

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die Aktivierung eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors
reguliert die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Genpromotors in
weiblichen katecholaminergen Neuroblastomzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von

Helen Eriksson

geboren am 02.05.2000 in Baden-Baden

Tag der Promotion: 27.01.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel
Prof. Dr. Adolfo Cavalié

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	4
3	Summary	6
4	Einleitung.....	8
4.1	Bedeutung und Funktion der Tyrosinhydroxylase.....	8
4.2	Expression der Tyrosinhydroxylase in unterschiedlichen Zellpopulationen.....	10
4.3	Stimulus-induzierte Expression der Tyrosinhydroxylase	10
4.4	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	11
4.4.1	G α_q -gekoppelte Rezeptoren	12
4.4.2	G α_q -gekoppelter Designerrezeptor	13
4.5	Fragestellung der Arbeit.....	16
5	Material und Methoden	17
5.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände	17
5.2	Chemikalien.....	18
5.3	Lösungen.....	19
5.4	Untersuchung des Tyrosinhydroxylase-Promotors.....	22
5.5	Verpackungs-, Expressions- und Transferplasmide für eine transiente Transfektion.....	24
5.5.1	Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$	24
5.5.2	Expressionsplasmid pCMV-G.....	25
5.5.3	Transferplasmide	25
5.5.3.1	Verwendete lentivirale Transferplasmide	26
5.5.3.2	Designerrezeptor R α_q	27
5.5.3.3	RNA-Interferenz mittels shRNA.....	27
5.6	Zelllinien	30
5.6.1	HEK293/TN-Zellen.....	30
5.6.2	SH-SY5Y-Zellen.....	30
5.7	Zellkultur.....	30

5.8	Passage der Zellen	31
5.9	Herstellung von Lentiviren sowie Infektion und Analyse von Zielzellen	31
5.9.1	Herstellung funktionsfähiger Lentiviren mithilfe der Calciumphosphat- Transfektion	31
5.9.2	Lentivirale Infektion	32
5.9.3	Serumreduktion.....	33
5.9.4	Stimulation	33
5.10	Reporteranalyse	34
5.10.1	Zellernte und Aufschluss der Zellen	34
5.10.2	Luziferaseassay zur Bestimmung der Reporteraktivität	34
5.10.3	Messung der Proteinkonzentration mit dem Bicinchoninsäure Assay (BCA)	35
5.10.4	Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität	35
5.10.5	Statistik.....	35
5.11	Proteinbiochemische Methoden.....	36
5.11.1	Zellernte und Isolierung des Zytoplasma- und Kernextraktes	36
5.11.2	SDS-Page	37
5.11.3	Western Blot.....	37
5.11.4	Immundetektion der Proteine.....	38
6	Ergebnisse	40
6.1	Die Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ aktiviert die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors.....	40
6.2	RGS2 hemmt die Transkription des durch den Tyrosinhydroxylase-Promotor kontrollierten Reportergens in $R\alpha_q$ -exprimierenden Neuroblastomzellen.....	42
6.3	Die dominant-negative Mutante der Phospholipase $C\beta_3$ stört die $R\alpha_q$ -induzierte Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase- Promotors	44
6.4	Calcineurin kontrolliert die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors nach Stimulation von $R\alpha_q$	46
6.5	ERK1/2 wird benötigt, um die Stimulation von $R\alpha_q$ mit der Transkription	

	eines Reportergens unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors zu verknüpfen.....	48
6.6	MKP-1 hemmt die Tyrosinhydroxylase-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ - Stimulation.....	49
6.7	Der Transkriptionsfaktor CREB verstärkt die Tyrosinhydroxylase- Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation.....	51
6.8	Die Expression des adenoviralen Proteins E1A schwächt die $R\alpha_q$ -vermittelte Tyrosinhydroxylase-Gentranskription ab.....	53
7	Diskussion.....	56
8	Literaturverzeichnis.....	62
9	Publikationen	73
10	Danksagung	74
11	Lebenslauf	75

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A239G	Austausch von Alanin (A) gegen Glycin (G) durch Mutation an Position 239
AP-1	activating protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB binding protein
cDNA	complementary DNA
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CnA	Calcineurin A
CNO	Clozapin N-oxid
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E1A	adenovirus early region 1A protein
EBS	Egr-1 binding site
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor

EGFP	enhanced green fluorescent protein
Egr-1	early growth response protein-1
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERE	estrogen response-element
ERK	extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alli – und andere
FCS	fetal calf serum
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRE	glucocorticoid response element
GTP	Guanosintriphosphat
G α_i	GPCR mit inhibitorischer α -Untereinheit
G α_q	GPCR mit α -Untereinheit vom Typ q
G α_s	GPCR mit stimulierender α -Untereinheit
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
IEG	immediate early gene
IP ₃	Inositoltriphosphat
kDA	Kilodalton
LTR	long terminal repeat
M	Molar
M3R	Muskarinerner Acetylcholinrezeptor, Typ M3
MAP	mitogen activated protein
Min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
NLS	nuclear localization sequence
PBS	phosphate buffered saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pi	anorganisches Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β
PLC β 3ct	dominant-negative Mutante der Phospholipase C β
RGS2	regulator of G-protein signaling-2
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
shRNA	small hairpin RNA
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
Y149C	Austausch von Tyrosin (Y) gegen Cystein (C) durch Mutation an Position 149
Δ CnA	konstitutiv aktive Calcineurin-Mutante
mg	Mikrogramm
ml	Mikroliter
μ M	Mikromolar
Ψ	Verpackungssignal

2 Zusammenfassung

Die Tyrosinhydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminbiosynthese, das die Umwandlung von L-Tyrosin in L-3,4-Dihydroxyphenylalanin katalysiert. Dadurch spielt das Enzym eine Schlüsselrolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten, die catecholaminerge Systeme betreffen. Die Expression der Tyrosinhydroxylase kann über extrazelluläre Signalmoleküle wie epidermale Wachstumsfaktoren, Nervenwachstumsfaktoren und Steroide reguliert werden, die ihre Wirkung über Tyrosinkinase-Rezeptoren beziehungsweise Steroidhormonrezeptoren realisieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, der größten Rezeptorfamilie, zu einer gesteigerten Expression der Tyrosinhydroxylase führt.

Als zelluläres Modell wurden catecholaminerge SH-SY5Y-Neuroblastomzellen verwendet, die Eigenschaften fetaler sympathischer Neuronen aufweisen und unter anderem die Tyrosinhydroxylase exprimieren. Die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors wurde mit Reportergenen gemessen, die unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors standen und mit Hilfe von rekombinanten Lentiviren in das Chromatin der Neuroblastomzellen integriert wurden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können mit verschiedenen G-Proteinen interagieren. Um die Spezifität der Rezeptor-induzierten Signalkaskade sicherzustellen, wurde ein $G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptor ($R\alpha_q$) in den Neuroblastomzellen exprimiert, der ausschließlich mit einem $G\alpha_q$ -Protein interagiert und der durch den synthetischen Liganden CNO aktiviert werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors die Transkription des Luziferase-Reportergens unter Kontrolle des proximalen Tyrosinhydroxylase-Promotors aktivierte. Die Transkription des Reportergens wurde durch die Überexpression von RGS2 (*regulator of G-protein signaling-2*), welches die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert, reduziert. Die Expression einer verkürzten, dominant-negativen Mutante der Phospholipase $C\beta_3$ verminderte ebenfalls die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$. Über die Interferenz von spezifischer shRNA (*small hairpin RNA*) gegen ERK1/2 konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 als Signalübermittler zwischen dem

Designerrezeptor $R\alpha_q$ und dem Reporter gen fungiert. Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors CREB hemmte die $R\alpha_q$ -induzierte Aktivierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors. Somit wurde CREB als nukleares Ziel der $R\alpha_q$ -initiierten Signalkaskade identifiziert. Expressionsversuche des adenoviralen Proteins E1A zeigten, dass die Transkription des Tyrosinhydroxylasegens unter epigenetischer Kontrolle steht und die Histonacetyltransferasen und Koaktivatorproteine CBP (*CREB binding protein*) und p300 involviert sind. Die Proteinphosphatasen MAP-Kinase-Phosphatase-1 und Calcineurin fungieren als Abschaltvorrichtungen für die $R\alpha_q$ -initiierte Signalkaskade, die die $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoraktivierung mit der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription verbindet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Expression der Tyrosinhydroxylase durch $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren kontrolliert wird. Angesichts der Tatsache, dass die Stimulation $G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptoren Neurone aktiviert, postuliere ich, dass die Expression der Tyrosinhydroxylase durch neuronale Aktivität reguliert wird.

3 Summary

Tyrosine hydroxylase is the rate-limiting enzyme of catecholamine biosynthesis, catalyzing the conversion of L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine. Thus, the enzyme plays a key role in the pathogenesis of a wide variety of diseases affecting catecholaminergic systems. Tyrosine hydroxylase expression can be regulated by extracellular signaling molecules such as epidermal growth factors, nerve growth factors, and steroids, which act via receptor tyrosine kinases and steroid hormone receptors, respectively.

This study investigated whether the stimulation of G protein-coupled receptors, the largest receptor family, leads to increased activation of the tyrosine hydroxylase promoter.

Catecholaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells, which feature characteristics of fetal sympathetic neurons and express tyrosine hydroxylase, were used as a cellular model. Tyrosine hydroxylase promoter activity was measured using reporter genes under the control of the tyrosine hydroxylase promoter integrated into the chromatin of neuroblastoma cells using recombinant lentiviruses.

G-protein-coupled receptors can interact with different G-proteins. To ensure the specificity of the receptor-induced signaling cascade, a $G\alpha_q$ -coupled designer receptor ($R\alpha_q$) was expressed in the neuroblastoma cells that interacted exclusively with a $G\alpha_q$ -protein and that could be activated by the synthetic ligand CNO.

The results of this study show that stimulation of the $G\alpha_q$ -coupled designer receptor activated transcription of the luciferase reporter gene under the control of the proximal tyrosine hydroxylase promoter. Transcription of the reporter gene was reduced by overexpression of RGS2 (regulator of G-protein signaling-2), which activates the GTPase activity of the $G\alpha$ -subunit. Expression of a truncated dominant-negative mutant of phospholipase $C\beta_3$ also decreased tyrosine hydroxylase promoter activity after stimulation of the designer receptor $R\alpha_q$. Knockdown experiments involving ERK1/2-specific small hairpin RNAs showed that ERK1/2 act as a signal transducer between the designer receptor $R\alpha_q$ and the reporter gene. Expression of a dominant-negative mutant of the transcription factor CREB inhibited $R\alpha_q$ -induced activation of the tyrosine hydroxylase promoter. Thus, CREB was identified as a nuclear target of the $R\alpha_q$ -initiated signaling cascade. Expression experiments of the adenoviral protein E1A showed that

transcription of the tyrosine hydroxylase gene is under epigenetic control and involves the histone acetyltransferases and coactivator proteins CBP (CREB binding protein) and p300. The protein phosphatases MAP kinase phosphatase-1 and calcineurin act as turn-off devices for the R_{α_q} -initiated signaling cascade linking G_{α_q} -coupled receptor activation to tyrosine hydroxylase gene transcription.

The results of this work suggest that tyrosine hydroxylase expression is controlled by G_{α_q} -coupled receptors. Given the fact that stimulation of G_{α_q} -coupled designer receptor activates neurons, I postulate that tyrosine hydroxylase expression is regulated by neuronal activity.

4 Einleitung

Erhöhte physische Aktivität, emotionale Erregung oder Veränderungen in der Umwelt lösen eine Stressreaktion aus, die eine veränderte Aktivität der Organe, der Drüsen und der glatten Muskulatur erfordert. Diese Veränderungen, die häufig auch als *fight-or-flight*-Reaktion zusammengefasst werden, sind von enormer Bedeutung, damit der Organismus angemessen auf seine Umwelt reagieren kann. Die schnelle Reaktion wird hauptsächlich durch die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin vermittelt, die in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks synthetisiert werden. Der Anstieg von frei zirkulierendem Adrenalin und Noradrenalin im Gefäßsystem und die verstärkte Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen führen zu einer Aktivierung von multiplen Signalwegen. Diese Signalwege resultieren beispielsweise in einem Anstieg des Blutdrucks und der kardialen Leistungsfähigkeit, in Entspannung der glatten Muskulatur und in metabolischen Veränderungen wie die Erhöhung des Blutzuckerspiegels und der Konzentration an freien Fettsäuren. Katecholamine können ebenfalls das Gedächtnis beeinflussen, indem sie auf afferent-sensorische Nerven wirken und die Funktion des zentralen Nervensystems modulieren. Während die schnelle *fight- or-flight*-Reaktion für das Überleben unerlässlich ist, kann eine längerfristige Dysbalance in katecholaminergen Systemen zu schwerwiegenden pathologischen Veränderungen führen. Häufige Ursache von Dysbalancen in katecholaminergen Systemen ist eine veränderte Expression oder Aktivität der Tyrosinhydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Katecholaminbiosynthese. Aus diesem Grund ist die Tyrosinhydroxylase in vielen Bereichen der biomedizinischen Forschung von fundamentalem Interesse und großer Bedeutsamkeit.

4.1 Bedeutung und Funktion der Tyrosinhydroxylase

Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist das erste [60] und das geschwindigkeitsbestimmende [46] Enzym der Katecholaminbiosynthese und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Physiologie dopaminerg, noradrenerg und adrenerg Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems [61].

Die Produkte der Katecholaminbiosynthese Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin agieren als Neurotransmitter, wobei Noradrenalin und Adrenalin darüber hinaus auch als Hormone fungieren können. Sie sind verantwortlich für multiple Funktionen wie Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Kognition, Bewegung, Verhalten, Emotion sowie der

Modulation autonomer Reflexe. Als Hormone der *fight-or-flight*-Reaktion des Körpers auf Gefahren sind Noradrenalin und Adrenalin, produziert von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, an Regulationsmechanismen des gesamten Körpers, wie beispielsweise der Kreislaufregulation, beteiligt [88].

Die physiologische Bedeutung der Tyrosinhydroxylase wird insbesondere durch ihre Rolle in der Entwicklung transgener Mäuse veranschaulicht. Die Inaktivierung beider Allele des Tyrosinhydroxylasegens bei transgenen Mäusen führte zu einer Letalität in der mittleren Gestationsperiode. Von den wenigen Überlebenden wiesen alle transgenen Mäuse Entwicklungsstörungen auf und starben innerhalb der ersten fünf Lebenswochen. Zurückführen ließ sich die erhöhte Letalität auf kardiovaskuläre Ursachen bedingt durch den Katecholaminmangel [37,101].

Auch im menschlichen Organismus haben Veränderungen im Katecholaminhaushalt weitreichende Folgen und führen zu diversen Pathologien. Solche Pathologien sind beispielsweise der Morbus Parkinson [26], das Segawa-Syndrom [51], die Schizophrenie [53], bipolare Störungen [20] und die Prolaktinämie [3]. Aber auch bei Neuroblastomen, einer der wenigen Entitäten solider maligner Tumoren im Kindesalter, ist eine Überexpression der Tyrosinhydroxylase zu verzeichnen.

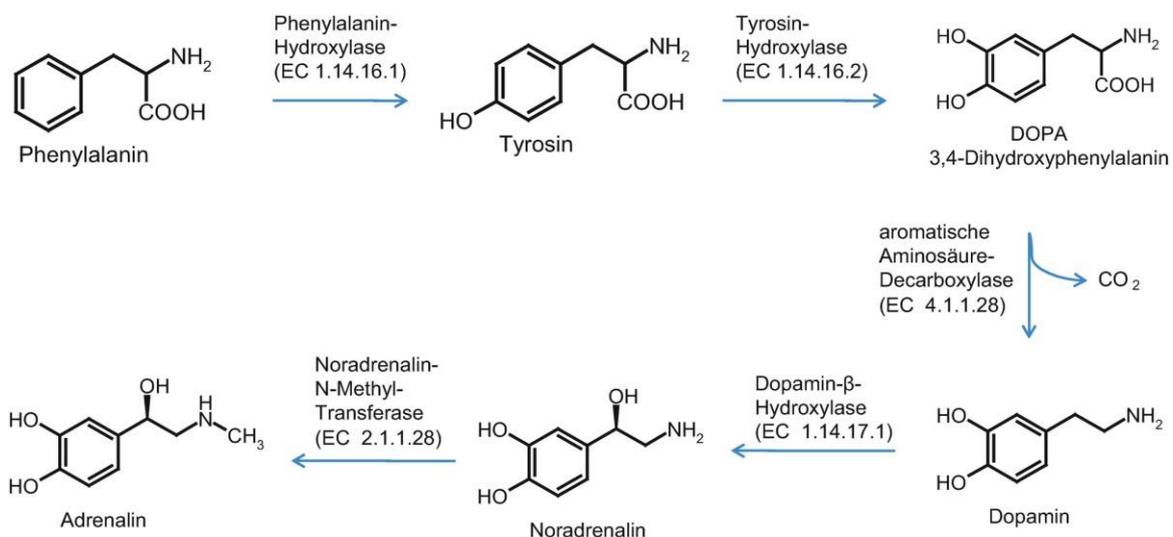


Abbildung 1: Darstellung der Katecholaminbiosynthese

Die Phenylalaninhydroxylase wandelt Phenylalanin in Tyrosin um. Darauf folgt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katecholaminbiosynthese, in dem die Tyrosinhydroxylase die Reaktion von Tetrahydrobiopterin (BH_4), molekularem Sauerstoff (O_2) und Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) katalysiert. Aus L-DOPA kann im nächsten Schritt, vermittelt durch die aromatische Aminosäuredecarboxylase, der Neurotransmitter Dopamin generiert werden. Die Dopamin-β-Hydroxylase hydroxyliert Dopamin zu Noradrenalin, das durch die Noradrenalin-N-Methyl-Transferase zu Adrenalin methyliert wird [13].

Abbildung entnommen aus: [23]

4.2 Expression der Tyrosinhydroxylase in unterschiedlichen Zellpopulationen

Die Tyrosinhydroxylase ist sowohl in Zellen des zentralen als auch in Zellen des peripheren Nervensystems vorzufinden. Im zentralen Nervensystem wird die Tyrosinhydroxylase vor allem in Zellen des Dienzephalons, des Mesenzephalons (unter anderem Substantia nigra, Area tegmentalis ventralis), des Hirnstamms (unter anderem Locus coeruleus), des Bulbus olfactorius, des Hypothalamus und der Retina exprimiert [49]. Dahingegen wird die Tyrosinhydroxylase im peripheren Nervensystem in den sympathischen Ganglien und in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks exprimiert [44].

Studien konnten zeigen, dass das menschliche Gehirn über vier Isoformen der humanen Tyrosinhydroxylase verfügt, die aus alternativem Spleißen der hnRNA resultieren. Das Vorhandensein und die relative Menge der Isoformen differieren zwischen den katecholaminergen Zellpopulationen, was zu einem vielfältigen Expressionsmuster der Tyrosinhydroxylase führt [47].

4.3 Stimulus-induzierte Expression der Tyrosinhydroxylase

Wie aufgrund der funktionellen Bedeutung der Katecholaminbiosynthese-Endprodukte zu erwarten ist, wird die Tyrosinhydroxylase auf transkriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene streng kontrolliert und moduliert, um die optimale Konzentration an Katecholaminen als Antwort auf vielfältige Stimuli zu generieren. Die dafür verantwortlichen Regulationsmechanismen kann man in kurzfristige (Feedback- Inhibition durch Katecholamine, allosterische Regulation und Phosphorylierung durch Proteinkinasen) und in mittel- bis langfristige Mechanismen (Veränderung der RNA- oder Enzymstabilität, Regulation auf Transkriptions- oder Translationsebene und alternatives RNA-Spleißen) unterteilen [39].

