



**Die ERK-ERK Interaktionsfläche als therapeutische Zielstruktur
zur selektiven Inhibition nukleärer ERK1/2-Funktionen zum Schutz vor
pathologischer kardialer Hypertrophie**

The ERK-ERK interface as a therapeutic target to selectively inhibit nuclear
ERK1/2 functions for the prevention of pathological cardiac hypertrophy

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Angela Tomasovic

aus

Aschaffenburg

Würzburg, Mai 2017

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Kristina Lorenz

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Gessler

3. Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Lohse

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiale Hypertrophie	1
1.1.1	Ursachen und Charakteristika der pathologischen kardialen Hypertrophie.....	2
1.1.2	Mechanismen und Signalwege in kardialer Hypertrophie	5
1.1.2.1	Initiation von Signalwegen an der Zellmembran	6
1.1.2.2	Calcium-abhängige Signalwege.....	11
1.1.2.3	Der PI3K/AKT-Signalweg.....	12
1.1.2.4	Transkriptionelle Kontrolle durch MEF2/HDAC.....	13
1.1.2.5	MAP-Kinasen-Signalwege	13
1.1.3	Unterschiede zwischen pathologischer und physiologischer Hypertrophie.....	15
1.1.4	<i>Remodeling</i> in pathologischer kardialer Hypertrophie.....	17
1.1.4.1	Myokardialer Zelltod	17
1.1.4.2	Kardiale Fibrose.....	19
1.2	Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2.....	20
1.2.1	Therapeutische Zielstrukturen der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade.....	20
1.2.1.1	Die Rolle der ERK-Signalkaskade in kardialer Hypertrophie	20
1.2.1.2	Die Rolle der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade in Krebs	22
1.2.2	Raf.....	22
1.2.3	MEK1/2.....	24
1.2.4	ERK1/2	24
1.2.4.1	Die Struktur von ERK2.....	25
1.2.4.2	Regulation der Signalweiterleitung und deren Spezifität	27
1.2.4.3	ERK1/2 Homo- und Heterodimerisierung.....	31
1.2.4.4	Die ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung	32
1.3	Zielsetzung.....	34
2	Material	37
2.1	Substanzen.....	37
2.2	Kits.....	37
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	38
2.4	Reagenzien für die Zellkultur.....	39
2.5	Enzyme	39
2.6	Antikörper.....	40
2.6.1	primäre Antikörper	40
2.6.2	sekundäre Antikörper	40
2.7	Isotopenmarkierte Substanzen.....	40

2.8	Oligonukleotide.....	41
2.9	Plasmidvektoren	41
2.10	gereinigte Proteine	42
2.11	biologisches Material.....	42
2.11.1	prokaryotische Zellen.....	42
2.11.2	eukaryotische Zellen.....	42
2.11.3	Adenoviren.....	43
2.11.4	adeno-assoziierte Viren (Serotyp 9).....	43
2.11.5	Tiere.....	43
2.12	(Stock-)Lösungen und Puffer.....	43
3	Methoden.....	51
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	51
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	51
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	52
3.1.3	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> , Hitzeschock-Methode.....	53
3.1.4	Kultivierung von <i>E.coli</i>	53
3.1.5	Präparative Aufreinigung von DNA.....	53
3.2	Zellbiologische Methoden	53
3.2.1	Primärzellen (Präparation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten).....	53
3.2.2	Zelllinien.....	54
3.2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	54
3.2.2.2	Kryokonservieren und Auftauen von Zellen.....	55
3.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	55
3.2.2.4	Beschichten mit Poly-D-Lysin	55
3.2.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	56
3.2.3.1	Adenovirale Transduktion.....	56
3.2.3.2	<i>In vivo</i> -Transduktion durch adeno-assoziierte Viren	56
3.2.3.3	DEAE-Dextran-Methode	57
3.2.3.4	Calciumphosphat-Co-Präzipitation	57
3.3	Proteinbiochemische Methoden	58
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten	58
3.3.1.1	Zelllysate.....	58
3.3.1.2	Herzlysate.....	58
3.3.2	Proteinbestimmung.....	59
3.3.3	SDS-PAGE.....	59
3.3.4	Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen.....	59
3.3.5	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (<i>Western Blot</i>).....	60

3.3.6	Tüpfelblot (<i>Dot Blot</i>)	60
3.3.7	Immundetektion immobilisierter Proteine.....	61
3.3.8	Ablösen gebundener Antikörper	61
3.3.9	Caspase-3/7-Aktivitäts-Assay.....	61
3.3.10	Immunpräzipitation von ERK aus Zelllysaten	62
3.4	Methoden zur Proteinanalyse	62
3.4.1	Proteinaufreinigungen.....	62
3.4.1.1	Aufreinigung von His ₆ -ERK2	62
3.4.1.2	Aufreinigung von GST-Peptid.....	63
3.4.2	ERK2-Phosphorylierungs-Assays	64
3.4.2.1	<i>Phosphopeptide Mapping</i> von aufgereinigtem His ₆ -ERK2.....	64
3.4.2.2	Nichtradioaktive Immundetektion von phosphoryliertem His ₆ -ERK2	65
3.5	Fluoreszenzbasierte Methoden	66
3.5.1	Zellfixierung.....	66
3.5.2	Phalloidin-Färbung.....	66
3.5.3	TUNEL-Färbung.....	67
3.5.4	Lokalisation von YFP-ERK2 (nukleäre-zu-zytosolische Verteilung).....	68
3.5.5	Proximity Ligation Assay (Duolink®).....	69
3.6	Histologische Methoden	70
3.6.1	Paraffinschnitte.....	70
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	70
3.6.3	(Pikro-) Siriusrot (SR)-Färbung	71
3.7	Physiologische Modelle.....	71
3.7.1	Mäuse	71
3.7.2	Transverse Aortenkonstriktion (TAC).....	72
3.7.3	9-Monatsmäuse.....	72
3.7.4	Gentherapie	73
3.7.5	Echokardiographie	73
3.7.6	Organentnahmen	74
3.8	Weitere Methoden	74
3.8.1	Nachweis von RNA.....	74
3.8.1.1	Qualitativer Nachweis von RNA aus Zelllysaten.....	74
3.8.1.2	Quantitativer Nachweis von RNA aus Herzlysaten (RT-PCR).....	75
3.8.2	[³ H]-Thymidin-Einbau	76
3.8.3	MBP (Myelin-Basisches Protein)-Assay	77
3.9	Statistik	77
4	Ergebnisse	81

4.1	Die Rolle der ERK1/2-Dimerisierung bei der Phosphorylierung und Lokalisation von ERK81	
4.2	Die ERK1/2-Dimerisierung als Regulationsmechanismus verschiedener ERK-Signale in Kardiomyozyten.....	84
4.2.1	Der Einfluss von monomerem ERK2 auf Hypertrophie und Zellüberleben von Kardiomyozyten.....	84
4.2.2	Monomeres ERK steuert die Aktivierung nukleärer und zytosolischer ERK1/2-Zielproteine auf unterschiedliche Weise	87
4.3	Monomeres ERK2 verringert ERK-vermittelte pathologische kardiale Hypertrophie ohne schädliche Auswirkungen zu haben.....	90
4.4	Monomeres ERK hat keinen Einfluss auf physiologische Hypertrophie	95
4.5	Charakterisierung eines Peptids zur Inhibition ERK-Dimerisierung	97
4.6	Das Peptid verringert ERK ^{Thr188} -vermittelte Effekte in Kardiomyozyten	104
4.7	Die AAV9-Peptid Gentherapie bewahrt vor einer durch Überlast hervorgerufene Herzinsuffizienz.....	108
4.8	Das Peptid als potenter Inhibitor der von MAPK-Signalwegen geleiteten Tumorzellproliferation.....	116
4.9	Die Auswirkungen von Cetuximab auf die ERK(TEY)-Phosphorylierung und das Zellüberleben in NRCMs	122
5	Diskussion	125
5.1	Die Hemmung der ERK-Aktivität als zweischneidiges Schwert in Bezug auf pathologische kardiale Hypertrophie.....	125
5.2	Die ERK ^{Thr188} -Autophosphorylierung als Trigger für nukleäre ERK-Effekte.....	126
5.3	Die Hemmung der ERK-Dimerisierung zur Inhibition pERK(Thr188)-vermittelter Effekte.....	129
5.3.1	Die Relevanz der Dimerisierung und Thr ¹⁸⁸ -Autophosphorylierung für die Lokalisation von ERK2	129
5.3.2	Der Einfluss einer Hemmung der ERK-Dimerisierung auf die Entwicklung pathologischer kardialer Hypertrophie	130
5.3.3	Eine fehlende ERK2-Dimerisierung bei physiologischer Hypertrophie.....	131
5.4	Die endogene ERK-Dimerisierungshemmung als Therapieansatz pathologischer kardialer Hypertrophie.....	132
5.5	Die Relevanz der ERK-Dimerisierung in der Tumorthherapie	134
5.5.1	Kardiotoxizität und Feedbackmechanismen bei Kinaseinhibitoren	135
5.5.2	Die Rolle der ERK-Dimerisierung bei der Krebszellproliferation	136
5.6	Ausblick.....	138
6	Zusammenfassung.....	143
7	Abkürzungsverzeichnis.....	147
8	Literaturverzeichnis	153
9	Anhang.....	179
9.1	Lebenslauf.....	179

9.2	Publikationsverzeichnis.....	180
9.2.1	Publikationen	180
9.2.2	Konferenzbeiträge	180
9.3	Eidesstattliche Erklärung.....	182
9.4	Danksagung.....	183

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Unterschiede der kardialen Hypertrophie	3
Abbildung 2: Zeitliche Abfolge der Veränderungen in Kardiomyozyten nach anhaltender hypertropher Stimulation.....	4
Abbildung 3: Signalwege in kardialer Hypertrophie.....	5
Abbildung 4: MAPKs-Signalwege.....	15
Abbildung 5: Dreidimensionale Strukturen von unphosphoryliertem und phosphoryliertem ERK2.....	26
Abbildung 6: Modell der ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung	33
Abbildung 7: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	51
Abbildung 8: <i>Western Blot</i> -Schichtanordnung	60
Abbildung 9: Auftragsschema einer DC-Platte für das Phosphopeptide-Mapping	65
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Genkonstruktes zur herzspezifischen Expression von ERK2 ^{Δ174-177}	72
Abbildung 11: Inhibition der Aktivierung und Autophosphorylierung von ERK1/2 durch PD98059.....	82
Abbildung 12: Monomeres ERK (ERK2-Δ4) reduziert die ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung ohne dabei die normale ERK-Aktivierung zu beeinflussen.....	83
Abbildung 13: ERK2-Δ4 weist eine reduzierte nukleäre Akkumulation nach Stimulation mit Phenylephrin auf.....	84
Abbildung 14: PD98059 inhibiert die PE-induzierte Zunahme der Querschnittsfläche von NRCMs und erhöht die Apoptoserate.....	85
Abbildung 15: Die Überexpression der dimerisierungsdefizienten ERK2-Δ4-Mutante führt zu einer signifikanten Reduktion der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche.....	87
Abbildung 16: ERK2-Δ4 weist eine reduzierte Aktivierung nukleärer, jedoch nicht zytosolischer Effektor-Proteine auf	89
Abbildung 17: Expressionskontrolle von ERK1/2 in wildtypischen und transgenen Mäusen	90
Abbildung 18: Die herzspezifische Überexpression von ERK2-Δ4 führt zu einer signifikanten Reduktion der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten nach TAC.....	91
Abbildung 19: Die Überexpression von ERK2-Δ4 reduziert interstitielle Fibrose nach TAC	93
Abbildung 20: Die Level an Collagen III sind in ERK2-Δ4 transgenen Mäusen nach TAC deutlich verringert	93
Abbildung 21: Die Überexpression von monomerem ERK2 hat keinen negativen Einfluss auf die Apoptoserate im Herzen.....	94

Abbildung 22: Die Überexpression von ERK2-Δ4 führt zu einem geringeren Anstieg der BNP-Level	95
Abbildung 23: Der Einfluss einer ERK2-Δ4-Überexpression auf physiologisches Herzwachstum.....	96
Abbildung 24: Überlebenskurve von Wt- und ERK2-4-transgenen Mäusen	97
Abbildung 25: Aminosäuresequenz des Peptids aus dem C-Terminus von ERK2 zur Inhibition der ERK-Dimerisierung.....	98
Abbildung 26: Das Peptid verhindert die Dimerisierung von ERK2.....	99
Abbildung 27: Detektion der Interaktion zwischen Flag-ERK2 und dem Peptid	100
Abbildung 28: Das Peptid beeinflusst nicht die normale Kinaseaktivität von ERK	101
Abbildung 29: Während die TEY-Phosphorylierung durch das Peptid unbeeinflusst bleibt, wird die Thr188-Phosphorylierung reduziert.....	102
Abbildung 30: Das Peptid mindert die ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung <i>in vitro</i>	103
Abbildung 31: Das Peptid verhindert die nukleäre Translokation von ERK2	104
Abbildung 32: Expressionsnachweis des Peptids in NRCMs	104
Abbildung 33: In NRCMs verringert das Peptid die ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung ohne die TEY-Phosphorylierung zu beeinflussen.....	105
Abbildung 34: Das Peptid reduziert die hypertrophe Antwort in NRCMs ohne negativen Einfluss auf das Zellüberleben zu nehmen	106
Abbildung 35: In Anwesenheit des Peptids werden nukleäre ERK-Zielproteine geringer aktiviert.....	107
Abbildung 36: Das Peptid hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Myc und MAX	108
Abbildung 37: Das AAV9-Peptid-Konstrukt transduziert erfolgreich das Myokardium	109
Abbildung 38: Die AAV9-Peptid Behandlung reduziert kardiale Hypertrophie.....	110
Abbildung 39: Die TAC-induzierte Lungenstauung ist in AAV9-Peptid-behandelten Mäusen geringer.....	111
Abbildung 40: Die Behandlung mit dem AAV9-Peptid Vektor reduziert interstitielle Fibrose.....	112
Abbildung 41: Die AAV9-Peptid Gentherapie reduziert myokardialen Zelltod	113
Abbildung 42: Die Therapie mit dem AAV9-Peptid Vektor reduziert die Expression des Herzinsuffizienzmarkers BNP und nimmt keinen negativen Einfluss auf die Mortalität der Mäuse	113
Abbildung 43: In Herzen wird die ERK ^{Thr188} -Phosphorylierung durch das AA9-Peptid Konstrukt verringert ohne die normale TEY-Aktivierung zu beeinflussen.....	114
Abbildung 44: Die Aktivierung anti-apoptotischer ERK-Zielproteine bleibt durch den AAV9-Peptid Vektor unbeeinflusst, wohingegen nukleäre ERK-Substrate vermindert aktiviert werden	116

Abbildung 45: RNA-Expressionskontrolle des Peptids in verschiedenen Krebszelllinien 117

Abbildung 46: Proliferationsraten der drei Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen 119

Abbildung 47: Die ERK(TEY)-Phosphorylierung der Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen..... 120

Abbildung 48: Die Apoptoserate der drei Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen 121

Abbildung 49: Cetuximab erhöht die Apoptose in NRCMs aufgrund einer verringerten ERK-Aktivierung 123

Abbildung 50: Mechanismus pathologischer ERK^{Thr188}-vermittelter Effekte..... 140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale pathologischer und physiologischer Hypertrophie 17

Tabelle 2: Echokardiographische Auswertung von FVB/N-Mäusen vor und nach TAC..... 92

Tabelle 3: Echokardiographische Charakterisierung von Mäusen im Alter von neun Monaten 97

Tabelle 4: Echokardiographische Untersuchung von C57Bl/6J-Mäusen im Gentherapiemodell 110

Tabelle 5: Kolorektale Adenokarzinomzelllinien und deren jeweiliger Mutationsstatus..... 117

1 Einleitung

1.1 Kardiale Hypertrophie

Kardiovaskuläre Erkrankungen und Ereignisse bilden in Deutschland die mit Abstand häufigste Todesursache (21,2%) (Statistisches Bundesamt, 2014). Aufgrund ihrer hohen Prävalenz fallen hier die meisten Gesundheitsausgaben an (22,5%) (Statistisches Bundesamt, 2016).

Ein bedeutender Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen ist die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH). Sie kann sowohl zu Herzinsuffizienz als auch zu koronarer Herzkrankheit, Schlaganfall, Arrhythmien und plötzlichem Herztod führen und erhöht das Sterberisiko um das 2-4-fache (Artham *et al.*, 2009). Studien zeigen, dass die Prävention oder sogar Regression der LVH die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität senkt und belegen somit die außerordentliche Bedeutung der LVH als therapeutischen Ansatz (Mathew *et al.*, 2001; Prineas *et al.*, 2001; Schmieder *et al.*, 1989), vor allem mit Blick auf deren hohe Prävalenz und sozioökonomische Relevanz.

Der Begriff *Hypertrophie* stammt aus dem Griechischen (*hypér*: über + *trophé*: Nahrung, Ernährung, Wachstum) und beschreibt in der Medizin die Vergrößerung eines Organs oder Gewebes aufgrund der Vergrößerung der einzelnen Zellen bei jedoch gleichbleibender Anzahl der Zellen. Bei kardialer Hypertrophie handelt es sich folglich um die Steigerung der myokardialen Masse, wobei das Wachstum des postnatalen Herzens eng mit dessen funktioneller Belastung verknüpft ist (Bernardo *et al.*, 2010). Somit ist die kardiale Hypertrophie ein adaptiver Prozess für eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Bedingungen, mit dem Versuch biomechanischen Stress zu optimieren und die Pumpleistung des Herzens aufgrund der gesteigerten hämodynamischen Belastung zu normalisieren. Da Kardiomyozyten nur begrenzt proliferieren können, ist es nicht verwunderlich, dass die Vergrößerung der Kardiomyozyten, also die Hypertrophie, die dominante zelluläre Reaktion auf hämodynamische Belastung oder myokardialen Schaden darstellt (Diwan und Dorn, 2007; Rohini *et al.*, 2010). Hypertrophes Wachstum des Herzens kann physiologischen und pathologischen Ursachen zugrunde liegen. Physiologische Hypertrophie tritt in gesunden Individuen, z. B. bei andauerndem physischem Training, auf und führt nicht zu kardialen Schaden. Pathologische Hypertrophie entwickelt sich bei chronischer Hypertonie, Myokardinfarkten oder Aortenklappenstenosen. Obwohl die Vergrößerung des Herzens zunächst auch einen wirkungsvollen kompensatorischen Mechanismus darstellt, geht die pathologische Hypertrophie mit einem Verlust der linksventrikulären Funktion einher und stellt so einen unabhängigen Risikofaktor für Herzinsuffizienz dar. Die Herzinsuffizienz selbst wird allgemein definiert als eine Bedingung, bei der die Auswurfleistung des Herzens nicht mehr der metabolischen Nachfrage des Organismus nachkommt, und ist eine letale Erkrankung (Barry *et al.*, 2008; Diwan und Dorn, 2007; Ponikowski *et al.*, 2016). Auf zellulärer Ebene geht die kardiale Hypertrophie mit einer Vergrößerung des Umfangs der Kardiomyozyten einher. Dies ist verbunden mit einer gesteigerten Proteinsynthese und einer erhöhten Organisation der Sarkomere. Bei

pathologischer Hypertrophie ist dies zusätzlich assoziiert mit der Expression von *immediate early genes* (IEGs) und der Aktivierung des sogenannten *fetalen Gen-Programms*, was schließlich verbunden ist mit Inflammation, Fibrose und damit einhergehend Wandsteifigkeit des Herzens (Rohini *et al.*, 2010; Samak *et al.*, 2016). Tatsächlich können eine primäre und sekundäre Prävention bei LVH durch die Behandlung mit Vasodilatoren/neurohumoralen Inhibitoren (z.B. *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE)-Hemmer) den klinischen Ausgang unabhängig von der Höhe des Blutdrucks verbessern, was die Relevanz einer geeigneten Therapie linksventrikulärer Hypertrophie verdeutlicht (Mathew *et al.*, 2001; Schiattarella und Hill, 2015).

1.1.1 Ursachen und Charakteristika der pathologischen kardialen Hypertrophie

Ventrikuläre Kardiomyozyten machen neben anderen Zellen des Herzens (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Mastzellen) zwar nur ein Drittel der Gesamtzahl der Zellen aus, sorgen dafür aber für 70-80% der Masse des Herzens (Nag, 1980). Myozyten bestehen aus Muskelfibrillen (Myofibrillen), welche aus Sarkomeren, der kleinsten kontraktile Einheit des Herzens, aufgebaut sind. Das Wachstum der Kardiomyozyten ist von der Initiation verschiedener Ereignisse als Reaktion auf die gestiegene Arbeitslast abhängig. So wird die Signalweiterleitung als Antwort auf neuroendokrine Faktoren oder über einen Apparat aktiviert, der krankheitsbedingte mechanische Dehnungen oder Wandspannungen detektiert (van Berlo *et al.*, 2013). Kardiomyozyten besitzen einen mechanosensitiven Mechanismus. Hierbei verknüpfen dehnungssensitive Ionenkanäle in der Plasmamembran sowie Strukturproteine (Integrine) die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett der Zelle, aber auch mit Sarkomeren, Calcium-abhängigen Proteinen und dem Zellkern (Bernardo *et al.*, 2010; Knoll *et al.*, 2003; Lyon *et al.*, 2015).

Das Voranschreiten der pathologischen Hypertrophie kann in drei Stadien unterteilt werden:

- (1) Entwicklung der Hypertrophie, in der die Vorlast größer ist als der Auswurf,
- (2) kompensatorische Hypertrophie, bei der das Arbeitslast/Massen-Verhältnis sowie der kardiale Auswurf in der Ruhephase ausgeglichen sind und
- (3) die offene Herzinsuffizienz mit ventrikulärer Dilatation und voranschreitendem Verlust der kardialen Auswurfleistung (Meerson, 1961).

Im ersten Stadium adaptiert das Herz zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion, indem das Myokard zu hypertrophieren beginnt. Dies geschieht im Einklang mit dem *Laplace'schem-Gesetz*, welches besagt, dass eine erhöhte Wandspannung (K) aufgrund einer erhöhten Arbeitslast (P: transmuraler Druck) reduziert werden kann, wenn die Wanddicke (h) größer wird (Diwan und Dorn, 2007; Grossman *et al.*, 1975).

$$\text{Laplace'sches – Gesetz: } K = \frac{P \times r}{2h}$$

K: Wandspannung, P: transmuraler Druck, r: intraventrikulärer Radius, h: Wanddicke

Im zweiten Stadium der kompensatorischen Hypertrophie ist das Verhältnis zwischen Arbeitslast und Hypertrophie ausgeglichen. Hier ist das Ausmaß der Hypertrophie relativ reversibel, wenn die Mehrbelastung, z.B. durch Therapie der Hypertonie, reduziert wird (Fagard, 1995).

Eine andauernde hypertrophe Stimulation führt jedoch in das dritte Stadium. Man erreicht den Status der irreversiblen Dekompensation. Diese Veränderungen gehen mit Störungen der Calcium-Homöostase und Ionenströme einher. Morphologisch ist dieses Stadium durch erhöhte Apoptose sowie Fibrose und im Endstadium Verdünnung der Ventrikelwand und Dilatation der Herzkammer gekennzeichnet (Frey *et al.*, 2004; Hill und Olson, 2008).

Kardiale Hypertrophie kann abhängig von der Geometrie des Herzens auch in verschiedene Varianten klassifiziert werden (Shimizu und Minamino, 2016).

Die *exzentrische Hypertrophie* entwickelt sich durch Volumenüberlastung und zeichnet sich durch Addition der Sarkomere in Serie sowie einer Längenzunahme der Kardiomyozyten aus. Sie entwickelt sich meist während kardialer Erkrankungen wie Myokardinfarkt oder dilatativer Kardiomyopathie und führt sowohl zu einer erhöhten kardialen Masse als auch zu einem vergrößerten Kammer Volumen (Frey *et al.*, 2004; Shimizu und Minamino, 2016) (Abbildung 1).

Die *konzentrische Hypertrophie* geht auf übermäßige Druckbelastung zurück und ist charakterisiert durch parallele Addition von Sarkomeren und einer Vergrößerung des Durchmessers der Kardiomyozyten. Man beobachtet hier einen Anstieg der relativen Wanddicke und kardialen Masse mit geringerem oder unverändertem Kammervolumen. Ursachen sind z.B. arterielle Hypertonie oder Aortenklappenstenose (Bernardo *et al.*, 2010; Grossman *et al.*, 1975) (Abbildung 1).

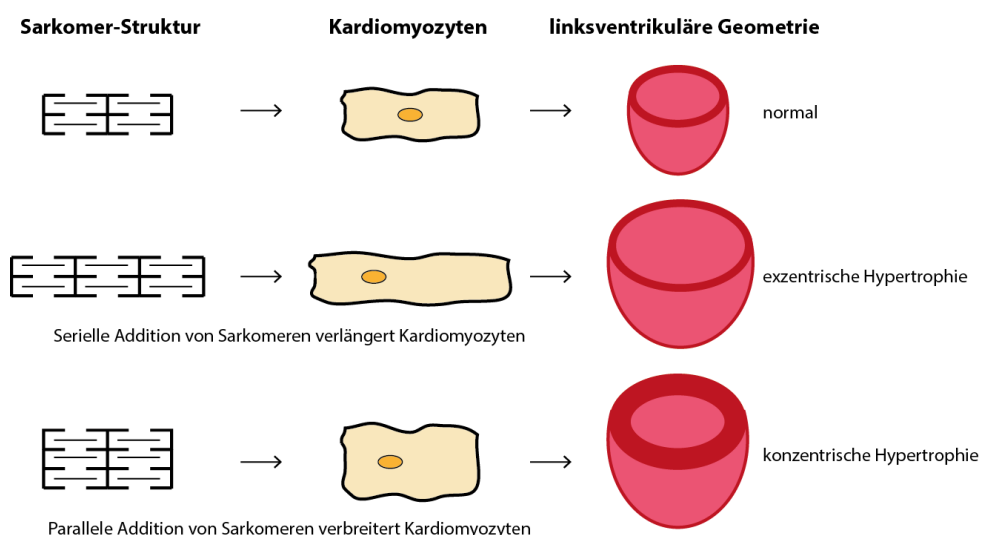


Abbildung 1: Morphologische Unterschiede der kardialen Hypertrophie

Die konzentrische Hypertrophie ist gekennzeichnet durch eine parallele Addition der Sarkomere, was zu einer Verdickung der Ventrikelwand führt, wohingegen die exzentrische Hypertrophie durch serielle Addition der Sarkomere mit Dilatation des Ventrikels charakterisiert ist. Modifiziert nach Bernardo *et al.*, 2010 und Gjesdal *et al.*, 2011.

Obwohl die pathologische kardiale Hypertrophie einen maladaptiven Prozess darstellt, ist sie hochorganisiert und an die jeweiligen Bedürfnisse des Herzens angepasst. Die übermäßige Volumen- oder Druckbelastung resultiert in konzentrischer oder exzentrischer Hypertrophie, indem spezifische intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Diese Mechanismen führen zu einer Veränderung des Umfanges der Kardiomyozyten und zwar auf eine Art und Weise, welche am angemessensten ist, um die jeweilige spezifische Belastung zu kompensieren (Barry *et al.*, 2008).

Daraus ergibt sich, dass kardiale Hypertrophie auf zellulärer Ebene allgemein drei aufeinanderfolgende Phasen durchläuft: extrazelluläre hypertrophe Stimulation, intrazelluläre Signalweiterleitung und Aktivierung nukleärer Ereignisse, welche zur Entwicklung des hypertrophen Phänotypen führen (Glennon *et al.*, 1995). Als Antwort auf hypertrophe Stimulation, sei diese hämodynamisch bedingt oder angeboren, wird in Kardiomyozyten das fetale Gen-Programm reaktiviert. Dieses stellt eine Gruppe von Genen dar, welche normalerweise nur während der Entwicklung des Herzens in der Embryogenese exprimiert und deren Expression im adulten Myokardium unterdrückt wird (Barry *et al.*, 2008). Der Prozess beginnt mit einer schnellen Aktivierung, innerhalb von 30min, von IEGs, wie den Proto-Onkogenen c-fos, c-jun und c-myc, dem Gen für das Hitzeschockprotein Hsp70 sowie dem Transkriptionsfaktor Egr1 (Iwaki *et al.*, 1990). Dies führt einige Stunden später zur Induktion von fetalen Genen (z.B. atrialer natriuretischer Faktor – ANF (Knowlton *et al.*, 1991), B-Typ natriuretisches Peptid – BNP (Nakagawa *et al.*, 1995), β -myosin heavy chain – β -MHC (Waspé *et al.*, 1990), α -Aktin des Skelettmuskels (Long *et al.*, 1989)) und im Verlauf weiterer Stunden findet eine Hochregulation der Gene von konstitutiv exprimierten kontraktilen Proteinen, wie *myosin light chain-2* (MLC-2) (Lee *et al.*, 1988) und kardialem α -Aktin, statt (Glennon *et al.*, 1995). Abbildung 2 veranschaulicht diese zeitliche Abfolge noch einmal in einem Überblick.

30min	Induktion der <i>immediate early genes</i> (Egr1, Hsp70, c-fos, c-jun, c-myc)
6-12h	Induktion des fetalen Gen-Programms (kontraktil: β -MHC, α -Aktin des Skelettmuskels; nicht-kontraktil: ANP, BNP)
12-24h	Hochregulation von konstitutiv exprimierten Genen (MLC-2, kardiales α -Aktin)
>24h	Allgemeiner Anstieg der Protein- und RNA-Menge, Vergrößerung der Zellen

Abbildung 2: Zeitliche Abfolge der Veränderungen in Kardiomyozyten nach anhaltender hypertropher Stimulation
Adaptiert nach Glennon *et al.*, 1995.

1.1.2 Mechanismen und Signalwege in kardialer Hypertrophie

Die Aktivierung biomechanischer und neurohumoraler Mechanismen ist der initiale Schritt zur Entwicklung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Shimizu und Minamino, 2016). Kardiomyozyten exprimieren eine Vielzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), Rezeptoren mit intrazellulärer Tyrosin- oder Serin/Threonin-Kinase Domäne und Glykoprotein (gp) 130 verbundene Rezeptoren. Biomechanische Signale werden über interne dehnungssensitive Rezeptoren weitergeleitet. Rezeptoren leiten mechanische und neurohumorale Signale in die Zellen weiter und koordinieren das hypertrophe Wachstum, indem sie die Genexpression im Zellkern verändern, die Translation von Proteinen vorantreiben und die Degradation der Proteine im Zytoplasma verringern (Heineke und Molckentin, 2006; Tham *et al.*, 2015).

Im Folgenden werden die zentralen Signalwege beschrieben, welche zur Entwicklung kardialer Hypertrophie beitragen.

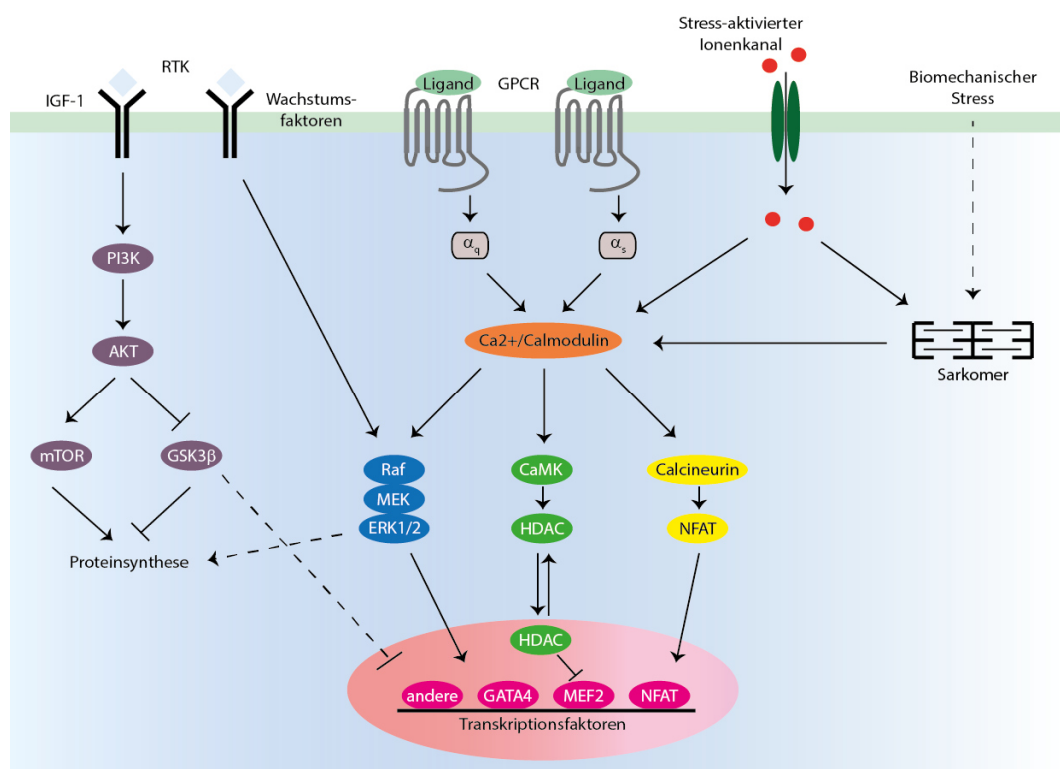


Abbildung 3: Signalwege in kardialer Hypertrophie

Neurohumorale Stimulation oder biomechanischer Stress induzieren hypertrophe Signalmechanismen. RTK: Rezeptortyrosinkinase, IGF-1: *insulin-like growth factor*, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, AKT: Proteinkinase B, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, GSK3β: Glykogensynthase-Kinase 3, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Raf: *rapidly accelerated fibrosarcoma*, MEK: MAP/ERK Kinase, ERK1/2: extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2, CaMK: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase, HDAC: Histon-Deacetylase, NFAT: *nuclear factor of activated T cells*, GATA4: *GATA binding protein 4*, MEF2: *myocyte enhancer factor 2*. Abbildung wurde modifiziert nach Frey und Olson, 2003.

