle klinische Bedeutung der Befunde

HMG-CoA-Reduktase Hemmer werden bei zahlreichen Patienten mit Hypercholesterinämie zur Senkung des kardiovaskulären Risikos eingesetzt (Scandinavian Simvastatin Study Group (4S) 1994, Treasure et al. 1995, WOSCOP 1995). Aktuelle Studien zeigen, dass Statine auch bei Patienten mit eher niedrigen LDL-Cholesterinwerten das vaskuläre Risiko senken können (ASCOT 2003, Sacks et al. 1996). Darüber hinaus belegen zahlreiche Untersuchungen, dass cholesterinunabhängige Effekte der Statine zu ihrer klinischen Wirkung im Hinblick auf eine Hemmung atherogener Prozesse beitragen können.

Auch auf myokardialer Ebene sind zahlreiche, primär cholesterinunabhängige, positive Effekte von HMG-CoA-Reduktase Hemmern durch experimentelle und klinische Daten

belegt. Auf molekularer bzw. zellulärer Ebene sind dies unter anderem die Hemmung proinflammatorischer Stimuli wie TNF α und hsCRP, vermehrte Expression der NO-Synthase, Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und die Hemmung kleiner G-Proteine wie RhoA und Rac1. Eine wesentliche Folge dieser grundlegenden Mechanismen ist eine Verminderung oxidativer Prozesse und von oxidativem Stress, beispielsweise durch eine Reduktion der Freisetzung freier Sauerstoffradikale (Giordano 2005). Zahlreiche Tierversuche zeigen, dass Statine *in vivo* zu einer Regression myokardialer Hypertrophie und zu einer verminderten myokardialen Schädigung nach Myokardinfarkt führen (Lefer et al. 2001, Senthil et al. 2005, Takemoto et al. 2001).

Hinweise, dass diese Effekte auch im klinischen Kontext von Bedeutung sind zeigen verschiedene Studien. Daten einer retrospektiven Analyse der Arbeitsgruppe belegen, dass Statinbehandlung zu einem verminderten oxidativen Phänotyp im Myokard herzinsuffizienter Patienten führt (Maack et al. 2003). Subgruppenanalysen großer Endpunktstudien wie der 4S-Studie oder der TNT-Studie zeigen, dass Statinbehandlung zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt führt und die Anzahl durch Herzinsuffizienz induzierter Krankenhausaufenthalte bei Patienten mit stabiler KHK signifikant senkt (Khush et al. 2007, Kjekshus et al 1997).

Im Rahmen der im vergangenen Jahr veröffentlichten CORONA-Studie (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure) wurden insgesamt 5011 Patienten im Alter von mindestens 60 Jahren und ischämisch bedingter Herzinsuffizienz eingeschlossen und mit 10 mg Rosuvastatin oder Placebo behandelt (CORONA group: Kjekshus J et al. 2007). Die Auswertung der Studie zeigte keinen Unterschied zwischen Statin und Placebo hinsichtlich des Auftretens des primären Endpunktes (kardiovaskulär bedingter Tod, nichttödlicher Myokardinfarkt oder Schlaganfall), wohingegen die Anzahl der kardiovaskulär bedingten Krankenhausaufenthalte durch die Statinbehandlung signifikant gesenkt wurde. Weitere placebokontrollierte Studien wie z.B. die GISSI-HF-Studie, die im Gegensatz zu CORONA Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Herzinsuffizienz einschließt, untersuchen aktuell die Effekte einer Statinbehandlung auf klinisch relevante Endpunkte (Tavazzi et al. 2004).

Ein wichtiger konzeptioneller Unterschied der angeführten Studien zur vorliegenden Arbeit besteht im Zeitpunkt der Behandlung. Während CORONA und GISSI-HF herzinsuffiziente

Patienten nach bereits erfolgtem kardialen Remodeling einschließen, erfolgt im experimentellen Teil dieser Arbeit die Statinbehandlung vor, respektive simultan zum hypertrophen Stimulus.