Eine langfristige Steigerung der Aktivität der Tyrosinhydroxylase kann durch verschiedene physiologische Stimuli ausgelöst werden. Als extrazelluläre Stimuli wurden Liganden von Tyrosinkinase-Rezeptoren, Glukokortikoide als Liganden von Steroidhormonrezeptoren, Phorbol ester, sowie transsynaptische neuronale Aktivität und Depolarisation identifiziert [19,54]. Auf transkriptioneller Ebene wurden mehrere Transkriptionsfaktoren nachgewiesen, die die basale und induzierte Tyrosinhydroxylase- Transkription steuern. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem CREB, Egr-1 und AP-1 [17,35,87].

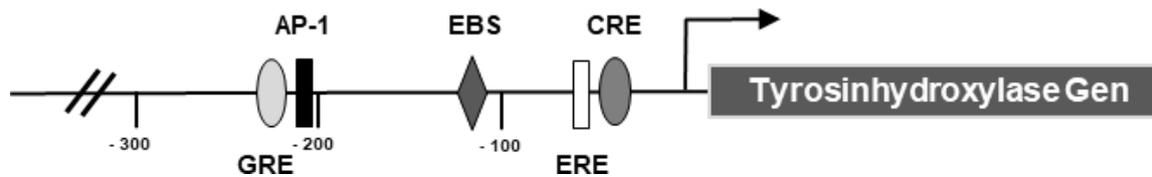


Abbildung 2: Regulation der Expression der Tyrosinhydroxylase auf Transkriptionsebene

Dargestellt ist der TH-Promotor mit aufgetragenen Basenpaaren in Bezug auf den Transkriptionsstart. Der TH-Promotor enthält multiple Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die der Regulation der TH-Expression dienen, wie stromaufwärts des Transkriptionsstarts die Bindungsstelle CRE (*cAMP response element*) für cAMP. CRE spielt eine entscheidende Rolle sowohl für die basale als auch für die durch cAMP induzierte Transkription des TH-Gens [34]. Östrogene und Glukokortikoide können ebenfalls eine Regulation der Transkription über die Bindungsstellen ERE (*estrogen-response element*) und GRE (*glucocorticoid response element*) vermitteln. Entscheidend für die Regulation ist außerdem die Bindungsstelle für den *activating transcription factor-1* (AP-1), die die Genexpression über Faktoren wie Phorbol ester, NGF und wahrscheinlich Stress reguliert [21,58]. Die Egr-1-Bindungsstelle (EBS) ermöglicht die Bindung des Zinkfingerproteins Egr-1 (*early growth response 1*) [67].

4.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bildet die größte Superfamilie der integralen Membranproteine und ist somit auch Angriffspunkt für über 35 % aller Medikamente in der Behandlung verschiedenster Krankheiten [29,68]. Das menschliche Genom enthält 800 identifizierte Gene, die für GPCR kodieren. GPCR können durch verschiedenste Liganden wie Hormone, Neurotransmitter und sensorische Stimuli aktiviert werden. Trotz der Vielfalt GPCR weisen alle ein gemeinsames Grundgerüst aus, welches aus sieben membrandurchspannenden α -Helices, einer extrazellulären Carboxylgruppe und einer intrazellulären Aminogruppe besteht [42,69]. Die Bindung der Liganden an den extrazellulären Bereich des GPCR führt zu einer intrazellulären Rekrutierung eines heterotrimeren G-Proteins, welches sich aus einer α -, β -, und γ -Untereinheit zusammensetzt. Das G-Protein liegt im inaktiven Zustand als heterotrimerer Komplex vor. Hierbei ist an der α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Bei Aktivierung des GPCR kommt es zu einer Konformationsänderung, wobei das an der α -Untereinheit gebundene Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird. Diese Konformationsänderung führt zur Dissoziation des heterotrimeren Komplexes in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit, wobei vor allem die Aktivierung der Effektorproteine durch die α -Untereinheit die folgende Signalkaskade determiniert. Nach Spaltung von GTP in GDP und anorganischem

Phosphat (Pi) durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit, gefördert durch RGS-Proteine, reassoziieren die Untereinheiten in den heterotrimeren inaktiven Zustand des G-Proteins [69,96]. Die heterotrimeren G-Proteine werden je nach der durch die α -Untereinheit eingeleitete Signalkaskade in die Hauptgruppen $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ unterteilt [27]. Die genetische Vielfalt der $G\alpha$ -Untereinheiten kommt dadurch zum Ausdruck, dass 16 verschiedene Gene für die $G\alpha$ -Untereinheit kodieren [82].

4.4.1 $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren

$G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren bilden eine Untergruppe der Superfamilie der GPCR ab. Sie aktivieren die Gentranskription durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [2]. Nach Aktivierung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptors durch *first messenger* wie beispielsweise Katecholamine, Angiotensin, Acetylcholin, Serotonin oder Histamin kommt es zur Rekrutierung von β -Isoformen der Phospholipase C. Die Phospholipase C hydrolysiert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die *second messenger* Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) [18,63]. Das lösliche IP_3 induziert im weiteren Verlauf der Signaltransduktion eine zytoplasmatische Erhöhung der Konzentration der Ca^{2+} -Ionen von etwa 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l durch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus Ca^{2+} -Speichern des endoplasmatischen Retikulums. Die Mobilisierung wird durch die Bindung und Aktivierung des ionotropen IP_3 -Rezeptors am endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelt. Dies führt zu einem Ca^{2+} -Ausstrom in Richtung des Konzentrationsgefälles aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma der Zelle. Das membranständige Glycerinderivat Diacylglycerol wirkt auf Ebene der Membran und aktiviert im Zusammenhang mit einer erhöhten Calciumkonzentration die Proteinkinase C [4,8]. Die Proteinkinase C kann im weiteren Verlauf verschiedene Effektormoleküle aktivieren. Zu diesen Effektorproteinen gehört die Gruppe der *mitogen activated protein* Kinasen (MAP-Kinasen), die Bestandteil hochkonservierter Signalkaskaden sind. Diese Signalkaskaden bestehen aus mehreren in Serie geschalteten Serin/Threonin Kinasen, die eine Phosphorylierungskaskade durchlaufen [78]. In neuronalen Zellen ist die Aktivierung der Proteinkinase C mit der Modulation von Ionenkanälen, der Desensibilisierung von Rezeptoren und einer Verstärkung der Neurotransmitterfreisetzung assoziiert, was zur Veränderung der Wirksamkeit synaptischer Übertragungen führen kann [70,79].

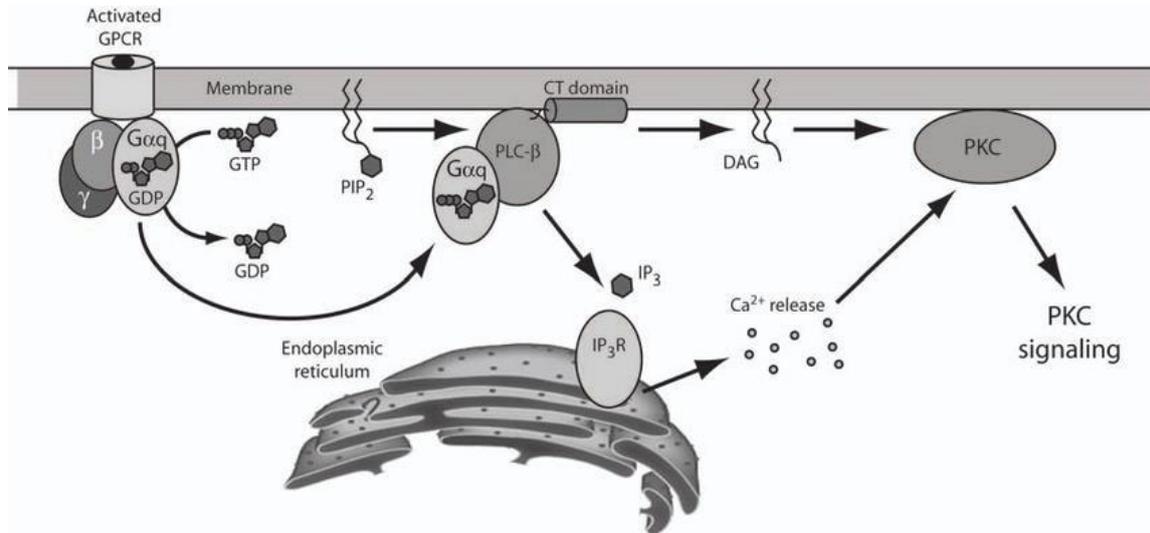


Abbildung 3: Signalkaskade nach Aktivierung des G α_q -gekoppelten Rezeptors

Die Bindung eines Liganden an den G α_q -gekoppelten Rezeptor löst eine Konformationsänderung des Rezeptors aus, durch die das an der G α -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ersetzt wird. Das heterotrimeres G-Protein dissoziiert in die Untereinheiten $\beta\gamma$ und α , wobei die G α -GTP Untereinheit das Enzym Phospholipase C β aktiviert. Die PLC β katalysiert die Bildung von DAG und IP $_3$ aus dem Phospholipid PIP $_2$. Sowohl DAG als auch IP $_3$ spielen als *second messenger* eine zentrale Bedeutung in der Signalkaskade. Das hydrophile IP $_3$ diffundiert in das Zytoplasma, wo es durch die Bindung an den ionotropen IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R) einen Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma bewirkt. Ca $^{2+}$ und DAG aktivieren die Proteinkinase C, die wiederum eine Vielzahl nachgeschalteter Effektorproteine phosphoryliert.

Abbildung entnommen und modifiziert aus: [77]

4.4.2 G α_q -gekoppelter Designerrezeptor

GPCR werden vielfältig auf Zellmembranen exprimiert. Derselbe Ligand kann an diverse GPCR binden und diese aktivieren. Ein GPCR kann außerdem eine Affinität zu unterschiedlichen heterotrimeren G-Proteinen haben, was zur Initiation differenter Signalkaskaden führt. Beispielsweise können β -adrenerge Rezeptoren in Kardiomyozyten sowohl mit G α_i als auch mit G α_s -Proteinen gekoppelt sein [100]. Darüber hinaus kann derselbe GPCR auch von unterschiedlichen Liganden aktiviert werden. Dies führt zu einer komplexen Multifunktionalität des Signalsystems der GPCR. Somit erweist sich die Interpretation der zellulären Antwort auf die GPCR Stimulation als sehr schwierig, da sie entweder auf die Aktivierung mehrerer Rezeptor-Subtypen oder auf die Komplexität der Signalwege nach Aktivierung eines einzelnen Rezeptorsubtyps zurückzuführen ist [27,91].

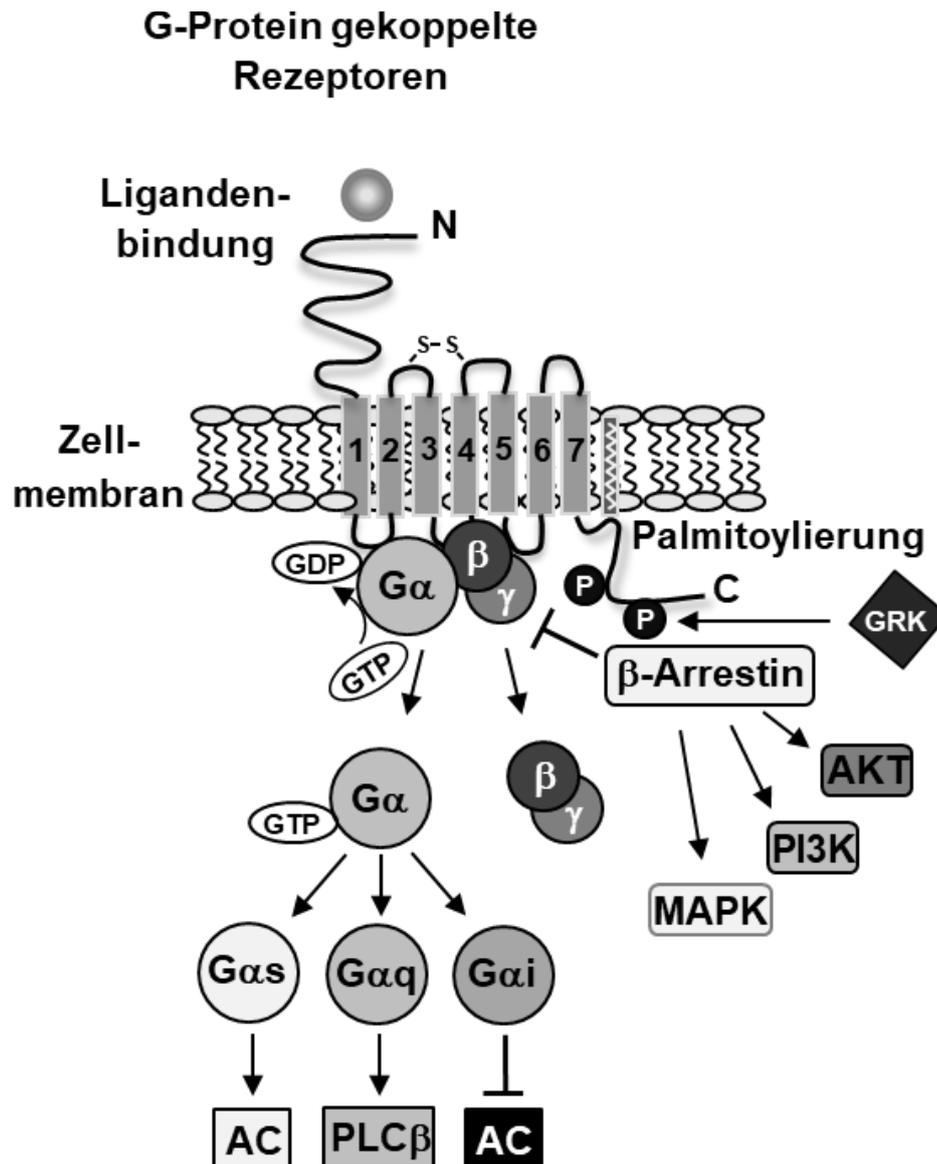


Abbildung 4: Komplexität der Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus sieben membrandurchspannenden α -Helices, die über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Eine vierte intrazelluläre Schleife wird durch Palmitoylierung der intrazellulären terminalen Aminogruppe erzeugt. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) können nach Freisetzung der assoziierten G-Proteine G-Protein-gekoppelte Rezeptoren phosphorylieren. β -Arrestine können an den phosphorylierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor binden und die weitere Signalübertragung blockieren. Außerdem führt die Bindung von β -Arrestin zur Internalisierung der Rezeptoren durch Endozytose. Darüber hinaus induzieren β -Arrestine G-Protein-unabhängige intrazelluläre Signalkaskaden, wie beispielweise die Aktivierung der Kinasen MAP, AKT und PI3.

Abbildung entnommen und modifiziert aus: [91]

Zur Reduktion dieser Komplexität in Experimenten wurden G-Protein-gekoppelte Designerrezeptoren entwickelt. Diese Designerrezeptoren können nur durch einen pharmakologisch inerten (Clozapin-N-oxid) und nicht durch endogen synthetisierte Liganden aktiviert werden und sind mit einem definierten G-Protein gekoppelt. Guettier und Kollegen beschrieben 2009 sowohl einen $G\alpha_s$ als auch einen $G\alpha_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptor, die in den β -Zellen des Pankreas transgener Mäuse exprimiert wurden. Der $G\alpha_q$ -gekoppelte Designerrezeptor beruht auf dem Grundgerüst des M3- muskarinergen Acetylcholinrezeptors (M3R), bei dem zwei Punktmutationen (Y148C, A238G) in der 3. und in der 5. Transmembrandomäne implementiert wurden. Aufgrund der Punktmutationen an diesen Stellen erfolgte ein Austausch zweier Aminosäuren, was die Spezifität für extrazelluläre Liganden verändert. Der M3R kann nun nicht mehr durch Acetylcholin, sondern nur durch Clozapin-N-oxid (CNO), einem Metaboliten des Antipsychotikums Clozapin, aktiviert werden [25].

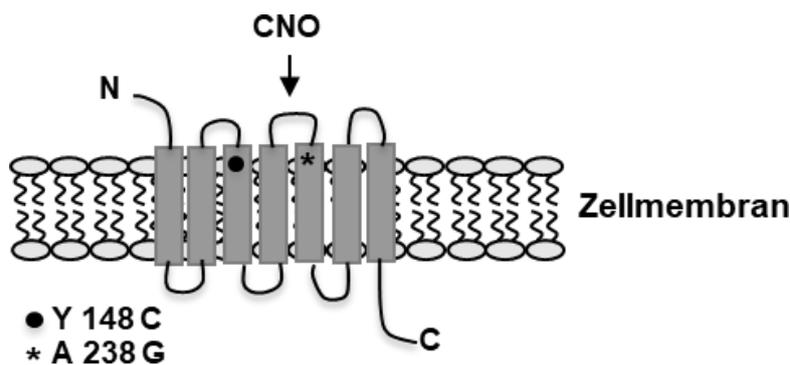


Abbildung 5: Schematische Darstellung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors $R\alpha_q$

Der $G\alpha_q$ -gekoppelte Designerrezeptor wurde auf Grundlage des M3 muskarinergen Acetylcholinrezeptors entwickelt und setzt sich wie alle GPCR aus sieben membrandurchspannenden α -Helices, die über Loop-Strukturen verbunden sind, zusammen. Durch die Punktmutationen Y 148 C und A 238 G kommt es zum Austausch der Aminosäuren an diesen Stellen in der 3. und 5. Transmembrandomäne. Dies verhindert die Bindung von Acetylcholin an den Rezeptor und ermöglicht die exklusive Bindung und Aktivierung des Rezeptors und den darauffolgenden Effektorproteinen durch CNO. Abbildung entnommen und modifiziert aus: [91]

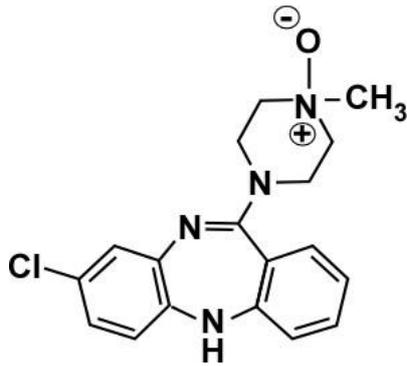


Abbildung 6: Darstellung von Clozapin-N-oxid

4.5 Fragestellung der Arbeit

Frühere Studien identifizierten Tyrosinkinase-Rezeptoren und Steroidhormonrezeptoren als Regulatoren der Expression der Tyrosinhydroxylase. Die Aktivierung $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus, die über gemeinsame Signalmoleküle mit der Signalkaskade der Tyrosinkinase-Rezeptoren verfügt. Dieser Umstand bildet die Grundlage der These, dass die Gentranskription der Tyrosinhydroxylase ebenfalls von $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren reguliert wird. Diese These ist Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit, in der untersucht wird, ob die Stimulation eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors in katecholaminergen SH-SY5Y Neuroblastomzellen die Gentranskription der Tyrosinhydroxylase aktiviert und über welche Signalmoleküle diese Aktivierung vermittelt wird.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Loch-Platte, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Loch-Platte, weiß	Nunc, Roskilde, DNK
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fisher, Berlin
ChemiDoc XRS+ imaging system	Bio-Rad, München
Einmal-Spitzen (200 µl bzw. 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Spritzen Injekt (10 ml bzw. 20 ml)	Braun AG, Melsungen
Einmalfilter 0,22 und 0,45 µM	Sarstedt, Nümbrecht
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
HoferT™ TE22 Mini Tank Blotting- Einheit	Fisher Scientific, Schwerte
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Luminometer	Berthold Detection Systems, Alabama, USA
Magnetrührer	Labortechnik, Staufen
Microplate Reader Infinite M Nano	M Nano Tecan, Männedorf, CH
Millipore Wasseranlage	Milli Q Millipore, Milford, USA
Neubauer Zählkammer improved	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Weilheim
Photometer (DNA-Messung)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (20 µl, 200 µl bzw 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Polystyrol-Röhrchen	Fisher Scientific, Nidderau
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 µm bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex-Mixer	IKA-Labortechnik, Staufen
Zellkulturflasche (75 cm ² bzw. 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø60 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

5.2 Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Bacillol	VWR, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BCA Protein Kit	Kit Pierce, Rockford, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Clozapin-N-Oxid (CNO)	BioTech, Wiesbaden-Nordenstedt
Coenzym A	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA, Marburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Chemikalienlager UdS
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	PAA, Marburg
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny) -	Roth, Karlsruhe
Ethansulfonsäure (HEPES)	
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Hexadimethrin Bromid (Polybrene)	Merck Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumhydrogencarbonat ((MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
NaF	Merck, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Marburg
Reporterlysepuffer (5x)	Promega, Mannheim
Slim Fast	Allpharm, Messel
Tricin	Roth, Karlsruhe

Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Marburg
Vanadate	Merck, Darmstadt

5.3 Lösungen

Nachfolgend werden die in den Versuchen verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet. Die pH-Wert Einstellung erfolgte mit Salzsäure und Natriumhydroxid. Falls nichts anderes angegeben ist, wurde destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

1x PBS

NaCl	170 mM
KCl	3,35 mM
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	4 mM
KH ₂ PO ₄	1,84 mM
pH 7,24	

1x SDS-Laufpuffer

Tris (pH 8,3)	250 mM
Glycin	2,5 M
SDS	1 %

1x Trypsin/EDTA

Trypsin	0,25 % (w/v)
EDTA	0,1 % (w/v)

2x HBSS

NaCl	274 mM
KCl	25 mM
Na ₂ HPO ₄	3,75 mM
Glukose	27,75 mM
HEPES	105 mM
pH 7,05-7,12	

Sterile Filtration mithilfe eines Sterilfilters (Ø0,22 µm).