1.1.2.1 Initiation von Signalwegen an der Zellmembran

Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Eine prohypertrophe Wirkung in Kardiomyozyten konnte für die Wachstumsfaktoren *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor β* (TGF- β), *insulin-like growth factor* (IGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) gezeigt werden (Long, 1996). Dabei sind Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) diejenigen Rezeptoren, über welche die meisten Wachstumsfaktoren ihre Effekte ausüben (Ullrich und Schlessinger, 1990).

RTKs sind Zelloberflächenrezeptoren, welche Regulatoren kritischer zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben, Metabolismus, Migration und Zellzykluskontrolle, darstellen. Der menschliche Organismus besitzt 58 bekannte RTKs, die in 20 Unterfamilien aufgeteilt werden. Alle RTKs haben einen ähnlichen Aufbau: eine Ligandenbindungsdomäne in der extrazellulären Region, eine transmembran-Helix und einen zytoplasmatischen Teil, welcher die Protein-Tyrosinkinase (PTK)-Domäne und zusätzliche regulatorische Sequenzen enthält, die der Autophosphorylierung und Phosphorylierung durch Proteinkinasen unterliegen (Lemmon und Schlessinger, 2010). Mit Ausnahme des Insulin-Rezeptors liegen alle RTKs als Monomere in der Zellmembran vor bis die Bindung eines Liganden die Dimerisierung dieser Rezeptoren induziert, was in einer Autophosphorylierung ihrer zytoplasmatischen Domäne (PTK-Domäne) und somit in der Aktivierung des Rezeptors resultiert. Darüber hinaus ist die Autophosphorylierung auch wichtig für die Rekrutierung und Aktivierung vieler Signal- und Adapterproteine über die *Src homology 2* (SH2)- oder die Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne. (Schlessinger, 2000). Adapterproteine (*Grb2 - growth factor receptor-bound protein 2* oder *Shc - src homology 2 domain containing protein*) binden über diese Domänen und verbinden den Rezeptor mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor *son of sevenless* (Sos), welcher den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) bei der an der Plasmamembran lokalisierten GTPase Ras (*rat sarcoma*) katalysiert und sie dadurch aktiviert. Diese bindet anschließend an ihre Effektoren, in diesem Fall *rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf), und aktiviert diese, wodurch der Mechanismus der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs)-Kaskade Raf/MEK/ERK in Gang gebracht wird (English *et al.*, 1999; Volinsky und Kholodenko, 2013) (siehe Abschnitt 1.1.2.5). Diese Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) kann über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert werden, da Sos auch ein direktes Substrat von ERK1 darstellt (Buday *et al.*, 1995; Volinsky und Kholodenko, 2013). Zudem kann ERK selbst auch den EGF-Rezeptor phosphorylieren und ihn so herunterregulieren (Li *et al.*, 2008).

Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCRs bestehen aus sieben Transmembran-Helices, verbunden über je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. Der extrazelluläre Bereich (N-Terminus) ist verantwortlich für die Bindung von Liganden, wohingegen der intrazelluläre Abschnitt (C-Terminus) mit G-Proteinen, Arrestinen

und anderen Effektoren interagiert. Die Ligandenbindung führt zu einem minimalen Konformationswechsel, welcher das gesamte Protein betrifft und schließlich die Bindung eines G-Proteins ermöglicht (Latek *et al.*, 2012; Latorraca *et al.*, 2017). Heterotrimäre G-Proteine bestehen aus drei heterologen Untereinheiten: α , β und γ . Die nichtkovalente Interaktion von G-Proteinen mit dem aktivierten Rezeptor ermöglicht den Austausch von GDP, gebunden an die α -Untereinheit, zu GTP und daraus resultierend die Dissoziation der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Heterodimer (Simon *et al.*, 1991). Beide Untereinheiten, $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$, sind in der Lage intrazelluläre Signalwege zu regulieren. Die Reaktion zwischen dem Rezeptor und dem G-Protein ist katalytisch, was bedeutet, dass ein GPCR mehrere G-Proteine aktivieren kann, bevor er selber durch phosphorylierungsabhängige Desensitivierung inaktiviert wird (van Biesen *et al.*, 1996).

Diese Desensitivierung zur Termination der Signalweiterleitung von GPCRs erfolgt in der Regel durch Phosphorylierung des Rezeptors über G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRKs) oder *second messenger*-Kinasen (Proteinkinase A - PKA oder Proteinkinase C - PKC). Die PKC/PKA-vermittelte Rezeptor-Phosphorylierung stellt einen klassischen Feedback-Mechanismus dar, wobei das Effektorenzym die Stimulation des eigenen Signals beendet (Lohse, 1993). Dahingegen findet die GRK-vermittelte Phosphorylierung nur am aktivierten Rezeptor statt, was zur Rekrutierung und Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor führt (Benovic *et al.*, 1986; Lohse *et al.*, 1990; Nuber *et al.*, 2016). Diese Interaktion verhindert eine weitere Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen und fördert dessen Internalisierung über den Clathrin-Mechanismus (Ferguson *et al.*, 1996; Lohse *et al.*, 1992; Lohse und Hoffmann, 2014). Weitere Prozesse der Desensitivierung von GPCRs verlaufen über die Degradierung der Rezeptoren in Lysosomen oder die dynamische Regulation derer Gentranskription und -translation. Diese Mechanismen benötigen allerdings mehrere Stunden im Vergleich zu dem sehr rasch stattfindenden Phosphorylierungsprozess (Lohse, 1993; Pierce *et al.*, 2002).

Die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt die Hydrolyse von GTP zu GDP und somit die darauffolgende Reassoziierung der G-Proteine, wodurch die G-Proteine inaktiviert werden (van Biesen *et al.*, 1996). Die $G\alpha$ -Untereinheiten werden abhängig von ihren jeweiligen Effektoren auch in verschiedene Klassen unterteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ (Oldham und Hamm, 2008).

$G\alpha_s$ -Proteine stimulieren die Adenylylzyklase (AC) und vermitteln so einen Anstieg der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Der *second messenger* cAMP aktiviert dann entweder die PKA oder den Ras-Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) (Beebe, 1994; de Rooij *et al.*, 1998). Die PKA phosphoryliert in Kardiomyozyten nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren dann beispielsweise viele Proteine, welche in die Kopplung von Erregung und Kontraktion involviert sind und erhöht somit die myokardiale Kontraktilität (Bers, 2002; Latek *et al.*, 2012). Die G-Proteine der $G\alpha_i$ -Familie dagegen vermitteln eine Rezeptor-abhängige Inhibition der AC und folglich eine Reduktion der cAMP-Produktion (Sunahara *et al.*, 1996). Der $G\alpha_q$ -Signalweg führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). PLC β produziert die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ verursacht die Freisetzung von intrazellulärem

Calcium, woraufhin DAG und das freigesetzte Calcium die PKC aktivieren, welche dann ihre Effektormoleküle phosphoryliert (Pierce *et al.*, 2002). $G_{\alpha_{12}}$ -Proteine aktivieren RhoGEF sowie andere G-Proteine (Latek *et al.*, 2012). Neben den G_{α} -Proteinen sind aber auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Lage Effektormoleküle zu regulieren, so z. B. PLCs, ACs und GRKs (Pierce *et al.*, 2002).

G_{α_q} Signalwege

Für Angiotensin II (Ang II), Endothelin-1 (ET-1) und Katecholamine (α -adrenerg: Noradrenalin und Adrenalin) konnte schon gezeigt werden, dass sie ausreichend sind, um kardiale Hypertrophie zu vermitteln (Nicol *et al.*, 2000). Sie binden an GPCRs, welche an G-Proteine der G_{α_q} Subklasse gekoppelt sind. IP_3 führt zur Mobilisation von internem Calcium, was mit der hypertrophen Signalweiterleitung durch die Calcineurin/ *nuclear factor of activated T cells* (NFAT)-Aktivierung oder die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)-Histon-Deacetylasen (HDACs)-Inaktivierung in Verbindung gebracht werden konnte (siehe Abschnitt 1.1.2.2) (Wilkins und Molkentin, 2004; Wu *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind G_{α_q} -Proteine Induktoren von MAPKs-Signalwegen, welche potent hypertrophes Wachstum einleiten können (Clerk und Sugden, 1999). Die PKC phosphoryliert beispielsweise Raf-1 in dessen Aktivierungsschleife und reguliert so direkt dessen Aktivität, wodurch die MAPK-Kaskade Raf/MEK/ERK initiiert wird (English *et al.*, 1999). Zudem kann die PKC mitunter auch das Raf Kinase inhibitorische Protein (RKIP) phosphorylieren. Dies führt zu dessen Dissoziation von Raf und hebt somit dessen inhibitorische Wirkung auf Raf auf. Phosphoryliertes RKIP assoziiert außerdem mit GRK2, verhindert dadurch zusätzlich die GPCR-Desensitivierung und führt somit zu einer verstärkten ERK-Signalweiterleitung (Lorenz *et al.*, 2003; Yeung *et al.*, 2000). So verwundert es nicht, dass die Inhibition der PKC die Aufhebung einer GPCR-vermittelten Hypertrophie in Mäusen verursacht (Arimoto *et al.*, 2006). Die Aktivierung G_{α_q} -gekoppelter Rezeptoren konnte zudem mit einer Autophosphorylierung von ERK2 an Threonin 188 (Threonin 208 in ERK1, beides in murinem ERK) in Verbindung gebracht werden. Dabei vermittelt diese Phosphorylierung die Aktivierung nukleärer Zielproteine von ERK, welche dafür bekannt sind die hypertrophe Signalweiterleitung zu induzieren (Lorenz *et al.*, 2009a). Außerdem kann freigesetztes Calcium auch die CaMKII aktivieren, was zur Phosphorylierung und Inhibition des Ras-GTPase aktivierenden Proteins (Ras-GAP) führt und Ras-Aktivierung induziert (Chen *et al.*, 1998). Weiterhin dämpft *Regulator of G-protein signaling 2* (RGS2) die G_{α_q} -Signalweitergabe im Herzen und dessen Einfluss auf kardiale Hypertrophie konnte schon dargestellt werden (Heximer *et al.*, 1997): RGS2-defiziente Mäuse entwickeln auf eine erhöhte Druckbelastung eine gesteigerte hypertrophe Antwort. Dabei ist in diesen Mäusen eine vermehrte Calcineurin-Expression sowie eine gesteigerte CaMKII- und MAPKs-Aktivität zu beobachten (Takimoto *et al.*, 2009). Im Einklang damit reduzierte die Überexpression von RGS2 die Phenylephrin-induzierte (G_{α_q} -Stimulus) Hypertrophie von Kardiomyozyten. Die RGS2-Überexpression beeinflusste jedoch nicht eine durch Isoprenalin (β -Adrenorezeptor-Agonist) verursachte Hypertrophie, welche mit der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung in Verbindung gebracht werden konnte (siehe nächsten Abschnitt) (Vidal *et al.*, 2012).

G α_s Signalweiterleitung/ β -adrenerge Signalwege

Der meist vertretene adrenerge Rezeptor im kardialen Gewebe ist der β_1 -Rezeptor, welcher an G α_s gekoppelt ist und somit die AC und daraus resultierend die Produktion von cAMP aktiviert. Die cAMP-abhängige PKA phosphoryliert schließlich diverse Substrate, darunter z. B. L-Typ Calciumkanäle, Phospholamban, Troponin I und den Ryanodin-Rezeptor, die alle an der Calcium-Homöostase in der Zelle beteiligt sind und dadurch Calcium-abhängige Signalwege des Herzens, welche u.a. Hypertrophie vermitteln, beeinflussen (Xiang und Kobilka, 2003). Transgene Mäuse mit einer Überexpression des β_1 -Adrenorezeptors entwickeln eine Hypertrophie der Kardiomyozyten begleitet von einer gesteigerten Kontraktilität (Engelhardt *et al.*, 1999). Genauso führt die transgene Überexpression von kardialem G α_s zu einer gesteigerten kardialen Hypertrophie (Iwase *et al.*, 1996).

PKA und Epac können beide die Aktivierung des *Ras-related protein 1* (Rap1), einer GTPase der Ras-Superfamilie, induzieren, welche die ERK1/2-Kaskade entweder aktiviert oder inhibiert. So kommt es beispielsweise dazu, dass in Zellen, die hauptsächlich B-Raf exprimieren, Rap1 mit B-Raf interagiert und es aktiviert, wohingegen in Zellen, welche nur Raf-1 exprimieren, Rap1 zu einer Inhibition der Kaskade führt (Naor *et al.*, 2000). Des Weiteren kann die PKA selber Raf-1 an Serin 43 und Serin 621 direkt phosphorylieren und so dessen Aktivität reduzieren (Hafner *et al.*, 1994; Mischak *et al.*, 1996). Außerdem existieren Belege dafür, dass die hypertrophen Effekte von Epac die Signalweitergabe von Ras, Calcineurin und der CaMKII beinhalten (Metrich *et al.*, 2008). Auch die Überexpression von RGS2 mindert die β -Adrenorezeptor-vermittelte Synthese von cAMP, die ERK1/2- und Proteinkinase B (AKT)-Aktivierung (siehe Abschnitt 1.1.2.3) sowie eine Hypertrophie von Kardiomyozyten (Nunn *et al.*, 2010). Auch die zuvor schon erwähnte ERK^{Thr188}-Phosphorylierung spielt in der G α_s -Signalweiterleitung eine große Rolle: Die G α_s -Aktivierung durch β -adrenerge Rezeptoren führt zur Aktivierung von ERK1/2 über die AC und infolgedessen zur Autophosphorylierung an Threonin 188. Diese Phosphorylierung verursacht die nukleäre Akkumulation von ERK und somit die Hypertrophie von Kardiomyozyten (Vidal *et al.*, 2012).

Letztlich geht eine chronische Aktivierung des β -adrenergen Systems mit einer Desensitivierung und Herunterregulierung β -adrenerger Rezeptoren, hypertrophem *Remodeling* und schlussendlich einer Verschlechterung der Herzfunktion einher (Bisognano *et al.*, 2000; Engelhardt *et al.*, 1999; Olson, 2004).

G α_i -vermittelt

Da die G α_i -Expressionslevel relativ hoch sind, resultiert die Rezeptor-abhängige Aktivierung in einer Freigabe großer Mengen an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Daher wird eine G α_i -Aktivierung für den hauptsächlichen Mechanismus betrachtet, welcher in einer G $\beta\gamma$ -vermittelten Signalweiterleitung resultiert (Clapham und Neer, 1997; Latek *et al.*, 2012). So deutet vieles darauf hin, dass bei der G α_i -ver-

mittelten ERK1/2-Aktivierung G $\beta\gamma$ -Untereinheiten die entscheidende Rolle für die Signalweiterleitung spielen (Hedin *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 1994). Dies erhärtet die Befunde zu der G $\beta\gamma$ -abhängigen Autophosphorylierung von ERK an Threonin 188, welche als Trigger für pathologische kardiale Hypertrophie identifiziert werden konnte (siehe nächsten Abschnitt) (Lorenz *et al.*, 2009a; Vidal *et al.*, 2012). Eine direkte Aktivierung der ERK-Kaskade durch die G α_i -Untereinheit konnte über eine Aufhebung der Suppression von Raf durch Rap1 mithilfe des Rap-GTPase aktivierenden Proteins (rapGAPII) bestätigt werden (Mochizuki *et al.*, 1999).

G $\beta\gamma$ -vermittelt

G α -Untereinheiten reichen nicht immer aus um diverse Signalwege zu aktivieren, es können darüber hinaus $\beta\gamma$ -Untereinheiten vonnöten sein, wie beispielsweise bei der ERK-Kaskade (Crespo *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass ein Inhibitor von G $\beta\gamma$ s zu einer verbesserten Kontraktilität und einer reduzierten kardialen Hypertrophie führte, verdeutlicht die Relevanz der $\beta\gamma$ -Signalweiterleitung in kardialer Hypertrophie (Casey *et al.*, 2010).

Die G $\beta\gamma$ -vermittelte ERK-Aktivierung erfolgt über eine Tyrosinkinase der Src-Familie. Diese phosphoryliert ein Membran-assoziiertes *Scaffold*-Protein, und zwar entweder eine weitere nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, wie die Pyruvatkinase 2 (Pyk2), oder eine Rezeptortyrosinkinase, wie den *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor (EGFR). Dadurch werden Shc-Grb2-Sos-Komplexe an die Membran rekrutiert (Daub *et al.*, 1996; Dikic *et al.*, 1996). Sos stimuliert dann den Austausch von GDP zu GTP bei Ras, was wiederum die Raf/MEK/ERK-Kaskade in Gang bringt (English *et al.*, 1999). Weitere potentielle Verbindungen zwischen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und dem ERK-Signalweg schließen die Protein-Tyrosin-Phosphatase SH-PTP1 (G $\beta\gamma$ -vermittelte Phosphorylierung/Inhibierung) und Ras-GEF ein, das sowohl durch GPCR-Stimulation als auch durch G $\beta\gamma$ -Co-Expression aktiviert werden kann (Gaits *et al.*, 1996; Mattingly und Macara, 1996). Außerdem spielt die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oberhalb der Sos- oder Ras-Aktivierung in der Signalweiterleitung eine wichtige Rolle in der G $\beta\gamma$ -vermittelten MAPK-Aktivierung (v. a. nach G α_i -Aktivierung) (Hawes *et al.*, 1996). Darüber hinaus assoziieren freie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten auch direkt mit Raf, was die Rekrutierung von Raf an die Membran mit sich bringt und in einer verminderten Signalweitergabe durch die PLC resultiert (Slupsky *et al.*, 1999).

Einen weiteren Beweis für die Rolle von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Vermittlung kardialer Hypertrophie liefert die Studie von Lorenz *et al.* und Vidal *et al.* zu der schon zuvor erläuterten ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung. Die Autoren zeigen, wie nach Stimulation G α_q - und G α_s -gekoppelter Rezeptoren freigelassene G $\beta\gamma$ s an aktivierte ERK-Dimere assoziieren und so das Zustandekommen dieser Autophosphorylierung begünstigen (Lorenz *et al.*, 2009a; Vidal *et al.*, 2012). Dabei ist das Auftreten dieser Autophosphorylierung ursächlich für die Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie (Ruppert *et al.*, 2013).

Weiterleiten von biomechanischem Stress

Zusätzlich zu hypertrophen Ereignissen, die durch Rezeptor-Liganden-Interaktionen initiiert werden, können Kardiomyozyten mechanische Deformation oder Dehnung durch einen internen sensorischen Apparat wahrnehmen. Obwohl bisher wenig über das Wahrnehmen der Kardiomyozyten von biomechanischem Stress und dessen Signalweiterleitung herausgefunden werden konnte, ist dennoch bekannt, dass physische Dehnung von Kardiomyozyten zum Einleiten hypertropher Genexpression führt und einen hypertrophen Phänotypen in der Abwesenheit neurohumoraler Faktoren auslöst (Zou *et al.*, 2002). Ein damit assoziierter Apparat beinhaltet z. B. Integrine, heterodimere Transmembranrezeptoren, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, welche die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett verbinden (Ross und Borg, 2001). So stellt beispielsweise das muskelspezifische Protein Melusin durch Interaktion mit Integrin $\beta 1$ ein wichtiges Signal der Mechanotransduktion dar, indem es die Entwicklung der Herzinsuffizienz durch Inaktivierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) verhindert (siehe Abschnitt 1.1.2.3) (Brancaccio *et al.*, 2003). Ein zweiter Mechanismus verläuft über das LIM-Domänen-Protein MLP (Muskel LIM Protein), welches an spezifische Proteine der Z-Scheiben (Bestandteile des Sarkomers) verankert ist, und durch Beeinflussung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs (siehe Abschnitt 1.1.2.2) kardiales *Remodeling* steuert (Heineke *et al.*, 2005). Unabhängig von Strukturproteinen kann biomechanischer Stress beispielsweise auch direkt über die Assoziation vom Angiotensin II Typ 1-Rezeptor mit der Janus-Kinase 2 (JAK2) an MAP-Kinasen weitergegeben werden, was dann zur Induktion von Hypertrophie führt (Zou *et al.*, 2004).

1.1.2.2 Calcium-abhängige Signalwege

Der Calcineurin/NFAT3-Signalweg

Calcineurin ist eine Calcium-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase, welche unter anderem Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie dephosphoryliert, was zu ihrer nukleären Translokation führt, wo sie Zielgene aktivieren können. Diese Phosphatase hat somit eine herausragende Rolle beim Weiterleiten von Calcium-Signalen hin zu einer zellulären Antwort (Klee *et al.*, 1998). Vieles deutet darauf hin, dass Calcium ein primäres Signal zur Induktion kardialer Hypertrophie darstellt: Die Hypertrophie-Stimuli Ang II, ET-1 und Phenylephrin (PE) aktivieren dabei alle Calcium-abhängige Signalwege (Karliner *et al.*, 1990; Leite *et al.*, 1994; Sadoshima und Izumo, 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl Calcineurin als auch NFAT3 ausreichend sind, um kardiale Hypertrophie zu induzieren (Dirkx *et al.*, 2013; Molkentin *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 2002). Bei intrazellulär ansteigenden Ca^{2+} -Konzentrationen wird Calcineurin durch direkte Bindung von Calcium und Calmodulin aktiviert und dephosphoryliert NFAT3. Dieses transloziert in den Kern und induziert fetale, prohypertrophe, kardiale Gene, indem es direkt mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, *GATA binding protein 4*

(GATA4), interagiert (Molkentin *et al.*, 1998). Die Relevanz dieses Signalweges wird dadurch verdeutlicht, dass die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 sehr effektiv das hypertrophe Wachstum *in vitro* und *in vivo* eindämmen können (Molkentin *et al.*, 1998; Sussman *et al.*, 1998).

Der CaMKII-Signalweg

Die CaMKII ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht wurde (Mattiuzzi *et al.*, 2015). Dabei wurde eine Hochregulation der CaMKII in Herzen herzinsuffizienter Patienten sowie Mäusen beobachtet (Bossuyt *et al.*, 2008; Hoch *et al.*, 1999; Kirchhefer *et al.*, 1999). Sowohl die Überexpression der nukleären Isoform CaMKII δ_B als auch die der zytosolischen Isoform CaMKII δ_C in Maus Herzen führte zu der Entstehung kardialer Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie (Zhang, T. *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). In beiden Modellen verursachte die transgene Überexpression eine Induktion des fetalen Genprogramms. In Übereinstimmung damit konnte in einem genetischen Mausmodell mit einer CaMKII-Inhibition eine kardiale Dilatation und Dysfunktion im Anschluss an einen Myokardinfarkt oder β -adrenerge Stimulation verhindert werden (Zhang *et al.*, 2005). Mechanistisch vermittelt die CaMKII ihre hypertrophen Effekte über die Phosphorylierung von Klasse II-HDACs (Bucks *et al.*, 2006) (näheres siehe Abschnitt 1.1.2.4).

1.1.2.3 Der PI3K/AKT-Signalweg

Phosphoinositid-3-Kinasen werden durch Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen mit IGF, FGF oder TGF, aber auch durch GPCRs aktiviert. Ein wichtiges Zielmolekül der PI3Ks ist die Serin/Threonin-Kinase AKT, welche nach Aktivierung durch Binden von PI3K an die Membran transloziert (Rohini *et al.*, 2010). Zur vollständigen Aktivierung muss AKT noch weiter durch die *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) phosphoryliert werden (Alessi *et al.*, 1997). Für PI3K und AKT konnte gezeigt werden, dass sie das Wachstum des Herzens stimulieren (Matsui *et al.*, 2002; Shioi *et al.*, 2000; Shioi *et al.*, 2002). Während kurzzeitige AKT-Aktivierung sogar kardiale Hypertrophie mit erhaltener oder sogar verbesserter linksventrikulärer Funktion auslöst, kann eine lang andauernde Aktivierung auch zu einer kardialen Dysfunktion führen (Kim *et al.*, 2003; Shiojima *et al.*, 2005). AKT reguliert dabei mindestens zwei Zielproteine der hypertrophen Signalweiterleitung: *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und GSK-3 (Aoyagi und Matsui, 2011; Heineke und Molkentin, 2006). mTOR aktiviert wichtige Regulatoren der Translation, wie *ribosomal protein S6 kinase beta-1* (p70S6 Kinase) und *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4EBP1/eIF4E), und erhöht so die Proteinsynthese. GSK-3 β phosphoryliert Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie, was zu deren Translokation in das Zytoplasma führt, wo diese inaktiv sind. AKT phosphoryliert und inhibiert somit GSK-3 β (Frey *et al.*, 2004). Zudem werden noch weitere Transkriptionsfaktoren, welche mit hypertropher Signalweiterleitung in Verbindung gebracht werden, von GSK-3 β reguliert, so z. B. auch das zuvor erwähnte GATA4 (Morisco *et al.*, 2001).

1.1.2.4 Transkriptionelle Kontrolle durch MEF2/HDAC

Der Transkriptionsfaktor *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) verbindet viele Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Signalwege und ist somit ein gemeinsames Zielmolekül verschiedenster hypertropher Stimulatoren (Dirkx *et al.*, 2013; Frey und Olson, 2003; Mattiazzi *et al.*, 2015). MEF2 wird durch eine Vielzahl von Signalwegen, einschließlich MAPKs und Calcineurin, reguliert. Dabei wird die transkriptionelle Aktivität von MEF2 durch andere Transkriptionsfaktoren (GATA4, NFAT) weiter gesteigert (McKinsey *et al.*, 2002; Youn *et al.*, 2000). Zudem wird die Aktivität von MEF2 auch über eine direkte Assoziierung mit HDACs kontrolliert. HDAC-Enzyme werden in drei Hauptgruppen unterteilt: Klasse I-HDACs 1, 2, 3 und 8, Klasse II-HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 sowie Klasse III-HDACs. Die Klasse II-HDACs werden präferentiell in gestreifter Muskulatur exprimiert und mit kardialer Hypertrophie in Verbindung gebracht (Frey und Olson, 2003; Heineke und Molkentin, 2006). HDACs deacetylieren nucleosomale Histone und induzieren dadurch die Kondensation von Chromatin und die transkriptionelle Repression durch Bindung spezieller Transkriptionsfaktoren, wie z.B. MEF2 (Lehmann *et al.*, 2014; McKinsey *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Klasse II-HDACs durch CaMKII und andere Kinasen löst deren Assoziation mit MEF2, was in einer Derepression der transkriptionellen Aktivität und dem nukleärem Export von HDACs resultiert. HDACs inhibieren damit die hypertrophe Signalweiterleitung und dienen sozusagen als eine „Bremse“ für das myokardiale Wachstum (Frey *et al.*, 2004; Zhang, C.L. *et al.*, 2002).

1.1.2.5 MAP-Kinasen-Signalwege

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)-Signalwege stellen eine wichtige Verbindung zwischen externen Stimuli und dem Zellkern dar, da sie eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit regulieren. (Frey und Olson, 2003). MAPKs sind vor circa 30 Jahren entdeckt worden und in allen Eukaryoten konserviert (Ramos, 2008). Ihre Signalwege bestehen aus einer Sequenz erfolgreich funktionierender Kinasen, was letztendlich in der zweifachen Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs), p38 Kinasen und ERKs resultiert. In Kardiomyozyten werden MAPKs-Kaskaden durch GPCRs, Rezeptortyrosinkinasen (IGF-1- und FGF-Rezeptoren), Serin/Threonin-Kinasen-Rezeptoren (TGF- β), gp130-Rezeptoren (Cardiotrophin-1) und Stress, wie z. B. Dehnung, ausgelöst (Heineke und Molkentin, 2006). Die MAPKs-Kaskaden sind Module aus je drei Kinasen, welche sich gegenseitig sequentiell phosphorylieren: MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK/MAP3K), MAP Kinase Kinase (MAPKK/MAP2K), MAP Kinase (MAPK) (siehe Abbildung 4). Die MAPK, also das letzte Mitglied dieses Moduls, ist eine Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinase, welche prohypertrophe Transkriptionsfaktoren und Gene aktivieren kann (Nicol *et al.*, 2000). Diverse MAP3Ks bilden ein komplexes Netzwerk aus Kinasen, welche entweder direkt auf Stressstimulation reagieren oder durch andere MAPKKKKs (MAP4K) oder G-Proteine der Rho-Familie (Ras, Rac, Rho, CDC42) reguliert werden (Heineke und Molkentin, 2006). Während p38 MAPKs und JNKs als durch Stress aktivierbar gelten (nicht nur anabol, sondern auch durch pathologischen Stress aktivierbar),

sind ERKs als anabole MAPKs bekannt, die auf Wachstum-assoziierte Signale reagieren (Rohini *et al.*, 2010).

Die Überexpression der MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1), welche alle der drei beschriebenen MAPK-Zweige inhibiert, minderte *in vitro* und *in vivo* das Entstehen einer kardialen Hypertrophie (Bueno *et al.*, 2001). Dies demonstriert die wichtige Rolle dieser Signalwege in der hypertrophen Signalweiterleitung. Während die JNK-Aktivität spezifisch nach einer Druck-Überlastung hochreguliert ist, wird die p38-Aktivität deutlich in Herzen induziert, die einer Volumen-Überlastung ausgesetzt werden (Wang, 2001). Genauso ist bekannt, dass auch ERK1/2 durch eine Nachlasterhöhung, hervorgerufen durch Ligand des Aortenbogens, aktiviert werden (Rapacciuolo *et al.*, 2001; Takeishi *et al.*, 2001).

Aktivierte ERK1/2 induzieren ein Umprogrammieren der Genexpression und initiieren damit einhergehend Zellwachstum, Proliferation, Zelldifferenzierung und anti-apoptotische Effekte. Zahlreiche Studien belegen die Beteiligung der MAPKs ERK1/2 an der Entstehung kardialer Hypertrophie (Bueno *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2009b; Muslin, 2008; Wang, 2007).

Die hypertrophen molekularen Mechanismen, welche durch die ERK1/2-Aktivierung in Gang gebracht werden, beruhen vor allem auf der Phosphorylierung nukleärer Transkriptionsfaktoren und –aktivatoren, wie Elk-1 (*E twenty six-like 1 transcription factor*), welches *immediate early genes* aktiviert, und GATA4 (Babu *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2001; Morimoto *et al.*, 2000). Außerdem stimulieren ERK1/2 die transkriptionellen Co-Aktivatoren p300 und CBP, deren Aktivität z. B. für die ANF-Expression mitentscheidend ist (Gusterson *et al.*, 2002; Mutlak und Kehat, 2015). ERK1/2-Aktivierung wird auch mit der Aktivierung der p70 S6 Kinasen 1 und 2 assoziiert, die an der Regulation der Translationseffizienz und folglich Akkumulation von Proteinen während hypertrophen Wachstum beteiligt sind (Iijima *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Zusätzlich zu der Fähigkeit, die Proteinsynthese zu beeinflussen, konnte auch gezeigt werden, dass ERK1/2 die ribosomale RNA-Transkription durch direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors UBF (*upstream binding factor*) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren regulieren (Stefanovsky *et al.*, 2001)(Abbildung 4).

Die MAPKs ERK1/2 und deren Funktion im Herzen und bei pathologischen Mechanismen werden im Verlauf dieser Arbeit noch eingehend diskutiert (siehe vor allem Abschnitt 1.2).