Die hier vorliegenden Befunde charakterisieren die isoprenoidabhängige Komplexbildung der Rac1-GTPase und des Kofaktors RhoGDI α als eine wesentliche Voraussetzung für oxidativen Stress und die Ausbildung eines hypertrophen myokardialen Phänotyps. Die Hemmung der Assoziation durch Statine liefert einen wichtigen Erklärungsansatz für präventive, antioxidative Effekte dieser Substanzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353:668-70.
2. Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 298:585-91.
3. Adra CN, Manor D, Ko JL, Zhu S, Horiuchi T, Van Aelst L, Cerione RA, Lim B (1997) RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94:4279-84.
4. Aelst van L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks *Genes and Development* 11:2295-2322.
5. ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial) Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J (2003) Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicenter randomised controlled trial. *Lancet* 361:1149-1158.
6. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG (2000) Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:10527-31.
7. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R (2005) Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366:1267-78.

8. Bedard K, Krause KH (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases. *Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev* 87:245-313.
9. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M (1991) Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 65:245–248.
10. Böhm M (2002) Pathophysiology of heart failure today. *Herz* 27:75-91.
11. Bokoch GM, Diebold BA (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100:2692-6.
12. Brandes R, Kreuzer J (2004) Vascular NADPH oxidase: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular research* 65:16-27.
13. Bromberg Y, Shani E, Joseph G, Gorzalczany Y, Sperling O, Pick E (1994) The GDP-bound form of the small G protein Rac1 p21 is a potent activator of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages. *J Biol Chem* 269:7055-8.
14. Brown JH, Del Re DP, Sussmann MA (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signalling hits. *Circ Res* 98:730-42.
15. CORONA Studie: Kjekshus J, Apetrei E, BarriosV, Böhm M, Cleland J, Cornel JH, Dunselman P, Fonseca C, Goudev A, Grande P, Gullestad L, Hjalmarson A, Hradec J, Jánosi A, Kamensk G, Komajda M, Korewicki J, Kuusi T, Mach F, Mareev V, McMurray J, Ranjith N, Schaufelberger M, Vanhaecke J, Van Veldhuisen DJ, Waagstein F, Wedel H, Wikstrand J, for the CORONA Group (2007) Rosuvastatin in Older Patients with Systolic Heart Failure. *N Engl J Med* 357:2248-226.
16. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655–673.
17. Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Theuer J, Mervaala E, Bieringer M, Gulba D, Dietz R, Luft FC, Haller H (2001) Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor.

Circulation 104:576-81.

18. Di Poi N, Faure J, Grizot S, Molnar G, Pick E, Dagher MC (2001) Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry* 40:10014-22.
19. Dovas A, Couchman JR (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390:1-9.
20. Dransart E, Olofsson B, Cherfils J (2005a) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6:957-66.
21. Dransart E, Morin A, Cherfils J, Olofsson B (2005b) Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors. *J Biol Chem* 280:4674-83.
22. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K (1977) Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem* 77:31-6.
23. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells: role of geranylgeranylation and rho proteins. *Circ Res* 83:683-690.
24. Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115:500-8.
25. Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
26. Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D (1998) Role of substrates and products of PI3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279:558-560.
27. Hordijk P (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98:453-62.

28. Istvan E, Deisenhofer J (2001) Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292:1160-1164.
29. Ito M, Adachi T, Pimentel DR, Ido Y, Colucci WS (2004) Statins inhibit beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes via a Rac1-dependent mechanism. *Circulation* 110:412-8.
30. Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC, Yaffe MB (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3:675-678.
31. Khush KK, Waters DD, Bittner V, Deedwania PC, Kastelein JJ, Lewis SJ, Wenger NK (2007) Effect of high-dose atorvastatin on hospitalizations for heart failure: subgroup analysis of the Treating to New Targets (TNT) study. *Circulation* 115:576-83.
32. Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A (2000) Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87:392-398.
33. Kjerkshus J, Pedersen TR, Olsson AG, Faergeman O, Pyörälä K (1997) The effects of simvastatin on the incidence of heart failure in patients with coronary heart disease. *J Card Fail* 3:249-54.
34. Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM (1995) Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* 269:221-3.
35. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-1135.
36. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274:21926-21931.