2x SDS-Ladepuffer

Tris/HCl (pH 6,8)	125 mM
EDTA	3 mM
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	9 %
Bromphenolblau	0,05 %

Blockinglösung

Die Blockinglösung wurde aus TBST und 4 % Slim Fast (w/v) hergestellt.

DMEM Vollmedium

FCS	10 %
Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

DMEM serumreduziert

FCS	0,5 %
Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

ECL-Lösung 1

Tris/HCl	100 mM
pH 8,5	

ECL-Lösung 2

H ₂ O ₂	5,4 mM
Luminol	2,5 mM
Tris/HCl	100 mM (pH 8,5)
Para-Coumarsäure	400 µM

Luciferase Assay Reagent

Tricin	22 mM
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x5H ₂ O	1,177 mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	2,94 mM
EDTA	0,11 mM
DTT	36,3 mM
Coenzym A	297 µM
ATP	583 µM
pH 7,8	

Luziferin 4,7 mM

Ponceau-Lösung

Ponceau S	0,1 %
Essigsäure	5 %

Puffer A

HEPES/KOH (pH 7,9)	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Glycerol	10 %
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Nonidet P40	1 %
PMSF	0,2 mM

Puffer C

HEPES/KOH (pH 7,9)	10 mM
Glycerol	10 %
NaCl	500 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,5 mM
Triton-x-100	0,5 %
PMSF	0,2 mM

Sammelgel

Rotiphorese 30	0,58 ml
0,5M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	5 μ l
H ₂ O	3,2 ml
APS (10%)	100 μ l
TEMED	10 μ l

Zur Vermeidung einer verfrühten Polymerisation des Polyacrylamids wurde das Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Initiator dieser Reaktion zuletzt hinzugefügt.

Trenngel

Rotiphorese 30	1,65 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	1,25 ml
10% SDS	100 μ l
H ₂ O	4,2 ml
APS (10%)	200 μ l
TEMED	20 μ l

Auch hier wurde das Ammoniumperoxodisulfat (APS) als letzte Komponente zugeführt.

5.4 Untersuchung des Tyrosinhydroxylase-Promotors

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des Tyrosinhydroxylasepromotors in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nach Aktivierung eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors untersucht. Zu diesem Zweck wurde mithilfe einer lentiviralen Infektion der Tyrosinhydroxylase-Promotor mit einem daran gekoppeltem Reportergen (hier: Luziferase) in das Chromatin der Neuroblastomzellen integriert.

Damit eine spezifische Signalkaskade untersucht werden konnte, an deren Ende die Aktivierung eines Chromatin-integrierten Reportergens stand, wurden die Zielzellen mit Lentiviren infiziert, die für den $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor $R\alpha_q$ kodierten.

Um zu überprüfen, inwiefern unterschiedliche Effektormoleküle einen Einfluss auf die Signalkaskade haben, wurden diese ebenfalls durch lentiviralen Gentransfer in den Zellen exprimiert. Durch die Bestimmung der Luziferaseaktivität konnte eine aktivierende oder hemmende Wirkung der Effektormoleküle auf die Signalkaskade analysiert werden.

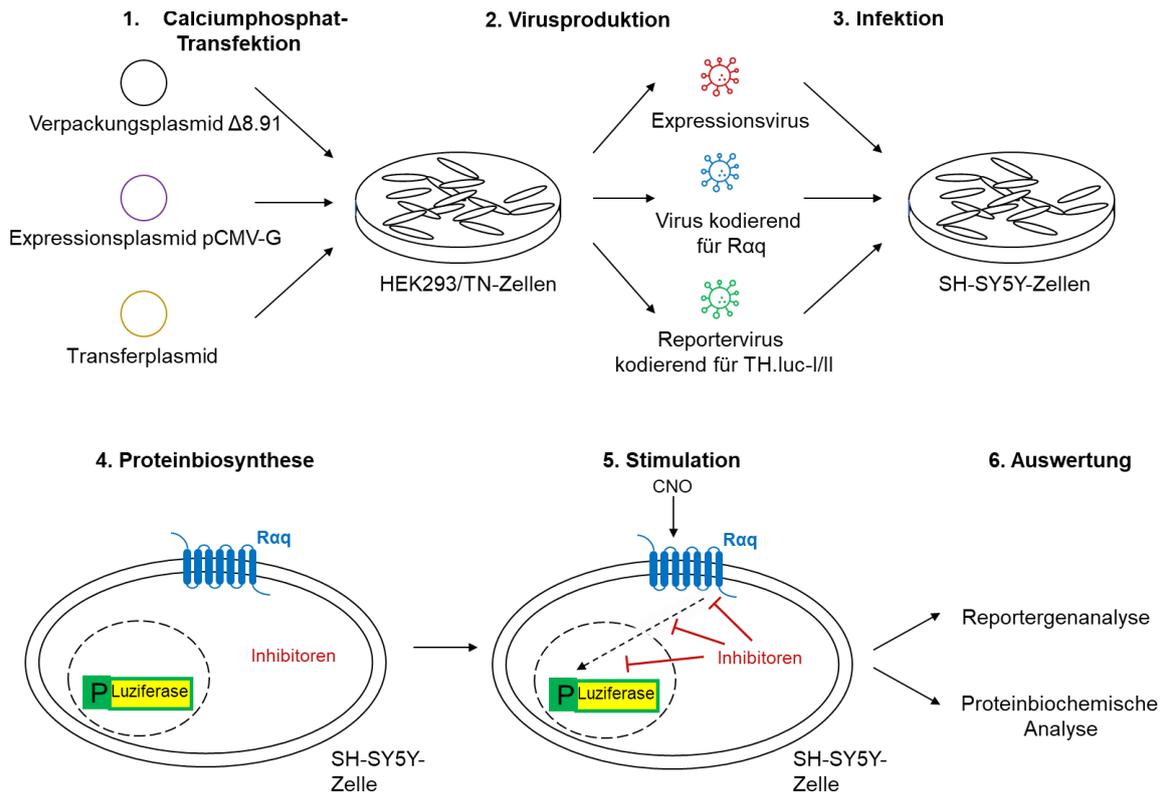


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Zur Herstellung lentiviraler Viren wurde mit der Calciumphosphat-Transfektions-Methode das Verpackungsplasmid, das Expressionsplasmid und ein Transferplasmid in HEK293/TN-Zellen eingebracht. Nach ca. 48-72 h wurden von den transfizierten Zellen Lentiviren gebildet, die mit dem Zellüberstand abgenommen wurden und unmittelbar zur Infektion der SH-SY5Y-Zellen verwendet wurden. Die Infektion der SH-SY5Y-Zellen wurde als Coinfektion mit drei unterschiedlichen Viren durchgeführt: ein Virus, das für den Tyrosinhydroxylasepromotor mit darauffolgendem Reportergen (hier: Luziferase) kodierte, ein Virus für den Designerrezeptor R α_q und ein Virus, das für Effektormoleküle kodierte, die mit der Signalkaskade interagierten. Bei korrektem Einbau in das Genom und nachfolgender Proteinbiosynthese konnte der Designerrezeptor in die Zellmembran integriert, mittels CNO aktiviert und dadurch die Signalkaskade stimuliert werden. Am Schluss der Signalkaskade stand der Tyrosinhydroxylasepromotor mit daran gekoppeltem Luziferasegen. Bei einer Aktivierung des Promotors wurde das Enzym Luziferase exprimiert. Dieses konnte mithilfe eines Luziferaseassays im Rahmen der Reporteranalyse bestimmt werden und wurde als Maß für die Aktivierung des Promotors genommen. Die Funktionalität der Transfergen tragenden Viren konnte im Zuge proteinbiochemischer Methoden analysiert werden.

5.5 Verpackungs-, Expressions- und Transferplasmide für eine transiente Transfektion

Zur Generierung von Lentiviren für molekularbiologische Analysen wurde das 3-Plasmid-System genutzt, das in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben wird.

Zu diesen drei Plasmiden gehörte ein Transferplasmid mit der zu übertragenden genetischen Information (Transfervektor), ein Verpackungsplasmid, das für virale Strukturproteine und Enzyme zur Bildung rekombinanter Lentiviren kodierte ($\Delta 8.91$), sowie ein Plasmid, das für ein Hüllprotein kodierte und das Infektionsspektrum des Lentivirus erweitert (pCMV-G-Expressionsplasmid). Diese drei Plasmide wurden durch Cotransfektion mit der Calciumphosphat-Methode in HEK293/TN-Zellen eingeschleust.

5.5.1 Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$

Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ sorgt dafür, dass die viralen Proteine Gag, Pol und Rev des HI-Virus exprimiert werden. Die LTR-Sequenz ist mutiert und inaktiv. Anstelle der LTR-Sequenzen wird die Expression durch den starken Cytomegaloviruspromotor (CMV) gesteuert, wodurch eine hohe Expressionsrate erreicht werden kann. Am 3'-Ende der Transkriptionseinheit befindet sich ein Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40 pA) [74].

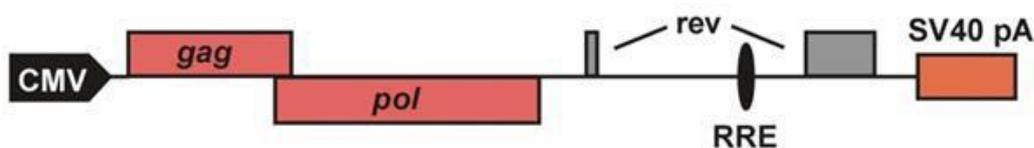


Abbildung 8: Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$

Stromaufwärts der Region, die für die viralen Proteine Gag, Pol und Rev kodiert, ist der starke Cytomegaloviruspromotor (CMV) lokalisiert. Dieser sorgt für eine hohe Expressionsrate. Stromabwärts liegt das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 (SV40 pA) [74].
Abbildung entnommen und modifiziert aus: [74]

5.5.2 Expressionsplasmid pCMV-G

Zur Umgehung des engen Tropismus des HI-Virus wurde eine Pseudotypisierung mit dem Protein G des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) durchgeführt, für welches das Expressionsplasmid pCMV-G kodiert.



Abbildung 9: VSV-G Expressionsplasmid (pCMV-G)

Dargestellt ist die Transkriptionseinheit des Expressionsplasmids pCMV-G. Zur Induktion der Expression des VSV-G-Hüllproteins ist am 5'-Ende der starke Cytomegaloviruspromotor (CMV) inseriert. Am 3'-Ende wurde das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 (SV40 pA) eingebaut [74].

Abbildung entnommen und modifiziert aus: [74]

5.5.3 Transferplasmide

Der SIN-Transfervektor steuert die Synthese der RNA, die als genomische RNA in die neu synthetisierten rekombinanten Lentiviren integriert wird. Folglich trägt der Vektor die genetische Information in Form eines Transgens des gewünschten Proteins beziehungsweise der gewünschten RNA.

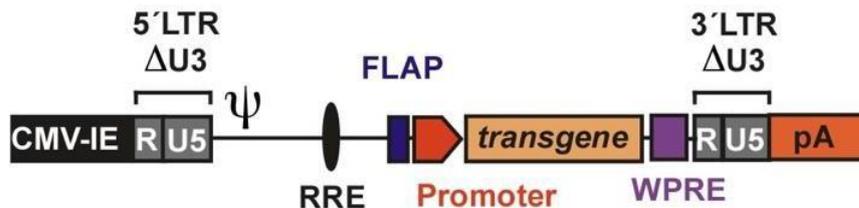


Abbildung 10: Lentiviraler Transfervektor

Die Abbildung stellt die Transkriptionseinheit des SIN-Transfervektors dar. Die Transkriptionseinheit steht unter Kontrolle des starken Cytomegaloviruspromotors (CMV-IE). Stromabwärts ist die Verpackungssequenz Ψ lokalisiert, welche als Verpackungssignal für die virale RNA von Gag-kodierten Proteinen erkannt wird und die Translokation viraler DNA in das VSV-Hüllprotein (pCMVG) gewährleistet. Als Promotor für die Transgenexpression dient der menschliche Ubiquitin-C-Promotor beziehungsweise der Cytomegaloviruspromotor. Im 3'-LTR ist eine Deletion der U3-Region ($\Delta U3$) vorzufinden. Das LTR ist daher nicht mehr funktionell. Allein der interne Promotor dirigiert die kontinuierliche Expression des Transgens [90]. Als zusätzliche Komponenten dienen das HIV-FLAP-Element und das *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE). Das HIV-FLAP-Element vereinfacht den Kerntransport der doppelsträngigen Virus-cDNA, wohingegen das WPRE für die Stabilität des viralen Transkripts verantwortlich ist und damit die Expression erhöht [74].

Abbildung entnommen und modifiziert aus: [74]

5.5.3.1 Verwendete lentivirale Transferplasmide

Tabelle 1: Auflistung der zur Transfektion verwendeten Transferplasmide und deren Merkmale

pFW-TH.luc-1	Kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors (Sequenz von -760 bis +19).
pFW-TH.luc-2	Kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors (Sequenz von -169 bis +19).
pFUW	Lentiviraler Transfervektor [50].
pFUW-ΔCnA	Kodiert für eine konstitutiv aktive Mutante der Proteinphosphatase Calcineurin A [72].
pFUW-E1A	Kodiert für das <i>adenovirus early region 1A protein</i> (E1A) [93].

pFUW-MKP-1	Kodiert für die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Phosphatase 1 [73].
pFUW-pHA-Rα_q	Kodiert für den G α_q -gekoppelten Designerrezeptor [91].
pFUW-PLCβ3ct	Kodiert für das C-terminale Fragment der Phospholipase C- β 3 (Sequenz von 845 bis 1237). N-terminal befindet sich ein FLAG-Epitop.
pFUW-REST-CREB	Kodiert für die dominant-negative Mutante von CREB [75].
pFUW-RGS2	Kodiert für das Protein <i>regulator of G-protein signaling 2</i> , welches zur Gruppe der GTPase aktivierenden Proteinen gezählt wird. N-terminal ist ein HA-tag angehängt [92].

5.5.3.2 Designerrezeptor R α_q

Die Struktur des G α_q -gekoppelten Designerrezeptors beruht auf der des muskarinergen M3 Acetylcholinrezeptors. Um die Bindungsstelle für den Liganden Acetylcholin zu inaktivieren, wurden zwei Punktmutationen in der 3. und 5. Transmembranregion eingebracht (Y148C, A238G). Die intrazelluläre Signalkaskade kann nun ausschließlich durch Bindung der pharmakologisch inerten Designerverbindung Clozapin-N-oxid (CNO) an den G α_q -gekoppelten Designerrezeptor aktiviert werden. Somit ist die selektive Aktivierung dieser Signalkaskade mit einem synthetischen Liganden möglich [91].

5.5.3.3 RNA-Interferenz mittels shRNA

Für die Analyse des ERK-Signalwegs wurden in dieser Arbeit ERK1/2-spezifische shRNA eingesetzt, die durch RNA-Interferenz die Expression der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 inhibieren konnte [80]. Mithilfe des lentiviralen Gentransfers konnte die spezifische shRNA in das Genom der Zielzelllinie integriert werden [84].

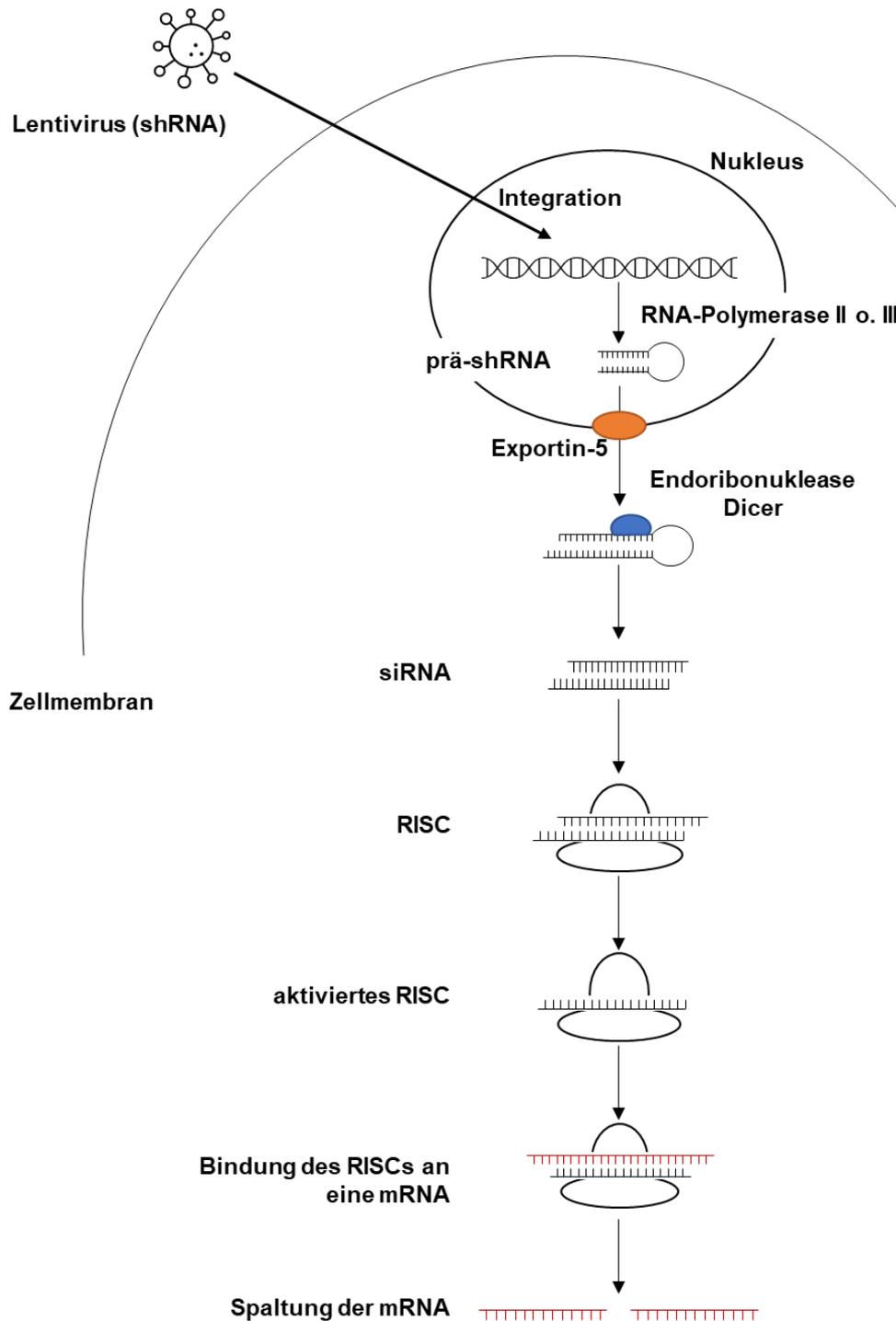


Abbildung 11: Mechanismus der RNA-Interferenz mittels shRNA

Nach erfolgreicher Integration der shRNA in das Chromatin der Zielzelle kommt es zur Transkription durch die RNA-Polymerase II oder III in eine prä-shRNA und darauffolgend zum Transport in das Zytoplasma via Exportin-5. Im Zytoplasma wird die prä-shRNA durch die Endoribonuklease Dicer in doppelsträngige siRNA prozessiert. Die aktive siRNA formt mit weiteren Proteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Als Bestandteil des RISCs bindet die siRNA an eine mRNA, welche eine komplementäre Basensequenz zur siRNA aufweist, und spaltet diese [80].