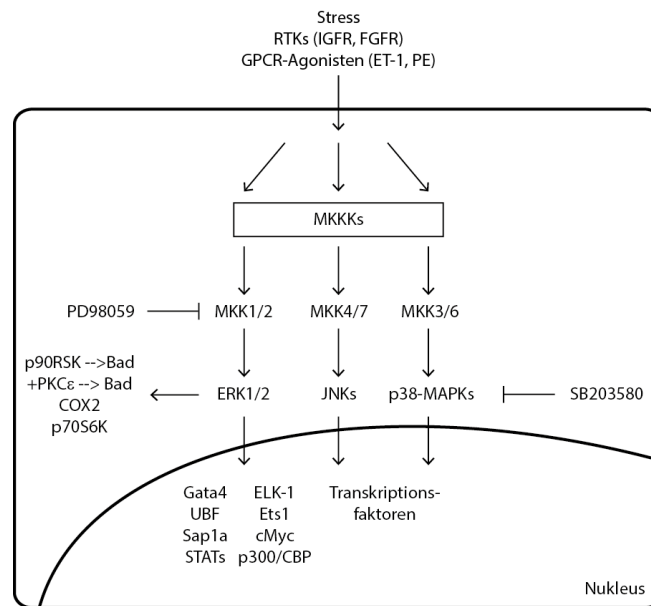


Abbildung 4: MAPKs-Signalwege

Die MAPK-Signalwege werden durch hypertrophe Stimulation aktiviert. Die am besten beschriebenen Signalwege sind die ERK1/2-, JNK- und p38-MAPK-Signalwege. Jeder MAPK-Signalweg besteht aus drei sich aufeinanderfolgend phosphorylierenden Kinasen, wobei die Effektor-Kinasen in den Zellkern translokieren und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren. Adaptiert nach Bueno und Molkentin, 2002 und Nicol et al., 2000.

1.1.3 Unterschiede zwischen pathologischer und physiologischer Hypertrophie

Abgesehen von einem vergleichbaren Anstieg der Herzmasse werden physiologische und pathologische Hypertrophie mit verschiedenen Merkmalen auf struktureller, metabolischer und biochemischer Ebene assoziiert (Bernardo *et al.*, 2010). Dabei wird die Vergrößerung des Herzens aufgrund des postnatalen Wachstums (bis auf das 3-fache des Kardiomyozytenumfangs), Ausdauersport und Schwangerschaft als physiologische Hypertrophie bezeichnet, da in diesen Fällen vor allem eine normale Herzfunktion erhalten bleibt und dieser adaptive Prozess sogar von Vorteil ist (Shimizu und Minamino, 2016). Während die pathologische Hypertrophie mit erhöhter Fibrose und Apoptose einhergeht, was die Kontraktilität des Herzens einschränkt, ist die myokardiale Struktur eines „Sportlerherzens“ durch eine ausbalancierte Hypertrophie der Kardiomyozyten, verbunden mit Neoangiogenese, gekennzeichnet (Bernardo *et al.*, 2010; Ellison *et al.*, 2012). Physisches Training steigert den koronaren Blutfluss, den Arterien Durchmesser sowie die Kapillardichte (Heiss *et al.*, 1976; Laughlin *et al.*, 2012; Oka *et al.*, 2014; Pelliccia *et al.*, 1990).

Physiologische Hypertrophie kann sich als exzentrische oder konzentrische Hypertrophie entwickeln. Während Ausdauersportler eine erhöhte Wanddicke mit signifikanter Dilatation des linken Ventrikels aufweisen (exzentrische Hypertrophie), entwickeln Kraftsportler höchstens eine moderate Dilatation des linken Ventrikels (konzentrische Hypertrophie) (Ellison *et al.*, 2012; Pelliccia *et al.*, 1991). Ein entscheidender Faktor der physiologischen Hypertrophie ist zudem ihre Reversibilität nach Schwangerschaft oder Trainingsende (Maillet *et al.*, 2013).

Dabei bestimmt nicht zwangsläufig die Dauer des hypertrophen Signals den Unterschied zwischen pathologischer und physiologischer Hypertrophie. Es ist vielmehr die molekulare Signatur des überlasteten Herzens, also nicht die hypertrophe Reaktion *per se*, welche zur hypertrophen Adaption oder Dekompensation führt (Perrino *et al.*, 2006).

In gesunden Herzen erfolgt die Energiegewinnung hauptsächlich aus der Oxidation von Fettsäuren (60-70% der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion). Glukose- und Laktat-Metabolismus tragen zu circa 30% der ATP-Synthese bei, wobei das Herz in der Lage ist, die Energiesubstrate abhängig von der Arbeitslast und der Bereitstellung der Moleküle im Blutkreislauf zu ändern (van der Vusse *et al.*, 1992). Bei pathologischer Hypertrophie finden eine Abnahme der Fettsäuren-Oxidation und eine Zunahme des Glukose-Metabolismus statt, was wie ein sinnvoller adaptiver Mechanismus erscheint, der es dem Herzen ermöglicht mehr ATP pro Sauerstoffmolekül zu produzieren (Allard *et al.*, 1994; van Bilsen *et al.*, 2009). Im Kontrast dazu ist der Metabolismus der physiologischen Hypertrophie, induziert durch physisches Training, durch einen Anstieg der Fettsäuren- und Glukoseoxidation charakterisiert (Gertz *et al.*, 1988).

Auch auf molekularer Ebene lassen sich zwischen den zwei Formen der Hypertrophie deutliche Unterschiede erkennen. Pathologische Hypertrophie wird begleitet von einer veränderten Expression kontraktile Proteine (α - und β -MHC), einer Induktion des fetalen Gen-Programms und einer Herunterregulierung Calcium-regulierender Proteine (wie die *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a* - SERCA2a) (Bernardo *et al.*, 2010). Im Prozess der physiologischen Hypertrophie wird sowohl die SERCA2a- als auch die CaMKII-Aktivität hochreguliert, was das Calcium-*Handling* von Kardiomyozyten verbessert und so deren Kontraktilität steigert (Ellison *et al.*, 2012). Während pathologische Hypertrophie des Weiteren hauptsächlich durch neuroendokrine Hormone, wie ET-1 und Ang II (siehe Abschnitt 1.1.2), vermittelt wird, scheint physiologische Hypertrophie durch andere Stimuli (Schilddrüsenhormone, Insulin, Wachstumsfaktoren, wie IGF-1) aktivierbar zu sein. Der IGF-1 induzierte PI3K/RAC-alpha AKT-vermittelte Signalweg wird dabei als hauptsächlichlicher Mechanismus der physiologischen Hypertrophie angesehen (Ellison *et al.*, 2012; Maillet *et al.*, 2013). Erhöhte kardiale IGF-1-Expression und Aktivierung des PI3K-Signalwegs sind mit Hypertrophie und verbesserter systolischer Funktion bei Ausdauersport verbunden, wobei keine Apoptose zu beobachten ist (McMullen *et al.*, 2004; Neri Serneri *et al.*, 2001).

Tabelle 1: Merkmale pathologischer und physiologischer Hypertrophie.

Merkmal	Pathologische Hypertrophie	Physiologische Hypertrophie
Stimulus	Krankheit Druck- oder Volumenbelastung Kardiomyopathie	Sport Postnatales Wachstum Schwangerschaft
Morphologie	Erhöhtes Kardiomyozytenvolumen Ausbildung neuer Sarkomerstrukturen Gestiegene Herzmasse	Erhöhtes Kardiomyozytenvolumen Ausbildung neuer Sarkomerstrukturen Gestiegene Herzmasse
Kardiale Fibrose	Ja	Nein
Apoptose	Ja	Nein
Fetales Gen-Programm	Aktiviert	Relativ unbeeinflusst
Kontraktile Proteine	Herunterregulierung von SERCA2a, α -MHC	Normal oder erhöht
Kardiale Funktion	unterdrückt	Normal oder erhöht
Metabolismus	Verringerte Fettsäuren-Oxidation Erhöhter Glukose-Bedarf	Erhöhte Fettsäuren-Oxidation Erhöhter Glukose-Bedarf
Reversibel	Nein	Ja
Assoziation mit Herzinsuffizienz und Sterblichkeit	Ja	Nein

Adaptiert nach Bernardo et al., 2010.

1.1.4 **Remodeling in pathologischer kardialer Hypertrophie**

Mit linksventrikulärem *Remodeling* sind im Allgemeinen kompensatorische Umbauprozesse bezüglich der Größe des Ventrikels, dessen Form und Funktion bezeichnet, welche durch mechanische, neurohumorale oder genetische Faktoren bestimmt werden. Ein charakteristischer Prozess ist hierbei die Hypertrophie des Ventrikels (Sutton und Sharpe, 2000). Es gehen damit aber auch viele andere Mechanismen einher, wie z.B. Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten, interstitielle Fibrose und Inflammation (Burchfield *et al.*, 2013). Das geometrische Ausmaß kardialen *Remodelings* kann mit verschiedenen Bildgebungsverfahren (Echokardiographie, Magnetresonanztomographie – MRT) und unter Berücksichtigung der linksventrikulären Masse sowie des linksventrikulären Volumens bestimmt werden. Leider schreitet ohne therapeutisches Eingreifen das *Remodeling* oft ohne klinisch erkennbare Symptome voran, bis sich schließlich die Herzfunktion verschlechtert und sich dies irreversibel in Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz manifestiert (Gjesdal *et al.*, 2011).

1.1.4.1 **Myokardialer Zelltod**

Bei pathologischer Hypertrophie sind drei verschiedene Varianten des Zelltods involviert: Nekrose, Apoptose und Autophagie (Moe und Marin-Garcia, 2016).

Apoptose ist ein hochregulierter und energieabhängiger Prozess, der einem programmierten Ablauf folgt („programmierter Zelltod“). Nekrose beschreibt dahingegen degenerative Veränderungen,

welche akut auf jegliche Art von Zelltod folgen (Kunapuli *et al.*, 2006). Autophagie ist ein ebenso hochkonservierter Mechanismus, bei dem intrazelluläre Komponenten, wie Mitochondrien, in Autophagosomen zu Lysosomen transportiert werden, um dort degradiert zu werden. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Autophagie bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz auftritt, ist die zugrundeliegende Rolle noch relativ unklar (Chiong *et al.*, 2011; Kostin *et al.*, 2003; Laurent *et al.*, 2015).

Apoptotische Zellen unterlaufen einem Schrumpfen des Zytoplasmas, einer Blasenbildung an der Plasmamembran, einer nukleären Kondensation und einer späteren Fragmentierung der ganzen Zelle in Vesikeln, welche dann durch Makrophagen oder benachbarte Zellen phagozytiert werden (Whelan *et al.*, 2010). Dieser Prozess kann auf unterschiedliche Arten initiiert werden. Bei dem *extrinsischen* Signalweg werden Oberflächenrezeptoren, wie Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Typ I, aktiviert, beim *intrinsischen* Signalweg sind Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum involviert (Chiong *et al.*, 2011; Moe und Marin-Garcia, 2016). Gerade in Kardiomyozyten ist der intrinsische Signalweg stark reguliert. Sie exprimieren verschiedene Mitglieder der *B-cell lymphoma* (Bcl)-2-Familie, welche Modulatoren für apoptotische Prozesse sind (Chiong *et al.*, 2011; Hengartner, 2000). Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg führen schließlich zu einer Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind Cystein-Proteasen und Bestandteil einer Enzymkaskade zum Einleiten der Apoptose. Es werden zunächst die Initiator-Caspasen aktiviert (Procaspase-2, -8, -9, -10, durch Dimerisierung und Autoproteolyse: Procaspase in Caspase), welche dann die Effektor-Caspasen (Procaspase-3, -6, -7) spalten. Das apoptotische Signal wird so durch die enzymatische Aktivität der Caspasen in der Zelle weitergeleitet und vervielfältigt (Boatright *et al.*, 2003; Boatright und Salvesen, 2003; Hengartner, 2000). Im Herzen findet Apoptose aufgrund der geringen Proliferationsrate von Kardiomyozyten nur sehr selten statt (Apoptoserate <1%), so dass auch ein minimaler Anstieg der Apoptoserate schwerwiegend ist (van Empel *et al.*, 2005). Jedoch ist bekannt, dass die Apoptose einen zentralen regulatorischen Mechanismus darstellt, welcher in dem adaptiven Mechanismus, hervorgerufen durch eine Druck-Überlastung, involviert ist. So ist die Apoptose auch ein Bestandteil der initialen Phase des kardialen *Remodelings* und geht mit hypertrophem Wachstum einher (Teiger *et al.*, 1996). Dieselben Neurohormone, welche eine kompensatorische Hypertrophie aufgrund hämodynamischer Belastung auslösen, stimulieren auch den apoptotischen Signalweg (Adams *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1995; Cigola *et al.*, 1997; Dorn und Brown, 1999; Singh *et al.*, 2000), wodurch sich das klinische Erscheinungsbild noch weiter verschlechtert.

Im Gegensatz zum Schrumpfen der apoptotischen Zellen schwellen nekrotische Zellen an. Dies geschieht infolge des Verlustes der Integrität ihrer Plasmamembran, da es während des Prozesses der Nekrose zu einer Aktivierung von Phospholipasen sowie Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Dabei kollabiert die gesamte zelluläre Homöostase und die ausgeschwemmten Zellbestandteile erzeugen eine inflammatorische Reaktion. Nekrose wird eingeleitet durch Todesrezeptoren, ROS, Calcium und die *Mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) (Konstantinidis *et al.*, 2012; Kroemer *et al.*, 2007; Vanlangenakker *et al.*, 2008; Whelan *et al.*, 2010). Nekrose von

Kardiomyozyten wird schon sehr lange als die entscheidende Form des Zelltods bei dekompensierender Hypertrophie, vor allem unter ischämischen Bedingungen, diskutiert. Da bei pathologischer kardialer Hypertrophie der Anstieg des Kardiomyozytendurchmessers und die weiteren Umbauprozesse, wie verringerte Kapillardichte und Fibrose, die Sauerstoffbereitstellung in die Myozyten erschweren, kommt es zur Initiation von Nekrose (Diwan und Dorn, 2007).

Obwohl alle der beschriebenen Arten des Zelltodes während der Pathogenese der kardialen Hypertrophie auftreten, bleibt noch ungeklärt, ob sie klar abgegrenzte Prozesse sind oder ein Kontinuum von sich überschneidenden biochemischen Ereignissen darstellen (Burchfield *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Kardiale Fibrose

Im Rahmen der Strukturveränderungen während des pathologischen kardialen *Remodelings* ist auch eine erhöhte Ablagerung an extrazellulärer Matrix im kardialen Gewebe zu beobachten (Fibrose), was zu einer Gefährdung der elektrischen Erregungsweiterleitung und somit Verschlechterung des Pumpvermögens des Herzens führt (Creemers und Pinto, 2011; Eghbali und Weber, 1990).

Die extrazelluläre Matrix wird von kardialen Fibroblasten sezerniert und bildet das strukturelle Rückgrat des Herzens (Schiattarella und Hill, 2015). Sie besteht aus Makromolekülen (hauptsächlich Kollagen I und III) und dient vorrangig der Bereitstellung eines strukturellen Netzwerks zur Übertragung der Kraft, ausgehend von einzelnen Myozyten hin zu einer organisierten systolischen Kontraktion des gesamten Herzens (Kong *et al.*, 2014). Darüber hinaus trägt die extrazelluläre Matrix zur passiven Steifheit in der Diastole bei und verhindert so eine Überdehnung und Gewebedeformation während sich der Ventrikel füllt (Burchfield *et al.*, 2013; Creemers und Pinto, 2011). Unter pathologischen Stressbedingungen, z.B. durch humorale Stimulation (TGF- β , ET-1, Ang II), proliferieren Fibroblasten, differenzieren zu Myofibroblasten und können dann Kollagen sezernieren (Spinale, 2007; Travers *et al.*, 2016).

Pathologische kardiale Hypertrophie ist eng mit der Fibrosierung des Gewebes verknüpft (Kamo *et al.*, 2015). So korreliert z.B. der Grad an Fibrose mit dem Ausmaß linksventrikulärer Hypertrophie und einer verschlechterten Ejektionsfraktion (Boluyt und Bing, 2000). Während in der initialen Phase der pathologischen Hypertrophie die erhöhte Kollagenablagerung durch die Hypertrophie von Kardiomyozyten ausgeglichen werden kann, kommt es im weiteren Verlauf zu einer exzessiven interstitiellen und perivaskulären Fibrose und damit einhergehend zu einer myokardialen Versteifung (Bishop und Lindahl, 1999; Thiedemann *et al.*, 1983). Fibrose beeinträchtigt die elektromechanische Kopplung von Kardiomyozyten und führt zur Hypoxie dieser Zellen aufgrund einer verringerten Kapillardichte und einer erhöhten Sauerstoff-Diffusions-Distanz (Sabbah *et al.*, 1995). Ein exzessives Maß an Fibrose resultiert somit in einem gesteigerten Risiko für Arrhythmien und einer ventrikulären Dysfunktion (Swynghedauw, 1999; Travers *et al.*, 2016).

1.2 Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2

1.2.1 Therapeutische Zielstrukturen der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade

1.2.1.1 Die Rolle der ERK-Signalkaskade in kardialer Hypertrophie

Der Einfluss des ERK-Signalweges auf Hypertrophie in Kardiomyozyten ist in einigen Studien untersucht worden (Mutlak und Kehat, 2015). So führte die kardiale Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von Ras (H-v12-Ras) zu linksventrikulärer Hypertrophie, verbunden mit verringerter Kontraktilität und systolischer Funktion sowie Induktion des fetalen Genprogramms und plötzlichem Tod (Mitchell *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2004). Versuche mit dem MEK-Inhibitor PD98059 konnten dies bestätigen, da hier die Agonist-induzierte Aktivität des BNP-Promotors (hypertropher Marker) reduziert werden konnte (Liang *et al.*, 2000). Die stabile Überexpression einer Mutante der MAP2K MEK1 (MEK1^{S217E,S221E}) induzierte linksventrikuläre Hypertrophie begleitet von einer verbesserten systolischen, aber reduzierten diastolischen Funktion und erhöhter Expression hypertropher Marker (ANF, BNP, α -Aktin des Skelettmuskels, β -MHC) (Bueno *et al.*, 2000). Dass die Tiere mit dieser konstitutiv aktiven MEK-Mutante eine erhöhte systolische Funktion aufwiesen und keine kardiotoxischen Effekte sichtbar waren, lässt auf alternative, ERK-unabhängige Signalwege von Ras schließen (Wang, 2007). Weiterhin ist denkbar, dass aktiviertes H-v12-Ras weitere modulatorische Proteine, wie G β -Untereinheiten, rekrutiert, welche einen Einfluss auf die Funktion der Raf/MEK/ERK-Kaskade haben (Lorenz *et al.*, 2009b; Slupsky *et al.*, 1999). Eine generelle Aktivierung der gesamten Kaskade durch solche regulatorischen Proteine könnte dann durch eine konstitutive Aktivierung nachgeschalteter Kinasen, wie MEK1^{S217E,S221E}, umgangen werden.

Im Gegensatz zu den *gain-of-function* Versuchen konnte mit einer herzspezifischen Überexpression einer dominant negativen Mutante der MAP3K Raf, Raf-1^{K375H}, eine reduzierte hypertrophe Antwort und Gen-Induktion während einer Nachlastserhöhung gezeigt werden (Harris *et al.*, 2004). Trotzdem stiegen bei diesen transgenen Tieren die Sterberate sowie die Apoptose in den Kardiomyozyten. Die ERK1/2-Aktivität war in diesen Mäusen reduziert, was nahelegt, dass Raf-1 notwendig für die Entstehung kardialer Hypertrophie und das Zellüberleben bei Drucküberlastung ist (Lorenz *et al.*, 2009b). Auch die Expression der MKP-1, welche direkt die Stärke und Dauer der MAPK-Aktivierung reguliert, verhindert kardiale Hypertrophie *in vitro* und *in vivo* (Bueno *et al.*, 2001).

Die Komplexität hypertropher Mechanismen wird durch einen Ansatz verdeutlicht, in dem Mäuse mit einer Genablation beider ERK1-Allele und eines ERK2-Allels (ERK1^{-/-}, ERK2^{+/-}) untersucht wurden. Die Mäuse wiesen ein normales hypertrophes Wachstum auf (Purcell *et al.*, 2007). Allerdings kann hier zum einen durch das noch vorhandene Allel eine Restaktivität an ERK2 nicht ausgeschlossen werden, zum anderen ist durch die hohe embryonale Letalität dieser Mäuse denkbar, dass die überlebenden Mäuse das Fehlen durch andere Gene kompensiert haben (Lorenz *et al.*, 2009b). In einem weiteren Versuch die ERK-Aktivität zu hemmen, wurde die dualspezifische Phosphatase 6 (DUSP6),

eine ERK1/2-spezifische Phosphatase, herangezogen. Eine herzspezifisch induzierbare Expression von DUSP6 reduzierte die ERK1/2-Aktivierung nach Aortenligation oder Phenylephrin-Infusion, während die Phosphorylierung anderer MAPKs (p38, JNK, ERK5) unverändert blieb (Purcell *et al.*, 2007). Zudem waren Fibrose und Apoptose in den Herzen dieser Mäuse erhöht, was auf eine protektive Rolle von ERK1/2 unter Stress-Bedingungen hindeutet. Diese Beobachtungen werden durch weitere Studien bekräftigt, in der die Relevanz einer Autophosphorylierung von ERK (an T188 in murinem ERK2) für das Zustandekommen pathologischer Hypertrophie herausgearbeitet wurde (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Die Autoren zeigten dabei auch, wie die Hemmung des ERK-Signalwegs durch den MEK-Inhibitor PD98059 zu einem Anstieg der Apoptose in Kardiomyozyten führt (Ruppert *et al.*, 2013).

Tatsächlich belegen einige Studien diese protektive Rolle des MEK-ERK-Signalwegs im Herzen, vor allem hinsichtlich dessen anti-apoptotischer Eigenschaften (Wang, 2007). Wachstumsfaktoren und andere MAPK-stimulierende Stoffe zeigen anti-apoptotische Eigenschaften in Verbindung mit einer gesteigerten ERK-Aktivität (De Windt *et al.*, 2000; Parrizas *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1997). Zudem schwächen pharmakologische Inhibitoren der MEK- oder ERK-Aktivität diese protektiven Effekte (Sugden und Clerk, 2006; Wang, 2007). *In vivo* sind MEK-transgene Herzen vor Schäden durch Ischämie/Reperfusion und Apoptose von Kardiomyozyten geschützt (Lips *et al.*, 2004). Damit verbunden führt die Inhibition von Raf-1 zu Apoptose in Kardiomyozyten und dekompensierter Herzinsuffizienz (Harris *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2004). Auch die direkte, genetische Inhibition von ERK2 fördert zellulären Schaden und Tod nach Ischämie/Reperfusion (Lips *et al.*, 2004).

Obwohl die protektive Rolle des Raf/MEK/ERK-Signalwegs durch viele Studien belegt werden konnte, ist wenig darüber bekannt, wie eine ERK-Aktivierung in zellulärer Protektion resultiert. In Kardiomyozyten wurde die Cyclooxygenase-2 (COX-2) als möglicher Mediator des protektiven ERK-Signalweges identifiziert und in T-Zellen wurde die Aktivierung von ERK mit der Induktion der Expression des FLICE (*FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme*)-inhibitorischen Proteins, einem Inhibitor der Caspase-Kaskade, in Verbindung gebracht (Adderley und Fitzgerald, 1999; Yeh *et al.*, 1998). Ein weiterer möglicher Mechanismus kann die Assoziation von ERK1/2 mit der PKC ϵ sein, welche ein gut beschriebener Mediator kardialer Protektion ist (Bueno und Molkentin, 2002). Die MAPKs ERK formen mit PKC ϵ einen Komplex in Mitochondrien, was zur Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2-Familie, führt (Baines *et al.*, 2002). Zusätzlich können ERK1/2 direkt die p90 ribosomalen S6 Kinasen (p90RSKs) phosphorylieren, welche das Zellüberleben durch die Phosphorylierung von Bad beeinflussen (Smith *et al.*, 1999; Valks *et al.*, 2002). Auch die direkte Phosphorylierung und die daraus resultierende Degradierung des pro-apoptotischen Proteins Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*)_{EL}, ebenfalls ein Mitglied der Bcl-2-Familie, durch ERK1/2 reduziert die apoptotische Signalweiterleitung (Ley *et al.*, 2003; Luciano *et al.*, 2003). Des Weiteren könnte auch die ERK1/2-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA4 eine Rolle spielen, da GATA4 unter anderem die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x(L) erhöht (Kitta *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass

die Initiator-Caspasen 8 und 9, zentrale Schlüsselemente zum Einleiten der Apoptose, durch ERK1/2 gehemmt werden können (Allan *et al.*, 2003; Holmstrom *et al.*, 2000; Soderstrom *et al.*, 2002) (Abbildung 4).

Zusammenfassend besitzt die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung im Herzen. Die Kaskade hat eine protektive anti-apoptotische Funktion und kann zudem Hypertrophie vermitteln.

1.2.1.2 Die Rolle der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade in Krebs

Da die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade eine herausragende Bedeutung in der Signalweiterleitung und damit einhergehend in vielen zellulären Prozessen innehat, ist es nicht verwunderlich, dass ihre Komponenten potentielle therapeutische Zielstrukturen darstellen. So weiß man, dass einige Mitglieder dieser Kaskade im Rahmen von Krebserkrankungen oft Mutationen aufweisen. Beispielsweise exprimieren rund ein Drittel aller Tumore eine konstitutiv aktive, mutierte Form von Ras und ungefähr 8% der Tumore eine aktivierte Form von B-Raf (Samatar und Poulikakos, 2014). Die prominenteste Mutation von B-Raf ist beispielsweise B-RafV600E, für die bekannt ist, dass sie unterschiedliche Krebsarten auslösen kann (Maurer *et al.*, 2011). Die übermäßige Aktivität der Kaskade trägt ganz entscheidend zu onkogenen Eigenschaften, wie Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Steigerung von Proliferation und Überleben bei (Montagut und Settleman, 2009). All diese Tatsachen machen die ERK-Kaskade zu einem attraktiven Ziel für die Entwicklung von Therapeutika.

Etliche Bemühungen blieben erfolglos, aktiviertes Ras als Zielstruktur für eine Therapie zu verwenden, was zu dem Schluss führte, dass Ras wohl keinen geeigneten Angriffspunkt darstellt, daher konzentrierte man sich in der Arzneimittelentwicklung auf dessen nachgeschaltete Kinasen Raf und MEK (Sebolt-Leopold, 2008). Die Raf-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib sowie der MEK-Inhibitor Trametinib konnten sich in der Therapie metastasierender Melanome mit einer B-Raf Mutation beweisen (Samatar und Poulikakos, 2014). Der EGF-Rezeptor ist bei Krebs ein starker Aktivator des ERK-Signalwegs. Daher wird die ERK-Aktivierung auch als Biomarker für die Potenz eines EGFR-Inhibitors herangezogen. Eine gesteigerte EGFR-Aktivität tritt häufig bei Brustkrebs oder kolorektalen Tumoren auf. Hierbei war Cetuximab der erste zugelassene monoklonale Antikörper, welcher die extrazelluläre Domäne des EGFR erkennt. Der komplett humanisierte Antikörper Panitumumab ist eine Weiterentwicklung und wird in der Therapie metastasierender kolorektaler Karzinome eingesetzt (Roberts und Der, 2007).

1.2.2 Die MAP3K Raf

Die Raf-Isoformen A-Raf, B-Raf und Raf-1 sind die am besten studierten MAP3K und regulieren am häufigsten und selektivsten den ERK-Signalweg (Raman *et al.*, 2007). Raf-Aktivierung beinhaltet allgemein eine Aufhebung der Inhibition der katalytischen Domäne durch die N-terminale regulatori-

sche Domäne von Raf (bestehend aus einer Ras-Bindungsdomäne und einer Cystein-reichen Domäne verantwortlich für die Interaktion mit der Kinase-Domäne und Autoinhibition). Dabei sind anschließend noch weitere Schritte für eine endgültige Aktivierung von Nöten (weitere Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen) (Maurer *et al.*, 2011). Der Aktivierungsprozess von Raf wird außerdem noch durch die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren (z. B. mit *Kinase suppressor of Ras* – KSR) begünstigt (Rajakulendran *et al.*, 2009). Diese Dimerisierungen werden unter anderem durch Ras gesteigert und unterstehen einer negativen Feedback-Regulation durch ERK (Ritt *et al.*, 2010; Rushworth *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2001).

Da Raf-1 im Körper weit verbreitet ist, erhielt es bisher die meiste Aufmerksamkeit. Nach mitogener Stimulation wird Raf-1 innerhalb von zwei bis drei Minuten transient aktiviert (Seger und Krebs, 1995). Dabei interagiert Ras mit der N-terminalen regulatorischen Domäne von Raf-1, was zu dessen Rekrutierung an die Plasmamembran führt (Leevers *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1994). Obwohl Raf-1 ursprünglich als der Hauptinitiator der ERK-Kaskade angesehen wurde, gerät B-Raf immer mehr in den Fokus von Forschern die entscheidende Isoform zu sein (Wellbrock *et al.*, 2004). B-Raf wird durch Ras und Rap1 mit unterschiedlichen Kinetiken aktiviert, und es wird vermutet, dass dessen Langzeit-Aktivierung durch Rap1, wie die Kurzzeit-Aktivierung von Raf-1 durch Ras, zu einem anhaltenden ERK-Signal führen kann (York *et al.*, 1998). Die Aktivierung von B-Raf durch die *Mixed-lineage protein kinase 3* (MLK3), einem Mitglied der MAP3K-Gruppe, treibt die ERK-vermittelte Proliferation voran, wohingegen Raf-1 wahrscheinlich durch PKC aktiviert wird (Chadee und Kyriakis, 2004a, b; Yoon und Seger, 2006). Darüber hinaus beinhaltet die Raf-1-Aktivierung dessen Assoziation mit diversen Proteinen, wie 14-3-3 (14-3-3-Proteine binden spezifische Phosphoserin-haltige Sequenzen und tragen so womöglich zur Bildung von Komplexen bei) und KSR, während die B-Raf-Aktivierung einfacher zu verlaufen scheint und nur die Phosphorylierung der zwei Hauptpositionen (Thr598 und Ser601) benötigt (Wellbrock *et al.*, 2004). Raf-1 bindet auch wie schon beschrieben an RKIP, welches die Raf-MEK-Assoziation unterbindet und so die MEK-Aktivierung verhindert (Yeung *et al.*, 2000). So scheint es, dass B-Raf und Raf-1 durch jeweils eigene Mechanismen reguliert werden und dadurch Signale unterschiedlicher externer Stimuli weitergeben können (Yoon und Seger, 2006).

Obwohl MEK1/2 als einzige weitgehend anerkannte Substrate von Raf zählen, existieren einige Hinweise für andere Effektoren – vor allem da es in drei Isoformen vorkommt. So gibt es Belege dafür, dass Raf-1 I κ B, den negativen Regulator des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), phosphoryliert und so dessen Degradierung induziert (Li und Sedivy, 1993). Andere Studien legen nahe, dass Raf-1 eine direkte Rolle im Zellüberleben spielt. Es bindet an *Bcl-2-associated athanogene-1* (BAG1), welches die Interaktion von Raf-1 mit Bad vermittelt. Die Phosphorylierung von Bad stimuliert schließlich Zellüberleben (Troppmair und Rapp, 2003).