37. Laufs U, Liao JK (2000) Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 87:526-8.
38. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53:911-20.
39. Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, Gibson MF, Lefer AM (2001) HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 15:1454-6.
40. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM (2002) Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 40:477-84.
41. Lorell BH, Carabello BA (2000) Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102:470-9.
42. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated With Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment. *Circulation* 108:1567-74.
43. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A (1998) Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂ α in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97:1536–1539.
44. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152:111-26.
45. Olofsson B (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11:545-54.

46. Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335:1001-1009.
47. Scandinavian Simvastatin Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383-1389.
48. Scherle P, Behrens T, Staudt LM (1993) Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:7568-72.
49. Schmitz U, Thommes K, Beier I, Wagner W, Sachinidis A, Dusing R, Vetter H (2001) Angiotensin II-induced stimulation of p21-activated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase is mediated by Rac1 and Nck. *J Biol Chem* 276:22003-10.
50. Senthil V, Chen SN, Tsybouleva N, Halder T, Nagueh SF, Willerson JT, Roberts R, Marian AJ (2005) Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 97:285-92.
51. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91:406-13.
52. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999) Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 85:147-153.
53. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108:1429-37.

54. Tavazzi L, Tognoni G, Franzosi MG, Latini R, Maggioni AP, Marchioli R, Nicolosi GL, Porcu M; GISSI-HF Investigators (2004) Rationale and design of the GISSI heart failure trial: a large trial to assess the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and rosuvastatin in symptomatic congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 6:635-41.
55. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW (1995) Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 332:481-7.
56. Vatner DE, Kunze DL (2000) Prologue: low-molecular-weight GTPases in the heart and circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:1733-1735.
57. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM (1996) Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348:1079–1082.
58. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G (2001) Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 59:646-54.
59. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:300-5.
60. WOSCOP (West of Scotland Coronary Prevention Study Group): Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Mc Farlane PW, Mc Killop JH, Packard CJ (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 333:1301-1307.

7. Danksagung und Veröffentlichungen

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe, sowie seiner konstruktiven Kritiken und Hilfestellungen bis zum Schluss.

Besonders möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. med. Florian Custodis, für seine hervorragende Unterstützung in allen Abschnitten der Arbeit, für seine ständige Bereitschaft mir mit seinen hilfreichen Ideen und Kommentaren beratend zur Seite zu stehen, bedanken.

Herrn Professor Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Möglichkeit, die vorgelegten Experimente in den Forschungslaboren der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchführen zu können.

Ein expliziter Dank gilt auch der Biologisch Technischen Assistentin Frau Isabel Pàez-Maletz für die Einarbeitung in die gesamte Methodik, ihre unendliche Geduld und immerwährende Hilfsbereitschaft.

Teile dieser Dissertationsschrift wurden wie folgt vorab veröffentlicht:

Originalarbeit:

Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U (2006) Association of RhoGDI α with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. Cardiovascular Research 71:342-51.

Abstracts:

Custodis F, Eberl M, Böhm M, Laufs U (2006) Regulation der Radikalfreisetzung im Rahmen der Myokardhypertrophie durch RhoGDI und Rac1. 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, P691.

Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U (2006) Association of Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. European Society of Cardiology Congress, Abstract 3238.

8. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

geb. am 12.06.1979 in Nürnberg, verheiratet

Schulischer Werdegang:

1985 – 1989 Grundschule Vilsbiburg
1989 – 1998 Maximilian-von-Montgelas Gymnasium, Vilsbiburg,
abgeschlossen mit der allg. Hochschulreife (Note 1,8)

Zivildienst:

1998 – 1999 Bayerisches Rotes Kreuz, Landshut,
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium:

1999 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Approbierter Arzt seit dem 17.09.2007
2000 – 2001 Auslandsstudienjahr an der University of Leicester, England
2002 – 2003 Auslandsstudienjahr an der Università degli studi di Perugia, Italien
2005 – 2006 Praktisches Jahr am Klinikum Saarbrücken, akademisches Lehr-
krankenhaus der Universität des Saarlandes, Wahlfach Neurologie

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

seit 10/2004 Laborexperimentelle Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von
Professor Dr. med. Ulrich Laufs (Kardiologie), Universität des
Saarlandes

Beruflicher Werdegang:

seit 12/2007 Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin,
Evangelisches Stadtkrankenhaus Saarbrücken (Chefarzt PD Dr. med.
Matthias Frank)