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten lentiviralen Transfervektoren, die eine RNA-Interferenz induzierten und deren Eigenschaften.

pLL3.7	Kontrollvektor [76].
pLL3.7shERK1	Kodiert für die shRNA, die eine RNA-Interferenz mit der für ERK1-kodierende mRNA ausbildet [28].
pLL3.7shERK2	Kodiert für die shRNA, die eine RNA-Interferenz mit der für ERK2-kodierende mRNA ausbildet [45].

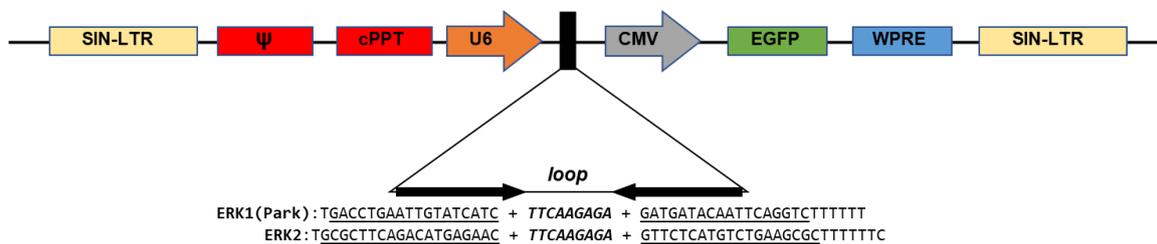


Abbildung 12: Provirus des pLL3.7 SIN-Transfervektors

Der Transfervektor pLL3.7 wird am 3' und am 5'-Ende von *self-inactivating long terminal repeat* (SIN-LTR)-Sequenzen terminiert. SIN-LTR-Sequenzen unterscheiden sich von LTR-Sequenzen in einer Deletion im U3-Element. Dies führt zum Verlust der Transkriptionsfähigkeit nach Übertragung des Vektors auf die Zielzelle. Stromabwärts der *central polypurine track* (cPPT) Sequenz ist der murine Promotor U6 lokalisiert. Im Bereich zwischen der U6 und CMV-Sequenz befindet sich die für die *small hairpin* RNA (shRNA) kodierende genetische Information. Als weitere Komponenten des Provirus befinden sich die Kodierinformation für das *green fluorescent protein* (EGFP) unter Kontrolle des Promotor-/Enhancer-Bereichs des CMV-Virus und das *woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element* (WPRE) [76].

5.6 Zelllinien

Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Zelllinien verwendet.

Eine Zelllinie fungierte als virusproduzierende Zelllinie, die mit dem Pseudotypierungsplasmid (CMV-G), einem Verpackungsplasmid (Δ 8.91) und dem Transferplasmid mit der Calciumphosphat-Transfektions-Methode transfiziert wurden, um Lentiviren für die Infektion von Zielzellen, der zweiten Zelllinie, zu erzeugen. In den Zielzellen wurde nach deren Infektion die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors untersucht.

5.6.1 HEK293/TN-Zellen

Die virusproduzierenden HEK293/TN-Zellen stammen ursprünglich aus humanen embryonalen Nierenzellen, welche mit dem humanen Adenovirus vom Typ 5 transfiziert wurden [22].

5.6.2 SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Neuroblastomzellen sind ein Subtyp der Zelllinie SK-N-SH. Dabei handelt es sich um Zellen einer Biopsie eines metastatischen Knochentumors eines 4-jährigen Mädchens aus dem Jahr 1970 [5].

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von J. L. Biedler zur Verfügung gestellt.

5.7 Zellkultur

Die für die Versuche verwendeten Zelllinien wurden in Kulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank im *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM), welches mit 10 % inaktivem fetalen Kälberserum supplementiert wurde, kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter der Sterilbank.

5.8 Passage der Zellen

Um eine übermäßige Konfluenz der jeweiligen Zelllinie in den Kulturflaschen zu verhindern, wurden die Zellen in einem Rhythmus von zwei bis drei Tagen passagiert. Bei einer Passage wurde zunächst das DMEM und die nicht adhärenen Zellen vom adhärenen Zellrasen abgesaugt und der adhärenen Zellrasen zweimal mit 1x PBS gespült. Zur Ablösung der adhärenen Zellen wurden diese mit 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Gestoppt wurde diese Reaktion durch die Zugabe von frischem DMEM-Medium. Die Zellen wurden nach vollständiger Resuspension mit der gewünschten Verdünnung oder Zellzahl in neue Kulturflaschen oder Schalen überführt.

5.9 Herstellung von Lentiviren sowie Infektion und Analyse von Zielzellen

5.9.1 Herstellung funktionsfähiger Lentiviren mithilfe der Calciumphosphat-Transfektion

Für eine möglichst optimale Konfluenz von ungefähr 50 % wurden am Tag vor der Transfektion 1,5 Millionen der HEK293/TN-Zellen pro 60 mm Zellkulturschale mit 4 ml DMEM mit 10 % FCS ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellen nach der Ablösung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und mehrere 16er Felder ausgezählt. Hierbei entspricht die gezählte Zahl eines 16er Feldes mit 10.000 multipliziert der Zellzahl, die in einem Milliliter enthalten ist.

Für die Transfektion wurde ein Calciumphosphat-DNA-Präzipitat hergestellt, welches durch die eukaryotische Zelle endozytotisch aufgenommen wurde. Zur Herstellung dieses Präzipitats wurden zwei Polystyrolröhrchen verwendet. In das erste Röhrchen wurden 250 µl einer zuvor frisch angesetzten 2x HBSS Lösung gegeben. Das zweite Röhrchen setzte sich aus 250 µl H₂O (Millipore Qualität), 27,5 µl einer Calciumchloridlösung (2,5 M), 5 µg des Verpackungsplasmids Δ8.91, 2,3 µg des Expressionsplasmids pCMV-G und 6,6 µg des jeweiligen Transfervektors zusammen. Die Konzentrationen der Plasmide wurden mithilfe eines Photometers bei 260 nm gemessen. Die Angaben beziehen sich auf je eine zu transfizierende 60 mm Zellkulturschale.

Das 2x HBSS wurde durch Einblasen von Luft mit einer Pasteurpipette und einem Pipettus durchmischt. Währenddessen wurde der Inhalt des zweiten Polystyrolröhrchens mit einem zweiten Pipettus und Pasteurpipette aufgenommen und tropfenweise dem 2x HBSS im ersten Polystyrolröhrchen zugefügt. Als Zeichen eines dabei entstandenen Calciumphosphat-DNA-Präzipitates war ein leichter weißer Niederschlag sichtbar.

Vor der Zugabe des Calciumphosphat-DNA-Präzipitates zu den Zellen wurde das Medium von den am Vortag ausplattierten Zellen abgenommen und durch 4 ml frisches DMEM-Medium ohne FCS mit 25 µM Chloroquin ersetzt. Direkt danach erfolgte die tropfenweise Zugabe von 500 µl des Calciumphosphat-DNA-Präzipitates

Anschließend wurden die Platten für 16-24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen nach Abnahme des Mediums zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem DMEM-Medium mit 10 % FCS versorgt. Das Medium enthielt zusätzlich 20 mM HEPES zur Stabilisierung des pH-Wertes. Zur Bildung der Lentiviren wurden die Platten anschließend für 72 h inkubiert.

Potenziell infektiöses flüssiges Material wurde mit Bacillol inaktiviert und feste Materialien sicher verpackt sowie autoklaviert.

5.9.2 Lentivirale Infektion

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter S2-Bedingungen ausgeführt und potenziell infektiöse Materialien wurden gesondert entsorgt.

Zur Infektion der SH-SY5Y-Zellen mit dem im Zuge der Transfektion (Kapitel 5.9.1) entstandenen Lentivirus wurde zunächst der Virusüberstand der 60 mm Zellkulturschalen von den transfizierten HEK293/TN-Zellen abgenommen und über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen filtriert. Da für die Experimente jeweils drei Viren mit unterschiedlichen Transgenen notwendig waren, wurden diese mit unterschiedlichen Verdünnungen in der Form einer Coinfektion gemischt.

Tabelle 3: Virusverdünnungen der bei der Coinfektion eingesetzten Lentiviren

Viren, die für das Reporter-gen (TH.luc-1/TH.luc-2) kodierten	1:6
Viren, die für den Designerrezeptor R α_q kodierten	1:3
Viren, die für Effektorproteine beziehungsweise shRNAs kodierten	1:3

Zusätzlich wurde den Viruslösungen Polybren (Hexadimethrin-Bromid, Konzentration 8 mg/ml) zugegeben, um die Wirksamkeit der Infektion zu steigern. Polybren fungiert als Polykation [10], welches die Adsorption des Virus an die Zelloberfläche erleichtert und somit die Infektionsrate verbessern kann.

Frisch trypsinierte SH-SY5Y-Zellen wurden in einem geringen Volumen (0,2-0,5 ml) auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit 3 ml Viruslösung beschichtet und für 8-24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Viruslösung abgenommen und frisches DMEM mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben.

5.9.3 Serumreduktion

Nachdem die infizierten Zellen 8-24 h mit DMEM mit 10 % FCS bedeckt waren, wurde eine Serumreduktion durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Inhaltsstoffe des FCS auf die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors zu minimieren. Hierfür wurde das DMEM mit 10 % FCS von den Zellen abgenommen und durch serumreduziertes DMEM mit 0,5 % FCS ersetzt und erneut für 24 h inkubiert.

5.9.4 Stimulation

Zur Aktivierung des in den SH-SY5Y-Zellen exprimierten G-Protein-gekoppelten Designerrezeptors R α_q wurden die serumreduzierten Zellen nach 24 h mit 1 μ M der Designerverbindung Clozapin-N-oxid (CNO) für 24 h in serumreduziertem Medium stimuliert.

5.10 Reportergenanalyse

5.10.1 Zellernte und Aufschluss der Zellen

Zur Analyse der Aktivität des in den infizierten Zellen exprimierten Reportergens wurden die Zellen 24 h nach der Stimulation geerntet. Dazu wurde der Zellrasen in den Zellkulturschalen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und daraufhin die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS bedeckt und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale vorsichtig gelöst. Die PBS-Zellsuspension wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand über dem Zellpellet vorsichtig abgenommen und das Pellet entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt analysiert. Vor der Analyse wurde das Zellpellet mit 1x Reporterlysepuffer versetzt und durch mehrmaliges schnelles Ziehen über ein Eppendorfgefäßständer zusätzlich mit mechanischer Unterstützung aufgeschlossen. Je nach Größe des Zellpellets wurde eine unterschiedliche Menge des Lysepuffers verwendet (70-120 µl).

5.10.2 Luziferaseassay zur Bestimmung der Reportergenaktivität

Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte mithilfe des Luziferaseassays. Der zu untersuchende Tyrosinhydroxylase-Promotor war vor dem Reporter gen lokalisiert. Das Reporter gen kodierte für das Enzym Luziferase, welches D-Luziferin mit ATP, Sauerstoff und Mg^{2+} in Oxyluziferin und Licht umwandelt. Die Stärke der Luziferaseaktivität erlaubte Rückschlüsse auf das Maß der Aktivierung des Promotors.

Für den Luziferaseassay wurden 9 ml des Luciferase Assay Reagenz mit 1 ml Luziferinlösung zusammengegeben und lichtgeschützt aufbewahrt. 50 µl dieses Gemisches wurden zu 5 µl des Lysepuffer-Protein-Extrakts in ein Loch einer weißen 96-Loch-Platte gegeben und die Luziferaseaktivität unmittelbar mit einem Luminometer gemessen.

5.10.3 Messung der Proteinkonzentration mit dem Bicinchoninsäure Assay (BCA)

Für die spätere Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität wurde mit dem Bicinchoninsäure Assay (BCA) die Proteinkonzentration des Lysepuffer-Protein-Extrakts quantifiziert. Der auf P. K. Smith basierende Bicinchoninsäure Assay macht sich die Biuret-Reaktion zunutze. Durch die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ kann dieses mit BCA einen blau-violetten Farbkomplex ausbilden, welcher bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch messbar ist. Als Standard diente je 12,5 μl einer BSA-Lösung mit den Proteinkonzentrationen von 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Für die Messung der Proteinkonzentration des Lysepuffer-Protein-Extrakts wurde von diesem 12,5 μl einer Probe in ein Loch der transparenten 96-Loch-Platte gegeben.

Zu den Standard BSA-Lösungen und den Lysepuffer-Protein-Extrakten wurden pro Loch je 100 μl einer fertigen, frisch angesetzten BCA-Lösung pipettiert, welche sich aus den Lösungen A und B im Verhältnis von 50:1 zusammensetzte. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C konnten die Konzentrationen mithilfe einer photometrischen Messung erfasst werden.

5.10.4 Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität

Um eine Vergleichbarkeit der gemessenen Luziferaseergebnisse zu gewährleisten, wurde folgende Formel zur Berechnung der relativen Luziferaseaktivität verwendet.

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{absolute Luziferaseaktivität}}{\text{Proteinkonzentration}}$$

5.10.5 Statistik

Zur Erreichung von statistischer Signifikanz der Versuchsergebnisse wurde jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt und pro Versuch jeweils vier Zellplatten mit demselben Ansatz kultiviert.

Die Analyse erfolgte über das Programm Excel Add-In WinSTAT (R. Fitch Software). Mit einem beidseitigen t-Test für unabhängige Stichproben wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten für normalverteilte Daten ermittelt und in den Abbildungen mit n.s. (nicht signifikant), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

5.11 Proteinbiochemische Methoden

5.11.1 Zellernte und Isolierung des Zytoplasma- und Kernextraktes

Die Zellernte zur Isolierung der Zytoplasma- und Kernextrakte für eine SDS-Page und den Western Blot erfolgte nach den gleichen Grundprinzipien wie die Zellernte für die Reporteranalyse.

Dafür wurden jeweils zwei 60 mm Zellkulturschalen pro Ansatz 2x mit 4 ml PBS (4 °C) gewaschen, das als Zusätze 1 mM Vanadate und 10 mM NaF für die Inhibition der Phosphatasen enthielt. Nach den Waschschrritten wurden die Zellen mit 500 µl PBS (4 °C) mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale geschabt und die PBS/Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4 °C mit 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets wurden entweder weiterverwendet oder bei -20 °C weggefroren.

Zur Isolierung des Zytoplasmaextrakts wurden die Zellen mit 60-100 µl des Puffers A lysiert. Auch dieser Schritt erfolgte auf Eis. Zur Unterstützung des Prozesses wurden die Proben in einem Rhythmus von 5 min während einer Gesamtdauer von 20 min mithilfe eines Vortex-Mixers durchmischt. Nach der Lyse wurde für 5 min bei 4 °C mit 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand als Zytoplasmaextrakt abgenommen und bei -70 °C weggefroren.

Für die Erzeugung des Kernextraktes wurde das Zellpellet mit 80-160 µl Puffer C (4 °C) versetzt, gevortext und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 13.000 rpm. Der Überstand wurde als Zellkernextrakt abgenommen und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -70 °C weggefroren.

Um gleiche Proteinmengen mit einer SDS-Page mit nachfolgendem Western Blot analysieren zu können, wurde eine Proteinbestimmung mit 2-4 µl der Extrakte mit der BCA-Methode durchgeführt.

5.11.2 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Sodiumdodecylsulfat, ein anionisches Tensid, lagert sich mit seinem hydrophoben Bereich an die Aminosäuren der Proteine an und verleiht diesen durch seine negative Sulfatgruppe eine negative Ladung. Die Stärke der negativen Ladung ist hierbei linear zum Molekulargewicht des Proteins. Somit ist die Auftrennung rein nach Molekulargewicht und nicht nach Eigenladung der Proteine möglich.

Zur Vorbereitung der Zytoplasma- und Kernextrakte wurde zu diesen 2x SDS-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 gegeben und für 3-5 min bei 95 °C erhitzt. Dieser Schritt und das β -Mercaptoethanol in dem SDS-Ladepuffer, welches die Spaltung von Disulfidbrücken bewirkt, führte zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur und somit zur Denaturierung der Proteine in den Extrakten.

Um die Extrakte im Anschluss auftrennen zu können, war ein aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehenden Polyacrylamidgel notwendig [41].

Zuerst wurde das Trenngel mit dem Biometra Minigel-Twin System erstellt und nach Zugabe von APS und TEMED eine Polymerisationszeit von 20 min abgewartet. Dann wurde das Sammelgel erstellt, dessen Polymerisationszeit nach Zugabe von APS und TEMED 45 min betrug.

Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Proteinproben in dem SDS-PAGE Probenpuffer in die Taschen in dem Sammelgel geladen (Ladung je Tasche 25 - 100 μ g). Als Standard diente 2,5-5 μ l eines vorgefärbten Molmassenmarkers. Während des Vorlaufs durch das Sammelgel (ca. 30-45 min) wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt, diese wurde jedoch auf 90 Volt erhöht, wenn die Lauffront das Trenngel erreicht hat (Gellauf, ca 3 ½ h).

5.11.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mithilfe der SDS-Page wurden diese mit der Western Blot-Technik auf eine aus Nitrozellulose bestehende Trägermembran übertragen.