1.2.3 Die MAP2Ks MEK1/2

MAP/ERK Kinasen (MEKs) bilden eine evolutionär konservierte Unterfamilie dualspezifischer Kinasen aus der Familie der Protein-Serin/Threonin Kinasen, welche die Phosphorylierung von Tyrosin- und Threoninstellen ihrer Zielproteine katalysieren. MEK1 und MEK2 vermitteln dabei die Phosphorylierung von ERK1/2, ihre bisher einzig bekannten physiologischen Substrate (Roskoski, 2012b). Sie haben Molekülgrößen von 45kDa (MEK1) und 46kDa (MEK2) und sind mit über 85% hochgradig homolog (Wortzel und Seger, 2011). Sie sind aufgebaut aus einem langen trifunktionellen N-Terminus, einer katalytischen Proteinkinasedomäne und einem kurzen C-Terminus, welcher das Aktivierungssegment enthält. Der N-terminale Abschnitt beinhaltet ein inhibitorisches Segment, eine nukleäre Exportsequenz (NES) und ein Teilstück, das zur Bindung des Substrates ERK beiträgt (Fischmann *et al.*, 2009). Die Aktivierung von MEK beinhaltet die Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Stellen an dem für MAPK typischen Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr-Motiv und kann mithilfe von Raf oder durch Autophosphorylierung geschehen (Ahn *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1994; Zheng und Guan, 1994). Im Falle von MEK1 sind es z. B. Serin 218 und 222, welche durch Raf-1 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung dieser beiden Positionen ist obligatorisch für die katalytische Aktivität von MEK1 (Alessi *et al.*, 1994; Zheng und Guan, 1994). Die Assoziation von MEK1/2 mit ihren voran- oder nachgeschalteten Interaktionspartnern wird dabei sehr stark durch *Scaffold*-Proteine, wie KSR, reguliert (Roskoski, 2012b). KSR ist ein essentielles *Scaffold*-Protein und koordiniert so das räumliche Zusammenbringen der einzelnen Komponenten der Raf/MEK/ERK-Kaskade, wodurch z.B. die Phosphorylierung von MEK1 durch Raf begünstigt wird (Brennan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011). Für beide MEKs ist bekannt, dass sie ERK1/2 vollständig aktivieren können (Chen *et al.*, 2001; Crews *et al.*, 1992; Zheng und Guan, 1993). Sie sind die einzigen Kinasen, welche beide regulatorischen Threonin- und Tyrosinstellen von ERK1/2 phosphorylieren können (Wortzel und Seger, 2011). Darüber hinaus bilden MEK1 und MEK2 Heterodimere aus, welche einem negativen Feedback-Mechanismus durch ERK unterliegen, bei dem die Phosphorylierung von Threonin 292 katalysiert wird und dies die Dephosphorylierung der Stellen Serin 218 und 222 in der Aktivierungsschleife erleichtert. Dies bestimmt schließlich die Länge und Stärke des nachfolgenden ERK-Signals (Catalanotti *et al.*, 2009).

1.2.4 Die MAPKs ERK1/2

Die MAPKs ERK1/2 wurden erstmals vor rund 30 Jahren aufgrund ihrer Eigenschaften *microtubule associated protein 2* (MAP-2) und Myelin-Basisches Protein (MBP) phosphorylieren zu können beschrieben (Ahn und Krebs, 1990; Ray und Sturgill, 1987). ERK1 (Größe: 44kDa, daher auch p44^{ERK1} genannt) und ERK2 (Größe: 42kDa, daher auch p42^{ERK2} genannt) sind zu 83% identisch, wobei die meisten Unterschiede zwischen ihnen außerhalb der Kinase-Domäne auftreten (Boulton *et al.*, 1991; Boulton *et al.*, 1990). Die hohe Übereinstimmung in ihrer Sequenz und die Tatsache, dass beide Kinasen ubiquitär co-exprimiert werden, lassen vermuten, dass sie gegenseitig austauschbar sind, da vor allem alle bekannten Stimuli des ERK1/2-Signalweges zu einer parallelen Aktivierung von ERK1 und

ERK2 führen (Lefloch *et al.*, 2009; Robbins *et al.*, 1993). Jedoch lassen diverse Studien, in denen die Gene von ERK1 oder ERK2 ausgeschaltet wurden, Rückschlüsse auf unterschiedliche Funktionen beider Kinasen zu. Beispielsweise ist das *erk1*-Gen für die Entwicklung von Mäusen entbehrlich, wohingegen der Verlust des *erk2*-Gens zu embryonaler Letalität führt, da diese Mäuse kein Mesoderm ausbilden können (Yao *et al.*, 2003). Interessanterweise belegt dieselbe Studie, dass *erk2*-Null embryonale Stammzellen eine unveränderte Proliferation aufweisen. Anscheinend ist ERK1 unter diesen Bedingungen *in vitro* doch in der Lage, den Verlust von ERK2 zu kompensieren. Weitere Untersuchungen bestätigen die Letalität *erk2*-defizienter Mäuse und die Tatsache, dass ERK1 dies nicht verhindern kann, obwohl es in diesen Mäusen sogar weitgehend exprimiert wird (Hatano *et al.*, 2003; Saba-El-Leil *et al.*, 2003). Eine mögliche Antwort auf die Frage, ob ERK1 und ERK2 nun unterschiedliche Funktionen besitzen, liefern die Versuche von Lefloch *et al.* (Lefloch *et al.*, 2008). Hier wurde beschrieben, dass sowohl die Aktivierung als auch die Aktivität beider Kinasen nicht unterscheidbar sind und das Verhältnis derer Expression mit dem der Aktivierung übereinstimmt. Sie schließen daraus, dass die unterschiedliche Genexpression von ERK1 und ERK2 ursächlich für die biologischen Abweichungen ist (Lefloch *et al.*, 2008).

1.2.4.1 Die Struktur von ERK2

Die MEK1/2-vermittelte duale Phosphorylierung von ERK1/2 an Threonin- und Tyrosinstellen (Thr183 und Tyr185 in murinem ERK2, dies entspricht Thr202/185 und Tyr204/187 in humanem ERK1/2), welche in dem für MAPKs typischen Motiv Thr-Xaa-Tyr in der Aktivierungsschleife liegen (im Falle von ERK1/2 Thr-Glu-Tyr: TEY-Motiv), führt zur 1000-fachen Aktivierung der Kinasen (Roskoski, 2012a). Dabei kommt es zunächst zur Phosphorylierung des Tyrosins, woraufhin der Komplex aus phospho-Tyrosin-ERK1/2 und MEK1/2 dissoziiert und anschließend wieder reassoziert, damit MEK1/2 dann die Phosphorylierung des Threonins katalysieren kann (Burack und Sturgill, 1997; Haystead *et al.*, 1992). Beide kovalent gebundenen Phosphatreste sind für den Erhalt einer hohen Kinaseaktivität notwendig (Robbins *et al.*, 1993; Seger *et al.*, 1992). Die Monophosphorylierung einer der beiden Positionen kann teilweise auch zu einer Aktivierung von ERK führen, welche aber unter gängigen Bedingungen wahrscheinlich nicht ausreichend für eine Signalweiterleitung ist (Zhou und Zhang, 2002). Nach Aktivierung vollziehen ERK1/2 ihre Funktionen schließlich über eine Vielzahl von Substraten, welche aufgrund verschiedener Konditionen, Zelltypen oder Zellkompartimenten variieren können (Yoon und Seger, 2006). Generell sind ERK1/2 Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen, das bedeutet, sie phosphorylieren Serin-/Threoninstellen auf die ein Prolin folgt: S/T-P, P+1-Position. Die korrekte Substraterkennung bzw. -bindung erfolgt über sogenannte *Docking*-Domänen (Interaktionsdomänen), wovon zwei für ERK sehr gut beschrieben sind: die D-Domäne, auch DEJL-Motiv, und die DEF-Domäne, auch FxFP-Motiv (Ramos, 2008). Die D-Domäne ist eine übliche Bindungsstelle für viele MAPKs und beinhaltet die Sequenz Arg/Lys-x-x-Arg/Lys-x₁₋₆-Leu-x-Leu. Sie interagiert mit ERK an dessen CRS (*cytosolic retention sequence*)/CD (*common docking*)-Motiv an den Positionen 316-319. Demgegenüber ist die DEF-Domäne charakterisiert durch die Sequenz Phe-x-Phe-Pro (FxFP), welche

direkt auf die S/T-P-Phosphorylierungsstelle folgt. Diese Domäne bindet ERK an den Stellen 185-261 (Ratten-ERK2), die an die Aktivierungslippe angrenzen und nur nach Aktivierung von ERK erreichbar ist. Die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten im Bereich der Erkennung und Bindung von Substraten tragen somit u. a. zur Substrat-Spezifität von ERK1/2 bei (Ramos, 2008; Yoon und Seger, 2006).

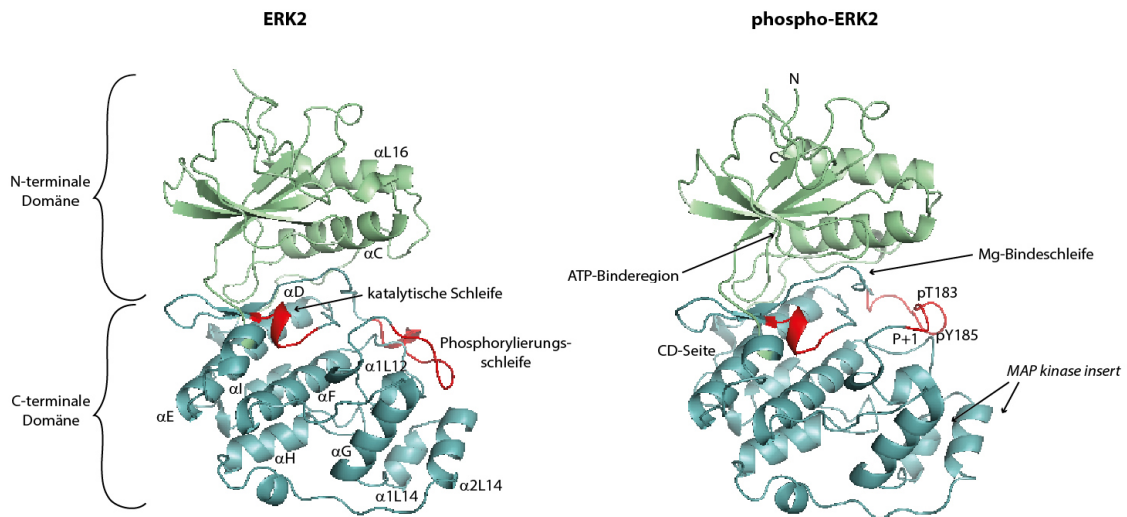


Abbildung 5: Dreidimensionale Strukturen von unphosphoryliertem und phosphoryliertem ERK2

Die dreidimensionalen Strukturen von unphosphoryliertem (links) und phosphoryliertem (rechts) ERK2 wurden adaptiert nach Canagarajah et al., 1997 und Zhang et al., 1994.

Sowohl die dreidimensionale Struktur von unphosphoryliertem als auch die von hochaktivem, phosphoryliertem ERK2 sind aufgeklärt (Canagarajah *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Im Allgemeinen besteht ERK2, wie alle Proteinkinasen und zuallererst für PKA beschrieben (Knighton *et al.*, 1991), aus einer kleinen N-terminalen und einer großen C-terminalen Domäne, welche diverse konservierte α -Helices und β -Stränge enthalten. Die beiden Domänen bilden einen tiefen Spalt, der als ATP- und Magnesiumbindungsstelle dient. Die Bindung von Substraten erfolgt an der Oberfläche dieser Tasche. Ein flexibler Linker ermöglicht es den Domänen, sich durch Rotation voneinander weg zu orientieren, um Substrate freizulassen oder sich zur Schließung des aktiven Zentrums zueinander hinzubewegen (Chen *et al.*, 2001; Wolf und Seger, 2002).

Die N-terminale Domäne wird von einem fünfsträngigen, antiparallel angeordneten β -Faltblatt dominiert (β 1- β 5). Daneben enthält sie auch zwei Helices: die α C-Helix, die bei aktiver und inaktiver Orientierung auftritt, und die α L16-Helix mit einer C-terminalen Verlängerung bis in den katalytischen Kern. Eine glycinreiche (GxGxxG) ATP-Phosphat-Bindungsschleife zwischen dem β 1- und β 2-Strang stellt den flexibelsten Bereich der N-terminalen Domäne dar und dient der Positionierung der β - und γ -Phosphate des ATP für die Katalyse. Die Salzbrücke zwischen dem β 3-Lysin und dem α C-Glutamat bildet eine Voraussetzung für den aktivierten Zustand der Kinase („ α C-in“-Konformation).

Diese ist zwar nötig, aber alleine nicht ausreichend für die vollständige Kinaseaktivität (Canagarajah *et al.*, 1997; Kornev *et al.*, 2006; Roskoski, 2012a; Taylor und Kornev, 2011).

Die C-terminale Domäne ist hauptsächlich α -helikal aus sechs konservierten Segmenten (α D- α I) aufgebaut und dient der Substratbindung. Sie beinhaltet außerdem vier kurze, konservierte β -Stränge (β 6- β 9), welche die meisten katalytischen Domänen zum Transfer von Phosphatresten auf Substrate beherbergen und zwischen den Helices α E und α F liegen (Chen *et al.*, 2001). Ein Einschub im C-Terminus, welcher circa 30-40 Aminosäuren umfasst, ist charakteristisch für MAPKs und wird daher *MAPK insert* genannt (English *et al.*, 1999).

Das Aktivierungssegment stellt das wichtigste regulatorische Element von Proteinkinasen dar. Seine Konformation beeinflusst die Substratbindung und die katalytische Aktivität des Enzyms und es befindet sich zwischen der katalytischen Schleife und der α F-Helix. Es besteht aus einer Magnesiumbindungsschleife am N-Terminus und der Aktivierungsschleife, bei ERK1/2 Aktivierungsschleife, in der Mitte. Diese Schleife, welche für die Positionierung eines Magnesiumions zuständig ist, beginnt mit dem für die Katalyse wichtigen, konservierten Motiv Asp-Phe-Gly (DFG). Das Aspartat in diesem Motiv bindet direkt zwei Magnesiumionen im aktiven Zentrum. Die Aktivierungsschleife enthält das TEY-Motiv und befindet sich auf der Oberflächenschleife L12. Im unphosphorylierten Zustand berührt die Aktivierungsschleife das *MAPK insert*, wodurch das Tyr185 des TEY-Motivs die P+1-Substratbindestelle blockiert. Die nach der Phosphorylierung dieses Motivs entstandenen negativ geladenen Phosphatreste bilden starke Wasserstoffbrückenbindungen aus und bringen so Konformationsänderungen mit sich, die das aktive Zentrum und die Substratbindungsoberfläche organisieren (English *et al.*, 1999; Kornev und Taylor, 2010; Roskoski, 2012a).

Die beschriebenen Strukturen von ERK2 legen eine schwache Stabilität des unphosphorylierten Enzyms dar, vor allem hinsichtlich der Aktivierungsschleife und α L16, einer C-terminalen Verlängerung zum katalytischen Zentrum. Im unphosphorylierten Zustand blockiert Y185 teilweise die Substratbindestelle. Phosphoryliert bindet Y185 allerdings an eine Anionenbindetasche und gibt so die Oberfläche zur Bindung des Prolins frei, gefolgt von der Phosphorylierungsstelle des Substrates. Die Konformationsänderungen, welche zu einer korrekten Anordnung des aktiven Zentrums führen, werden durch ein Netzwerk an Interaktionen von phosphoryliertem T183 und Stellen in der N-terminalen Domäne verursacht und verändern dadurch die Position von α L16 und die Orientierung der α C-Helix der N-terminalen Domäne. Diese Repositionierungen führen schließlich auch zu einer Rotation der beiden Domänen zueinander hin (Cobb, 1999).

1.2.4.2 Regulation der Signalweiterleitung und deren Spezifität

Circa 80% der zellulären Proteine weisen die minimale Übereinstimmungssequenz (S/T-P) für Substrate von ERK1/2 auf. Tatsächlich wurden schon über 150 Substrate von ERK beschrieben. Diese Substrate können in verschiedene Gruppen kategorisiert werden: Transkriptionsfaktoren, Protein-

kinasen und Phosphatasen, *Scaffold*-Proteine und Proteine des Zytoskeletts, Rezeptoren und Signalmoleküle, apoptoseassoziierte Proteine und andere. Während die eine Hälfte dieser Proteine im Zellkern lokalisiert ist, befindet sich die andere Hälfte im Zytosol, an der Plasmamembran und an Zellorganellen. Obwohl viele dieser Substrate in derselben Zelle exprimiert sein können, ist es eher unwahrscheinlich, dass alle simultan phosphoryliert werden. Es bestehen zeitliche und räumliche Koordinationsmechanismen und diese können in fünf verschiedene Arten aufgeteilt werden (Wortzel und Seger, 2011; Yoon und Seger, 2006).

1) Unterschiede in der Dauer und Stärke des Signals

In PC12-Zellen induzieren EGF und NGF (*nerve growth factor*) eine starke Aktivierung von ERK1/2. Allerdings verursacht die Stimulation mit EGF eine transiente Aktivierung (Höhepunkt nach 15 Minuten und basale Level nach 40 Minuten erreicht) und Proliferation der Zellen, wohingegen NGF-Stimulation zu einer langanhaltenden Aktivierung (nach 15-180 Minuten) und Differenzierung der Zellen führt (Marshall, 1995; Nguyen *et al.*, 1993). Ursächlich dafür sind wahrscheinlich *immediate early genes*, welche bestimmte zelluläre Prozesse abhängig von der Länge des Signals induzieren (Murphy *et al.*, 2002). Die Dauer des Signals wird dabei hauptsächlich über Phosphatasen bestimmt, was sie zu wichtigen Regulatoren von ERK1/2-Signalwegen macht (Keyse, 2008) (siehe folgenden Absatz).

2) Mechanismen zur Inaktivierung der Kaskade

Da für eine hohe MAPK-Aktivität beide Aktivierungsstellen, also Threonin und Tyrosin, phosphoryliert vorliegen müssen, führt die Entfernung schon einer dieser Phosphatstellen durch Phosphatasen zur Inaktivierung von MAPKs (Cobb, 1999). MAPK-Phosphatasen (MKPs) gehören zu der Gruppe der dualspezifischen Phosphatasen (daher auch „DUSP“ als Abkürzung gebräuchlich). Diese sind in der Lage MAPKs selektiv an beiden Positionen zu dephosphorylieren und werden in zwei Gruppen unterteilt. Sie sind entweder durch Wachstumsfaktoren oder stressinduzierte Gene kodiert und weitestgehend im Zellkern lokalisiert (DUSP1/MKP-1, DUSP2, DUSP4/MKP-2) oder sie werden nicht akut durch Transkription reguliert und befinden sich im Zytosol (DUSP6/MKP-3, DUSP7 und DUSP9/MKP-4 – alle ERK-spezifisch). Diese Unterschiede implizieren schon Abweichungen in der zeitlichen und räumlichen Inaktivierung die sie verursachen (Caunt und Keyse, 2013; Kidger und Keyse, 2016; Pearson *et al.*, 2001). Dabei können ERK1/2 die Aktivität der MKPs sogar auch direkt beeinflussen. MKP-1 wird durch ERK1/2 phosphoryliert, was womöglich vor proteosomaler Degradierung schützt, und die Aktivität der MKP-3 wird als Konsequenz der Bindung von ERK1/2 an deren regulatorischer Domäne gesteigert (Brondello *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2000). Viele MKPs werden charakteristischerweise unter basalen Bedingungen nur in geringen Mengen exprimiert, wobei deren Expression nach Stimulation entweder als *immediate early* oder *delayed early genes* induziert wird (Amit *et al.*, 2007; Nunes-Xavier *et al.*, 2010). Solche MKPs können folglich nur auf langanhaltende ERK-Signale Einfluss nehmen, wohingegen konstitutiv exprimierte MKPs theoretisch Reaktionen auf alle Phasen einer Stimulation unterbinden können (Caunt und Keyse, 2013). Auch die Phosphoprotein-Phosphatasen 2A

und 1 (PP2A und PP1) sind wichtige Regulatoren der ERK1/2-Aktivität (English *et al.*, 1999). Beispielsweise trägt das *SV40 small tumor antigen* zur Proliferation bei, indem es durch Interaktion mit PP2A dessen Aktivität in Richtung ERK1/2-Signalweg verringert (Sontag *et al.*, 1993).

Aufgrund der Vielfalt der Phosphatasen, welche mit ERK1/2 interagieren, kann geschlussfolgert werden, dass Phosphatasen stimulusabhängig, zeitlich reguliert, subpopulationsabhängig und meist in Gruppen agieren, um eine adäquate Inaktivierung der MAPKs gewährleisten zu können (Caunt und Keyse, 2013; Cobb, 1999).

3) Crosstalk der MAPK-Komponenten mit anderen Signalwegen

Ein und derselbe Stimulus kann nicht nur die Raf/MEK/ERK-Kaskade, sondern auch andere Signalkaskaden, u.a. PI3K-AKT und NF- κ B, aktivieren. Diese Kaskaden können auch miteinander interagieren und so den Ausgang der jeweiligen Signalwege modulieren (Wortzel und Seger, 2011). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der PI3K-AKT-Signalweg die Raf/MEK/ERK-Kaskade inhibiert, indem AKT Raf in dessen regulatorischer Domäne phosphoryliert (Zimmermann und Moelling, 1999).

4) Vorhandensein mehrerer Komponenten auf jedem Level der Kaskade

Die Tatsache, dass auf der Stufe der MAP3K nicht nur verschiedene Isoformen von Raf, sondern auch andere Proteine, wie MEKK1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*), Cot (*Cancer Osaka thyroid*, MAP3K8) und Mos (*Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog*), involviert sein können und diese unter unterschiedlichen Konditionen agieren, weist auf die vielseitige Aktivierung der Kaskade hin (Wortzel und Seger, 2011). Obwohl MEK1 und MEK2 zu über 85% identisch sind, bilden Ras und Raf-1 nur mit MEK1 Signalkomplexe. Nach EGF-Stimulation in HeLa-Zellen aktiviert Raf-1 sowohl MEK1 als auch MEK2, A-Raf jedoch nur MEK2 (Jelinek *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996). So können nicht nur wie oben beschrieben ERKs selber unterschiedliche Funktionen aufweisen, auch die vorgeschalteten Kinasen tragen zur Erweiterung der Spezifität bei.

5) Interaktion mit Scaffold- oder Ankerproteinen

Scaffold-Proteine rekrutieren Proteine, welche zu einem bestimmten Signalweg gehören, und bringen sie so in räumliche Nähe zueinander. Dies führt zu schnelleren Kinetiken, höheren Spezifitäten, Kompartimentalisierung und *Crosstalk* mit anderen Signalwegen. Darüber hinaus ermöglichen es *Scaffold*-Proteine einer Signalkaskade unterschiedliche Funktionen als Antwort auf einen oder mehrere Stimuli zu erfüllen, indem sie verschiedene Substrate zur Kaskade rekrutieren und diese zudem vor Phosphatasen schützen können (Chuderland und Seger, 2005; Liang und Sheikh, 2016). Während *Scaffold*-Proteine mehr als eine Komponente eines Signalmoduls binden, interagieren Ankerproteine nur mit einer Komponente (Roskoski, 2012a).

MEK Partner 1 (MP1) bindet selektiv MEK1 und ERK1 und steigert dadurch deren Interaktion und Aktivierung (Schaeffer *et al.*, 1998). Der Komplex wird aufgrund dessen Interaktion mit dem endosomalen Protein p14 zu *late endosomes* geführt, was bedeutet, dass beide Proteine für die MP1-gesteigerte Aktivierung von ERK an Endosomen benötigt werden (Teis *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2001).

KSR ist das am besten untersuchte *Scaffold*-Protein des ERK-Signalwegs und bindet Raf, MEK1/2 und ERK1/2 (Morrison, 2001; Yu *et al.*, 1998). Nach Aktivierung wird KSR zur Plasmamembran rekrutiert indem es mit dem 14-3-3 Protein oder mit γ -Untereinheiten von heterotrimären G-Proteinen interagiert (Chuderland und Seger, 2005; Muller *et al.*, 2001). In ruhenden Zellen ist ein Teil von MEK1/2 mit KSR assoziiert und wird nach Aktivierung von KSR an die Plasmamembran zu dessen direktem Aktivator Raf-1 gebracht. Dabei formen sich Raf/MEK/ERK-Komplexe, welche eine Aktivierung von ERK1/2 erleichtern (Raman *et al.*, 2007).

β -Arrestin1/2 können Raf, MEK und ERK binden, wobei sich der β -Arrestin/Raf/MEK/ERK-Komplex während der Endozytose von GPCRs bildet und aktiviertes ERK so bei den *early endosomes* anzutreffen ist (DeFea *et al.*, 2000a; DeFea *et al.*, 2000b). Das Binden von β -Arrestin1/2 an ERK1/2 erleichtert zwar die Aktivierung von ERK1/2 durch GPCRs, allerdings können β -Arrestine auch an phosphorylierte ERK1/2 binden und so die ERK-abhängige Transkription vermindern, da durch die Interaktion deren Translokation in den Zellkern unterbunden wird (Tohgo *et al.*, 2002).

Genauso wie β -Arrestine dient Sef (*similar expression to fgf genes*) als räumlicher Regulator für ERK1/2, indem es auch als zytosolischer Anker für aktiviertes ERK dient. Es kolokalisiert dabei mit aktivem MEK und ERK am Golgi-Apparat in stimulierten Zellen (Torii *et al.*, 2004).

Ein weiterer wichtiger zytoplasmatischer Anker von ERK1/2 ist MEK selbst. MEK besitzt eine NES. Die Tatsache, dass ERK in ruhenden Zellen mit MEK assoziiert ist, zieht dessen zytosolische Lokalisation mit sich, welche aber nach Stimulation der MAPK-Kaskade aufgehoben wird, da ERK von MEK dann aufgrund von Konformationsänderungen dissoziiert (Fukuda *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1997).

6) Subzelluläre Lokalisation der MAPK-Komponenten

Wie schon angedeutet, ist ein überaus wichtiger Mechanismus, der zur Spezifität der Raf/MEK/ERK-Kaskade beiträgt die Begrenzung der einzelnen Komponenten dieser Kaskade auf spezifische zelluläre Kompartimente und die dynamische Veränderung deren Lokalisation nach Stimulation.

In ruhenden Zellen befinden sich alle Mitglieder der MAPK-Kaskade primär im Zytoplasma, hauptsächlich aufgrund spezialisierter Anker-/*Scaffold*-Proteine und im Falle von MEK noch zusätzlich der NES (Shaul und Seger, 2007). Die Verteilung der Komponenten wird nach Stimulation allerdings drastisch verändert. Raf-1 wird aufgrund der Interaktion mit aktiviertem Ras zur Plasmamembran rekrutiert, während MEKs und ERKs sich von ihren zytoplasmatischen Ankern lösen und viele ihrer Moleküle dadurch in den Zellkern translozieren (Chen *et al.*, 1992; Jaaro *et al.*, 1997; Warne *et al.*, 1993). Dabei verwenden sowohl ERKs als auch MEKs aktive und passive Transportmechanismen, um in den Nukleus zu gelangen (Adachi *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass der aktive Transport

von ERK in den Zellkern die Homodimerisierung von ERK nach Stimulation benötigt. Andererseits konnten andere Studien zeigen, dass die Mutation der Dimerisierungsstellen die stimulusinduzierte Translokation nicht beeinflusst (Adachi *et al.*, 1999; Khokhlatchev *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2001). Die Rolle der Dimerisierung von ERK auf dessen Lokalisation ist somit nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Lösung dieser Frage liefern diverse Studien zu einer Autophosphorylierung von ERK2 an Threonin 188 (T208 in ERK1). Diese Autophosphorylierung wurde als Trigger für die Translokation von ERK in den Zellkern identifiziert (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Dabei ist die Dimerisierung von ERK eine Notwendigkeit für das Auftreten dieser Phosphorylierung (Lorenz *et al.*, 2009a). Weitere Studien lieferten Hinweise darauf, dass ERKs in den Kern translozieren, indem sie direkt mit Proteinen des Kernporenkomplexes (*nuclear pore complex*, NPC), sog. Nukleoporinen (NUPs), interagieren (Matsubayashi *et al.*, 2001; Whitehurst *et al.*, 2002). Obwohl ERK1/2 selber keine NLS-Sequenz besitzen, ersetzt die SPS (Ser-Pro-Ser)-Domäne deren Funktion, indem diese nach ihrer Phosphorylierung die Assoziation von ERK mit Importin7 ermöglicht (Chuderland *et al.*, 2008). Importine bilden Komplexe mit zytosolischen Proteinen und Proteinen des NPC und tragen so zur energieabhängigen Translokation von Proteinen bei (Xu und Massague, 2004).

Schon kurze Zeit nach Stimulation werden MEKs über das Exportin-System, das sich der NES bedient, exportiert (Jaaro *et al.*, 1997). ERKs verweilen jedoch länger im Nukleus, was wahrscheinlich auf deren Interaktion mit neu synthetisierten kurzlebigen Proteinen zurückzuführen ist, die als nukleäre Anker fungieren (Lenormand *et al.*, 1998). Zuletzt führt der nukleäre Export von MEK selber auch zur zytosolischen Relokalisation von ERK über einen MEK-abhängigen, aktiven Transportmechanismus (Adachi *et al.*, 2000).

Durch die Lokalisation der einzelnen Komponenten der MAPK-Kaskade werden die Signale zu ihren jeweils geeigneten Substraten weitergeleitet, was maßgeblich zum Erhalt der Spezifität dieser Signalkaskade beiträgt (Shaul und Seger, 2007).

1.2.4.3 ERK1/2 Homo- und Heterodimerisierung

Phosphoryliertes ERK formt sowohl mit ebenfalls phosphoryliertem als auch mit unphosphoryliertem ERK Dimere. Die Dissoziationskonstante für das Dimer von aktivem ERK2 beträgt 7,5nM und ist somit 3000-fach kleiner als die für unphosphoryliertes ERK. Dies lässt den Schluss zu, dass phosphoryliertes ERK wohl als Dimer in Zellen vorliegt (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Khokhlatchev *et al.* zeigten außerdem, dass die Inhibition der Dimerisierung eine verminderte nukleäre Akkumulation von ERK mit sich führt. Somit stellt die Dimerisierung sehr wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Translokation von ERK in den Kern dar (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie bekräftigt, welche beschreibt, dass ERK nicht nur passiv als Monomer, sondern auch über einen aktiven Mechanismus als Dimer in den Zellkern gelangen kann (Adachi *et al.*, 1999). Das Dimer, welches in der Kristallstruktur von phosphoryliertem ERK2 beobachtet werden kann, schließt Stellen

nahe der Phosphorylierungsdomäne ein, welche durch die Aktivierung von ERK einer Konformationsänderung unterlaufen (Canagarajah *et al.*, 1997). Dabei besteht das Interface des Dimers aus einem nichthelikalen *Leucin-Zipper*, der von Stellen im C-Terminus und einem Netzwerk an Interaktionen zwischen Positionen in der Phosphorylierungsschleife und im C-Terminus gebildet wird (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Das Dimer ist symmetrisch und die aktiven Zentren sind in beiden ERK-Molekülen zugänglich.

Eine genauere Untersuchung von ERK2-Dimeren zeigt, dass der *Leucin-Zipper* aus den Aminosäuren L333, L336 und L344 beider ERK-Moleküle gebildet wird. H176 aus der Aktivierungslippe und E343 aus dem C-Terminus formen an beiden Enden des Interfaces jeweils ein Ionenpaar. Insgesamt sind pro Monomer elf Aminosäuren an der Ausbildung des Dimers beteiligt (Wilsbacher *et al.*, 2006).

Ob die Dimerisierung von ERKs tatsächlich eine Voraussetzung für ihre Translokation in den Kern darstellt bleibt weiterhin umstritten und ist noch nicht gänzlich geklärt. Der aktive Transport von ERK-Dimeren ist nicht der einzige Translokationsmechanismus von ERK, jedoch ist es möglich, dass der aktive Mechanismus zur schnellen Translokation in den Kern benötigt wird (Adachi *et al.*, 1999). Interessanterweise lassen sich ERK-Dimere durch *Live Cell Imaging* mithilfe von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messungen nicht detektieren (Burack und Shaw, 2005). Casar *et al.* kommen auch auf den Schluss, dass die Dimerisierung von ERK zur räumlichen Spezifizierung des ERK-Signalwegs beiträgt. Allerdings ist in diesem Fall die Dimerisierung essentiell für die Bindung von ERK an zytosolische *Scaffolds* und begünstigt so die zytosolische und nicht nukleäre ERK-Signalweiterleitung (Casar *et al.*, 2008). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine dimerisierungsdefiziente Mutante von ERK1 (ERK1^{Δ193-196}, kurz: ERK1-Δ4) eine mit wildtypischem ERK1 vergleichbare Kerntranslokation aufweist (Lidke *et al.*, 2010).

All diese diversen Ergebnisse lassen annehmen, dass die Dimerisierung von aktivem ERK nicht einem speziellen Signal dient, sondern vielmehr als räumlicher Regulationsmechanismus betrachtet werden kann, welcher durch unterschiedliche Mechanismen initiiert wird und den Ausgang verschiedener Signalwege betrifft.