Hierfür wurde das Tank-Blot-Verfahren verwendet. Auf das Polyacrylamidgel (Gel) mit den separierten Proteinbanden wurde eine Nitrozellulosemembran (Membran) gelegt und das Gel/Membran-Sandwich von beiden Seiten mit je vier 2 mm Whatman-Papier- Stücken, die zuvor in Transferpuffer eingeweicht wurden, fixiert. Das

Gel/Membran/Whatman-Sandwich wurde in eine Sandwich-Gel-Kassette eingespannt, die in den mit Transferpuffer befüllten Western-Blot Tank eingesetzt wurde (HoferT™ Mini Tank Blotting-Einheit). Dabei war die Membran in Richtung der Anode positioniert und das Polyacrylamidgel in Richtung der Kathode ausgerichtet. Durch das Anlegen einer Spannung von 300 mA für 4 h senkrecht zur Laufrichtung des Gels wurden die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das elektrische Feld von dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Zur Überprüfung der korrekten Übertragung der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran wurde die Ponceau-Färbung angewendet. Zuvor wurde die Membran zweimal für 2,5 min mit Millipore Wasser gewaschen und anschließend gefärbt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in eine Ponceau Lösung, bestehend aus 0,1 % Ponceau S und 5 % Essigsäure, eingelegt. Dadurch wurden die vorhandenen Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran reversibel und unspezifisch rot angefärbt. Rückgängig konnte diese Färbung durch einmaliges fünfminütiges Waschen der Nitrozellulosemembran mit 1x TBST gemacht werden.

5.11.4 Immundetektion der Proteine

Für einen spezifischen Nachweis der Proteine, die auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert wurden, war ein immunologischer Nachweis mittels Antikörper notwendig. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde eine Blockinglösung, bestehend aus TBST und 4 % Slim Fast (w/v), hergestellt und für 30 min bis 1 h bei Raumtemperatur auf die auf einer Labor-Wippe befindlichen Membran gegeben.

Im Anschluss wurde ein Primärantikörper, der in TBST verdünnt wurde, in eine Schale mit der Membran gegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgenommen und die Membran dreimal für je 5 min mit TBST gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Primärantikörper richtete sich gegen ein spezifisches Epitop des gesuchten Proteins.

Um die Bindung des Primärantikörpers an das Protein nachweisen zu können, wurde ein Sekundärantikörper verwendet. Dieser ist spezifisch gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und für den späteren Nachweis an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Der Sekundärantikörper wurde in einem zweiten

Inkubationsschritt mit TBST verdünnt und für drei Stunden zu der Membran gegeben. Danach wurde die Membran erneut dreimal für je 5 min mit TBST gewaschen.

Nach dem letzten TBST-Waschschritt wurde der Blot mit einem Papiertuch kurz leicht abgetupft, um überschüssiges TBST zu entfernen. Durch die Zugabe einer Substratlösung, bestehend aus den ECL-Lösungen 1 und 2, sowie die sofortige Platzierung des Blottes mit etwas Substratlösung zwischen 2 Polyethylen Folien, wurde die Bindung des Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper mit dem ChemiDoc Imaging System detektiert. Das Prinzip der Nachweisreaktion ist die Oxidation eines Chemilumineszenz Farbstoffes, der durch die Meerrettichperoxidase oxidiert wird und zur Emission von Licht führt, das mit dem Imaging-System aufgenommen wird.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper mit den jeweiligen Verdünnungsgraden und Referenzen.

	Antikörper/Verdünnung	Referenzen
Primärantikörper Anti-HA	Anti-HA/ 1:3000-1:5000 in TBST	BioLegend, San Diego #901516
Primärantikörper FLAG	Anti-FLAG M2/ 1:3000-1:5000 in TBST	Sigma-Aldrich, München #F1804
Sekundärantikörper	Peroxidase konjugierter Ziege anti-Maus IgG (H+L)/ 1:20000 in TBST	Jackson Immuno Research, Cambridgeshire #115-035-003

6 Ergebnisse

6.1 Die Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ aktiviert die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors $R\alpha_q$ auf die Transkription eines Reportergens hat, das unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors steht. Hierfür wurde ein Luziferase-Reportergen, das durch Sequenzen des Tyrosinhydroxylase-Promotors kontrolliert wurde, mittels lentiviralen Gentransfers in das Chromatin von SH-SY5Y-Zellen eingebettet. Mit diesem Ansatz konnten die Reportergene in die nukleosomale Organisation der DNA integriert werden, was im Gegensatz zu transient transfizierten Plasmiden, die einer prokaryotischen Genorganisation mit einem nicht restriktiven transkriptionellen Grundzustand ähneln, eher den genetischen Bedingungen innerhalb der Zelle entspricht. Darüber hinaus wurden SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zusätzlich mit Lentiviren infiziert, die für den $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor $R\alpha_q$ kodierten.

Eine schematische Darstellung der Proviren TH.luc-1 und TH.luc-2 ist in Abbildung 13A zu sehen, einschließlich der markanten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB und AP-1 am Tyrosinhydroxylase-Promotor. Nach der Infektion wurden die Zellen 24 h lang in serumreduziertem Medium inkubiert. Die Stimulation erfolgte im Anschluss mit 1 μ M CNO in serumreduziertem Medium für 24 h. Abbildung 13B zeigt, dass die Stimulation des Designerrezeptors zu einer Hochregulierung der vom Tyrosinhydroxylase-Promotor gesteuerten Reportergen-Transkription in der Größenordnung des Vierfachen (TH.luc-1) bzw. des 2,3-Fachen (TH.luc-2) führte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors durch $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren reguliert wird.

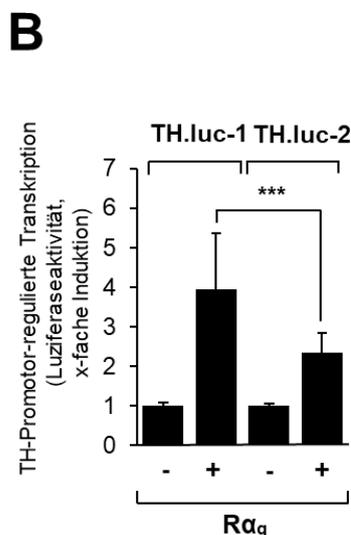
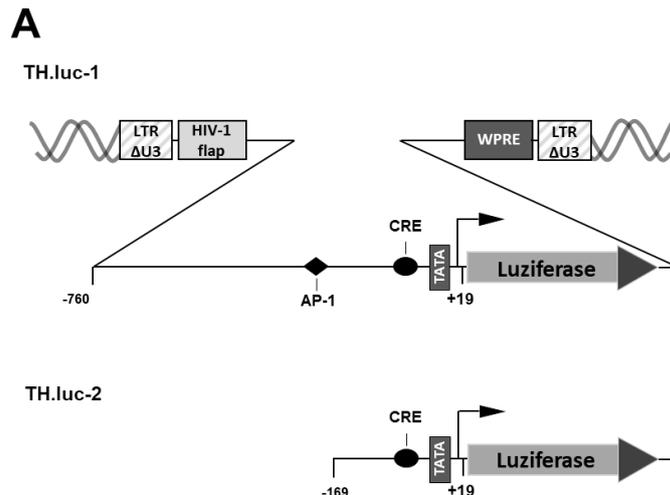


Abbildung 13: Die Stimulation eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors aktiviert die Transkription von in Chromatin eingebetteten Tyrosinhydroxylase-Promotor-gesteuerten Reportergenen.

(A) Proviren, die für das Luziferase-Reportergen unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors kodieren. Während TH.luc-1 über die Bindungsstellen AP-1 und CRE verfügt, ist die AP-1 Bindungsstelle im TH.luc-2 Reportergen deletiert.

(B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für den Designerrezeptor $R\alpha_q$ und die Reportergene TH.luc-1 oder TH.luc-2 kodierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h in serumreduziertem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit CNO (1 μ M) stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach Präparation eines Zellextrakts wurden die Luziferaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde jeweils auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)

6.2 RGS2 hemmt die Transkription des durch den Tyrosinhydroxylase-Promotor kontrollierten Reportergens in $R\alpha_q$ -exprimierenden Neuroblastomzellen

Die Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zur Dissoziation der trimeren G-Proteine und zum Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit. Die α -Untereinheit verfügt über eine intrinsische GTPase-Aktivität, die die Bildung von GDP aus GTP katalysiert und folglich zu einer Inaktivierung des Signals des G-Proteins führt. RGS-Proteine (*regulators of G-protein signaling*) erhöhen diese intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit und verringern damit die Konzentration der aktivierten GTP-gebundenen α -Untereinheiten [32]. In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation muskarinerges $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren die Expression von RGS2 in SH-SY5Y-Zellen erhöht [85]. Da es sich bei RGS2 um ein $G\alpha_q$ -spezifisches Protein handelt, könnte die Hochregulation von RGS2 infolge der $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptorstimulation als molekularer Schalter zur Beschleunigung des Signalabschlusses fungieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression von RGS2 die Signalkaskade, die die Aktivierung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors mit der Transkription des Tyrosinhydroxylasegens verbindet, stört. Der modulare Aufbau von RGS2 ist in Abbildung 14A dargestellt.

In einem ersten Schritt wurde beobachtet, ob RGS2 in SH-SY5Y-Zellen exprimiert wurde, die mit einem für RGS2-kodierenden Lentivirus infiziert wurden. Als Kontrolle dienten SH-SY5Y-Zellen, die mit einem für β -Galaktosidase kodierendem Virus infiziert wurden. Nach der Infektion wurde die virale Lösung von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt und im Anschluss für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Ernte und der Präparation des Zytoplasmaextrakts wurde die Probe mittels SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot sichtbar gemacht. Abbildung 14B zeigt die Expression von RGS2 in den Zellen, die mit einem RGS2-kodierenden Lentivirus infiziert wurden.

Um die Auswirkung der Expression von RGS2 auf die $G\alpha_q$ -vermittelte Signalkaskade zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen mit drei unterschiedlichen Lentiviren infiziert. Diese Lentiviren kodierten für das Reportergen TH.luc-1, den Designerrezeptor $R\alpha_q$ und RGS2. Als Kontrolle wurden die Zellen statt mit RGS2-kodierenden Viren mit Viren infiziert, die für β -Galaktosidase kodierten. Die Expression von RGS2 beeinträchtigte die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors in SH-SY5Y-Zellen signifikant. Die Transkription des Reportergens war in Gegenwart von RGS2 um 66 % reduziert (Abbildung 14C).

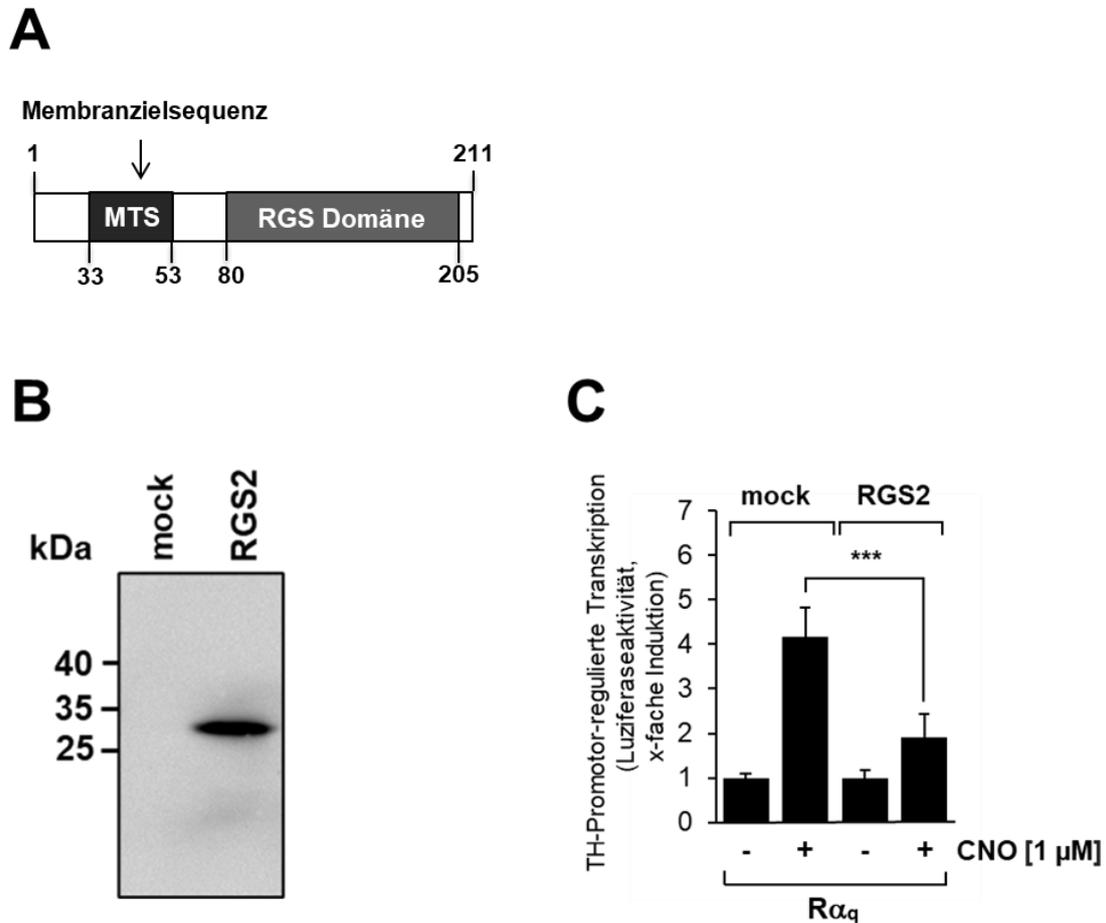


Abbildung 14: Die Expression von RGS2 dämpfte die Hochregulierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors nach Stimulation eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors.

(A) Modulare Struktur von RGS2, einem kleinen hydrophilen und basischen Protein. RGS2 besitzt eine RGS-Domäne, die auch Bestandteil anderer RGS-Proteine ist und die GTPase-Aktivität vermittelt, und eine Membranzielssequenz (*Membrane Targeting Sequence*, MTS).

(B) Western-Blot-Analyse von Zellen, die mit dem RGS2-kodierenden Lentivirus infiziert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit Viren infiziert, die für β -Galaktosidase kodierten. Nach der Infektion wurde die Viruslösung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach dreitägiger Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, der Zytoplasmaextrakt präpariert und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt. RGS2 wurde mittels eines Antikörpers gegen das HA-Tag im Western Blot nachgewiesen. Das Molekulargewicht ist im linken Bereich der Abbildung in kDa angegeben.

(C) SH-SY5Y-Zellen, die das TH.luc-1-Reportergen enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für den Designerrezeptor $R\alpha_q$ kodierte. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit einem für RGS2-kodierenden Lentivirus oder mit einem für β -Galaktosidase-kodierenden Lentivirus (mock) infiziert. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)).

6.3 Die dominant-negative Mutante der Phospholipase C β 3 stört die R α_q -induzierte Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors

Die dissoziierte G α -GTP-Untereinheit führt zur Aktivierung der Phospholipase C β 3, die die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat katalysiert. Die Expression der C-terminalen Domäne der Phospholipase C β 3, die als wichtige Bindungsstelle an die Zellmembran dient, schwächt die G α_q -gekoppelten Rezeptorsignale ab. Im Folgenden sollte daher geprüft werden, ob die Expression der Phospholipase C β 3-Mutante einen Einfluss auf die Tyrosinhydroxylase-Promotor-regulierte Transkription nach Stimulation von G α_q -gekoppelten Designerrezeptoren hat. Der modulare Aufbau der Phospholipase C β 3 und der Mutante PLC β 3ct ist in Abbildung 15A dargestellt.

Um die Expression der Phospholipase C β 3-Mutante in SH-SY5Y-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit der PLC β 3ct-Mutante infiziert. Als Kontrolle dienten SH-SY5Y-Zellen, die mit einem Virus infiziert wurden, das für β -Galaktosidase kodierte. Nach der Infektion wurden die Zellen drei Tage kultiviert und anschließend geerntet. Nach Präparation des Zytoplasmaextrakts wurde die Probe mittels SDS-Page aufgetrennt und durch Anti-Flag-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Abbildung 15B zeigt die Expression der Phospholipase-C β 3-Mutante in den infizierten Zellen.

Anschließend wurden R α_q -exprimierende SH-SY5Y-Zellen, die ein Chromatin-eingebettetes Tyrosinhydroxylase-Promoter-kontrolliertes Reportergen (TH.luc-1) enthielten, analysiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem Lentivirus infiziert, das für PLC β 3ct oder β -Galaktosidase (mock) kodierte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transkription des Reportergens TH.luc-1 in Gegenwart von PLC β 3ct um 75 % reduziert war (Abbildung 15C). Daher ist die Phospholipase C β 3 erforderlich, um die Stimulation von R α_q mit der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription zu verbinden.

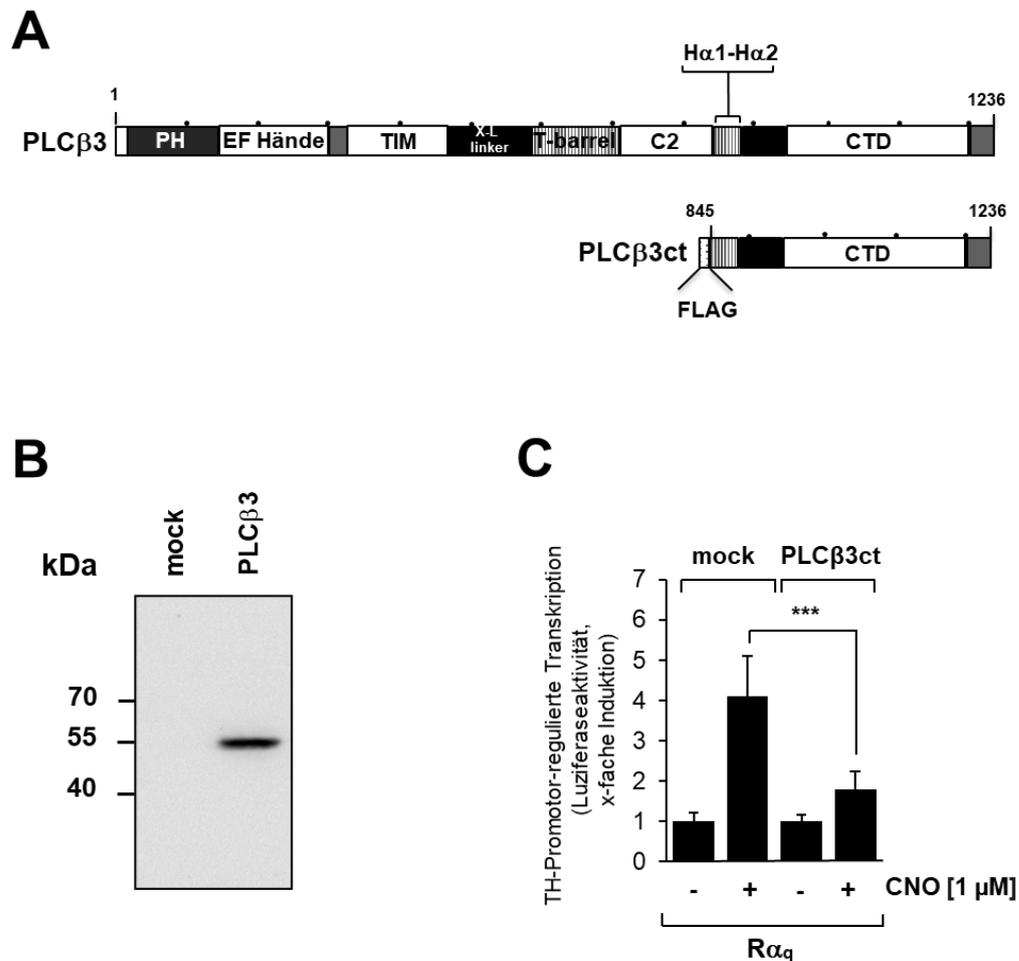


Abbildung 15: Die Phospholipase C β 3 ist für die Hochregulierung der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription nach Stimulation eines G α_q -gekoppelten Designerrezeptors erforderlich.