1.2.4.4 Die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung

Ein weiterer regulatorischer Mechanismus, welcher zur Signalspezifität von ERK1/2 beiträgt, ist deren Autophosphorylierung an Threonin 188 in murinem ERK2 (Thr208 in ERK1). Sie fördert die nukleäre Akkumulation von ERK und damit einhergehend die Aktivierung nukleärer Zielproteine, welche dafür bekannt sind kardiale Hypertrophie zu verursachen (Lorenz *et al.*, 2009a). Humane Proben insuffizienter Herzen und transgene Mausmodelle, die Mutationen an der Stelle 188 trugen, beweisen einen kausalen Zusammenhang zwischen dieser Autophosphorylierungsstelle und kardialer Hypertrophie. So wurde diese Autophosphorylierungsstelle in transgenen Mäusen untersucht, welche entweder eine Defizienz bezüglich der Thr188-Phosphorylierung aufwiesen, indem Threonin 188 zu

Alanin oder Serin getauscht wurde, oder in denen die konstitutive Thr188-Phosphorylierung simuliert wurde, durch den Austausch von Threonin 188 zu Asparaginsäure (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Die Untersuchung dieser Mäuse erbrachte, dass die kardiale Hypertrophie, hervorgerufen durch eine Erhöhung der Nachlast durch eine Aortenligation, von der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung abhängig ist und phosphorylierungsdefiziente Mutanten diese hypertrophe Reaktion signifikant verringern.

Dabei ist das Auftreten der Thr188-Autophosphorylierung das Resultat einiger notwendiger Ereignisse (siehe Abbildung 6).

- (1) Die hypertrophe Aktivierung $G\alpha_q$ - oder $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren und folglich
- (2) Aktivierung der gesamten Raf/MEK/ERK-Kaskade mit damit einhergehender dualen Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv, damit aktiviertes ERK dann
- (3) dimerisieren kann und das entstandene Dimer mit freigesetzten
- (4) $G\beta\gamma$ -Untereinheiten interagiert (Lorenz *et al.*, 2009a; Vidal *et al.*, 2012).

Die Autophosphorylierung tritt langsamer auf als die Phosphorylierung im TEY-Motiv, ist dafür aber über einen längeren Zeitraum persistent, was zu der Rolle, welche sie in dem Langzeitprozess der kardialen Hypertrophie spielt, passt (Lorenz *et al.*, 2009a).

Eine weitere Studie belegt die Anwendbarkeit der Thr188-Autophosphorylierung als therapeutische Zielstruktur in pathologischer kardialer Hypertrophie. Mausmodelle zeigen, dass die Beeinträchtigung der Autophosphorylierung selektiv pathologische Hypertrophie verringert, ohne dabei Auswirkungen auf die anti-apoptotische Signalweiterleitung von ERK im Herzen zu haben (Ruppert *et al.*, 2013).

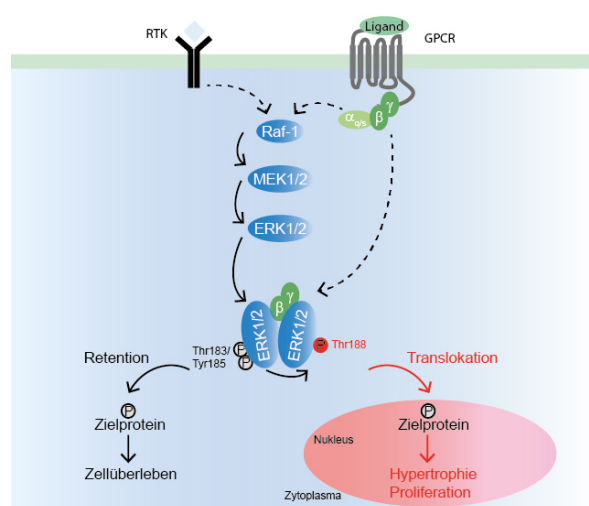


Abbildung 6: Modell der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung

Die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade durch GPCRs oder RTKs führt zu einer dualen Phosphorylierung von ERK im TEY-Motiv, wodurch die Kinase aktiviert ist und dimerisieren kann. Hypertrophe Stimulation führt darüber hinaus zu der Interaktion von ERK-Dimeren mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und anschließend zu einer Autophosphorylierung an der Position Threonin 188. Dies fördert die nukleäre Lokalisation von ERK. Schema adaptiert nach Lorenz *et al.*, 2009b.

1.3 Zielsetzung

ERK1/2 sind wie im Vorhergehenden herausgearbeitet wichtige Mediatoren der Signaltransduktion von externen Stimuli. Dabei spielen sie im Herzen eine herausragende Rolle bei der Vermittlung pathologischer Hypertrophie sowie des Zellüberlebens. Sie sind Bestandteil der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade und werden von MEK1/2 durch duale Phosphorylierung am TEY-Motiv aktiviert. Bei der Vielzahl möglicher ERK-Substrate ist eine spezifische Regulierung der Signalweiterleitung von essentieller Bedeutung. Einige solcher Regulationsmechanismen sind bekannt, so wie die Dimerisierung von ERK nach Aktivierung oder die daraus folgende Autophosphorylierung an Threonin 188. Es bleibt jedoch offen, wie das Wissen um diese Signalregulierungen therapeutisch genutzt werden kann, um pathologische Zustände, an denen ERK1/2 beteiligt sind, zu mindern oder sogar zu verhindern. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass ERK1/2 auch protektive Rollen zugesprochen werden. So vermitteln sie im Herzen auch das Zellüberleben. Die Studien über die ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung liefern eine mögliche Lösung zum selektiven Eingreifen in die Signalweiterleitung von ERK1/2. Dennoch fehlt ein anwendbarer therapeutischer Ansatz um das Auftreten dieser Autophosphorylierung zu unterbinden. Eine Möglichkeit dazu bietet die Dimerisierung von ERK, da sie eine Voraussetzung für die ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung darstellt. Ziel dieser Studie ist es herauszuarbeiten, welche Auswirkungen die Inhibition der Dimerisierung auf Kardiomyozyten und das Herz insgesamt hat und ob sie womöglich eine therapeutische Strategie zur spezifischen Behandlung ERK^{Thr188}-vermittelter pathologischer Hypertrophie sein könnte.

2 Material

2.1 Substanzen

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Merck, Sigma-Aldrich oder Roth bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Peqlab
Alexa Fluor®488 Phalloidin	Molecular Probes
Ampuwa®	Fresenius Kabi
Coomassie Brilliant Blau R-250	BioRad
p-Cumarsäure	Fluka
Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran)	Pharmacia
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen
DNA-Größenstandard (100 Basenpaar/1 Kilobasenpaar)	NEB
Luminol	Alexis
PD98059	Calbiochem (Merck Millipore)
peqGold Proteinmarker III®	Peqlab
peqGold TriFast™	Peqlab

2.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	eBioscience
Caspase-Glo®3/7 Assay	Promega
Duolink® <i>In Situ</i> Red Starter Kit Mouse/Rabbit	Sigma
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Plasmid Plus Midi Kit®	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	BioRad
SuperScript® Reverse Transcriptase	Invitrogen

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon® Ultra Zentrifugationseinheiten	Millipore
Autoradiographiefilme	Fuji Film
Cellulose-Dünnschichtchromatographie-Platten	Merck
Chromatographiepapier	Hartenstein
Chromatographiesäulen	BioRad
Deckgläser	Hartenstein
Entwicklungs- und Fixierlösungen für Autoradiographiefilme	Sigma Aldrich
Eukitt® (Mounting-Medium)	Sigma Aldrich
Fluoromount G™ (Mounting-Medium)	SouthernBiotech
Immersionsöl für die Mikroskopie (fluoreszenzfrei)	Appllichem
Kryoröhrchen	Nunc
Lumineszenzplatten (96-well, weiß)	Nunc
Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA)-Agarose	Quiagen
Objektträger	Hartenstein
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Hartenstein/ GE Healthcare
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare
Superfrost®-Objektträger	Hartenstein
Zellkulturschalen	Nunc
Zählerröhrchen für Flüssigszintillationszählung (Polyethylen)	Hartenstein, Perkin Elmer
Zellsieb (40µM), Nylon	BD Biosciences

2.4 Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
BrdU	Sigma Aldrich
DPBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium)	PAN
DMEM mit 4,5g/l Glukose	PAN
FCS	Biochrom
L-Glutamin (200mM)	PAN
McCoy's 5A Medium	Gibco
MEM Eagle ohne NaHCO ₃	Sigma Aldrich
Opti-MEM®	Invitrogen
Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)	PAN
Poly-D-Lysin Hydrobromid	MP Biomedicals, Sigma Aldrich
RPMI Medium 1640	Gibco
Trypsin/EDTA	PAN
Vitamin B ₁₂	AppliChem

2.5 Enzyme

Name	Hersteller
HiFi-Taq	Peqlab
Kollagenase Typ 2 (323U/mg)	Worthington, Lakewood
Desoxyribonuklease (DNase) I, RNAse frei	Sigma Aldrich
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen
Trypsin (Difco™ Trypsin 250)	BD Biosciences

2.6 Antikörper

2.6.1 primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognr.
c-Myc	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-789
c-Myc	Maus	1:350	Sigma	M4439
ERK1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9102
ERK2	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-153
Flag	Maus	1:10000, 1:200	Sigma-Aldrich	F3165
Gβ	Kaninchen	1:5000	Santa Cruz	sc-378
HA	Maus	1:5000	Covance	MMS-101R
HA	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	3724
Max	Kaninchen	1:200	Santa Cruz	sc-197
Phospho-Bim (Ser69)	Kaninchen	1:400	Cell Signaling	4581
Phospho-Elk-1 (Ser383)	Kaninchen	1:750	Cell Signaling	9181
Phospho-Elk-1 (Ser383)	Kaninchen	1:1000	abcam	ab34270
Phospho-ERK1/2 (TEY)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9101
Phospho-ERK1/2 (Thr188)	Kaninchen	1:2000	Lorenz et al., 2009	
Phospho-ERK1/2 (Thr188)	Kaninchen	1:1000	Badrilla	A010-40AP
Phospho-p90RSK (Ser380)	Kaninchen	1:5000	abcam	9341

2.6.2 sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognr.
Kaninchen, Peroxidase-konjugiertes IgG	Ziege	1:5000-1:10000	Dianova	111035144
Maus, Peroxidase-konjugiertes IgG	Ziege	1:5000-1:10000	Dianova	115035003

2.7 Isotopenmarkierte Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
[γ - ³² P]-ATP	Hartmann
Methyl-[³ H]-Thymidin	Amersham

2.8 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Myc-Peptid (<i>reverse</i>)	5'-tct gta tcc tgg ctg gaa tct-3'
Myc-Peptid (<i>forward</i>)	5'-atg gag cag aag ctc atc agc-3'
RT-PCR-Primer	
GAPDH (<i>reverse</i>)	5'-tgg caa agt gga cat tgt tg-3'
GAPDH (<i>forward</i>)	5'-cat tat cgg cct tga ctg tg-3'
ANF (<i>reverse</i>)	5'-agt gcg gcc cct gct tcc tca-3'
ANF (<i>forward</i>)	5'-aca gat ctg atg gat ttc aag aac ctg c-3'
Collagen Typ III (<i>reverse</i>)	5'-acc ccc aat gtc ata gg-3'
Collagen Typ III (<i>forward</i>)	5'-aaa cag caa att cac tta cac-3'
Myc-Peptid (<i>reverse</i>)	5'-tcg tcc aac tcc atg tca aa-3'
Myc-Peptid (<i>forward</i>)	5'-atc agc gag gag gac ctc-3'

2.9 Plasmidvektoren

Bezeichnung	Spezies	Bemerkung	Referenz
pAd/CMV/V5			Invitrogen
pAd/CMV/V5-Flag-ERK2	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pAd/CMV/V5-Flag-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pAd/CMV/V5-Flag-ERK2 ^{Δ174-177,T188D}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pAd/CMV/V5-YFP-ERK2	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pAd/CMV/V5-YFP-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pAD/CMV/V5-eGFP	Qualle		T. Stiewe, Marburg
pAD/CMV/V5-LacZ	<i>E. coli</i>		K. Lorenz, Würzburg
pAd/CMV/V5-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid)	Maus	N-terminaler Myc- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3			Invitrogen
pcDNA3-HA-ERK2	Maus	N-terminaler HA- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-Flag-ERK2	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-Flag-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-Flag-ERK2 ^{Δ174-177,T188D}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-YFP-ERK2	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-YFP-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-YFP-ERK2 ^{Δ174-177,T188D}	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pcDNA3-α _{1B} -AR	n.v.		K. Lorenz, Würzburg
pET-3c-His ₆ -ERK2	Maus	N-terminaler His ₆ - <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
pGex-KG-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid)	Maus	N-terminaler Myc- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg

Die verwendeten Affinitätssequenzen (*tags*) waren wie folgt:

tag	Aminosäuresequenz
Flag	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
GST	Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp
HA	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
His ₆	His His His His His His
Myc	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

2.10 gereinigte Proteine

Bezeichnung	Herkunft
GST-Peptid	diese Arbeit
His ₆ -ERK2	diese Arbeit

2.11 biologisches Material

2.11.1 prokaryotische Zellen

Bezeichnung	Herkunft
<i>E.coli</i> BL21 pLysS	Novagen
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Stratagene

2.11.2 eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
Colo320	humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen	A. Wiegering, Würzburg
COS7	Nierenzellen des <i>Cercopithecus aethiops</i> transformiert mit SV-40	Pharmakologie, Würzburg
HEK293	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus Typ 5 (Ad5)	Pharmakologie, Würzburg (Graham <i>et al.</i> , 1977)
HT29	humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen	A. Wiegering, Würzburg
LS174T	humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen	A. Wiegering, Würzburg
NRCMs	neonatale Rattenkardiomyozyten	diese Arbeit

2.11.3 Adenoviren

Bezeichnung	Spezies	Bemerkung	Herkunft
AdV-Flag-ERK2	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
AdV-Flag-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
AdV-Flag-ERK2 ^{Δ174-177,T188D}	Maus	N-terminaler Flag- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
AdV-YFP-ERK2	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
AdV-YFP-ERK2 ^{Δ174-177}	Maus	N-terminaler YFP- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg
AdV-eGFP	Qualle		T. Stiewe, Marburg
AdV-LacZ	<i>E. coli</i>		K. Lorenz, Würzburg
AdV-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid)	Maus	N-terminaler Myc- <i>tag</i>	K. Lorenz, Würzburg

2.11.4 adeno-assoziierte Viren (Serotyp 9)

Bezeichnung	Spezies	Bemerkung	Herkunft
pdsCMV-MLC0.26- <i>eGFP</i>	Qualle		O. Müller, Heidelberg
pdsCMV-MLC0.26-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid)	Maus	N-terminaler Myc- <i>tag</i>	O. Müller, Heidelberg

2.11.5 Tiere

Bezeichnung	Herkunft
Sprague Dawley Ratten	Janvier
Wildtyp-Mäuse mit FVB/N Hintergrund	Pharmakologie, Würzburg
ERK2 ^{Δ174-177} transgene Mäuse (FVB/N Hintergrund)	K. Lorenz, Würzburg
Wildtyp-Mäuse mit C57Bl/6J Hintergrund	Pharmakologie, Würzburg

2.12 (Stock-)Lösungen und Puffer

20/2-Puffer: (pH 7,2)

HEPES	20mM
EDTA	2mM

Aufschlusspuffer:

Tris (pH7,6)	20mM
NaCl	100mM
DTT	2mM
EDTA	1mM

2x BBS-Puffer: (pH 6,95)

N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure	50mM
NaCl	280mM
Na ₂ HPO ₄	1,5mM

Blockmilch:

Trockenmilchpulver	5% (m/V)
NaCl	100mM
Tris (pH 7,4)	10mM
Tween 20	0,1% (V/V)

BSA-Blocklösung: (in DPBS)

BSA	10% (m/V)
Tween 20	0,01% (V/V)
Glycin	300mM

BSA-Waschpuffer:

Albumin Fraktion V	0,25% (m/V)
NaCl	150mM
Tris (pH 7,4)	50mM
Nonidet P-40	0,2% (V/V)

CBFHH-Puffer: (pH 7,4, steril filtriert)

Dextrose	5,55mM
HEPES	20,06mM
NaCl	137mM
NaH ₂ PO ₄ x7H ₂ O	0,34mM
KCl	5,36mM
KH ₂ PO ₄	0,44mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,81mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml

Chloroquinmedium:

DMEM (4,5g/l Glukose)	27ml
FCS	3ml
Chloroquin (5mg/ml in TBS)	300µl

Coomassie-Lösung:

Coomassie Brilliant Blau R-250	80mg
HCl 37%	3ml
H ₂ O	ad 100ml

DC-Marker:

Nε-(2,4-Dinitrophenyl)-L-Lysin	10mg
Xylencyanol	2mg

n-Butanol	50µl
Pyridin	25µl
Essigsäure	25µl
H ₂ O	1,9ml

DEPC-H₂O: (in H₂O)

DEPC	1:1000
1h stehen lassen und dann autoklavieren	

0%-DMEM-Medium:

DMEM (4,5g/l Glukose)	
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml

5xDNA-Ladepuffer:

EDTA	100mM
Glycerin	50% (V/V)
Bromphenolblau	0,1% (m/V)

Dot Blot-Lysepuffer: (in DPBS)

NaN ₃	1,5mM
NaF	50mM
Na ₄ P ₂ O ₇	5mM
Na ₃ VO ₄	1mM
PMSF	1mM
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	20µg/ml
Benzamidin	0,4mM

Einfrriermedium:

Komplettmedium	70% (V/V)
DMSO	10% (V/V)
FCS	20% (V/V)

Elektrophorese-Puffer: (pH1,9)

Ameisensäure	50ml
Essigsäure	156ml
H ₂ O	ad 2000ml

Elutionspuffer:

Tris (pH7,6)	20mM
NaCl	200mM
DTT	2mM
EDTA	1mM
Glutathion, reduziert	10mM

Entfärbungslösung:

Methanol	40% (V/V)
Essigsäure	10% (V/V)

Eosin-Lösung:

Eosin G (gelblich)	10g
H ₂ O	ad 1000ml

Hämatoxylin-Färbelösung:

Hämatoxylin	1g
Kaliumaluminiumsulfat	50g
Natriumiodat	200mg
Chloralhydrat	50g
Zitronensäure	1g
H ₂ O	ad 1000ml

Kardiomyozyten-Medium:

L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
BrdU	30µg/ml
FCS	5%/1%/0%(V/V)
in MEM-Medium	

Komplettmedium:

FCS	10% (V/V)
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
in DMEM (4,5g/l Glukose) oder RPMI 1640 oder McCoy's 5A	

4fach-Ladepuffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	200mM
SDS	8% (m/V)
Glycerin	40% (m/V)
β-Mercaptoethanol	20% (V/V)
Bromphenolblau	0,05% (m/V)

LB-Agarplatten: (in Petrischalen)

Agar	1,2% (m/V; in LB-Medium unter erhitzen lösen)
Ampicillin	0,1mg/ml (Selektionsantibiotikum)

LB (lysogeny broth)-Medium: (autoklaviert)

Pepton aus Casein	1,6% (m/V)
Hefeextrakt	1% (m/V)

NaCl	0,5% (m/V)
------	------------

Luminollösung: Vor Gebrauch Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen

Lösung A:

Tris (pH 8,3)	100mM
p-Cumarinsäure	0,396mM
Luminol	2,5mM

Lösung B:

Tris (pH 8,3)	100mM
H ₂ O ₂ 30%	0,1% (V/V)

Lysepuffer:

Triton-X-100	1%(V/V)
EDTA	5mM
NaCl	300mM
Tris (pH 7,4)	50mM
NaN ₃	1,5mM
NaF	50mM
Na ₄ P ₂ O ₇	5mM
Na ₃ VO ₄	1mM
PMSF	1mM
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	20µg/ml
Benzamidin	0,4mM

MEM-Medium: (pH 7,3, steril filtriert)

MEM	10,5g
NaHCO ₃	350mg
Vitamin B12	2mg
H ₂ O	ad 1000ml

10xPBS:

NaCl	1,37M
KCl	26,8mM
Na ₂ HPO ₄	101mM
KH ₂ PO ₄	15mM

Permeabilisations-Lösung:

Triton-X-100	0,1% (m/V)
Natriumcitrat	0,1% (m/V)

Phospho-Chromatographie-Puffer:

n-Butanol	750ml
Pyridin	500ml
Essigsäure	150ml
H ₂ O	600ml

Ponceau S-Lösung:

Ponceau S	0,1g
Essigsäure	5ml
H ₂ O	ad 100ml

Preplating-Medium:

L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
FCS	5% (V/V)
in MEM-Medium	

Puffer 1:

Tris (pH7,4)	20mM
NaCl	300mM
β-Mercaptoethanol	7mM

Puffer 2:

Tris (pH7,4)	20mM
NaCl	500mM
β-Mercaptoethanol	7mM

PVP-Lösung:

Polyvinylpyrrolidon (K90) (PVP, 360.000 M _r)	50mg
Essigsäure	57,5 µl
H ₂ O	ad 10ml

Sammelgel: (4% Acrylamid)

Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (m/V))	1,5ml
4x Sammelgelpuffer (0,5M Tris (pH 6,8), 0,4% SDS (m/V))	3ml
H ₂ O	7,5ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lsg. 10% (m/V)	120µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	12µl

10x SDS-Laufpuffer:

Tris-HCl	0,25M
Glycin	1,92M
SDS	1% (m/V)

Siriusrot-Färbelösung:

Direct Red 80 (1% (m/V) in H ₂ O)	1 Teil
gesättigte Pikrinsäurelösung (in H ₂ O)	9 Teile

Stripping-Puffer:

Glycin (pH 2,5)	100mM
SDS	0,1% (m/V)

50xTAE-Puffer: (Gel- und Laufpuffer)

EDTA	50mM
Essigsäure (konz.)	6% (m/V)
Tris-HCl	2M

TBS-Puffer: (pH 7,4, steril filtriert)

Tris	25mM
NaCl	137mM
KCl	5mM
MgCl ₂	0,5mM
CaCl ₂	0,7mM
NaH ₂ PO ₄	0,6mM

Transferpuffer:

Tris-HCl	20mM
Glycin	150mM
Methanol	20% (V/V)

Trenngel: (12% Acrylamid)

Rotiphorese® Gel 30	12ml
4x Trenngelpuffer (1,5M Tris (pH 8,8), 0,4% SDS (m/V))	7,5ml
H ₂ O	10,5ml
APS-Lösung. 10% (m/V)	195µl
TEMED	15µl

Trypsinlösung:

Trypsin	340mg
DNase I (in 0,15M NaCl)	4mg
CBFHH-Puffer	ad 250ml

Waschpuffer:

Tris (pH7,6)	20mM
NaCl	200mM
DTT	2mM
EDTA	1mM

3 Methoden

Soweit nicht anderweitig beschrieben wurde Wasser im Folgenden immer in Millipore-Qualität eingesetzt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Für seine bahnbrechende Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, englisch: *polymerase chain reaction*) aus dem Jahr 1987, erhielt Kary B. Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie. Seine Erfindung ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen (Saiki *et al.*, 1988) sowie das Einführen von Mutationen, Deletionen oder Affinitätssequenzen *in vitro*. Das Schema einer PCR wird in Abbildung 7 vereinfacht dargestellt. Zunächst muss die doppelsträngige DNA (englisch: *deoxyribonucleic acid*) denaturiert werden, also in Einzelsträngen vorliegen. Dies geschieht durch Brechen von Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen bei hohen Temperaturen von etwa 94°C. Beim anschließenden Absenken der Temperatur ermöglicht man die Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide (*Primer*). Diesen Vorgang nennt man auch *Annealing*. Man benötigt dafür ein *Primer*-Paar, wobei jeweils ein *Primer* komplementär zum 5'-Ende und der andere komplementär zum 3'-Ende der DNA ist. Die Temperatur beim *Annealing* wird von der Länge und Sequenz der *Primer* bestimmt und liegt meist in der Nähe des Schmelzpunktes derer, es müssen daher für jedes Konstrukt die Bedingungen neu bestimmt werden. Daraufhin folgt die *Elongation* bei ca. 72°C, bei der eine thermostabile DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auffüllt bis schließlich zwei komplette DNA-Doppelstränge vorliegen. Dieser Zyklus kann mehrfach wiederholt werden, wobei sich die vorhandene DNA-Menge jedes Mal verdoppelt.

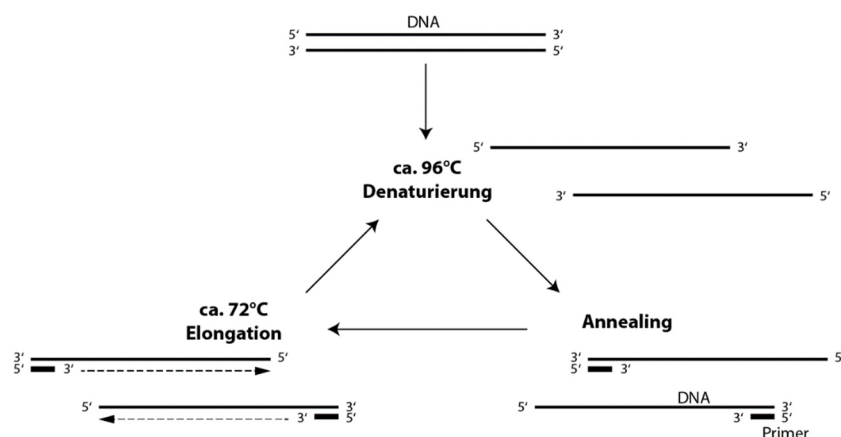


Abbildung 7: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion
Vereinfachtes Prinzip eines Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion.

Beispiel für einen PCR-Ansatz:

DNA-Vorlage	0,1-1µg
5' Ende-Primer	0,5-1µM
3' Ende-Primer	0,5-1µM
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	200µM
Polymerase-Puffer (10x)	10µl
DNA-Polymerase	1µl (1-5U/µl)
H ₂ O	ad 100µl

Beispiel für einen PCR-Ablauf:

Denaturierung: 94°C	3min	} 30x
Denaturierung: 94°C	1min	
Annealing: 55°C	1min	
Elongation: 72°C	2min	
Elongation: 72°C	5min	
Kühlung: 4°C	∞	

Zur Durchführung der Reaktion unter den oben angegebenen Temperaturwechsel und Wiederholungen wurden *Thermocycler* (Thermocycler S1000 Thermalcycler Biorad oder Mastercycler Epgradient Eppendorf) verwendet.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bedient man sich standardmäßig der Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wird die Konzentration der Agarose analog der gewünschten Porengröße des Gels in Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden DNA-Konstrukte gewählt. Je größer das Konstrukt, desto niedriger konzentriert setzt man die Agarose ein. Üblicherweise arbeitet man im Bereich von 1-2%igen (m/V) Agarosegelen, angesetzt in TAE-Puffer (Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer). Zum Anfärben der DNA-Fragmente wird dem Gel noch 0,5µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid ist ein Phenanthridin-Farbstoff, welcher in die DNA interkalieren kann. Dabei wird sein Anregungsspektrum so verschoben, dass es bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark fluoresziert und somit die Nukleinsäuren im Gel sichtbar macht. Der zuvor beschriebene PCR-Ansatz wurde mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Um einen Anhaltspunkt für die Größe der DNA-Fragmente zu erhalten wurde ein DNA-Größenstandard (100bp- oder 1kb-Leiter, New England Biolabs) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele mithilfe des E.A.S.Y® Win-Dokumentationssystems (Herolab) dokumentiert.

3.1.3 Transformation kompetenter *Escherichia coli*, Hitzeschock-Methode

Als Transformation bezeichnet man das nicht-virale Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Eine Möglichkeit dies zu tun ist die Hitzeschock-Methode. Mittels eines Hitzeschocks entstehen in der Zellmembran der Bakterien kurzzeitig Poren, wodurch die DNA in die Zelle gelangen kann (Huff *et al.*, 1990). Diese Methode wurde zur präparativen Aufreinigung von Plasmiden, wie dem pcDNA3-Plasmidvektor, verwendet. Dazu wurde ca. 1µg DNA zu 100µl kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*) (XL1-blue, Stratagene und BI21, Novagen) gegeben. Anschließend wurden die Zellen 15min auf Eis inkubiert und der Hitzeschock für 50sec bei 42°C durchgeführt. Danach kamen die Zellen nochmal für 1min auf Eis, bis sie dann mit 900µl *lysogeny broth* (LB)-Medium versetzt und 50min lang bei 37°C inkubiert wurden. Ca. 50µl dieses Ansatzes wurden schließlich auf einer LB-Agarplatte mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert und für ca. 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Kultivierung von *E.coli*

Von den oben beschriebenen Agar-Kulturen wurden Einzelkolonien der mit dem pcDNA3-Plasmidvektor transformierten Bakterien gepickt und 50ml LB-Medium, welches mit 0,1mg/ml Ampicillin versetzt wurde, damit angeimpft. Dieser Ansatz wurde wiederum für ca. 15 Stunden bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation mit einer Beckmann Avanti Zentrifuge (3400g, 10min, 4°C) geerntet.

3.1.5 Präparative Aufreinigung von DNA

Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das Plasmid Plus Midi Kit® (Quiagen) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch bei 260nm am NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) gemessen. Hierbei misst man auch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280nm (A_{260}/A_{280}). Ein Wert unter 1,6 deutet auf eine zu starke Verschmutzung mit Proteinen hin (Jansohn und Rothhämel, 2012).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Primärzellen (Präparation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten)

Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCMs, englisch: *neonatal rat cardiomyocytes*) wurden aus den Herzen 1-3 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten präpariert. Nachdem die Herzen isoliert und in CBFHH-Puffer gegeben wurden, erfolgten alle restlichen Arbeitsschritte unter einer Sterilbank. Hier wurden zunächst die Herzohren entfernt. Das zurückgebliebene ventrikuläre Gewebe wurde zerkleinert und

mit DNase-haltiger Trypsinlösung (Difco™ Trypsin 250, BD Biosciences) in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten enzymatisch verdaut (Chlopcikova *et al.*, 2001; Harary und Farley, 1963; Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012).

Das Gewebe wurde so zunächst für 15min in 7,5ml Trypsin-Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur vorverdaut und der Überstand verworfen. Nun folgte der tatsächliche Verdau, welcher mehrfach wiederholt wurde. Dazu wurde das Gewebe immer mit 7,5ml Trypsinlösung für 10min gerührt, anschließend wurde das Gewebe in der Lösung resuspendiert, der Überstand abgenommen und wieder Verdau-Lösung auf das Gewebe gegeben. Der Überstand, welcher die Zellsuspension enthielt, wurde dabei in 50ml-Falcons gesammelt, die fetales Kälberserum (FCS) enthielten, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Diese Schritte wurden bis zum kompletten Verdau des Gewebes wiederholt. Die gesammelte Zellsuspension wurde daraufhin abzentrifugiert (10min, 800g, Eppendorf Centrifuge 5804), der Überstand verworfen und das Pellet mit *Preplating*-Medium resuspendiert. Um Zellklumpen und restliche Gewebestücke zu entfernen wurde die Suspension durch ein Sieb (40µm, Nylon, BD Biosciences) gegeben. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturschalen verteilt und eine Stunde bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert (*Preplating*). Bei diesem Schritt wurden die Kardiomyozyten von anderen Zelltypen, wie zum Beispiel adhärennten Fibroblasten, getrennt, da Fibroblasten deutlich schneller am Boden der Zellkulturschalen anhaften als Kardiomyozyten (Chlopcikova *et al.*, 2001). Schließlich wurde das Medium mit den darin enthaltenen Kardiomyozyten abgenommen und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Hierzu wurde etwas Zellsuspension zu gleichen Teilen mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt. Trypanblau färbt nur tote Zellen blau an, da es nicht durch die intakte Membran lebender Zellen gelangen kann, somit sind lebende Zellen nicht angefärbt und leuchten hell. Zuletzt wurden die Zellen in 5%-Kardiomyozytenmedium (inkl. BrdU) in der jeweils benötigten Zelldichte in Zellkulturschalen ausgesät, welche zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet (siehe Abschnitt 3.2.2.4) wurden. Bromodesoxyuridin (BrdU) im Kardiomyozytenmedium diente dazu, die Proliferation von verbliebenen Fibroblasten zum hemmen (Chlopcikova *et al.*, 2001). Die Zellen wurden bei 37°C und 1% CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf 1%-Kardiomyozytenmedium gewechselt.

3.2.2 Zelllinien

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden wie im Folgenden beschrieben passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit DPBS gewaschen. Das Ablösen der adhärennten Zellen erfolgte kurz (ca. 2min) mit einer Trypsin-EDTA-Lösung. Die enzymatische Reaktion wurde daraufhin mit dem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Komplettmedium abgestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 passagiert. Das Passagieren erfolgte alle 2-3 Tage.

Cos7- und HEK293-Zellen wurden bei 37°C und 7% CO₂-Gehalt in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Die Krebszelllinien Colo320, LS174T (RPMI 1640-Komplettmedium) und HT29 (McCoy's 5A-Komplettmedium) wurden bei 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

3.2.2.2 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung dient der Langzeitlagerung von Zellen. Dazu wurden die Zellen in einer möglichst frühen Passage eingefroren. Sie wurden mithilfe der Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst, in wenig Medium aufgenommen und dann in einem Falcon zentrifugiert (120g, 3min, RT, Hettich Rotina 48R). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in kaltem Einfriermedium resuspendiert und anschließend in ein gekühltes Kryoröhrchen überführt (1ml/Röhrchen). Die Zellen wurden so für 2h bei -20°C und danach über Nacht bei -80°C gelagert und daraufhin in Stickstofftanks überführt. Dem Einfriermedium wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) und ein höherer Anteil an FCS als Kryoprotektiva zugesetzt.