(A) Modulare Struktur der Phospholipase C β 3 und der verkürzten Mutante PLC β 3ct. Dargestellt ist die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), vier Tandem-EF-Hand-Wiederholungen, die katalytische Triosephosphat-Isomerase (TIM)-Barrel-Domäne, die C2-Domäne, das Helix-Turn-Helix-Motiv (H1-H2) und die C-terminale Domäne (CTD)

(B) Western-Blot-Analyse von Zellen, die mit PLC β 3ct-kodierenden Lentiviren infiziert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit Viren infiziert, die für β -Galaktosidase kodierten. Nach der Infektion wurde die Viruslösung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach dreitägiger Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, der Zytoplasmaextrakt präpariert und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt. PLC β 3ct wurde mittels eines Anti-Flag-Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Das Molekulargewicht ist im linken Bereich der Abbildung in kDa angegeben.

(C) SH-SY5Y-Zellen, die das TH.luc-1-Reportergen enthalten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, das für den Designerrezeptor R α_q kodierte. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das entweder für PLC β 3ct oder β -Galaktosidase (mock) kodierte. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte +/- der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von R α_q mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: p<0,001 (***).

6.4 Calcineurin kontrolliert die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors nach Stimulation von $R\alpha_q$

Die Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ katalysiert die Spaltung von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat. Das neu synthetisierte IP_3 bindet an intrazellulär lokalisierte IP_3 -Rezeptoren und löst einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol aus. Ca^{2+} -Ionen agieren als *second messenger* und aktivieren verschiedene Ca^{2+} -reaktive Proteinkinasen und Calcineurin, eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase. Calcineurin kann die Gentranskription aktivieren oder blockieren, je nachdem welche Transkriptionsfaktoren analysiert werden [43].

Um die funktionelle Rolle von Calcineurin bei der Regulation der $R\alpha_q$ -induzierten Transkription des Tyrosinhydroxylasegens mittels eines *Gain-of-Function*-Ansatzes zu untersuchen, wurde in SH-SY5Y-Zellen eine verkürzte Mutante von Calcineurin A (ΔCnA) exprimiert. Die Mutante ΔCnA enthält im Gegensatz zu CnA lediglich eine verkürzte Bindungsstelle für Calmodulin (CaM) und keine C-terminale Autoinhibitor-Domäne (AI) (Abbildung 16A). Dadurch ist ΔCnA konstitutiv aktiv und benötigt keine Ca^{2+} -Ionen für die Aktivierung.

Neben einem ΔCnA -kodierenden Lentivirus wurden die SH-SY5Y Zellen außerdem mit einem $R\alpha_q$ - und TH.luc-1-kodierenden Lentivirus infiziert. Abbildung 16B zeigt, dass die Transkription des TH.luc-1-Reportergens in Gegenwart von ΔCnA signifikant reduziert war. Die Transkription war im Vergleich zur Kontrolle (mock) um 71 % vermindert, was darauf hindeutet, dass Calcineurin als negative Rückkopplungsschleife für die Signalkaskade fungiert, die den $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor mit der Transkription des Tyrosinhydroxylasegens verbindet.

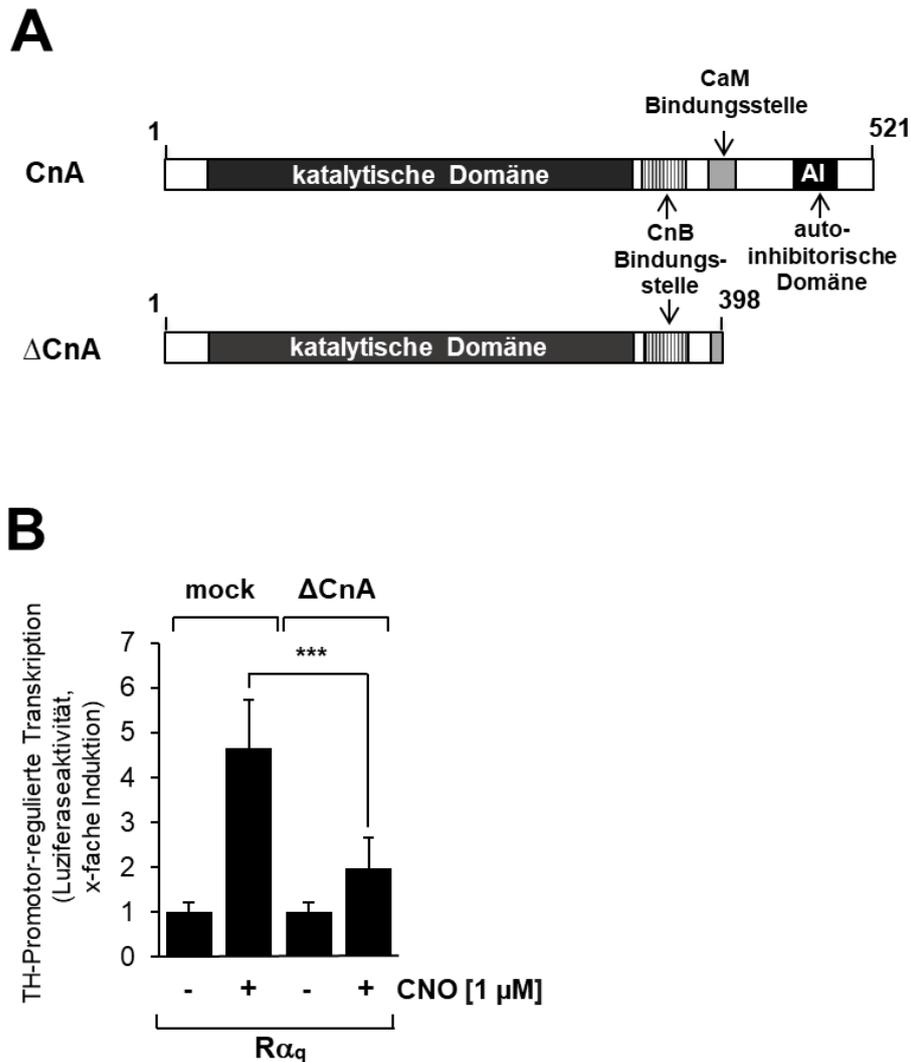


Abbildung 16: Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A unterbricht die Signalkaskade, die die Stimulation des G_{α_q} -gekoppelten Designerrezeptors mit der Transkription des Tyrosinhydroxylase-Gens verbindet.

(A) Schematische Darstellung von Calcineurin A (CnA) und der verkürzten Mutante Δ CnA. CnA weist Bindungsstellen für die Ca^{2+} -bindenden Proteine Calcineurin B (CnB) und Calmodulin (CaM) auf. Die autoinhibitorische Domäne (AI) befindet sich C-terminal. Δ CnA enthält keine autoinhibitorische Domäne (AI) und auch Teile der CaM Bindungsstelle sind deletiert. Dadurch ist die Δ CnA-Mutante konstitutiv aktiv.

(B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reportergen TH.luc-1 und den Designerrezeptor R_{α_q} kodierten. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das entweder für Δ CnA oder β -Galaktosidase (mock) kodierte. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von R_{α_q} mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***).

6.5 ERK1/2 wird benötigt, um die Stimulation von $R\alpha_q$ mit der Transkription eines Reportergens unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors zu verknüpfen

In Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptoren die extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase MAP (ERK1/2), die c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) und die p38 Proteinkinase aktiviert [97]. Da ERK1/2 bereits als Regulator der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription identifiziert wurde, wurde im Folgenden überprüft, ob auch die $G\alpha_q$ -gesteuerte Tyrosinhydroxylase-Gentranskription ERK1/2 als Signaltransduktor benötigt [48]. Um die Rolle von ERK1/2 zu beleuchten, wurde die ERK1/2-Expression mittels RNA-Interferenz reduziert. Zu diesem Zweck wurden ERK1- und ERK2-spezifische *small hairpin* (sh)RNA in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mittels lentiviralen Gentransfers eingebracht. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass die Hochregulation der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription in stimulierten $R\alpha_q$ -exprimierenden SH-SY5Y-Zellen durch die verringerte Konzentration an ERK1- und ERK2-Isoformen signifikant beeinträchtigt war. Die Transkription des Tyrosinhydroxylase-Reportergens TH.luc-1 war im Vergleich zur Kontrolle (mock) um 76 % reduziert, was darauf hinweist, dass die Aktivierung von ERK1/2 den $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor mit der Transkription des Tyrosinhydroxylasegens verbindet.

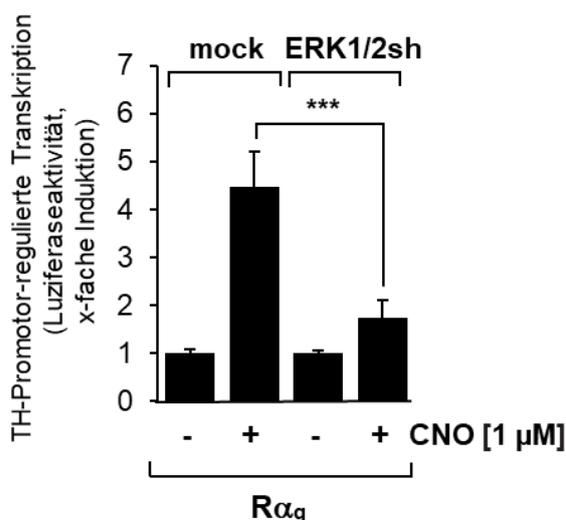


Abbildung 17: ERK1/2 fungiert als Signalübermittler von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptoren.

Die Inhibition der ERK1/2-Expression schwächt die Tyrosinhydroxylase-Gentranskription nach Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptoren ab. SH-SY5Y-Zellen wurden mit Lentiviren kodierend für den Designerrezeptor $R\alpha_q$ und für das TH.luc-1-Reportergen infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die für eine ERK1- und eine ERK2-spezifische shRNA kodierten. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das mit dem lentiviralen Transfervektor pLL3.7 erzeugt wurde (mock). Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T- Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)

6.6 MKP-1 hemmt die Tyrosinhydroxylase-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation

Phosphoryliertes und aktiviertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern, um das Transkriptionsprogramm durch Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen zu verändern. Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg Bestandteil der $R\alpha_q$ -gesteuerten Gentranskription unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors ist. Dieser Signalweg gehört zur Gruppe der *mitogen activated protein kinase*-Signalwege. Diese Signalwege bestehen aus drei hintereinander geschalteten Proteinkinasen, der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP- KKK), der MAP-Kinase-Kinase (MAP-KK) und der MAP-Kinase (MAP-K), die sich durch gegenseitige Phosphorylierung aktivieren [55].

In diesem Experiment wurde die *mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase* (MKP-1) exprimiert (Abbildung 18A). MKP-1 ist eine Phosphatase, die Teil der negativen Rückkopplungsschleife der MAP-Kinase-Signalwege ist und die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 im Zellkern dephosphoryliert und diese somit inaktiviert [33,83]. Wie in Abbildung 18B gezeigt, führte die Expression von MKP-1 zu einer signifikanten Reduktion der TH-Promotoraktivität von 56,6% im Vergleich zur Kontrolle (mock) in CNO-stimulierten, $R\alpha_q$ -exprimierenden SH-SY5Y-Zellen. Dieses Ergebnis untermauert das Ergebnis des vorangegangenen Experiments, dass ERK1/2 als Signaltransduktor fungiert, der die Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designrezeptors mit der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription verbindet.

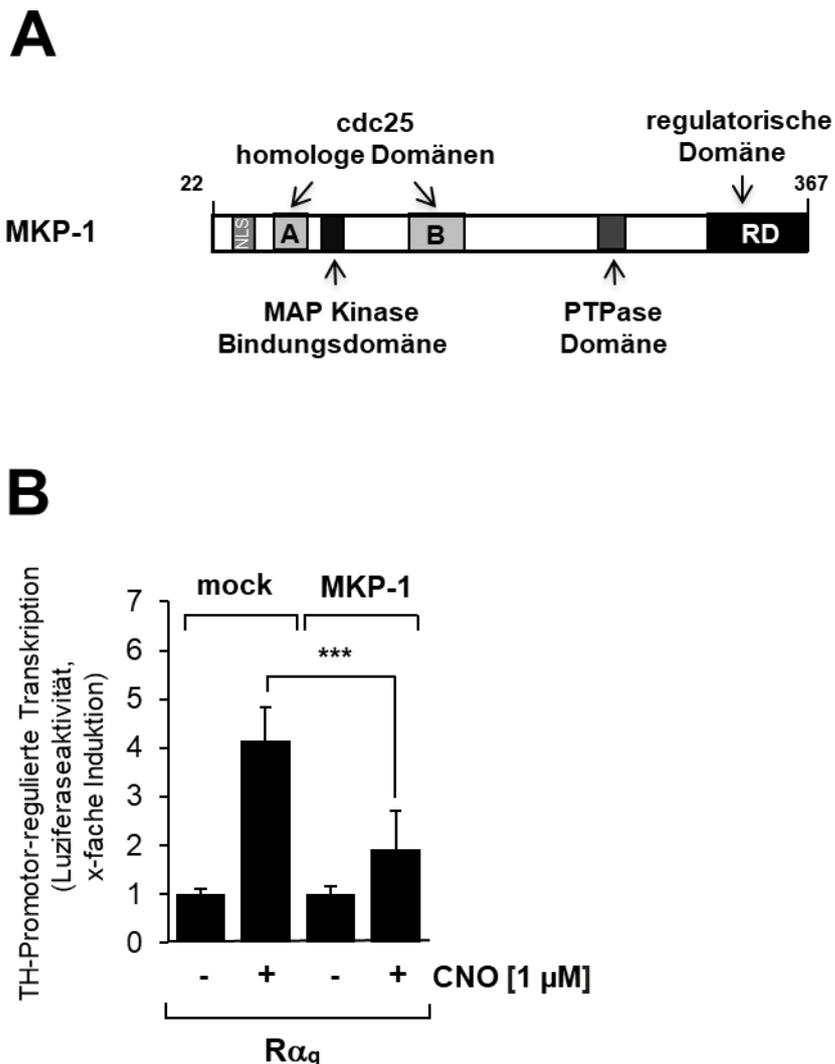


Abbildung 18: Die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors wird durch die Expression von MKP-1 reduziert.

(A) Modulare Struktur von MKP-1. Das Enzym enthält eine N-terminale *non-consensus nuclear localization sequence* (NLS), ein N-terminales Cluster basischer Aminosäuren, das als ERK1/2-Bindungsstelle fungiert, zwei Domänen mit Sequenzähnlichkeiten zur Phosphatase *cdc25* (*cell division cycle 25*), eine C-terminale katalytische Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne.

(B) Die Expression von MKP-1 beeinträchtigte die $R\alpha_q$ -induzierte Hochregulierung der Tyrosinhydroxylase-Promotoraktivität in SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, das entweder für MKP-1 oder β -Galaktosidase (mock) kodierte. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die zum einen für das Reportergen TH.luc-1 und zum anderen für den Designerrezeptor $R\alpha_q$ kodierten. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)

6.7 Der Transkriptionsfaktor CREB verstärkt die Tyrosinhydroxylase-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation

Der Tyrosinhydroxylase-Promoter enthält ein *cAMP response element* (CRE), das als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB fungiert [44,89,95]. CREB ist Integrator zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass CREB in HEK293-Zellen nach Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptoren aktiviert wird [91]. Phosphoryliertes nukleäres ERK1/2 aktiviert die Mitogen und Stress-induzierte Proteinkinase (MSK-1), welche CREB durch Phosphorylierung am Serinrest 133 aktivieren kann [15]. Hier wurde eine dominant-negative CREB-Mutante (REST/CREB, Abbildung 19A) in SH-SY5Y-Zellen exprimiert, um die Beteiligung von CREB an der Regulation der $R\alpha_q$ -induzierten Tyrosinhydroxylase-Gentranskription zu beurteilen. Die Expression von REST/CREB in SH-SY5Y-Zellen ist in Abbildung 19B dargestellt.

Darauffolgend wurden SH-SY5Y-Zellen, die $R\alpha_q$ exprimierten und ein in Chromatin eingebettetes TH.luc-1-Reporter gen enthielten, mit Lentiviren kodierend für REST/CREB oder β -Galaktosidase (mock) infiziert. Abbildung 19C zeigt, dass die $R\alpha_q$ -vermittelte Tyrosinhydroxylase-Gentranskription in Zellen, die die REST/CREB-Mutante exprimierten, signifikant beeinträchtigt war. In CNO-stimulierten $R\alpha_q$ -exprimierenden SH-SY5Y-Zellen, die REST/CREB exprimierten, war die Transkription des Reporter gens um mehr als 75 % reduziert. Daher ist CREB unerlässlich, um die $R\alpha_q$ -induzierte Signalkaskade mit der Transkription des Tyrosinhydroxylase-Gens zu verbinden.

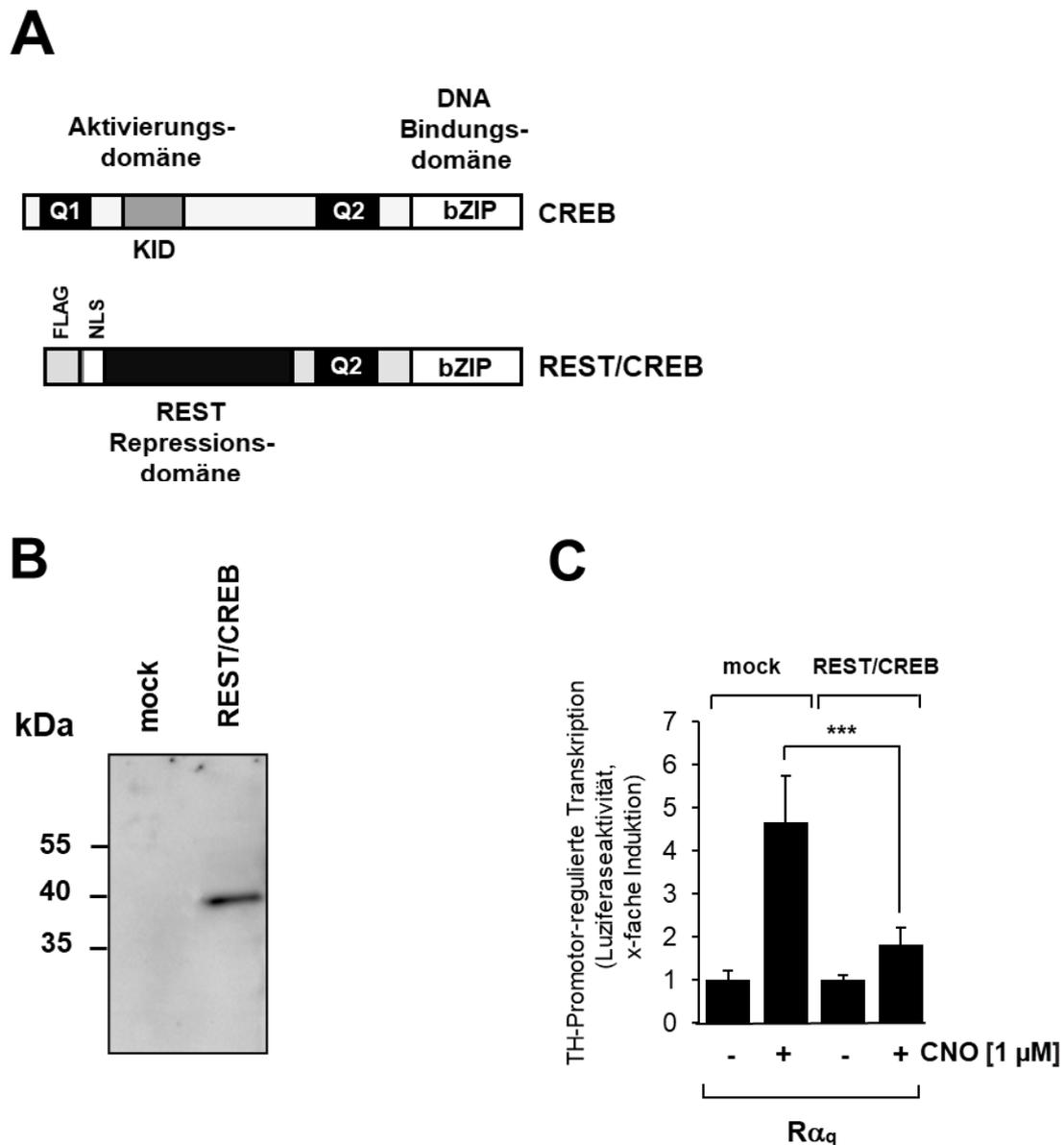


Abbildung 19: Die Stimulation der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription nach $R\alpha_q$ -Aktivierung erfordert CREB.