Um diese Zellen nun wieder aufzutauen wurden die Kryoröhrchen unter fließendes, warmes Wasser gehalten. Die Zellen wurden daraufhin resuspendiert, in ein Falcon mit 10ml des jeweiligen warmem Komplettmedium überführt und anschließend zentrifugiert (120g, 3min, RT, Hettich Rotina 48R) und wieder in etwas Komplettmedium aufgenommen. Diese Schritte sollen rasch ablaufen und dienen dazu, die Zellen von DMSO zu befreien, da dieses toxisch ist. Die Zellen wurden dann in 10ml Komplettmedium in Zellkulturschalen ausplattiert und bei 37°C und dem jeweils nötigen CO₂-Gehalt inkubiert.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl eignet sich klassischerweise die Neubauer-Zählkammer. Die Zählkammer besteht aus einem Objektträger und einem Deckglas. Der Objektträger besitzt ein eingekerbtes Liniennetz mit definierter Tiefe. Bringt man nun das Deckglas auf dem Objektträger auf, hat man in dem Zwischenraum ein definiertes Volumen. Die zu zählende Zellsuspension wurde an den Rand des Objektträgers pipettiert und aufgrund von Kapillarkräften in den Zwischenraum gezogen. Mithilfe des Liniennetzes konnten nun die Zellen in den einzelnen Quadranten gezählt und mit einem Faktor multipliziert werden, der für die Kammer spezifisch ist, um so die tatsächliche Zellkonzentration zu erhalten.

3.2.2.4 Beschichten mit Poly-D-Lysin

Für Versuche mit NRCMs und Krebszellen, aber auch für Mikroskopieanalysen anderer Zelllinien mussten die (*Multiwell*-) Zellkulturschalen oder *Glascoverslips* vor dem Aussäen der Zellen mit Poly-D-Lysin beschichtet werden, um die Adhäsion der jeweiligen Zellen zu verbessern. Poly-D-lysin ist ein positiv geladenes Polymer und kann daher mit negativ geladenen Zellen gut interagieren. Da

Poly-D-Lysin synthetisch ist, kann es zudem schwer enzymatisch angebaut werden und so die Adhäsion der Zellen verlängern (Mazia *et al.*, 1975). Die (*Multiwell*-) Zellkulturschalen oder *Glascoverslips* wurden dazu für 30min mit einer sterilen Lösung Poly-D-Lysin in DPBS (0,1mg/ml) beschichtet. Die Lösung wurde abgenommen und die (*Multiwell*-) Zellkulturschalen oder *Glascoverslips* anschließend mit DPBS gewaschen.

3.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.3.1 Adenovirale Transduktion

Transduktion ist die Übertragung von genetischem Material (DNA) durch Viren. In dieser Versuchsreihe wurden adenovirale Vektoren des Typs pAd/CMV/V5 verwendet, um NRCMs und Krebszellen zu transduzieren.

Bei NRCMs erfolgte die Transduktion mit Adenoviren 48h nach deren Präparation. Dazu wurde der Virus 1:2000 in 0%-Kardiomyozytenmedium vorverdünnt und davon ein entsprechendes Volumen direkt in das Medium zu den NRCMs pipettiert. Die zu pipettierenden Volumina wurden so gewählt, dass man eine vergleichbare Expression der jeweiligen Konstrukte erhielt.

Die Krebszellen wurden im Gegensatz zu NRCMs 4h nach ihrem Passagieren transduziert, indem der Adenovirus zuvor 1:800 in Komplettmedium vorverdünnt wurde.

Für alle Zellen galt, dass 48h nach der Transduktion die jeweiligen Versuche durchgeführt wurden.

3.2.3.2 *In vivo*-Transduktion durch adeno-assoziierte Viren

Die hier verwendeten adeno-assoziierten Viren (AAVs) wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Müller (Universitätsklinikum Heidelberg, Abteilung Innere Medizin III) von Dr. Andreas Jungmann hergestellt. Sie hatten den Serotyp AAV9-dsCMV-MLC260. Einzelheiten zur Herstellung und Aufreinigungen der Vektoren sind den Publikationen von Pleger *et al.* und Schmid *et al.* zu entnehmen (Pleger *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 2015).

Adeno-assoziierte virale Konstrukte:

Myc-Peptid	1,4E+13vg/ml
	1,8E+13vg/ml
eGFP (Kontrollvirus)	1,198E+13vg/ml

Die AAVs wurden mit sterilem DPBS so verdünnt, dass man in einem Volumen von 150µl eine Viruspartikelzahl von 1×10^{12} hatte. Dieses Volumen wurde C57Bl/6J-Mäusen als Bolus in die Schwanzvene direkt im Anschluss an die transverse Aortenkonstriktion (siehe Abschnitt 3.7.2) injiziert (durchgeführt von Prof. Dr. Kristina Lorenz). Zu dem Thema Gentherapie mit AAVs wird ausführlicher unter Punkt 3.7.4 eingegangen.

3.2.3.3 DEAE-Dextran-Methode

Die DEAE-Dextran-Methode kann zum Transfizieren verschiedener eukaryotischer Zelltypen verwendet werden. Sie beruht auf dem Prinzip, dass negativ geladene DNA zusammen mit positiv geladenen Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran-Polymeren Komplexe bildet, die dann an der negativ geladenen Zellmembran adsorbieren und wahrscheinlich durch Endozytose in die Zelle gelangen (Schenborn und Goiffon, 2000b). Befindet sich die DNA schließlich in der Zelle, kann sie lysosomal abgebaut werden. Der Zusatz von Chloroquin verringert diese Degradation der DNA (Luthman und Magnusson, 1983). Die Zugabe von DMSO, der sog. „DMSO-Schock“, stört die Integrität der Zellmembran und erhöht so auch die Transfektionseffizienz (Schenborn und Goiffon, 2000b).

Diese Transfektionsmethode wurde in dieser Versuchsreihe zum Einbringen von DNA in COS7-Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 40.000-60.000 Zellen/ml auf zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtete (*Multiwell*-) Zellkulturschalen (teilweise mit *Glascoverslips*) ausgesät und über Nacht in Kompletmedium (7% CO₂, 37°C) kultiviert. Dann erfolgte die Transfektion mit den jeweiligen pcDNA3-Konstrukten. Hierfür wurden die Zellen mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend 200µl Transfektionsansatz/*well* pipettiert (15min, 37°C, 5% CO₂). Danach wurden noch 800µl Chloroquinmedium/*well* hinzugegeben (3h, 37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und der „DMSO-Schock“ mit 10% (V/V) DMSO in DPBS (500µl/*well*) durchgeführt. Die Zellen wurden daraufhin mit DPBS gewaschen und mit je 1ml Kompletmedium/*well* inkubiert (7% CO₂, 37°C). Ca. 48h nach der Transfektion wurden die Versuche mit den Zellen durchgeführt.

Zusammensetzung des Transfektionsansatzes: (für 1 Well einer 12-Well-Platte)

TBS	100µl
α _{1B} -adrenerger Rezeptor	0,4µg
DNA	0,3-1,56µg
DEAE (1mg/ml in TBS)	100µl

3.2.3.4 Calciumphosphat-Co-Präzipitation

Bei der Calciumphosphat-Co-Präzipitation bildet die DNA beim Vermischen mit Calciumchlorid und einem Phosphatpuffer ein Präzipitat (Schenborn und Goiffon, 2000a). Man geht davon aus, dass diese Präzipitate letztendlich über Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden (Chen und Okayama, 1987; Loyter *et al.*, 1982).

Diese Methode der Transfektion diente der Übertragung von pcDNA3-Konstrukten in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden 4h nach dem Passagieren auf 9cm-Zellkulturschalen transfiziert. Dazu wurde 1ml des Transfektionsansatzes/Schale pipettiert und inkubiert (24h, 37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24h wieder zurück in den 7% CO₂-Inkubator gestellt, woraufhin die Versuche durchgeführt wurden.

Transfektionsansatz: (9cm-Zellkulturschale)

H ₂ O	450µl
2,5M CaCl ₂	50µl
DNA	3-10µg
2x BBS-Puffer	500µl

pcDNA3-Konstrukte:

Flag-ERK2	3µg
Myc-Peptid	10µg
pcDNA3-Plasmid (leer, Kontrolle)	10µg

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

3.3.1.1 Zelllysate

Zur Lyse von Zellen wurden detergenzhaltige Puffer verwendet. Die Zellen wurden 1x mit DPBS gewaschen und dann eiskalter Lysepuffer (inkl. Phosphatase- und Proteaseinhibitoren) zupipettiert. Nach der Lyse (25min, 4°C) wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt, sonifiziert (Bandelin Sono Puls HD 200, 5 Stöße bei Cycle 30, Power MS72/D) und dann zentrifugiert (10min, 25.200g, 4°C, Hettich EBA 12R), um unlösliche Bestandteile aus dem Lysat zu entfernen. Der Überstand wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 3.3.2) und dem Einstellen auf eine einheitliche Proteinmenge mit DPBS für weitere Versuche verwendet (oder bei -20°C zwischengelagert). Für die *Western Blot* Analyse (siehe Abschnitt 3.3.5) wurden die Lysate vorher noch mit 4fach-Ladepuffer versetzt.

3.3.1.2 Herzlysate

Gefrorene Mausherzen wurden in Lysepuffer mechanisch mit einem Ultra-Turrax-Stab (Janke und Kunkel, Ultra turrax T25) zerkleinert und homogenisiert (ca. 20sec) und danach zentrifugiert (10min, 25.200g, 4°C, Hettich EBA 12R). Mit dem Überstand wurde so verfahren, wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben.

Die fertigen Lysate wurden entweder für den Caspase-3,7-Aktivitäts-Assay (Proteinkonzentration 0,2µg/µl) oder für die *Western Blot* Analyse (hier mit 4fach-Ladepuffer versetzt) weiterverwendet oder gegebenenfalls bei -20°C zwischengelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge von Proteinlysaten bediente man sich des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) nach Anweisung des Herstellers. Dieser Methode liegt zugrunde, dass Kupfer(II) in alkalischer Lösung in Anwesenheit von Proteinen zu Kupfer(I) reduziert wird (Biuret-Reaktion) und dieses dann mit Bicinchoninsäure (BCA, englisch: *bicinchoninic acid*) einen violetten Komplex bildet. Die Messung erfolgte gegen eine Standardreihe (bovines Serumalbumin) in 96-well-Mikrotiterplatten in einem Photometer (SpectraMax, Molecular Devices) bei 562nm.

3.3.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe mit Molekülmassen zwischen 5 und 250kDa (Laemmli, 1970). Bei dieser Art der Elektrophorese verwendet man diskontinuierliche Gele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlicher Porengröße, auf Polyacrylamidbasis und SDS als anionisches Tensid, welches die Proteine komplett umgibt, sodass diese konstant negativ geladen sind und es bei der Auftrennung somit ausschließlich auf die Molekülgröße ankommt. Größere Proteine werden so stärker im Gel zurückgehalten. Für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-System von BioRad oder das vertikale Gelelektrophorese-System von Hoefer (Gelgröße 16x18cm) verwendet. Beim Herstellen der Gele wurde zuerst das Trenngel in die Kammern gegossen und nach dem Aushärten darauf dann das Sammelgel. Zum Beladen der Gele mit den Proteinlysaten und einem Molekulargewichtsstandard (peqGold Proteinmarker III®, Peqlab) wurden die Kammern mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Schließlich erfolgte die Elektrophorese durch Anlegen einer konstanten Spannung (200V) für das BioRad-System oder einer konstanten Stromstärke (70mA/Gel) für das Hoefer-System.

3.3.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Um Proteine direkt nach der elektrophoretischen Trennung in Polyacrylamid-Gelen visualisieren und teilweise auch quantifizieren zu können, kann der Farbstoff Commassie Brilliant Blau R-250 verwendet werden, da dieser unspezifisch an Proteine bindet (Neuhoff *et al.*, 1988). Zu diesem Zweck wurden die Gele jeweils 3x 1min in der Coomassie-Lösung in einer Mikrowelle gekocht, bis die Färbung sichtbar war, und daraufhin noch 1x 1min in Wasser. Anschließend wurden die Gele für ca. 2h in einer Entfärbungslösung geschwenkt, um den Hintergrund zu reduzieren und die Proteine im Gel zu fixieren.

3.3.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (*Western Blot*)

Der elektrophoretische Transfer dient der Immobilisation und Detektion von Proteinen, welche zuvor mithilfe eines Polyacrylamid-Gels aufgetrennt wurden. Dabei werden die Proteine auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) übertragen (Burnette, 1981). In dieser Arbeit wurde dazu eine Nass-Blot-Apparatur (Mini Transblot Cell, Biorad) und PVDF-Membranen mit einer Porengröße von $0,45\mu\text{m}$, in Methanol äquibriert, verwendet. Die Membran wurde zusammen mit dem Polyacrylamid-Gel in mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt und in die Transferkammer, mit Transferpuffer gefüllt, mitsamt aller nötigen Vorrichtungen eingesetzt (Anordnung siehe Abbildung 8). Die Elektrophorese fand schließlich unter Kühlung statt (100V, 1h).

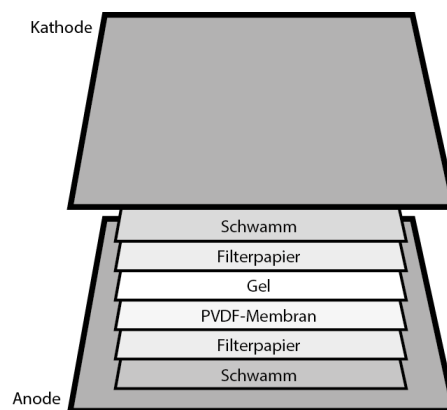


Abbildung 8: Western Blot-Schichtanordnung

Schematischer Aufbau aller Bestandteile zum elektrophoretischen Transfer von Proteinen in einer Transferkammer (nähere Erläuterungen siehe Text).

Um die Gesamtheit aller membrangebundener Proteine darzustellen, wurde für einige Versuche die Membran nach dem Transfer kurz mit einer wasserlöslichen Ponceau S-Lösung angefärbt (Romero-Calvo *et al.*, 2010).

3.3.6 Tüpfelblot (*Dot Blot*)

Bei der *Dot Blot*-Methode wird das Proteinlysate nicht wie oben beschrieben erst mithilfe einer SDS-PAGE getrennt, sondern direkt auf die Membran aufgetropft (Hawkes *et al.*, 1982). Es dient v.a. dem Nachweis kleinster Proteinmengen und der Detektion sehr kleiner bzw. großer Proteine, was für die *Western Blot* Methode ungeeignet ist. Für diese *Blotting*-Methode wurden die Lysate, wie in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, hergestellt, allerdings wurde hierfür der *Dot Blot*-Lysepuffer zum Lysieren der Zellen verwendet. Die Membran wurde wie gewohnt in Methanol äquibriert und auf eine 3fache Schicht Filterpapier, mit Transferpuffer getränkt, gelegt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Proteinlysate mit β -Mercaptoethanol versetzt (5% (V/V)). Die Lysate wurden direkt auf

die Membran getropft (je 10µl). Dies wurde pro Lysat 1-3x durchgeführt. Zwischen den einzelnen Applikationen ließ man die Tropfen in die Membran einziehen, bis sie angetrocknet waren.

3.3.7 Immundetektion immobilisierter Proteine

Die nach dem *Western Blot* oder *Dot Blot* immobilisierten Proteine können als Antigene fungieren und so mit geeigneten Antikörpern visualisiert werden (Burnette, 1981). Dies bezeichnet man Immundetektion. Nach dem *Blotting* wird die Membran dafür zunächst in Blockmilch geschwenkt (ca. 2h, RT), um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren, und dann über Nacht in einer Antikörperlösung inkubiert (4°C, schwenkend). Der Antikörper erkennt ein bestimmtes Epitop auf dem zu untersuchenden Protein (primärer Antikörper) und wurde entweder in Blockmilch oder in BSA-Waschpuffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran mehrfach für einige Minuten mit BSA-Waschpuffer von ungebundenen Antikörpern befreit und daraufhin mit einem weiteren Antikörper inkubiert (sekundärer Antikörper, verdünnt in BSA-Waschpuffer, 2h, RT), welcher gegen das IgG der Spezies des primären Antikörpers gerichtet und zusätzlich an Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Membran wurde schließlich wieder gewaschen. Nun erfolgte die Detektion der Proteine. Hierfür wurde entweder das Pierce® ECL plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) oder Luminollösung auf die Membran gegeben. Die an die sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Die dadurch entstehende (Chemie-)Lumineszenz kann durch Auflegen von Autoradiographiefilmen (Super RX, Fuji Film) detektiert und analysiert werden (Ogata *et al.*, 1983).

3.3.8 Ablösen gebundener Antikörper

Um eine bereits untersuchte Membran abermals entwickeln zu können, müssen zunächst die zuvor gebundenen Antikörper von ihr gelöst werden, was als *Strippen* bezeichnet wird. Die Membranen müssen dazu in *Stripping*-Puffer mit niedrigem pH-Wert inkubieren (Legocki und Verma, 1981). Sie wurden hierfür wieder in Methanol äquilibriert und dann für 2h bei RT in *Stripping*-Puffer geschwenkt. Nach dem *Strippen* wurde die Membran kurz mit Wasser gewaschen und dann mit den einzelnen Schritten aus Abschnitt 3.3.7 fortgefahren.

3.3.9 Caspase-3/7-Aktivitäts-Assay

Die Caspasen 3 und 7 spielen eine zentrale Rolle in der Exekutionsphase der zellulären Apoptose und bieten durch Messung ihrer Aktivität die Möglichkeit, den Grad der Apoptose in einem Proteinlysate zu bestimmen. Zur Messung der Caspase 3/7-Aktivität von Mausherzen wurde das Caspase-Glo®3/7-Assay Kit (Promega) verwendet. In diesem Kit wird ein prolumineszentes Substrat der Caspasen 3 und 7 bereitgestellt, welches nach Spaltung ein Substrat der Luciferase freigibt und so zur Lumines-

zenz führt. Dieses Signal kann gemessen werden und ist direkt proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7. Je 50µl der Herzlysate wurden in eine weiße 96-well-Platte (Nunc) pipettiert und mit 50µl des Reaktionsgemisches aus dem Kit vermischt. Diese Mischung wurde 1h bei RT inkubiert und anschließend das Lumineszenzsignal der einzelnen Proben bei 700nm gemessen (EnVision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer).

3.3.10 Immunpräzipitation von ERK aus Zelllysaten

Die Immunpräzipitation bedient sich der Eigenschaft von Antikörpern, Zielproteine (Antigene) aus einer komplexen Probe isolieren zu können (Kaboord und Perr, 2008). In dieser Arbeit wurde diese Methode dazu verwendet Flag-ERK aus HEK293-Zelllysaten zu präzipitieren. Hierfür wurden pro Probe 8µl Protein-A-Sepharose (*Beads*) über Nacht mit 1,125µl (=5,625µg) anti-Flag-Antikörper in DPBS inkubiert und dadurch aneinander gekoppelt. Nach dem Koppeln wurden die *Beads* mit 20/2-Puffer gewaschen und dann 50µl 20/2-Puffer je Probe hinzugefügt.

Konfluente HEK293-Zellen, mit Flag-ERK2, Myc-Peptid oder pcDNA3 transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.4), wurden wie unter Punkt 3.3.1.1 beschrieben lysiert und 800µl des daraus entstandenen Zelllysats mit 50µl *Beads* inkubiert (2h, 4°C, rotierend). Anschließend wurde der Ansatz noch 3x mit 20/2-Puffer gewaschen und konnte dann für weitere Versuche verwendet werden.

3.4 Methoden zur Proteinanalyse

3.4.1 Proteinaufreinigungen

3.4.1.1 Aufreinigung von His₆-ERK2

Die Anreicherung und Aufkonzentrierung von His₆-ERK2 geschah mithilfe des pET-Expressionssystems. Zu diesem Zweck wurde His₆-ERK2 in den pET-3c-Vektor (Agilent Technologies) kloniert. Dieser Vektor wurde in den *E.coli* Stamm BL21 (Novagen) eingebracht. Dieser besitzt ein T7-Expressionssystem, welches unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors steht (Dubendorff und Studier, 1991). Die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zum Nährmedium der Bakterien induziert diesen Promotor und somit das T7-Expressionssystem und die Synthese des zuvor transformierten Konstruktes. Für die Aufreinigung von Proteinen mit einer His₆-Affinitätssequenz ist das Prinzip der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie mit einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Säule (Quiagen) anwendbar (Hochuli *et al.*, 1987). Die Agarose als Säulenmatrix ist an Nitrilotriessigsäure gekoppelt. Diese bildet Chelate mit Nickelionen, welche mit den Seitenketten des Histidins interagieren und so das Protein reversibel an die Säule binden. Das Protein kann dann wieder durch Zugabe von Imidazol von der Säule eluiert werden, da dieses das Protein von den Bindungsstellen am Nickel verdrängt.

Bei der präparativen Aufreinigung von His₆-ERK wurden transformierte *E.coli*-Einzelkolonien gepickt und in 10ml LB-Medium mit 0,1mg/ml Ampicillin in einem Rotationsschüttler inkubiert (ca. 15h, 37°C). 4ml davon wurden dann in 400ml LB-Medium mit Ampicillin bis zu einer Zelldichte von 10⁸ Zellen/ml gezogen. Das entspricht einer optischen Dichte von 0,4-0,5 E₆₀₀. Bei Erreichen dieser Zelldichte wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 200µM IPTG induziert und die Bakterien so 6h weitergezogen, bis sie schließlich abzentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, 3400g, 10min, 4°C), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden. Zur Weiterverarbeitung wurde das Bakterienpellet mit 15ml Puffer 1 auf Eis aufgetaut und resuspendiert. Die Zellen wurden dann zum Aufbrechen sonifiziert (Bandelin Sono Puls HD 200, 3x 15 Stöße bei Cycle 30, Power MS72/D) und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Beckmann Le-70, 1h, 165000g, 4°C) entfernt. Für die Affinitätschromatographie wurde eine Chromatographiesäule (BioRad) mit 1ml Ni-NTA-Agarose befüllt und mit Puffer 1 äquilibriert. Der Bakterienzellüberstand wurde anschließend auf die Säule gegeben und 5x mit 3ml und 3x mit 5ml Puffer 2 gewaschen. Daraufhin wurde das Protein mit 150mM Imidazol von der Säule eluiert (30min, 4°C, rotierend) und auf eine zuvor mit Puffer 1 äquilibrierte Zentrifugationseinheit (30kDa, Millipore) gegeben und so 6x mit Puffer 1 gewaschen, um die Imidazolkonzentration zu reduzieren. Schließlich wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteinlösung aliquotiert und nach Schockfrost bei -80°C gelagert.

3.4.1.2 Aufreinigung von GST-Peptid

Für die Aufreinigung von GST-Peptid wurde das Peptid zuerst in das pGex-KG-Plasmid kloniert (Lorenz *et al.*, 2003). In diesem Vektor wird die Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusionspartner und Affinitätssequenz für das gewünschte aufzureinigende Protein bereitgestellt, und zwar so, dass nach erfolgter Anreicherung die GST-Sequenz (26kDa) durch die schnittstellenspezifische Protease Thrombin abgespalten werden kann (Smith und Johnson, 1988). Die Prozedur der Aufreinigung ist sehr ähnlich zu der mit der His₆-Affinitätssequenz. Bis zur Zugabe von IPTG ist diese sogar identisch. Hier wurde das IPTG über Nacht bei 30°C mit der Bakterienzellkultur inkubiert. Das Bakterienpellet wurde später dann in 15ml Aufschlusspuffer lysiert und auf eine Glutathion SepharoseTM 4B-Säule (1ml, GE Healthcare) gegeben. Die Säule wurde zuvor mit Waschpuffer äquilibriert. Nach dem Durchlaufen des Lysats wurde die Säule 3x mit 5ml Waschpuffer gewaschen und das Protein schließlich mit 2,5ml Elutionspuffer eluiert (10min, RT). Danach wurde das Eluat wieder mithilfe der Zentrifugationseinheiten (10kDa, äquilibriert in Waschpuffer) gewaschen und so wie oben beschrieben weiter verfahren.

3.4.2 ERK2-Phosphorylierungs-Assays

3.4.2.1 *Phosphopeptide Mapping* von aufgereinigtem His₆-ERK2

Verschiedene Phosphorylierungsstellen in einem Protein können oft unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion und Signalweiterleitung dessen haben. Zur Identifizierung unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen ist das *Phosphopeptide Mapping* eine sehr nützliche Methode, bei der eine ³²P-markierte Substanz mit Enzymen verdaut wird und die daraus resultierenden radioaktiven Phosphopeptide in zwei Dimensionen (Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie) voneinander getrennt werden (van der Geer und Hunter, 1994). Zu diesem Zweck wurde aufgereinigtes His₆-ERK2 (1µM) zusammen mit Gβγ-Untereinheiten (500nM) sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit des GST-Peptids (80µM) in einem radioaktiven Phosphorylierungsansatz inkubiert (20min, 30°C, leicht schüttelnd).

Radioaktiver Phosphorylierungsansatz: (in 20/2-Puffer)

ATP	100µM
MgCl ₂	10mM
[γ- ³² P]-ATP	50µM

Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 4fach-Ladepuffer versetzt, die Proteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Anfärben der Membran mit einer Ponceau S-Lösung konnten die Proteine sichtbar gemacht und so die ERK2-Bande (42kDa) ausgeschnitten werden. Diese Membranschnipsel wurden nach dem Waschen mit Methanol und Wasser in einer PVP-Lösung inkubiert (30min, 37°C). Daraufhin wurden die Membranen 5x mit Wasser und noch 2x mit einer 50mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH₄HCO₃)-Lösung gewaschen, bevor sie über Nacht mit Trypsin (gelöst in 50mM NH₄HCO₃, Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) verdaut wurden (37°C), um ERK2 von der PVDF-Membran zu lösen. Die Membranstücke wurden dann entfernt und die Enzym/ERK2-Lösung in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend lyophilisiert (4h, Vr-I Hetovac, Heto). Das Lyophilisat wurde im Anschluss in 5µl Ampuwa®-Wasser (Fresenius Kabi) gelöst und in 0,5µl Einheiten (Proben insg. je 3,5 µl, DC-Marker insg. 1µl) auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte (20x20cm, Merck) aufgetragen (Auftragschema siehe Abbildung 9).

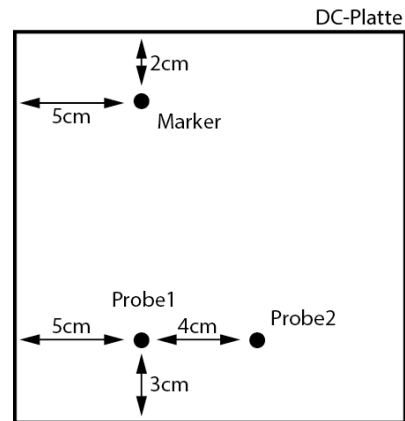


Abbildung 9: Auftragsschema einer DC-Platte für das Phosphopeptide-Mapping

Schematische Darstellung des Auftragsschemas der einzelnen Proben auf einer DC-Platte.

Nachfolgend wurden die Phosphopeptide für die erste Dimension in Elektrophorese-Puffer elektrophoretisch getrennt (10psi, 1000V, 25min, Hunter Thin Layer Peptide Mapping Electrophoresis System HTLE-7002), eine halbe Stunde getrocknet und für die zweite Dimension in einer mit Phospho-Chromatographie-Puffer äquilibrierten DC-Kammer chromatographisch separiert (8h, dunkel). Nach abermaligem Trocknen der DC-Platte wurden die aufgetrennten Phosphopeptide darauf autoradiographisch detektiert.

Der gesamte Versuchsaufbau erfolgte analog zu der Beschreibung von Lorenz *et al.* (Lorenz *et al.*, 2009a).

3.4.2.2 Nichtradioaktive Immundetektion von phosphoryliertem His₆-ERK2

Stehen sehr gute, spezifische Antikörper zur Verfügung können verschiedene Phosphorylierungsstellen in einem Protein auch mithilfe der Immundetektion (siehe Abschnitt 3.3.7) unterschieden werden. Um für diesen Zweck aufgereinigtes His₆-ERK2 zu phosphorylieren wurde es in den gleichen Mengen wie im Punkt zuvor beschrieben mit G β γ -Untereinheiten und dem GST-Peptid inkubiert, in diesem Fall aber in einem nichtradioaktiven Phosphorylierungsansatz.

Nicht-radioaktiver Phosphorylierungsansatz: (in 20/2-Puffer)

ATP	100 μ M
MgCl ₂	10mM

Nach der Reaktion wurden die einzelnen Ansätze mit 4fach-Ladepuffer versetzt und mittels *Western Blot* und anschließender Immundetektion mit geeigneten Antikörpern die gesuchten Phosphorylierungsstellen analysiert.

3.5 Fluoreszenzbasierte Methoden

3.5.1 Zellfixierung

Das Fixieren von Zellen dient der Beibehaltung deren Struktur und Anordnung im Gewebe, auch im Hinblick darauf, dass sie der Weiterverarbeitung standhalten sollen. Sie erhält unter anderem auch den Zustand und die räumliche Aufteilung von Proteinen und anderen Molekülen in der Zelle, so dass dies später untersucht werden kann (Thavarajah *et al.*, 2012). Zur Fixierung von Zellen oder Geweben wurde hier eine 4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung in PBS verwendet. PFA ist ein Quervernetzer von Proteinen, der z.B. mit primären Aminen zu Schiff'schen Basen und mit Amidinen zu Hydroxymethyl-Produkten reagiert, ohne dabei sichtbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine zu nehmen (Mason und O'Leary, 1991). Die Zellen wurden zum Fixieren zunächst 2x mit DPBS gewaschen, dann in der PFA-Lösung inkubiert (10min, RT) und schließlich noch 1x mit DPBS gewaschen. Die entnommenen Gewebeteile, zumeist Herzen, wurden über Nacht bei 4°C in der PFA-Lösung fixiert.

Herstellung der 4%igen PFA-Lösung:

- 4g PFA in 50ml Wasser unter Rühren auf 60°C erhitzen
- 1M NaOH hinzugeben bis PFA vollständig gelöst ist (pH ca. 7,5)
- Lösung unter Rühren abkühlen lassen
- 10ml 10xPBS hinzugeben und mit Wasser ad 100ml verdünnen
- Aliquotieren und bis zum Gebrauch bei -20°C lagern

3.5.2 Phalloidin-Färbung

Phalloidin gehört zu der Gruppe der Phallotoxine welche in grünen Knollenblätterpilzen vorkommen und hat die Eigenschaft sehr selektiv an polymeres F-Aktin zu binden (Cooper, 1987). Das hier verwendete Phalloidin war zusätzlich noch mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor[®] 488 konjugiert und ermöglichte so die Visualisierung der Wechselwirkung mit F-Aktin und folglich die Abgrenzungen des Zytoskeletts. Diese Möglichkeit der Sichtbarmachung wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, mikroskopisch die Querschnittsfläche von NRCMs darzustellen und dies als Maß für das Zellwachstum (Hypertrophie) heranzuziehen. NRCMs wurden dazu in einer zuvor mit Poly-D-Lysin beschichteten 12-well-Zellkulturschale mit *Glascoverslips* ausgesät (300.000 Zellen/well). Für den Versuch wurden die Zellen (24h nach adenoviraler Transduktion) für 24h durch Serumentzug gehungert (0%-Kardiomyozytenmedium) und daraufhin weitere 24h sowohl mit als auch ohne Phenylephrin (4µM) inkubiert, um dann, wie im Punkt zuvor beschrieben, fixiert zu werden. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren und NRCMs so für die weitere Behandlung und Färbung durchlässig zu machen wurden die Zellen mit einer -20°C kalten Aceton-Methanol-Mischung (1:1) behandelt (2min). Organische Lösungsmittel, wie Methanol und Aceton, lösen Lipide aus der Zellmembran und

machen sie so permeabel (Jamur und Oliver, 2010). Anschließend wurden die Zellen mit einer BSA-Block-Lösung (2% (m/V) in DPBS) inkubiert (30min, RT) und daraufhin mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin gefärbt (Molecular Probes, 5U/ml, 20min, RT, dunkel). Die Zellen wurden im Anschluss 1x mit DPBS gewaschen, um dann die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 700ng/ml) zu färben (30min, RT, schwenkend). DAPI bindet bevorzugt an A-T-reiche Regionen der DNA und fluoresziert daraufhin bei Anregung mit ultraviolettem Licht (Kapuscinski, 1990). Zuletzt wurden die Zellen wieder 3x mit DPBS gewaschen und mithilfe von Fluoromount-G™ (SouthernBiotech) auf Objektträger aus Glas *gemountet*. Für die Auswertung wurden NRCMs mit einem Leica TCS SP5 Konfokal-Mikroskop analysiert (Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 OIL). Dazu wurde DAPI mit dem Diodenlaser (405nm) und Alexa Fluor® 488 mit dem Argonlaser (488nm) angeregt. Die Emission von DAPI wurde zwischen 430 und 453nm, die von Alexa Fluor® 488 bei 520-550nm gemessen. Für die Bestimmung der Querschnittsfläche wurden ca. 50 Zellen pro Versuchsbedingung und Experiment analysiert und die Pixelanzahl in der Querschnittsfläche (bestimmt mit Adobe Photoshop) als indirektes Maß für die Fläche herangezogen.

3.5.3 TUNEL-Färbung

Während der frühen Phase des programmierten Zelltodes (Apoptose) entstehen durch Endonukleasen verursachte Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Die TUNEL (*Terminal dUTP Nick End Labeling*)-Methode beruht darauf, die durch diese Fragmentierung freiwerdenden 3'-OH-Enden der DNA mit einem Enzym (TdT, terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) zu markieren, welches dann fluoreszenzmarkierte Nukleotide an die Strangenden anhängt um somit apoptotische Zellkerne mikroskopisch sichtbar machen zu können (Gavrieli *et al.*, 1992). Diese Färbung wurde sowohl mit NRCMs als auch mit den verschiedenen Krebszelllinien durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in einer zuvor mit Poly-D-Lysin beschichteten 24-*well*-Zellkulturschale mit *Glascoverslips* ausgesät (NRCMs: 150.000 Zellen/*well*, Krebszellen: 25.000 Zellen/*well*). Nach Transduktion der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen wurde die Färbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auch hier zunächst wieder, wie in Abschnitt 3.5.1, beschrieben fixiert. Im Anschluss wurden die Zellmembranen permeabilisiert (7min, auf Eis). Bei diesem Versuch wurde allerdings eine detergentshaltige Permeabilisations-Lösung verwendet. Detergenzien, wie das nichtionische Triton-X-100, interagieren mit Cholesterol in den Membranen, lösen es und hinterlassen so eine löchrige Membranstruktur (Jamur und Oliver, 2010). Nach zweimaligem Waschen mit DPBS, wurden je 20µl der fertigen TUNEL-Färbelösung (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche, hergestellt nach Anweisung des Herstellers) auf jedes *Coverslip* gegeben und die Zellen damit in einer feuchten Kammer inkubiert (1h, 37°C, dunkel). Als Positivkontrolle wurde ein *well* vor der Färbung mit 25µl DNase I behandelt (0,1mg/µl DPBS). Für die Negativkontrolle wurde ein weiteres *well* nur mit der Färbelösung aus dem Kit ohne Enzym inkubiert. Anschließend wurde 2x 5min mit DPBS gewaschen und dann mit Hoechst 33258 (1,12µM) die Kerne angefärbt (5min, RT, schwenkend, dunkel). Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 bindet in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA präferentiell an A-T-reichen

Positionen (Kapuscinski, 1990). Die Zellen wurden schließlich 3x mit DPBS gewaschen und wie zuvor beschrieben *gemountet*. Zur letztendlichen Analyse der Färbung wurden die Zellen mit dem Leica DM400B Fluoreszenz-Mikroskop (Objektiv: HCX PL Fluotar) untersucht. Hoechst 33258 wurde durch den Fluoreszenzfilterwürfel A, Tetramethylrhodamin (TMR) durch den Fluoreszenzfilterwürfel N21 visualisiert. Für die repräsentative Quantifizierung der Apoptoserate wurden pro *Coverslip* fünf Ausschnitte mit beiden Filtern aufgenommen und diese Bilder im Anschluss mit der Software Diskus (Ver. 4.80) übereinandergelegt. Dann wurden die gesamten Zellkerne (blau) und die TUNEL-positiven Kerne (rot) separat gezählt und das prozentuale Verhältnis daraus gebildet. Pro Bedingung und Versuchstag wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet.

3.5.4 Lokalisation von YFP-ERK2 (nukleäre-zu-zytosolische Verteilung)

Um die Lokalisation von ERK2-wt (-/+ Peptid) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) in Zellen zu analysieren und danach das Verteilungsverhältnis von nukleärer zu zytosolischer Lokalisation bestimmen zu können, wurden ERK2-wt oder ERK2-Δ4 mit *yellow fluorescent protein* (YFP) markiert, im Folgenden YFP-ERK2-wt oder YFP-ERK2-Δ4 genannt. Die fluoreszierenden Eigenschaften des YFP ermöglichten das überexprimierte ERK2 oder seine Mutante innerhalb einer Zelle zu visualisieren. Diese Analyse wurde in COS-7 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben in 12-*well*-Zellkulturschalen mit *Glascoverslips* kultiviert und mithilfe der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.3). 24h nach der Transfektion wurde 0%-DMEM-Medium (Hungermedium) auf die Zellen gegeben.

Weitere 24h nach dem Mediumwechsel wurden einige *wells* mit 10μM Phenylephrin inkubiert (10min, 37°C) und daraufhin die Zellen, wie in Abschnitt 3.5.1 erläutert, fixiert. Daraufhin wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt (700ng/ml, 30min, dunkel, schwenkend), die Zellen 3x mit DPBS gewaschen (je 5min, dunkel, schwenkend) und die *Glascoverslips* zuletzt auf Objektträger *gemountet*. Die fixierten Zellen wurden schließlich mit dem Leica TCS SP5 Konfokal-Mikroskop (Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 OIL) analysiert. YFP wurde mit dem Argonlaser (488nm) angeregt, DAPI mit dem Diodenlaser (405nm). Der Messbereich der Emissionen betrug bei YFP 550 bis 620nm, bei DAPI 430 bis 453nm. Die Bilder wurden im sequentiellen Modus angefertigt. Der Objektträger wurde so justiert, dass er sich in der Kernebene befand. Sämtliche Einstellungen waren für alle Aufnahmen konstant (1024x1024 Pixel, 400Hz, 2,3facher Zoom). Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die ImageJ-Software verwendet. Anhand des DAPI-Bildes konnte der Bereich des Kernes, anhand der YFP-Aufnahme der des Zytosols markiert werden. Daraufhin wurde die Zellkernbegrenzung aus der DAPI-Aufnahme in der YFP-Aufnahme angezeigt, sodass im YFP-Bild nun gleichzeitig beide Begrenzungen zu sehen waren. Im Anschluss wurden mithilfe des Programms die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der definierten Abschnitte ermittelt. Nachdem der Mittelwert der Intensität der Hintergrundfluoreszenz von den beiden Werten abgezogen wurde, konnte der Quotient aus nukle-

ärer und zytosolischer Fluoreszenzintensität gebildet werden. Dies spiegelt letztendlich das Verteilungsverhältnis der Lokalisation der YFP-Konstrukte wider. Pro Bedingung und Versuchstag wurden 15 Zellen ausgewertet.

3.5.5 Proximity Ligation Assay (Duolink®)

Der *Proximity Ligation Assay* (*in situ* PLA, Duolink®) ist eine relativ neue Methode, die dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen dient. Sie bietet im Vergleich zu herkömmlichen Nachweismethoden für die Beobachtung der Dynamiken von Proteinen eine erhöhte Selektivität durch den Gebrauch von zwei Erkennungsstellen und eine erhöhte Sensitivität durch das Einbeziehen einer DNA-Amplifikation als Bestandteil der Detektion der Zielmoleküle (Jarvius *et al.*, 2007). Gegen die zu analysierenden Interaktionspartner werden Antikörper aus unterschiedlichen Spezies eingesetzt. Speziespezifische Zweitantikörper (PLA-Proben), die an Oligonukleotide gekoppelt sind, sollen nun an die primären Antikörper binden und die Bildung zirkulärer DNA-Stränge ermöglichen, wenn sie sich nahe genug zueinander befinden. Diese DNA-Ringe dienen dann als Vorlage für eine lokalisierte Polymerase-Kettenreaktion durch eine *rolling-circle amplification* (RCA). Fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden ermöglichen schließlich die mikroskopische Analyse der Proben, da jedes Amplifikationsprodukt als einzelner, leuchtender Punkt sichtbar wird. Diese Nachweismethode wurde komplett von Sofia Kramer unter der Anweisung von Angela Tomasovic durchgeführt. Dazu wurden COS7-Zellen verwendet (50.000 Zellen/well, 12-well-Zellkulturschale mit Poly-D-Lysin beschichtet und *Glascoverslips*), die je nach Anliegen mithilfe der DEAE-Dextran-Methode transfiziert wurden oder dahingehend unbehandelt waren. Die Zellen wurden dann, wie schon zuvor beschrieben, mit Phenylephrin stimuliert (10µM, 10min, 37°C), wie in Abschnitt 3.5.1 aufgeführt, fixiert und mit einem eiskalten Gemisch aus Aceton und Methanol (1:1) permeabilisiert (2min). Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer BSA-Blocklösung blockiert (30min, RT) und die Zellen dann mit je 20µl Antikörper, verdünnt in 1% BSA (m/V), inkubiert (2h, RT, feuchte Kammer).

Danach erfolgte der *in situ* PLA mit dem Duolink® In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma) nach Anweisung des Herstellers. Die erzeugten Signale wurden mit dem Leica TCS SP5 Konfokal-Mikroskop (Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 OIL) aufgenommen. Dazu wurden sie mit dem Helium-Neon-Laser (594nm) angeregt und die Emission zwischen 604 und 656nm detektiert. Es fand auch eine DAPI-Färbung der Zellkerne statt. Diese Signale wurden mit dem Diodenlaser angeregt (405nm) und deren Emission zwischen 430 und 453nm detektiert. Die Aufnahmen erfolgten im sequentiellen Modus (1024x1024 Pixel, 400Hz, 2,3facher Zoom).

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Paraffinschnitte

Das fixierte Gewebe, zumeist Herzen, wurde in kleinen Kassetten in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Microtom (Leica RM 2165) in 2µM dicke Gewebeschnitte zerteilt (Lorenz *et al.*, 2009a). Die Schnitte wurden dann auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Superfrost®) übertragen und einige Stunden bei 45°C getrocknet. All diese Schritte wurden von den technischen Assistentinnen Marianne Babl und Martina Fischer durchgeführt.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine gern genutzte histologische Standardmethode, um einen Überblick über die Struktur des zu untersuchenden Gewebes zu erlangen. Hämatoxylin färbt in seiner oxidierten Form (Hämatein/"Hämalaun") DNA in Zellkernen an (blau bis violett) und Eosin färbt unspezifisch Proteine; so werden dann das Zytosol und die extrazelluläre Matrix rot bis pink dargestellt (Fischer *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2009a). Diese Färbung wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die Querschnittsfläche von Myozyten in Herzschnitten zu untersuchen. Dazu mussten die Schnitte zunächst wie nachfolgend gezeigt entparaffiniert werden.

Entparaffinieren:

Roti®-Histol	4min
Roti®-Histol	4min
Roti®-Histol	4min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 70% (V/V)	2min
H ₂ O	4x30sec

Im Anschluss wurden die Schnitte jeweils 10min in einer Hämatoxylin-Färbelösung gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Dann wurden die Schnitte in eine Eosin-Lösung (+20µl Eisessig) überführt, für 50sec darin gefärbt, 2x mit Wasser gewaschen (30sec) und wie nachfolgend beschrieben wieder entwässert.

Entwässern:

Ethanol 70% (V/V)	1min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Ethanol 100% (V/V)	2min
Roti®-Histol	3min
Roti®-Histol	3min

Die Schnitte wurden zuletzt mit Eukitt® eingedeckt. Zur Auswertung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten wurden die Schnitte mit einem Leica DM 4000B Mikroskop (Objektiv: Leica HCX PL Fluotar 20x/0,75) bei 200facher Vergrößerung digital abfotografiert. Mithilfe von Adobe Photoshop wurden bei 6 Zellen/Bild (insgesamt 60 Zellen/Schnitt) die Pixelanzahl der umrandeten Zellen als Maß für die Querschnittsfläche betrachtet. Nur Kardiomyozyten mit zentral liegendem Zellkern wurden in die Auswertung mit reingenommen. Die Auswertung wurde verblindet durchgeführt und erfolgte gemäß der Beschreibung von Ruppert et al. (Ruppert *et al.*, 2013).

3.6.3 (Pikro-) Siriusrot (SR)-Färbung

Die SR-Färbung dient dem Visualisieren von Kollagen in Geweben. Dabei reagiert der stark anionische Farbstoff über seine Sulfonsäuregruppen mit basischen Gruppen in den Kollagenmolekülen (Junqueira *et al.*, 1979). So wird bei dieser Färbung Kollagen rot und das restliche Gewebe gelb angefärbt.

Die Schnitte wurden für diese Färbung, wie im Punkt zuvor beschrieben, entparaffiniert und dann mit der Siriusrot-Färbelösung behandelt (45min). Im Anschluss wurden sie 2x mit Wasser gewaschen (je 30sec) und, wie zuvor beschrieben, entwässert und mit Eukitt® eingedeckt. Für die Analyse der interstitiellen Fibrose wurden die Herzschnitte mit einem Leica DM 4000B Mikroskop (Objektiv: Leica HCX PL Fluotar 5x/0,15) in 50facher Vergrößerung digital abfotografiert und der prozentuale Anteil an Fibrose am Gesamtschnitt über die Pixelanzahl der jeweiligen Farbnuancen mithilfe von Adobe Photoshop bestimmt. Die Auswertung erfolgte verblindet und für die gesamte Fläche eines Schnittes (Ruppert *et al.*, 2013).

3.7 Physiologische Modelle

3.7.1 Mäuse

Die transgene Mauslinie ERK2^{Δ174-177} wurde von Prof. Dr. Kristina Lorenz durch Vorkerninjektion des Konstruktes in befruchtete Oozyten von FVB/N-Mäusen generiert und bereitgestellt (Lorenz *et al.*, 2009a). Das Konstrukt wird dabei herzspezifisch überexprimiert, da es unter der Kontrolle des α-MHC

(*myosin heavy chain*)-Promotors liegt. Das α -MHC-Gen kodiert für ein herzmuskelspezifisches Protein, das an der Kontraktion des Herzens beteiligt ist und dessen *Enhancer*-Element unterstützt hohe Level an herzmuskelspezifischer Expression, unabhängig von dessen Position oder Orientierung (Molkentin *et al.*, 1996). Das zusätzliche Anbringen einer Polyadenylierungssequenz (Poly-A-Sequenz) des viralen SV₄₀-Genoms an das Konstrukt schützt die mRNA vor enzymatischer Degradation und fördert ihre Translation (van den Hoff *et al.*, 1993). Der Aufbau des Konstruktes ist in Abbildung 10 dargestellt.



Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Genkonstruktes zur herzspezifischen Expression von ERK2^{Δ174-177}
Schematische Darstellung des klonierten ERK2^{Δ174-177}-Konstruktes mit ATG als Startcodon.

Für diese transgenen Mäuse wurden als Kontrolltiere rein wildtypische Mäuse mit FVB/N-Hintergrund verwendet. Für die Gentherapieversuche dienten Mäuse mit C57Bl/6J-Hintergrund. Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Nach dem Absetzen der Mäuse wurden sie von Martina Fischer zur Untersuchung der Transgenität genotypisiert.

Die Zucht und Haltung aller in dieser Arbeit verwendeten Tiere erfolgte im Einklang mit dem Tierschutzgesetz. Außerdem waren alle Versuchsvorhaben sowie deren Bedingungen von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

3.7.2 Transverse Aortenkonstriktion (TAC)

Die Transverse Aortenkonstriktion (englisch: *transverse aortic constriction*, TAC) ist ein *in vivo* Maus-Modell für pathologische myokardiale Zellhypertrophie und beruht auf einer mikrochirurgischen Methode, um den Druckgradienten entlang der Aorta zu erhöhen (>60mmHg) (Lorenz *et al.*, 2009a; Rockman *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 2003). Diese Operation wurde an acht Wochen alten ERK2^{Δ174-177} transgenen Tieren und FVB/N-Kontrollmäusen durchgeführt. Die Prozedur wurde komplett von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. Einen Tag vor und 6 Wochen nach der Operation wurden die Herzen der Mäuse echokardiographisch untersucht (siehe Abschnitt 3.7.5). Nach dem letzten Ultraschall wurden die Mäuse getötet und deren Herzen entnommen, um sie biochemisch und histologisch zu untersuchen.

3.7.3 9-Monatsmäuse

Der Ansatz, postnatales Herzwachstum zu untersuchen, bietet die Möglichkeit, die „normale“, physiologische Hypertrophie eines alternden Herzens zu analysieren. Dazu wurden wieder ERK2^{Δ174-177}

transgene Mäuse und FVB/N-Kontrolltiere miteinander verglichen. Die Mäuse wurden im Alter von 9 Monaten echokardiographisch untersucht und deren Herzen zur weiteren Analyse entnommen.

3.7.4 Gentherapie

Um C57Bl/6J-Mäuse einer Gentherapie mit dem Peptid zu unterziehen und dessen Effekt auf maladaptive Prozesse zu untersuchen musste bei ihnen zunächst die Ligation des Aortenbogens durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.7.2). Direkt im Anschluss wurden den Mäusen die adeno-assoziierten Viren (AAVs) in die Schwanzvene injiziert (zur Virusverdünnung siehe Abschnitt 3.2.3.2) (Schmid *et al.*, 2015). AAVs sind einsträngige DNA-Parvoviren und benötigen Helferviren (z.B. Adenoviren) für ihre Vermehrung (Atchison *et al.*, 1965). Da sie zudem nicht human pathogen sind und ein sehr einfaches Genom aufweisen, eignen sie sich, im Vergleich zu adenoviralen Konstrukten, sehr gut für einen *in vivo* Gentransfer (Flotte *et al.*, 1993; Vassalli *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden AAVs des Serotyps 9 (AAV9) verwendet, da speziell dieser relativ spezifisch und effizient das Myokardium transduziert (Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006). Die verwendeten AAV-Konstrukte enthielten zusätzlich noch einen *myosin light chain* (MLC)-Promotor für eine muskelspezifische Expression der Konstrukte und einen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, welcher allgemein einen starken *Enhancer* der Transkription darstellt (Boshart *et al.*, 1985; Pleger *et al.*, 2011; Rosenthal *et al.*, 1989).

Die TAC-Operation sowie die Bolus-Applikation der AAVs in die Schwanzvene der Mäuse wurden komplett von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. Einen Tag vor und 4 Wochen nach der Operation wurden die Mäuse echokardiographisch untersucht und deren Organe für weitere Untersuchungen entnommen.

3.7.5 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden an narkotisierten Mäusen (Pentobarbital *i.p.*, 35mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mithilfe der Vevo[®] 770 und Vevo[®] 2100 (VisualSonics) Bildgebungssysteme und beinhalteten die enddiastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVHW), die enddiastolische intraventrikuläre Septumdicke (IVS) und den enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Innendurchmesser (LVID_{ED} und LVID_{ES}) (durch zweidimensionalen M-Mode erhalten). Weiterhin konnte durch das PW-Dopplerverfahren (*pulsed-waved* Doppler) die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes [V_{\max} (mm/s)] an der Position der transversen Aortenkonstriktion bestimmt werden. Darüber hinaus wurden auch die systolische Verkürzungsfraktion (FS, *Fractional shortening*) sowie der Aortendruckgradient unter Zuhilfenahme der Analysesoftware von VisualSonics und den folgenden Formeln berechnet.

$$\text{Systolische Verkürzungsfraktion}[\%] = \left(\frac{\text{LVID}_{\text{ED}} - \text{LVID}_{\text{ES}}}{\text{LVID}_{\text{ED}}} \right) \times 100$$

$$\text{Aortendruckgradient[mmHg]} = 4 \times \left(\frac{V_{\max}}{1000} \right)^2$$

Die Auswertungen der echokardiographischen Untersuchungen wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt.

3.7.6 Organentnahmen

Für die Organentnahmen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet, deren Gesamtkörpergewicht gewogen und anschließend der Thorax geöffnet, das Herz entnommen und von Blut entleert gewogen. Dann wurden die Herzohren abgeschnitten und das reine Herzgewicht bestimmt. Das Herz wurde daraufhin auf Höhe des Papillarmuskels geteilt, wobei der Herzboden zum Fixieren in Paraformaldehyd gelegt wurde. Die Herzspitze wurde weitestgehend vom rechten Ventrikel befreit, nochmals geteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert. Darüber hinaus wurde auch die Lunge der Mäuse entnommen und direkt gewogen. Zuletzt wurde zum Messen der Länge des Schienbeins (*Tibia*) noch der Unterschenkel entnommen.

3.8 Weitere Methoden

3.8.1 Nachweis von RNA

3.8.1.1 Qualitativer Nachweis von RNA aus Zelllysaten

Um nachzuweisen, dass die adenoviral transduzierten Krebszelllinien das eingebrachte Myc-Peptid-Konstrukt aufnehmen und dessen Transkription möglich ist, wurde *ribonucleic acid* (RNA) aus diesen Zellen isoliert. Die Zellen wurden zunächst in zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtete Zellkulturschalen ausgesät (75.000 Zellen/*well*) und mit dem Myc-Peptid-Adenovirus-Konstrukt, oder dem LacZ-Kontrollvirus transduziert. Dann wurden sie 1x mit DPBS gewaschen und anschließend wurde mit der RNA-Isolation mithilfe des peqGOLD TriFast™-Reagenzes (Pqlab, 1ml/*well*) begonnen. Die Isolation erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde schließlich in 30µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration der isolierten RNA wurde im Anschluss am NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) bei 260nm gemessen. Nun erfolgte die cDNA-Synthese. Diese war notwendig, um die daraus erhaltene cDNA später in einer PCR amplifizieren und schließlich nachweisen zu können. Dafür mussten 1µg RNA in einem Endvolumen von 10µl in DEPC-H₂O eingesetzt werden. Die RNA wurde dabei zunächst mit 1mM dNTPs und 2nM Oligo(dT)₁₅-Primer inkubiert (10min, 70°C) und dann auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Mastermix, erst 60min bei 42°C, dann 15min bei 70°C.

Mastermix cDNA-Synthese: (Ansatz für 1 Probe)

5x first strand buffer	4,0µl	} SuperScript® II Reverse Transkriptase-Kit (Invitrogen)
DTT (100mM)	2,0µl	
SuperScript® II Reverse Transkriptase (200U/µl)	1,0µl	
DEPC-H ₂ O	0,9µl	
RNasin® (Promega, 40U/µl)	0,1µl	

Für die Negativ-Kontrolle wurde die SuperScript® II Reverse Transkriptase aus dem Mix weggelassen. Alle Proben wurden noch mit 25µl DEPC-H₂O verdünnt und dann für eine PCR als Amplifikationsvorlagen, um das Myc-Peptid nachzuweisen, verwendet. Die *Annealing*-Temperatur betrug 48°C.

5' Ende-Primer (*reverse*): 5'-tct gta tcc tgg ctg gaa tct-3'

3' Ende-Primer (*forward*): 5'-atg gag cag aag ctc atc agc-3', erkennt den *Myc-tag*

3.8.1.2 Quantitativer Nachweis von RNA aus Herzlysaten (RT-PCR)

Zur präparativen Isolation von RNA aus Herzgeweben wurde das RNeasy® Mini Kit (Quiagen) verwendet. Dazu mussten die Herzen zunächst mechanisch in 600µl des mitgelieferten RLT-Puffers (inkl. β-Mercaptoethanol 1:100) zerkleinert werden (Ultra-Turrax-T8, IKA®-Werke). Danach wurde das Lysat zusammen mit 1,2ml DEPC-H₂O und 20µl Proteinase K (Quiagen) 20min bei 55°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (8000g, 1min, eppendorf centrifuge5417 C). Mit dem Überstand wurde die weitere Isolation der RNA anhand des Protokolls des Kit-Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde im Anschluss, wie zuvor in Abschnitt 3.8.1.1 dargelegt, in cDNA umgeschrieben. Mit der erhaltenen cDNA wurde schließlich eine *Real-time* (RT)-PCR zur quantitativen Analyse der zu untersuchenden RNA durchgeführt. Bei der RT-PCR mit EvaGreen® nutzt man die Tatsache, dass der Farbstoff an doppelsträngige DNA bindet und die so gemessene Fluoreszenz proportional zu den PCR-Produkten zunimmt (Mao *et al.*, 2007). Die cDNA wurde dazu in Triplikaten in 384-*well*-Platten (BioRad) zusammen mit dem Mastermix inkubiert.

RT-PCR-Mastermix: (für 1 Probe)

SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad)	6,0µl	} siehe Abschnitt 2.8 für eine Auflis- tung der verwendeten Primer
5' Ende-Primer (<i>reverse</i>)	0,2µl	
3' Ende-Primer (<i>forward</i>)	0,2µl	
H ₂ O	3,6µl	
cDNA	2,5µl	

Die PCR erfolgte in einem C1000™ Thermal Cycler CFX384™ Real-Time System (BioRad) unter Verwendung des CFX Manager Programms (BioRad), welches durchgehend die Fluoreszenzintensität aufzeichnete.

RT-PCR-Ablauf:

Denaturierung 98°C	120min	} 39x
Denaturierung 98°C	20min	
Annealing:56°C	20min	
Elongation:40°C	40min	
Elongation:65°C	300min	

Mit jedem Zyklus nimmt die Fluoreszenzintensität zu, bis sie am Ende ein zuvor festgelegtes Plateau erreicht. Die Software errechnet dann für jede einzelne Probe die Anzahl an Zyklen bis zum Erreichen dieses Plateaus (Ct-Wert, englisch: *threshold cycle*). Die Ct-Werte konnten nun mit Microsoft Excel und unter Zuhilfenahme der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet werden (Livak und Schmittgen, 2001), wobei zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung der Triplikate bestimmt wurde und sie anschließend gegen ein Haushaltsgen, d.h. ein Gen, welches unabhängig von äußeren Einflüssen reguliert wird (hier: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH), normiert wurden. Das Enzym GAPDH ist an der Glykolyse beteiligt und eignet sich klassischerweise gut als Haushaltsgenkontrolle für Herzgewebe (Diez und Simm, 1998). Die Normierungsformel lautete folgendermaßen.

$$\Delta Ct(Probe) = Ct(Zielgen) - Ct(Haushaltsgen)$$

Der so erhaltene ΔCt -Wert jeder Probe musste nun noch einmal normiert werden, diesmal gegen den ΔCt -Wert der Kontrollgruppe (basal), wodurch man dann die n-fache Expression des Zielgens errechnen kann.

$$\Delta\Delta Ct(Probe) = \Delta Ct(Probe) - \Delta Ct(Kontrolle)$$

$$n - \text{fache Expression (Gruppe } x \text{ zu Kontrollgruppe)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Zur Kontrolle der ganzen RT-PCR wurde für jedes Primer-Paar eine Standardkurve erstellt. Die Spezifität des Fluoreszenzsignals wurde mithilfe einer Schmelzkurve, aufgenommen von der Software, für jede Probe kontrolliert.

3.8.2 [3H]-Thymidin-Einbau

Um die Proliferation der verwendeten Krebszelllinien zu untersuchen wurde der [³H]-Thymidin-Einbau bei ihnen durchgeführt. Wegen seiner sehr hohen DNA-Spezifität ermöglicht das Nukleosid Thymidin (v.a. in der Methylform) eine sehr selektive radioaktive Markierung der DNA bzw. des Zellkerns und das allein während der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus (S-Phase) (Rajewsky, 1966). Dieser Versuch bietet so die Möglichkeit, über das Messen der in die Zellen eingebrachten Radioaktivität (β -Strahlung des Tritiums) die Proliferationsrate der Zellen bestimmen zu können. Die Krebszellen wurden zu diesem Zweck in zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtete 24-well-Zellkulturschalen ausgesät (15.000 Zellen/well), mit Adenoviren transduziert und mit verschiedenen Substanzen behandelt. Um

den Einbau zu starten wurde Methyl- ^3H -Thymidin, verdünnt in dem jeweiligen Kompletmedium (1:2000, ergibt $0,5\mu\text{Ci/ml}$, insg. $400\mu\text{l/well}$), auf die Zellen gegeben (4h, 37°C , $5\%\text{CO}_2$). Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit DPBS gewaschen, dann die Proteine mit 5%iger Trichloressigsäure (TCA) (1h, 4°C) präzipitiert und anschließend die Proben mit $0,5\text{M NaOH}$ aufgenommen (1h, 37°C). Die Inhalte der *wells* wurden in Zählerröhrchen überführt und mit $4,5\text{ml}$ Szintillationslösung (IRGA-SAFE PLUS, Perkin Elmer) gemischt. Zuletzt wurden die *counts per minute* (cpm) mithilfe eines β -Zählers (Beckman Coulter LS1801) bestimmt.

3.8.3 MBP (Myelin-Basisches Protein)-Assay

Das Myelin-Basische Protein ist ein effektives Substrat vieler Kinasen und dessen Phosphorylierung durch Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen kann als universelles Maß für die Aktivität der jeweils zu untersuchenden Kinasen betrachtet werden. Um in diesem Fall die Aktivität von ERK2 unter bestimmten Bedingungen zu untersuchen wurde Flag-ERK2, wie in Abschnitt 3.3.10 beschrieben, aus HEK293-Zelllysaten präzipitiert und anschließend in einem MBP-Phosphorylierungsansatz inkubiert (20min, 30°C , schüttelnd).

MBP-Phosphorylierungsansatz: (in 20/2-Puffer)

ATP	$100\mu\text{M}$
MgCl_2	10mM
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	$50\mu\text{M}$
MBP	$150\mu\text{g/ml}$

Daraufhin wurde der ganze Ansatz mit 4fach-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel eingeschweißt und das radioaktiv markierte MBP autoradiographisch (PMITM Personal Molecular Imager, BioRad) detektiert.

3.9 Statistik

Die Quantifizierung von *Western Blot* Ergebnissen sowie die Auswertung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten zwischen Nukleus und Zytosol erfolgte unter Zuhilfenahme der Image J-Software. Für alle anderen mikroskopischen Aufnahmen diente Adobe Photoshop, soweit dies nicht unter dem jeweiligen Punkt anders beschrieben wurde. Zum Erstellen von Abbildungen wurden Adobe Photoshop und Adobe Illustrator verwendet.

Alle Daten, es sei denn anders beschrieben, wurden mithilfe von GraphPad Prism[®] statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (*mean* \pm SEM) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*, ≥ 3 Gruppen) mit nachfolgendem Bonferroni-Test oder ungepaarten t-Test (2 Gruppen) ermittelt, beide parametrisch mit einem Konfidenzintervall von 95%. $P < 0,05$ wurde im Weiteren mit „*“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse

stammen stets von mindestens 3 unabhängigen Experimenten und wurden zur Vereinfachung teilweise auf eine definierte Kontrollbedingung normiert. Mikroskopische und echokardiographische Auswertungen wurden verblindet durchgeführt und analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle der ERK1/2-Dimerisierung bei der Phosphorylierung und Lokalisation von ERK

ERK1/2 werden von ihren vorangeschalteten Kinasen MEK1/2 an den Positionen Threonin 183 und Tyrosin 185 (murines ERK2) im TEY-Motiv der Aktivierungslippe phosphoryliert und folglich aktiviert. Um die Auswirkungen einer Hemmung dieser ERK-Aktivierung auf die Autophosphorylierung an Threonin 188 und die ERK-vermittelten zellulären Funktionen zu untersuchen wurde der MEK-Inhibitor PD98059 verwendet. PD98059 bindet selektiv an die inaktive Form von MEK1 und verhindert somit deren Aktivierung durch Raf (Alessi *et al.*, 1995). Die Inhibition von MEK1 führt schließlich auch zu einer verminderten ERK-Phosphorylierung und daraus resultierend zu einer reduzierten ERK-Aktivierung (Dudley *et al.*, 1995). Die Untersuchungen wurden mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCMs) durchgeführt, da sich dieses Primärkultursystem sehr gut zur Analyse morphologischer und biochemischer Charakteristika des Herzens sowie der Signalweiterleitung im kardialen System eignet (Chlopčikova *et al.*, 2001). Zur Induktion der Raf/MEK/ERK-Kaskade wurde Phenylephrin (PE) verwendet, ein Agonist am G_q -gekoppelten α_1 -Rezeptor und potenter hypertropher Stimulus (Bogoyevitch *et al.*, 1993).