(A) Modulare Struktur von CREB und REST/CREB. Abgebildet ist die phosphorylierungsabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne von CREB (*kinase-inducible domain* (KID)). Am C-Terminus befindet sich die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne bZIP. Der Mutante REST/CREB fehlt die KID-Domäne, statt der eine Transkriptionsrepressionsdomäne exprimiert wurde, die von dem Transkriptionsrepressor REST abgeleitet ist. Am C-terminalen Ende verfügt REST/CREB ebenfalls über bZIP. Somit ist die Mutante REST/CREB ein Fusionsprotein aus bZIP und der Transkriptionsrepressionsdomäne REST.

(B) Expression von REST/CREB in SH-SY5Y-Zellen nach lentiviraler Infektion mit einem REST/CREB-kodierenden Lentivirus, visualisiert durch einen Western-Blot. Als Kontrolle wurden die SH-SY5Y-Zellen mit Viren infiziert, die für β -Galaktosidase kodierten. Die Viruslösung wurde nach 24 h von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach dreitägiger Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, der Kernextrakt präpariert und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt. REST/CREB wurde mittels Anti-Flag- Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Das Molekulargewicht ist im linken Bereich der Abbildung in kDA angegeben.

(C) Die Expression von REST/CREB dämpft die Tyrosinhydroxylase-Gentranskription in $R\alpha_q$ -exprimierenden SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit CNO. Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder für β -Galaktosidase (mock) oder für REST/CREB kodierten. Außerdem wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die das TH.luc-1-Reportergen enthielten oder für $R\alpha_q$ kodierten. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die Luziferaseaktivität wurde jeweils auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte +/- der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T-Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)).

6.8 Die Expression des adenoviralen Proteins E1A schwächt die $R\alpha_q$ -vermittelte Tyrosinhydroxylase-Gentranskription ab

Die CREB-induzierte Transkription wird über die Histonacetyltransferasen CBP (CREB-bindendes Protein) und p300 reguliert [40,52]. CBP/p300 enthält eine katalytische Histon-Acetyltransferase (HAT)-Domäne, die das Chromatin in eine offene Form umwandelt, die die Transkription von Genen ermöglicht [98]. Das adenovirale Protein E1A bindet an CBP/p300, was zur Hemmung der CREB-regulierte Transkription führt [11]. In diesem Experiment wurde untersucht, ob E1A die Tyrosinhydroxylase- Gentranskription in $R\alpha_q$ -exprimierenden SH-SY5Y-Zellen beeinflusst. Der modulare Aufbau und die Expression von E1A in katecholaminergen SH-SY5Y-Zellen sind in den Abbildungen 20A und 20B dargestellt. Abbildung 20C zeigt, dass E1A die $R\alpha_q$ -induzierte Transkription des TH.luc-1-Reportergens um 60,5 % reduzierte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Regulation der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription nach Aktivierung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor epigenetisch kontrolliert wird.

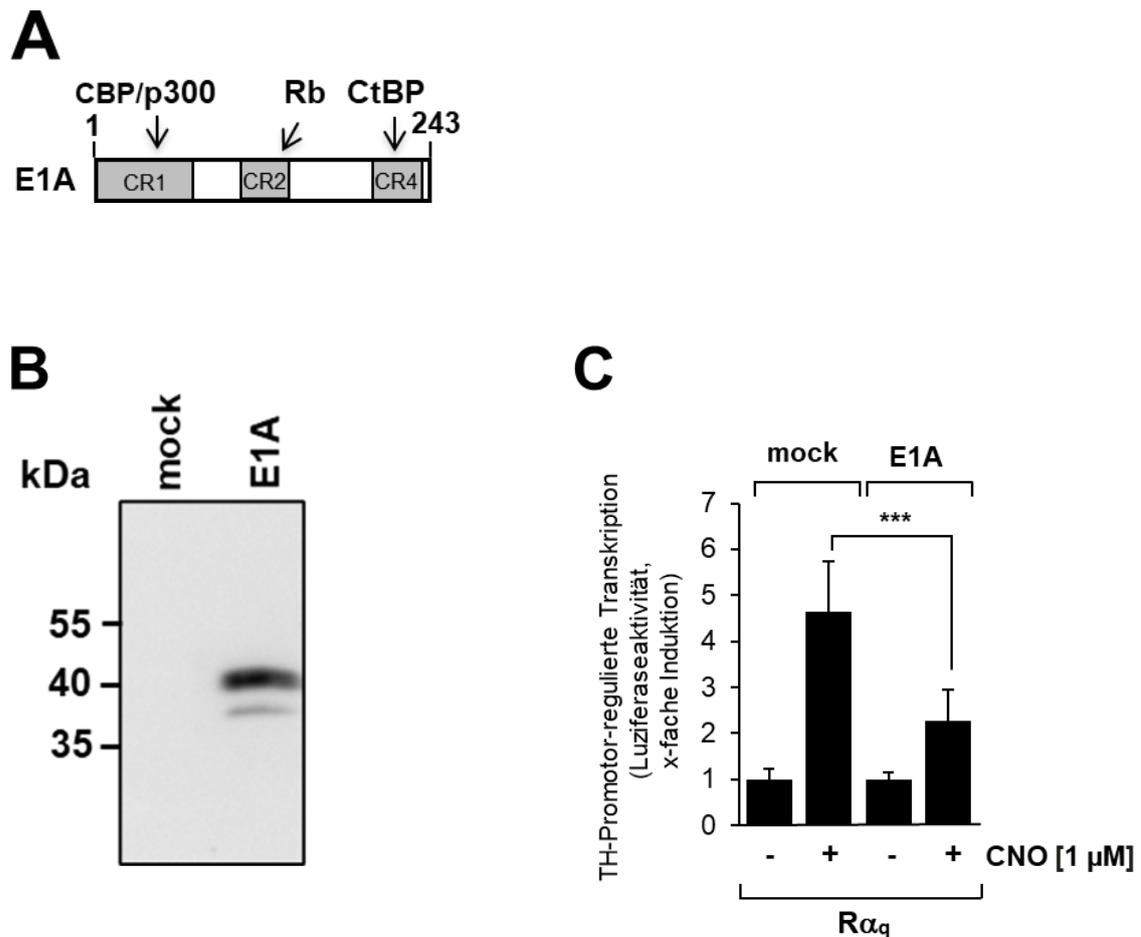


Abbildung 20: Die Expression des adenviralen Proteins E1A schwächt die Transkription des Tyrosinhydroxylase-Promoter-gesteuerten Reportergens nach Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptoren

(A) Modulare Struktur von E1A 12S. Dargestellt sind die konservierten Regionen (*conserved regions*) CR1, CR2 und CR4. CBP, p300 und andere Chromatin-modifizierenden Proteine interagieren mit der N-terminalen Domäne von E1A, einschließlich CR1. E1A bindet an das Retinoblastom-Protein RB und erzwingt den Eintritt in die S-Phase, wobei CR2, aber auch Sequenzen innerhalb von CR1 daran beteiligt sind. Die C-terminale konservierte Region 4 (CR4) bindet das transkriptionelle Korepressorprotein CtBP und enthält zusätzlich das Kernlokalisierungssignal.

(B) Western-Blot-Analyse von Zellen, die mit E1A-kodierenden Lentiviren infiziert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit Viren infiziert, die für β -Galaktosidase kodierten. Nach der Infektion wurde die Viruslösung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach dreitägiger Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, der Zytoplasmaextrakt präpariert und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt. E1A wurde mittels eines Anti-Flag-Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Das Molekulargewicht ist im linken Bereich der Abbildung in kDa angegeben.

(C) SH-SY5Y-Zellen, die ein chromatinintegriertes TH.luc-1-Reportergen enthalten, wurden mit einem $R\alpha_q$ -kodierenden Lentivirus infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, das entweder für E1A oder β -Galaktosidase (mock) kodierte. Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und analysiert, wie in der Legende zu Abbildung 13 beschrieben wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung der errechneten Induktion der TH.luc-1 Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden. Mittels des Students T- Test wurden die erhaltenen Werte auf ihre Signifikanz überprüft: $p < 0,001$ (***)

7 Diskussion

Die Expression der Tyrosinhydroxylase wird durch vielzählige Liganden für Tyrosinkinase-Rezeptoren und Steroidhormonrezeptoren reguliert. Weniger Betrachtung hat bislang die Effekte einer Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf die Expression der Tyrosinhydroxylase gefunden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Gruppe integraler Membranproteine dar und sind somit wichtige Vermittler der Signalübertragung. Bekannt ist bereits, dass die Aktivierung $G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptoren eine Depolarisation der Neuronen und einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auslöst, was die neuronale Aktivität stimuliert [1]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren eine tiefgreifende Wirkung auf die Transkriptionsregulation hat [72,73,91], was darauf hindeutet, dass die Transkriptionsregulation ein integraler Bestandteil der $G\alpha_q$ -vermittelten Signaltransduktion ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren in der Regulation der Expression der Tyrosinhydroxylase zu untersuchen.

Als zelluläres Modellsystem wurden katecholaminerge SH-SY5Y-Neuroblastomzellen verwendet, in deren Chromatin Luziferasereportergene unter Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors eingebettet wurden. SH-SY5Y-Neuroblastomzellen weisen mehrere identischen Charakteristika mit fetalen sympathischen Neuronen auf und exprimieren die Tyrosinhydroxylase und andere neuronale Markerproteine [16,38,57]. Um möglichst physiologische Bedingungen in der Zelle nachzuahmen, wurde die Methodik der lentiviralen Infektion gewählt, die es ermöglicht, Reportergene in die natürliche Chromatinstruktur zu integrieren [59]. Neben den Reportergenen TH.luc-1 und TH.luc-2 wurde ein $G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptor in den Zellen exprimiert. Damit wurde sichergestellt, dass der G-Protein-gekoppelte Rezeptor ausschließlich an das $G\alpha_q$ -Protein gekoppelt ist und allein der $G\alpha_q$ -Signaltransduktionsweg betrachtet werden konnte.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Tyrosinhydroxylase-Promotor empfindlich auf die Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors reagiert. Daher wurde in weiteren Schritten untersucht, welche Signalmoleküle den Designerrezeptor mit der Aktivierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors verbindet.

Zunächst wurde die Rolle der RGS-Proteine (*regulators of G-protein signaling*) genauer betrachtet. RGS-Proteine sind GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die mit den $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine interagieren und die GTP-Hydrolyse beschleunigen. Dadurch wird die Lebensdauer verschiedener aktiver GTP-gebundener $G\alpha$ -Untereinheiten reguliert. RGS-Proteine verfügen über eine RGS-Domäne, bestehend aus etwa 120 Aminosäuren, die zur Bindung an $G\alpha$ -Untereinheiten erforderlich ist. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten muskarinergen Rezeptoren zu einer Hochregulierung der RGS2-Expression in SH- SY5Y-Zellen führt, wohingegen die Stimulation der Zellen mit epidermalen Wachstumsfaktoren oder Forskolin keine Auswirkung auf die zelluläre RGS2-mRNA-Konzentration hatte [85]. Die Stimulation von Nebennierenrindenzellen der Zona glomerulosa mit Angiotensin II, das den $G\alpha_q$ -gekoppelten Angiotensin-II-Rezeptor in diesen Zellen aktiviert, führte ebenfalls zu einem Anstieg der RGS2-mRNA-Konzentration [71]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die spezifische Aktivierung von $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren die Expression des $G\alpha_q$ -spezifischen RGS-Proteins auslöst, was zu einer Verringerung der Konzentration an GTP-gebundenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten führt. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Ansicht, indem sie zeigen, dass die Überexpression von RGS2 die durch den Tyrosinhydroxylase-Promotor regulierte Gentranskription nach Stimulation eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors deutlich reduzierte.

Die aktivierte, GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit stimuliert die Phospholipase $C\beta_3$, was zur Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat führt. In dieser Arbeit wurde das Enzym gehemmt, indem die C-terminale Domäne der Phospholipase $C\beta_3$, die die Membrananheftungsstelle umfasst, exprimiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der Phospholipase $C\beta_3$ die Signalkaskade, die den $G\alpha_q$ -Proteingekoppelten Designerrezeptor mit der Transkription des vom Tyrosinhydroxylase-Promotor gesteuerten Reportergens verbindet, signifikant beeinträchtigte. Somit wurde die Phospholipase $C\beta_3$ als Signaltransduktor identifiziert.

Der proximale Tyrosinhydroxylase-Promotor enthält ein regulatorisches, kanonisches *cAMP response element* (CRE), welches die Sequenz 5'-TGACGTCA-3' umfasst und eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB darstellt. Bei der Aktivierung von CREB ist vor allem die Phosphorylierung am Serinrest 133 von entscheidender Bedeutung. Diese Phosphorylierung kann sowohl von der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA), aber auch von der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (PKC) oder

der Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase (MSK) katalysiert werden. Phosphoryliertes, aktiviertes CREB rekrutiert Koaktivatoren und bildet mit einem weiteren phosphoryliertem CREB ein phospho-CREB-Dimer, das in der Lage ist, an das CRE zu binden und die Transkription zu initiieren [7,30,99]. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von CREB oder die Expression der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase stimuliert die Aktivität des Tyrosinhydroxylase-Promotors unter Beteiligung von CREB [89]. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Stimulation der Tyrosinhydroxylase-Expression in PC12-Zellen durch Nikotin CREB erfordert [24]. Im Gegensatz dazu war CREB nicht an der Phorbol- induzierten Hochregulierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors beteiligt [86]. Die hier durchgeführten Experimente mit einer dominant-negativen Mutante von CREB zeigen, dass CREB an der Regulation des Tyrosinhydroxylase-Promotors nach Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors beteiligt ist.

Eine frühere Studie zeigte, dass die Stimulation von $G\alpha_q$ -gekoppelten Designrezeptoren die MAP-Kinasen extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase MAP (ERK1/2), die c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) und die p38 Proteinkinase aktiviert [97]. Diese Arbeit legte den Fokus auf die Rolle von ERK1/2, da andere Studien bereits beschrieben, dass diese Kinase die Tyrosinhydroxylase-Gentranskription reguliert [48]. Mittels spezifischer RNA-Interferenz gegen ERK1 und ERK2 wurde untersucht, ob die Proteinkinase ERK1/2 bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt. Hierfür wurden ERK1 und ERK2 spezifische *small hairpin* (sh)RNA in SH-SY5Y Neuroblastomzellen exprimiert, die die ERK1/2-Expression reduzierten. Die verringerte Konzentration von ERK1 und ERK2 führte zu einer deutlich verminderten Aktivität des Tyrosinhydroxylase- Promotors. Dies lässt den Rückschluss zu, dass ERK1/2 als Signaltransduktor fungiert, der die Stimulation des $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptors mit der Gentranskription der Tyrosinhydroxylase verbindet.

In einem weiteren Schritt wurde die MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen exprimiert. Diese Phosphatase ist Teil der negativen Rückkopplungsschleife des MAP-Kinase Signalwegs und dephosphoryliert und inaktiviert die Kinasen ERK, JNK und p38 [31,83]. Da die Expression von MKP-1 in SH- SY5Y-Zellen die TH.luc-1 Aktivität deutlich reduzierte, lässt das die Folgerung zu, dass kernexprimierte phosphorylierte MAP-Kinasen für die Induktion der Tyrosinhydroxylase- Gentranskription notwendig sind. Der Transkriptionsfaktor CREB ist ein Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase

IV, aber nicht der ERK1/2, da ERK1/2 CREB am Serinrest 133 nicht direkt phosphorylieren kann. Jedoch phosphoryliert ERK1/2 die Mitogen- und Stress-induzierte Proteinkinase (MSK), die wiederum CREB phosphoryliert und aktiviert [81]. Die Expression von MKP-1 dämpfte die vom Tyrosinhydroxylase-Promotor gesteuerte Gentranskription höchstwahrscheinlich durch Verhinderung der Phosphorylierung von MSK durch ERK1/2.

Phosphoryliertes CREB wird durch Dephosphorylierung inaktiviert, die von den Proteinphosphatasen 1 und 2A katalysiert wird. Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin steuert indirekt die CREB-regulierte Transkription [6,43,93]. Es wurde vorgeschlagen, dass Calcineurin den Proteinphosphatase-Inhibitor-1 dephosphoryliert und inaktiviert. Dieses kleine saure Protein bindet in seiner phosphorylierten Form als Pseudosubstrat an die Proteinphosphatase-1 und inhibiert diese. Wenn der Proteinphosphatase-Inhibitor-1 jedoch durch Calcineurin dephosphoryliert wird, ist die Proteinphosphatase-1 aktiv und dephosphoryliert und inaktiviert CREB [94]. Somit sind Calcineurin, MKP-1 und RGS2 Teil einer negativen Rückkopplungsschleife, die in die Signalkaskade zwischen $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren und der Gentranskription eingreift.

Die CREB-induzierte Transkription über das cAMP-Reaktionselement (CRE) wird durch die Koaktivatorproteine *CREB binding protein* (CBP) und p300 reguliert [40,52]. CBP/p300 sind Acetyltransferasen, die die Übertragung von Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf die ϵ -Aminogruppen in Histonen und Nicht-Histonproteinen katalysieren [12,56,66]. Die Acetylierung von Histonproteinen führt zu einer Verringerung der positiven Ladungen, was die Interaktion mit der sauren DNA schwächt. Das Chromatin wandelt sich in eine offene Konfiguration um, die die Gentranskription zulässt [64]. In dieser Arbeit wurde mit einem genetischen Ansatz untersucht, ob die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-induzierte Aktivierung der Tyrosinhydroxylase-Gentranskription CBP/p300 erfordert. Hierzu wurde das adenovirale Protein E1A exprimiert, das an CBP und p300 bindet und deren CBP/p300-Acetyltransferase-Aktivitäten hemmt [9,66]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von E1A die durch den $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor induzierte Aktivierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors deutlich reduziert. Vor kurzem wurde gezeigt, dass E1A die Insulinrezeptor-induzierte Transkriptionsaktivierung über CRE und CREB sehr aktiv blockiert. Im Gegensatz dazu wurde die AP-1-induzierte Transkription in Anwesenheit oder Abwesenheit von E1A nicht verändert [93]. Der in dieser Arbeit zur Steuerung der Reporter-gen-Transkription

verwendete Tyrosinhydroxylase-Promotor enthielt sowohl eine CRE- als auch eine AP-1-Stelle. Während die Aktivität von E1A auf die CRE/CREB-regulierte Transkription gut dokumentiert ist [11,62,93], ist die Wirkung von E1A auf die AP-1-regulierte Transkription umstritten. Es wurde eine Hochregulierung der AP-1-Aktivität durch E1A beschrieben, aber auch eine Unterdrückung der Phorbol ester-induzierten Kollagenase-Promotoraktivität durch E1A [14,36,65]. Diese Schlussfolgerungen beruhen auf einer transienten Transfektion, während in dieser Arbeit chromatinintegrierte Reportergene für die Analyse einer epigenetischen Kontrolle der Tyrosinhydroxylase-Expression verwendet wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Ansicht stützen, dass die CREB-regulierte Tyrosinhydroxylase-Expression epigenetisch durch die Histon-Acetyltransferasen CBP und p300 kontrolliert wird.

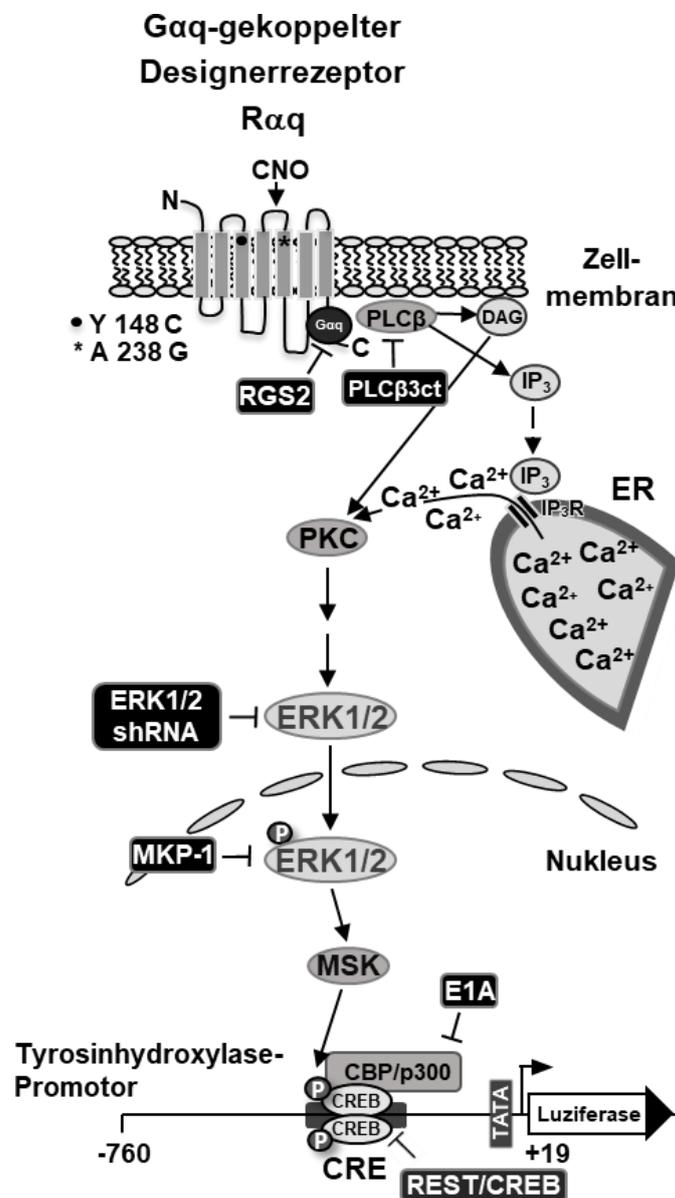


Abbildung 21: Signalkaskade, die den $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptor mit dem Tyrosinhydroxylase-Promotor verbindet.

Diese Arbeit zeigt, dass die Stimulation $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren eine Signalkaskade in katecholaminergen Neuroblastomzellen auslöst, die zur Aktivierung des Tyrosinhydroxylase-Promotors führt. Die Aktivierung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins und zur Bildung der aktivierten GTP-gebundenen $G\alpha_q$ -Untereinheit. Die GTP-gebundenen $G\alpha_q$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β , die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in IP₃ und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. Die Expression von RGS2 beschleunigt die Umwandlung von GTP-gebundenem in GDP-gebundenem $G\alpha_q$, während die Expression der C-terminalen Domäne von Phospholipase C β 3 dominant-negativ wirkt. IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums und löst den Einstrom von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma aus. Der Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert die Phosphatase Calcineurin und die Proteinkinase C (PKC), was zur Aktivierung der Proteinkinase ERK1/2 führt. Das phosphorylierte und aktivierte ERK1/2 migriert in den Zellkern und phosphoryliert und aktiviert die Mitogen- und Stress-induzierte Proteinkinase (MSK), die ihrerseits CREB phosphoryliert und aktiviert. Phosphoryliertes CREB rekrutiert die Koaktivatorproteine CBP und p300, die als Histon-Acetyltransferasen fungieren und eine Brücke zum basalen Transkriptionsapparat schlagen. Die ERK1/2-Konzentration wurde in dieser Arbeit durch Expression von ERK1- und ERK2-spezifischen shRNAs reduziert. Phosphoryliertes ERK1/2 wurde durch die Kernphosphatase MKP-1 dephosphoryliert und inaktiviert. Eine dominant-negative Mutante von CREB schwächte die Funktion von CREB ab. Die Expression des adenoviralen Proteins E1A blockiert die Aktivität der CBP/p300-Proteine.

8 Literaturverzeichnis

1. Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicoletis MA, McNamara JO, Roth BL (2009) Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63:27–39
2. Alexander S, Mathie A, Peters J (2011) G Protein-Coupled Receptors. *British Journal of Pharmacology* 164:5–113
3. Arbogast LA, Voogt JL (1991) Mechanisms of tyrosine hydroxylase regulation during pregnancy: evidence for protein dephosphorylation during the prolactin surges. *Endocrinology* 129:2575–2582
4. Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315–321
5. Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33:2643–2652
6. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca²⁺- and Stimulus Duration-Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression. *Cell* 87:1203–1214
7. Bullock BP, Habener JF (1998) Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37:3795–3809
8. Bunting M, Tang W, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1996) Molecular Cloning and Characterization of a Novel Human Diacylglycerol Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271:10230–10236
9. Chakravarti D, Ogryzko V, Kao HY, Nash A, Chen H, Nakatani Y, Evans RM (1999) A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* 96:393–403

10. Chaney WG, Howard DR, Pollard JW, Sallustio S, Stanley P (1988) DNA transfection of Mammalian cells using polybrene. *Methods Mol Biol* 4:363–370
11. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 281:1505–1509
12. Dancy BM, Cole PA (2015) Protein Lysine Acetylation by p300/CBP. *Chem Rev* 115:2419–2452
13. Daubner SC, Le T, Wang S (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508:1–12
14. de Groot R, Foulkes N, Mulder M, Kruijjer W, Sassone-Corsi P (1991) Positive regulation of jun/AP-1 by E1A. *Molecular and Cellular Biology* 11:192–201
15. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17:4426–4441
16. Ekici M, Hohl M, Schuit F, Martínez-Serrano A, Thiel G (2008) Transcription of Genes Encoding Synaptic Vesicle Proteins in Human Neural Stem Cells: Chromatin Accessibility, Histone Methylation Pattern, and the essential role of REST. *Journal of Biological Chemistry* 283:9257–9268
17. Fossom LH, Sterling CR, Tank AW (1992) Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol Pharmacol* 42:898–908
18. Fukami K (2002) Structure, Regulation, and Function of Phospholipase C Isozymes. *The Journal of Biochemistry* 131:293–299
19. Fukuchi M, Fujii H, Takachi H, Ichinose H, Kuwana Y, Tabuchi A, Tsuda M (2010) Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca²⁺ signals evoked via the N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Research* 1366:18–26

20. Furlong RA, Rubinsztein JS, Ho L, Walsh C, Coleman TA, Muir WJ, Paykel ES, Blackwood DHR, Rubinsztein DC (1999) Analysis and metaanalysis of two polymorphisms within the tyrosine hydroxylase gene in bipolar and unipolar affective disorders. *American Journal of Medical Genetics* 88:88–94
21. Gizang-Ginsberg E, Ziff EB (1990) Nerve growth factor regulates tyrosine hydroxylase gene transcription through a nucleoprotein complex that contains c-Fos. *Genes Dev* 4:477–491
22. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn RY (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* 36:59–72
23. Gressner AM, Arndt T (2019) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
24. Gueorguiev VD, Cheng S-Y, Sabban EL (2006) Prolonged Activation of cAMP-response Element-binding Protein and ATF-2 Needed for Nicotine-triggered Elevation of Tyrosine Hydroxylase Gene Transcription in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 281:10188–10195
25. Guettier J-M, Gautam D, Scarselli M, Azua IR de, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, Roth BL, Wess J (2009) A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *PNAS* 106:19197–19202
26. Haavik J, Toska K (1998) Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 16:285–309
27. Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 99:25–44
28. Hong S-K, Yoon S, Moelling C, Arthan D, Park J-I (2009) Noncatalytic Function of ERK1/2 Can Promote Raf/MEK/ERK-mediated Growth Arrest Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 284:33006–33018
29. Insel PA, Sriram K, Gorr MW, Wiley SZ, Michkov A, Salmerón C, Chinn AM (2019) GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 40:378–387

30. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004) What turns CREB on? Cellular Signalling 16:1211–1227
31. Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. Science 298:1911–1912
32. Kehrl JH, Sinnarajah S (2002) RGS2: a multifunctional regulator of G-protein signaling. Int J Biochem Cell Biol 34:432–438
33. Keyse SM (1998) Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. Seminars in Cell & Developmental Biology 9:143–152
34. Kilbourne EJ, Nankova BB, Lewis EJ, McMahon A, Osaka H, Sabban DB, Sabban EL (1992) Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by membrane depolarization. Identification of the responsive element and possible second messengers. Journal of Biological Chemistry 267:7563–7569
35. Kim KS, Lee MK, Carroll J, Joh TH (1993) Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. Journal of Biological Chemistry 268:15689–15695
36. Kitabayashi I, Chiu R, Gachelin G, Yokoyama K (1991) E1A dependent up-regulation of c-jun/AP-1 activity. Nucleic Acids Research 19:649–655
37. Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T (1995) Targeted Disruption of the Tyrosine Hydroxylase Locus Results in Severe Catecholamine Depletion and Perinatal Lethality in Mice. Journal of Biological Chemistry 270:27235–27243
38. Kume T, Kawato Y, Osakada F, Izumi Y, Katsuki H, Nakagawa T, Kaneko S, Niidome T, Takada-Takatori Y, Akaike A (2008) Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. Neuroscience Letters 443:199–203
39. Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate Regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity and Gene Expression. Journal of Neurochemistry 67:443–462
40. Kwok RPS, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SGE, Green MR, Goodman RH (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature 370:223–226

41. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
42. Lagerström MC, Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339–357
43. Langfermann DS, Schmidt T, Rössler OG, Thiel G (2019) Calcineurin controls gene transcription following stimulation of a Gαq-coupled designer receptor. *Experimental Cell Research* 383:111553
44. Lazaroff M, Patankar S, Yoon SO, Chikaraishi DM (1995) The Cyclic AMP Response Element Directs Tyrosine Hydroxylase Expression in Catecholaminergic Central and Peripheral Nervous System Cell Lines from Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 270:21579–21589
45. Lesch A, Rössler OG, Thiel G (2017) Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1. *J Cell Biochem* 118:2409–2419
46. Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 148:1–8
47. Lewis DA, Melchitzky DS, Haycock JW (1993) Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience* 54:477–492
48. Lindgren N, Goiny M, Herrera-Marschitz M, Haycock JW, Hökfelt T, Fisone G (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by depolarization stimulates tyrosine hydroxylase phosphorylation and dopamine synthesis in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 15:769–773
49. Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telecephalon: New evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Research* 306:19–30
50. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* 295:868–872

51. Lüdecke B, Dworniczak B, Bartholomé K (1995) A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Hum Genet* 95:123–125
52. Lundblad JR, Kwok RPS, Laurance ME, Harter ML, Goodman RH (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 374:85–88
53. Mallet J (1996) The TiPS/TINS Lecture Catecholamines: from gene regulation to neuropsychiatric disorders11At the 1995 Annual Meeting of the European Neuroscience Association, held in Amsterdam, the plenary lecture given by Jacques Mallet was sponsored jointly by TiPS and TINS. The following article is adapted from this lecture. *Trends in Neurosciences* 19:191–196
54. Markey KA, Towle AC, Sze PY (1982) Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development. *Endocrinology* 111:1519–1523
55. Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:82–89
56. Martinez-Balbás MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J* 17:2886–2893
57. Marwarha G, Rhen T, Schommer T, Ghribi O (2011) The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates α -synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors—relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 119:1119–1136
58. Miner LL, Pandalai SP, Weisberg EP, Sell SL, Kovacs DM, Kaplan BB (1992) Cold-induced alterations in the binding of adrenomedullary nuclear proteins to the promoter region of the tyrosine hydroxylase gene. *J Neurosci Res* 33:10–18
59. Müller I, Rössler OG, Thiel G (2011) Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol Pharmacol* 80:1179–1189

60. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910–2917
61. Najimi M, Hermans E, Rostène W, Forgez P (2001) Transcriptional Regulation of the Tyrosine Hydroxylase Gene by Neurotensin in Human Neuroblastoma CHP212 Cells. *Metab Brain Dis* 16:165–174
62. Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Parvin JD, Montminy M (1997) Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev* 11:738–747
63. Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, Lefkowitz RJ (2007) Targeting of Diacylglycerol Degradation to M1 Muscarinic Receptors by β -Arrestins. *Science*
64. Nitsch S, Zorro Shahidian L, Schneider R (2021) Histone acylations and chromatin dynamics: concepts, challenges, and links to metabolism. *EMBO Rep* 22:52774
65. Offringa R, Gebel S, van Dam H, Timmers M, Smits A, Zwart R, Stein B, Bos JL, van der Eb A, Herrlich P (1990) A novel function of the transforming domain of E1a: Repression of AP-1 activity. *Cell* 62:527–538
66. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell* 87:953–959
67. Papanikolaou NA, Sabban EL (1999) Sp1/Egr1 motif: a new candidate in the regulation of rat tyrosine hydroxylase gene transcription by immobilization stress. *J Neurochem* 73:433–436
68. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639–650
69. Ritter SL, Hall RA (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:819–830
70. Robinson PJ (1991) The role of protein kinase C and its neuronal substrates dephosphin, B-50, and MARCKS in neurotransmitter release. *Mol Neurobiol* 5:87–130

71. Romero DG, Plonczynski MW, Gomez-Sanchez EP, Yanes LL, Gomez-Sanchez CE (2006) RGS2 is regulated by angiotensin II and functions as a negative feedback of aldosterone production in H295R human adrenocortical cells. *Endocrinology* 147:3889–3897
72. Rössler OG, Henss I, Thiel G (2008) Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 470:93–102
73. Rössler OG, Thiel G (2009) Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* 10:40
74. Rössler OG, Thiel G (2015) Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Gαq-Coupled Designer Receptors. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* 49–60
75. Rubil S, Rössler OG, Thiel G (2016) CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Br J Pharmacol* 173:305–318
76. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Parijs LV (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics* 33:401–407
77. Sandal M, Paltrinieri D, Carloni P, Musiani F, Giorgetti A (2013) Structure/Function Relationships of Phospholipases C Beta. *Current protein & peptide science* 14:650–7
78. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18:790–798

79. Shearman MS, Sekiguchi K, Nishizuka Y (1989) Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacol Rev* 41:211–237
80. Shi Z-D, Ji X-Y, Berardi DE, Qazi H, Tarbell JM (2010) Interstitial flow induces MMP-1 expression and vascular SMC migration in collagen I gels via an ERK1/2-dependent and c-Jun-mediated mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H127-135
81. Simon J, Arthur C, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K, Impey S (2004) Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 Mediates cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation and Activation by Neurotrophins. *J Neurosci* 24:4324–4332
82. Simon M, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G Proteins in Signal Transduction. *Science* 252:802–808
83. Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM (2001) Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 276:16491–16500
84. Song H, Yang P-C (2010) Construction of shRNA lentiviral vector. *N Am J Med Sci* 2:598–601
85. Song L, Sarno PD, Jope RS (1999) Muscarinic Receptor Stimulation Increases Regulators of G-protein Signaling 2 mRNA Levels through a Protein Kinase C-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 274:29689–29693
86. Stefano L, Sarraj J, Rossler OG, Vinson C, Thiel G (2006) Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *J Neurochem* 97:92–104
87. Tank AW, Curella P, Ham L (1986) Induction of mRNA for tyrosine hydroxylase by cyclic AMP and glucocorticoids in a rat pheochromocytoma cell line: evidence for the regulation of tyrosine hydroxylase synthesis by multiple mechanisms in cells exposed to elevated levels of both inducing agents. *Mol Pharmacol* 30:497–503

88. Tekin I, Roskoski R, Carkaci-Salli N, Vrana KE (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *Journal of Neural Transmission* 121:1451–1481
89. Thiel G, Al Sarraj J, Vinson C, Stefano L, Bach K (2005) Role of basic region leucine zipper transcription factors cyclic AMP response element binding protein (CREB), CREB2, activating transcription factor 2 and CAAT/enhancer binding protein alpha in cyclic AMP response element-mediated transcription. *J Neurochem* 92:321–336
90. Thiel G, Rössler O (2007) Viren als Werkzeuge der Gentherapie. Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht. *Biol Unserer Zeit* 37:241–248
91. Thiel G, Kaufmann A, Rössler OG (2013) G-protein-coupled designer receptors – new chemical-genetic tools for signal transduction research. *Biological Chemistry* 394:1615–1622
92. Thiel G, Welck J, Wissenbach U, Rössler OG (2019) Dihydrotestosterone activates AP-1 in LNCaP prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 110:9–20
93. Thiel G, Wagner L, Ulrich M, Rössler OG (2021) Immediate-early transcriptional response to insulin receptor stimulation. *Biochemical Pharmacology* 192:114696
94. Thiel G, Schmidt T, Rössler OG (2021) Ca²⁺ Microdomains, Calcineurin and the Regulation of Gene Transcription. *Cells* 10:875
95. Tinti C, Yang C, Seo H, Conti B, Kim C, Joh TH, Kim K-S (1997) Structure/Function Relationship of the cAMP Response Element in Tyrosine Hydroxylase Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 272:19158–19164
96. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ (1996) Mitogenic Signaling via G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews* 17:698–714
97. Vaqué JP, Dorsam RT, Feng X, Iglesias-Bartolome R, Forsthoefel DJ, Chen Q, Debant A, Seeger MA, Ksander BR, Teramoto H, Gutkind JS (2013) A Genome-wide RNAi Screen Reveals a Trio-Regulated Rho GTPase Circuitry Transducing Mitogenic Signals Initiated by G Protein-Coupled Receptors. *Molecular Cell* 49:94–108

98. Wang F, Marshall CB, Ikura M (2013) Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell Mol Life Sci* 70:3989–4008
99. Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JSC (2002) MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 22:2871–2881
100. Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG (1999) Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res* 85:1092–1100
101. Zhou Q-Y, Quaife CJ, Palmiter RD (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374:640–643

9 Publikationen

Helen Eriksson, Oliver G. Rössler, Gerald Thiel (2022): Tyrosine hydroxylase promoter activity is upregulated in female catecholaminergic neuroblastoma cells following activation of a Gαq-coupled designer receptor. *Neurochemistry International* 160:105407

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gerald Thiel für die Bereitstellung der interessanten Thematik meiner Dissertation und die Möglichkeit, die Experimente in seiner Arbeitsgemeinschaft zu absolvieren, bedanken. Bei Fragen und Problemen sowohl bei den Experimenten als auch beim Schreiben der Dissertation konnte ich mich immer auf seine schnelle Hilfe verlassen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Oliver Rößler, der für alle Belange jederzeit ein offenes Ohr hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Zudem bedanke ich mich vielmals bei Alisia, Lars, Max, Niko, Iris und Sabine, die den Laboralltag auf vielfältige Weise bereichert haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in allen Situationen meines Bestrebens stets unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.