Wurden NRCMs nun mit PD98059 vorbehandelt bevor sie mit PE stimuliert wurden, sah man schon unter basalen Bedingungen (unstimuliert, -PE) eine signifikante Reduktion der ERK1/2-Aktivität, gemessen an der Phosphorylierung des TEY-Motivs (Abbildung 11A, B). Während die Kontrollzellen nach Stimulation mit PE eine deutliche ERK-Aktivierung (pERK(TEY)) aufwiesen, führte die Stimulation der mit PD98059 behandelten Zellen nur zum Rückgewinn der basalen ERK-Aktivität (Abbildung 11A, B). Bei der Untersuchung der Autophosphorylierung an Threonin 188 konnte der MEK-Inhibitor PD98059 basal nichts ausrichten, wohingegen er allerdings nach Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der Thr188-Phosphorylierung führte (Abbildung 11A, C). Dies bestätigte, dass die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung vor allem während hypertropher Bedingungen auftritt und basal keine Rolle spielt, da der MEK-Inhibitor hier keinen Einfluss zeigte. Ähnliche Ergebnisse berichteten genauso Ruppert *et al.* (Ruppert *et al.*, 2013).

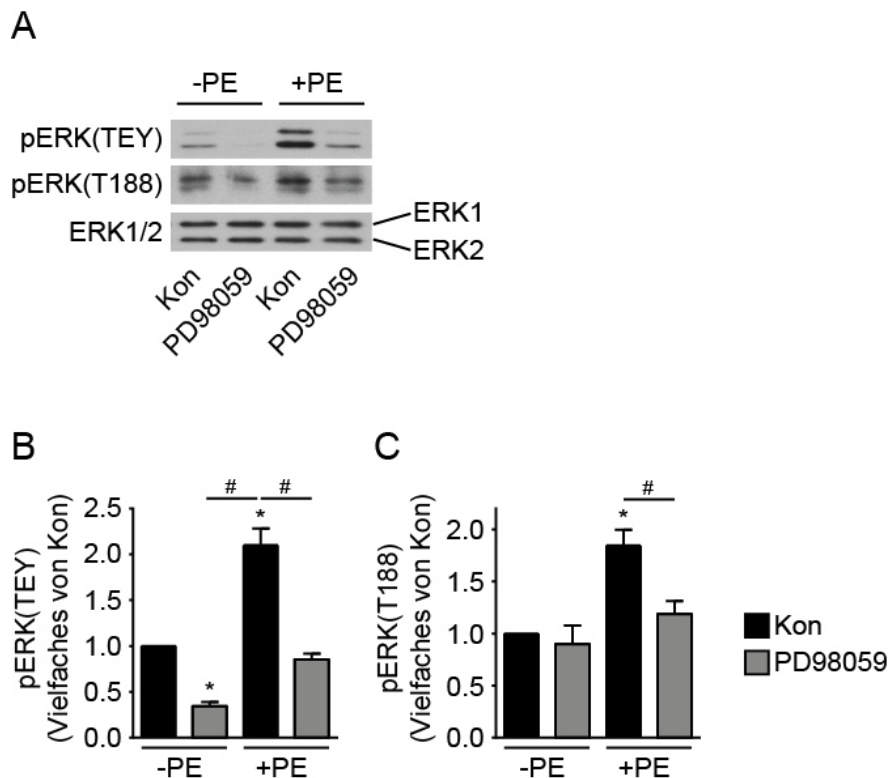


Abbildung 11: Inhibition der Aktivierung und Autophosphorylierung von ERK1/2 durch PD98059.

Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCMs) wurden mit PD98059 (30 μ M) für 60min vorinkubiert und daraufhin mit Phenylolephrin (PE) (10min, 4 μ M) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und ERK1/2, pERK1/2(TEY) und pERK1/2(T188) mittels *Western Blot* detektiert. Abbildung A zeigt jeweils repräsentative Immunoblots (ERK1/pERK1: 44kDa, ERK2/pERK2: 42kDa) und Abbildung B/C die quantitative Auswertung von pERK(TEY)/pERK(T188) (normiert gegen Kon unstimuliert). $n \geq 3$ unabhängige Experimente. Kon=Kontrolle (unbehandelte NRCMs), *, $P < 0,05$ zu Kon (unstimuliert, -PE), #, $P < 0,05$ zu Kon (stimuliert, +PE), Mittelwert \pm S.E.M.

Um nun die Effekte von monomerem ERK auf die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen von ERK1/2 zu untersuchen, wurde mit einer Mutante gearbeitet, welche in der Literatur schon als dimerisierungsdefiziente Mutante von ERK beschrieben wurde: ERK2 $\Delta^{174-177}$, kurz: ERK2- $\Delta 4$ (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2009a; Wilsbacher *et al.*, 2006). Es ist eine Deletionsmutante, der die Aminosäuren 174-177 fehlen. An dieser Stelle befindet sich das Histidin (Position 176), welches mit der Glutaminsäure an Position 343 eine ionische Wechselwirkung im Dimer eingeht (Wilsbacher *et al.*, 2006). Mit der ERK2- $\Delta 4$ -Mutante ist diese Interaktion nicht mehr möglich. Wie zuvor beim MEK-Inhibitor PD98059 beobachtet, hatte die Überexpression von ERK2- $\Delta 4$ in NRCMs, verglichen mit Zellen, welche mit wildtypischem ERK2 (ERK2-wt) transduziert wurden, ähnliche Auswirkungen auf die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung. Unstimuliert übte die Mutante keinen Effekt aus, nach Stimulation konnte sie jedoch, wie zuvor auch PD98059, zu einer signifikant reduzierten ERK^{Thr188}-Phosphorylierung führen (Abbildung 12A, C). Gegensätzlich zu PD98059 hatte ERK2- $\Delta 4$ allerdings keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des TEY-Motivs, weder basal noch nach Stimulation mit PE (Abbildung 12A, B). Diese ERK-Mutante hat demnach eine normale Enzymaktivität, wie auch schon zuvor berichtet (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

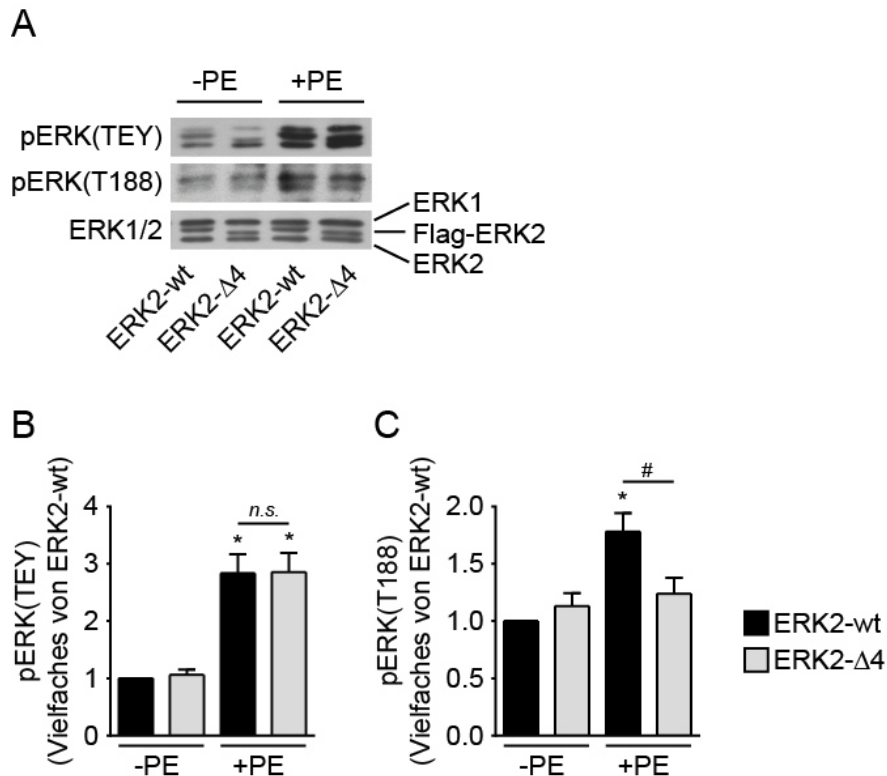


Abbildung 12: Monomeres ERK (ERK2-Δ4) reduziert die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung ohne dabei die normale ERK-Aktivierung zu beeinflussen.

NRCMs wurden mit ERK2-wt (Kontrolle) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) adenoviral transduziert, wobei beide Konstrukte einen Flag-tag enthielten. Die Zellen wurden dann mit PE (10min, 4μM) stimuliert, lysiert und daraufhin die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien von ERK mithilfe der angegebenen phosphospezifischen Antikörper im *Western Blot* untersucht. Abbildung A: repräsentative Immunoblots (ERK1/pERK1: 44kDa, ERK2/pERK2: 42kDa), Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pERK(TEY)- und pERK(T188)-Blots (normiert gegen ERK2-wt unstimuliert). n≥3 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu ERK2-wt (unstimuliert), #, P<0,05 zu ERK2-wt (stimuliert), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

Wie bereits in vergangenen Versuchsreihen festgestellt wurde, ist ERK2-Δ4 zudem nicht mehr in der Lage Gβγ-Untereinheiten zu binden (Lorenz *et al.*, 2009a). Da diese Interaktion nach der Dimerisierung von ERK aber auch eine Voraussetzung für die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung darstellt, sind die beschriebenen Ergebnisse eine weitere Bestätigung des postulierten Mechanismus zum Auftreten dieser Autophosphorylierung.

Frühere Studien beschäftigten sich mit unterschiedlichen Mutationen von ERK2 an der Autophosphorylierungsposition T188. Die phosphorylierungsmimetische Mutante ERK2^{T188D} wies, verglichen mit ERK2-wt, eine erhöhte Lokalisation im Zellkern nach Stimulation auf, wohingegen die phosphorylierungsdefizienten Mutanten ERK2^{T188A} und ERK2^{T188S} eine gegenüber ERK2-wt geringere Kerntranslokation hatten (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013). Es stellte sich daher die Frage, welche Ergebnisse in Bezug auf die Lokalisation mit der monomeren ERK2-Mutante zu erwarten waren, da die Dimerisierung eine Voraussetzung für das Auftreten der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung darstellt. Diese Fragestellung wurde in COS7-Zellen untersucht. Ein Teil der Zellen wurden dazu mit ERK2-wt der andere mit ERK2-Δ4 transfiziert. Die verwendeten Konstrukte waren N-terminal an YFP gebunden. Die Zellen wurden schließlich mit PE stimuliert. Um die Position der Zellkerne ausfindig machen

zu können, wurden diese mit DAPI angefärbt. In Abbildung 13A sind konfokale Aufnahmen dieser Zellen dargestellt. Die mit YFP-ERK2-wt transfizierten Zellen ließen eine klare nukleäre Akkumulation nach hypertropher Stimulation mit PE erkennen. Dies war bei den mit YFP-ERK2- $\Delta 4$ transfizierten Zellen nicht der Fall. Basal war zwischen den zwei Konstrukten kein Unterschied zu erkennen. Abbildung 13B zeigt die quantitative Auswertung des Verhältnisses zwischen der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und der des Zytosols. Auch die quantitative Auswertung der Bilder zeigt nach Stimulation eine signifikant reduzierte Kerntranslokation von YFP-ERK2- $\Delta 4$ im Gegensatz zu YFP-ERK2-wt.

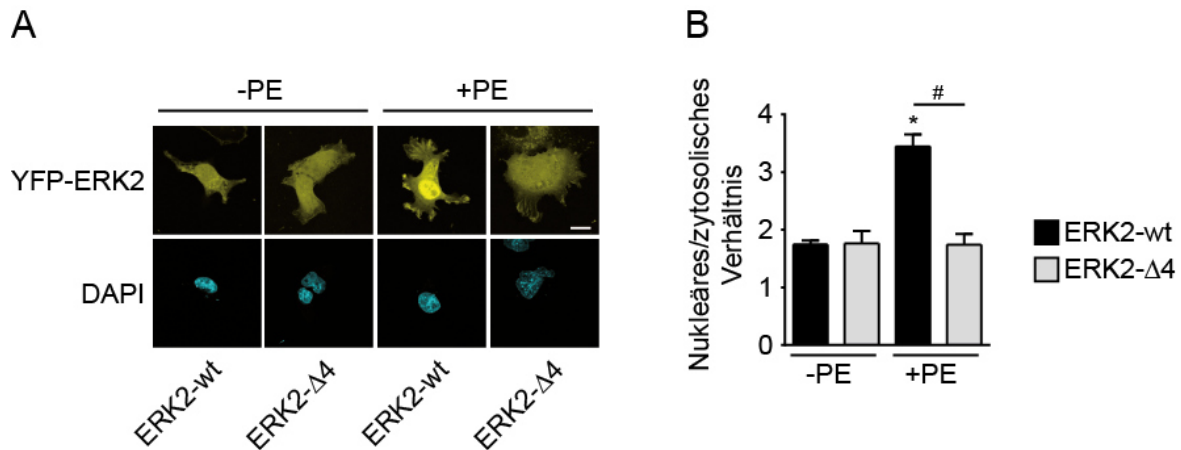


Abbildung 13: ERK2- $\Delta 4$ weist eine reduzierte nukleäre Akkumulation nach Stimulation mit Phenylephrin auf.

Lokalisationsversuche in COS7-Zellen. Die Zellen wurden dazu entweder mit YFP-ERK2-wt oder mit YFP-ERK2 ^{$\Delta 174-177$} (kurz: YFP-ERK2- $\Delta 4$) transient transfiziert, mit dem α_1 -Rezeptor kotransfiziert und mit PE stimuliert (10min, 4 μ M). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Gezeigt sind repräsentative konfokale Aufnahmen (Maßstab: 20 μ m) (A) und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Zellkern zu Zytosol (B). n=4 unabhängige Experimente (15 Zellen pro Bedingung und Experiment). *, $P < 0,05$ zu ERK2-wt (unstimuliert), #, $P < 0,05$ zu ERK2-wt (stimuliert), Mittelwert \pm S.E.M.

4.2 Die ERK1/2-Dimerisierung als Regulationsmechanismus verschiedener ERK-Signale in Kardiomyozyten

4.2.1 Der Einfluss von monomerem ERK2 auf Hypertrophie und Zellüberleben von Kardiomyozyten

Die ersten Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl der MEK-Inhibitor PD98059 als auch monomeres ERK2 die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung reduzieren. Allerdings ging dies bei PD98059 einher mit einer verringerten ERK-Aktivierung (pERK(TEY)), wohingegen ERK2- $\Delta 4$ diese nicht beeinflusste (Abbildung 11, Abbildung 12). Außerdem wies ERK2- $\Delta 4$ eine verringerte nukleäre Akkumulation als ERK2-wt auf (Abbildung 13). Die zellulären Auswirkungen dieser Aspekte wurden im Folgenden analysiert.

Dafür wurden NRCMs wieder mit PD98059 behandelt. Anschließend wurden die Zellen im Hinblick auf die Beteiligung von ERK1/2 an der Entwicklung der PE-induzierten Hypertrophie und Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-vermittelten Apoptose untersucht.

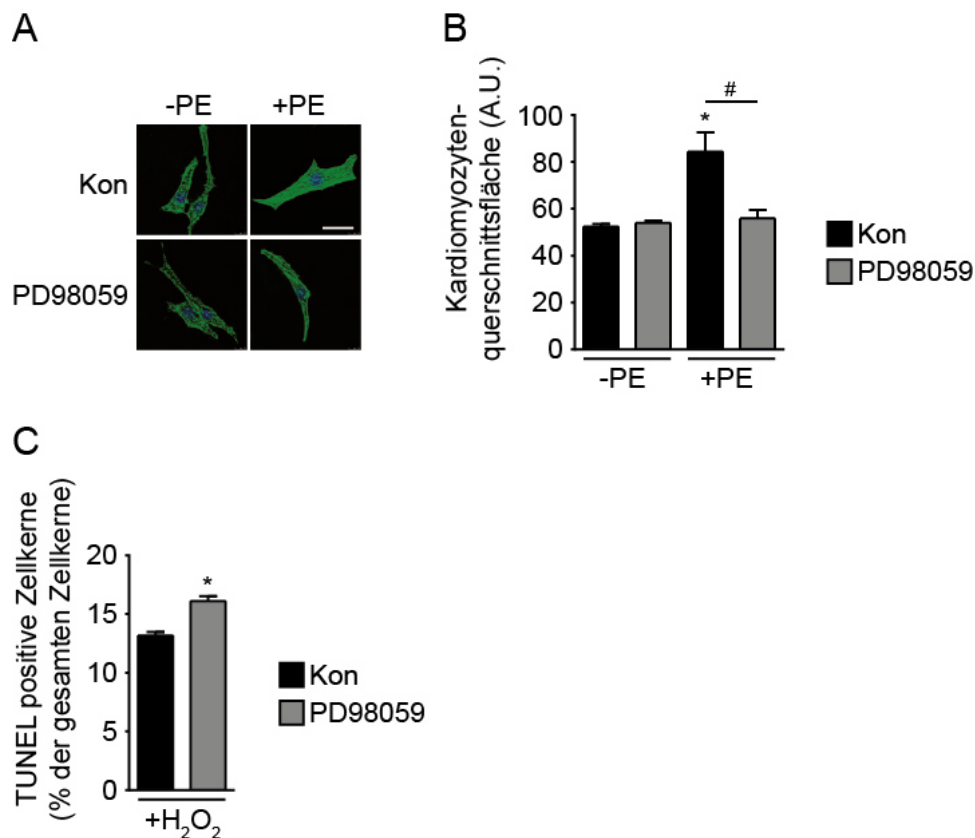


Abbildung 14: PD98059 inhibiert die PE-induzierte Zunahme der Querschnittsfläche von NRCMs und erhöht die Apptoserate.

Abbildung A zeigt repräsentative konfokale Aufnahmen von NRCMs, welche mit Alexa Fluor® 488 markiertem Phalloidin gefärbt wurden. Der Zellkern wurde mit DAPI visualisiert. Die Zellen wurden mit PD98059 vorinkubiert oder waren unbehandelt (Kontrolle, kurz: Kon). Anschließend wurden sie mit PE (24h, 4µM) stimuliert (Maßstab: 20µm). Graph B ist die quantitative Auswertung der Fläche. n=5 unabhängige Experimente (50 Zellen je Bedingung und Experiment). A.U.=arbitrary units. *, P<0,05 zu Kon (unstimuliert), #, P<0,05 zu Kon (stimuliert), Mittelwert ±S.E.M. Für Abbildung C wurden NRCMs (±PD98059) mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert (60min, 100µM) und die DNA-Fragmentierung durch Apoptose dann mithilfe der TUNEL-Methode gefärbt und quantifiziert. n=4 unabhängige Experimente (≥100 Zellen je Bedingung und Experiment). *, P<0,05 zu Kon (mit H₂O₂ behandelt), Mittelwert ±S.E.M.

Um das hypertrophe Wachstum der NRCMs zu analysieren, wurde ihre Querschnittsfläche betrachtet. Hypertrophiert eine Zelle, vergrößert sich dadurch auch ihre Querschnittsfläche. Die Zellen wurden zur Visualisierung des Zytoskeletts mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin gefärbt. Abbildung 14A zeigt repräsentative Bilder solcher NRCMs. Sie veranschaulichen, wie die Kontrollzellen durch den hypertrophen Stimulus PE an Umfang zunahm. Mit PD98059 behandelte Zellen hingegen zeigten keine nennenswerte hypertrophe Reaktion auf den Stimulus. Die quantitative Auswertung der Querschnittsfläche dieser Zellen ist in Abbildung 14B dargestellt. Während unbehandelte Zellen (Kon) nach Stimulation signifikant hypertrophieren, bleibt dieser Effekt in mit PD98059 behandelten Zellen aus. Dass der MEK-Inhibitor hier so einen starken reduzierenden Effekt zeigte, verdeutlicht die wichtige Rolle der ERK-Aktivierung in der Vermittlung hypertropher Antworten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon von Ruppert *et al.* dargestellt werden (Ruppert *et al.*, 2013).

Zur Untersuchung der Apoptose wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Stimulus verwendet. Es führt über die Entstehung von ROS zu oxidativem Stress und der Aktivierung von ERK1/2 (Aikawa *et al.*, 1997; Clerk *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2001). Als Maß für die Apoptose wurde die charakteristische Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen quantifiziert (Kepp *et al.*, 2011). Die 3'-OH-Enden dieser DNA-Fragmente können mithilfe des *Terminal dUTP Nick End Labelings*, der TUNEL Methode, fluoreszenzmarkiert und somit zur Quantifizierung sichtbar gemacht werden (Gavrieli *et al.*, 1992). Zellkulturen von NRCMs, welche mit PD98059 vorbehandelt wurden, wiesen nach Behandlung mit H_2O_2 signifikant mehr TUNEL-positive Zellkerne auf als zuvor unbehandelte Zellen (Abbildung 14C). Diese Tatsache verdeutlicht die wichtige kardioprotektive Rolle von ERK1/2 im Hinblick auf die anti-apoptotischen Effekte dieser Kinasen.

Da nun unter Verwendung des MEK-Inhibitors PD98059 bestätigt werden konnte, dass die Aktivierung von ERK1/2 für die Entstehung PE-induzierter Hypertrophie und die Verringerung H_2O_2 -vermittelter Apoptose entscheidend ist, sollten nun die Auswirkungen der Dimerisierung von ERK auf diese ERK-Signale untersucht werden.

Verglichen mit ERK2-wt-transduzierten Zellen wiesen NRCMs, welche ERK2- $\Delta 4$ überexprimierten, kleinere Querschnittsflächen nach hypertropher Stimulation mit PE auf (Abbildung 15A). Die quantitative Auswertung dieser Aufnahmen verdeutlichte den signifikanten Unterschied in der hypertrophen Reaktion auf Phenylephrin zwischen wildtypischem ERK2 und der dimerisierungsdefizienten Mutante (Abbildung 15B).

Betrachtet man die Apoptoserate in diesen Zellen, fällt auf, dass die monomere Mutante ERK2- $\Delta 4$ keinen negativen Einfluss auf die Sterberate nahm (Abbildung 15C). Im Gegensatz zu den Versuchen mit PD98059 nahm die Apoptose hier nicht zu (Abbildung 14C), die anti-apoptotischen Eigenschaften von ERK blieben also erhalten.

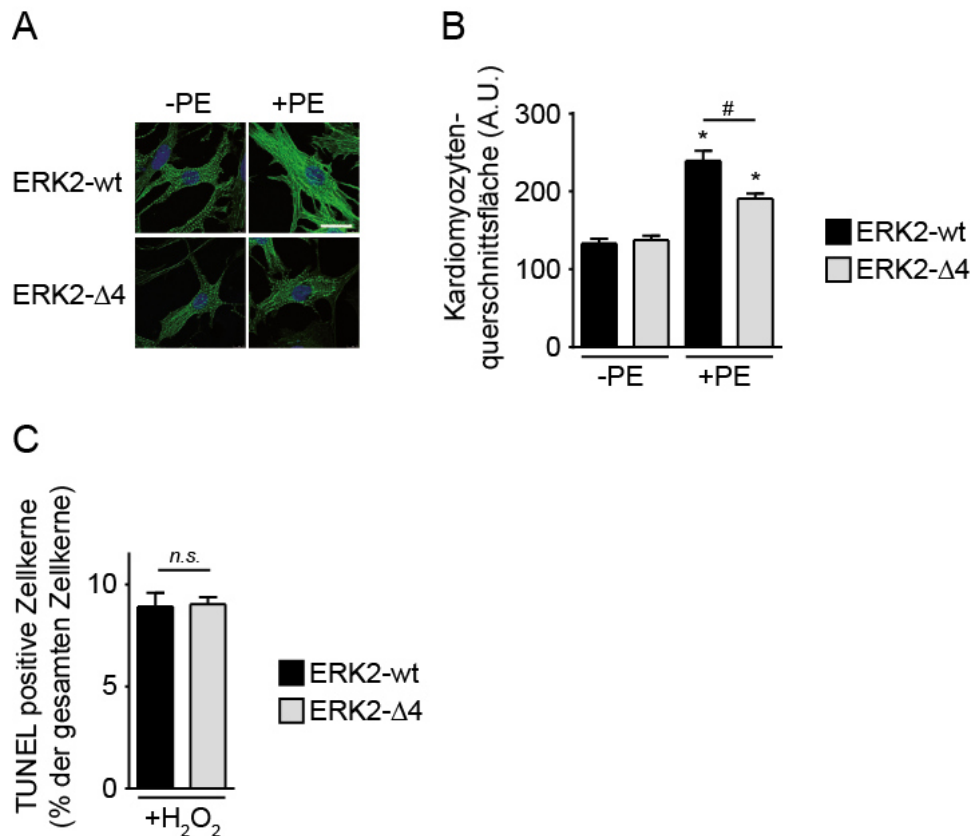


Abbildung 15: Die Überexpression der dimerisierungsdefizienten ERK2-Δ4-Mutante führt zu einer signifikanten Reduktion der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche

Abbildung A: repräsentative konfokale Aufnahmen von NRCMs, gefärbt mit Alexa Fluor® 488 markiertem Phalloidin (Zellkern mit DAPI gegengefärbt). Die Zellen wurden entweder mit ERK2-wt (Kontrolle) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transduziert und anschließend mit PE (24h, 4μM) stimuliert (Maßstab: 20μm). Abbildung B: quantitative Auswertung der Querschnittsfläche aus den konfokalen Aufnahmen. n≥5 unabhängige Experimente (50 Zellen je Bedingung und Experiment) (Die Färbung der NRCMs und die quantitative Auswertung zum Erlangen dieses Graphen wurden von Susanne Homann durchgeführt). A.U.=arbitrary units. *, P<0,05 zu ERK2-wt (unstimuliert), #, P<0,05 zu ERK2-wt (stimuliert), Mittelwert ±S.E.M. Abbildung C: NRCMs (±PD98059) wurden mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert (60min, 100μM). Quantitative Analyse der apoptotischen Zellkerne mithilfe der TUNEL-Methode. n≥3 unabhängige Experimente (≥100 Zellen je Bedingung und Experiment). *, P<0,05 zu ERK2-wt (mit H₂O₂ behandelt), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

4.2.2 Monomeres ERK steuert die Aktivierung nukleärer und zytosolischer ERK1/2-Zielproteine auf unterschiedliche Weise

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gezielte Beeinflussung der ERK-Dimerisierung die Möglichkeit bietet, nur bestimmte ERK-Funktionen zu regulieren. Einerseits hemmt monomeres ERK (ERK2-Δ4) die Entwicklung der Hypertrophie von NRCMs, ein nukleär vermitteltes ERK1/2-Signal. Andererseits hat ERK2-Δ4 im Gegensatz zu PD98059 keinen negativen Einfluss auf die Apoptoserate in Kardiomyozyten, welches ein primär zytosolisches ERK-Signal darstellt. Wie ließen sich diese Beobachtungen auf subzellulärer Ebene erklären? Zur Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus wurden nun die Auswirkung von monomerem ERK2 auf die Phosphorylierung bekannter nukleärer und zytosolischer ERK-Zielproteine analysiert.

Als zytosolisches Zielprotein wurde Bim gewählt. Es gehört zur Bcl-2-Familie, deren Mitglieder wichtige Regulatoren des Apoptosesignalwegs sind. Bim wirkt pro-apoptotisch, indem es mit anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie interagiert und so deren Signale antagonisiert. Der hydrophobe C-Terminus von Bim führt darüber hinaus zu dessen Lokalisation an intrazytoplasmatische Membranen (O'Connor *et al.*, 1998). Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade führt zur ERK-vermittelten Phosphorylierung von Bim an Serin 69, was dessen Degradation über den Proteasomsignalweg zur Folge hat und so dessen pro-apoptotischen Eigenschaften entgegenwirkt (Ley *et al.*, 2003; Luciano *et al.*, 2003).

Repräsentativ als nukleäres Zielprotein wurde der Transkriptionsfaktor *E twenty six-like 1 transcription factor* (Elk-1) untersucht. Elk-1 ist ein Protein der *ternary complex factor* (TCF)-Familie, einer Subklasse der *E-twenty-six* (ETS)-Domäne Transkriptionsfaktoren. Die ERK-vermittelte Phosphorylierung von Elk-1 an Serin 383 und Serin 389 verursacht nicht nur die Translokation von Elk-1 in den Zellkern, sondern auch Konformationsänderungen am Protein, welche dessen erhöhte Bindung an DNA und Steigerung der transkriptionellen Aktivität mit sich führen (Lavaur *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 1999). Die mit PE induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten ist assoziiert mit einer veränderten Genexpression die unter anderem auf einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von Elk-1 beruht. Diese, von Elk-1 abhängige, Steigerung der Transkription kann mithilfe von MEK-Inhibitoren aufgehoben werden (Babu *et al.*, 2000). Somit ist Elk-1 ein entscheidender Faktor in der Weiterleitung ERK-abhängiger hypertropher Signale.

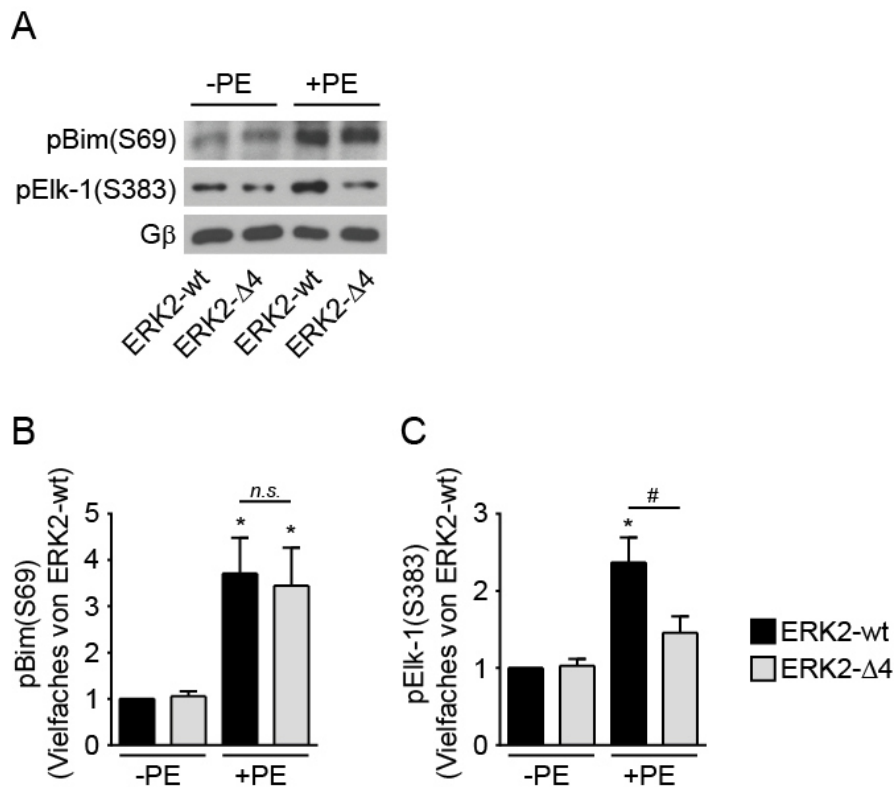


Abbildung 16: ERK2-Δ4 weist eine reduzierte Aktivierung nukleärer, jedoch nicht zytosolischer Effektor-Proteine auf

NRCMs wurden entweder mit ERK2-wt oder mit ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transduziert und anschließend mit PE (10min, 4μM) stimuliert. Die Zellen wurden danach lysiert und die Phosphorylierung von Bim an Ser69 bzw. Elk-1 an Ser383 mittels *Western Blot* nachgewiesen und quantifiziert. Abbildung A: repräsentative Immunoblots für pBim (26kDa) und pElk-1 (45kDa). Als Ladekontrolle diente Gβ (36kDa). Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pBim/pElk-1-Immunoblots, normiert gegen ERK2-wt (unstimuliert). n≥3 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu ERK2-wt (unstimuliert/-PE), #, P<0,05 zu ERK2-wt (stimuliert/+PE), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

Western Blot-Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der TUNEL- und Hypertrophie-Versuche aus den vorausgegangenen Versuchsreihen. ERK2-Δ4 besaß eine mit ERK2-wt vergleichbare Aktivität im Hinblick auf die Phosphorylierung von Bim an S69 (Abbildung 16A, B). Jedoch lag Elk-1 in mit ERK2-Δ4 transduzierten Zellen nach Stimulation mit PE deutlich weniger phosphoryliert vor (Abbildung 16A, C).

Die Versuche zeigen, dass ERK2-Δ4 nur einen Einfluss auf nukleäre Zielproteine hat und daher ERK-vermittelte Signale im Vergleich zu wildtypischem ERK2 differentiell beeinflussen kann. Dies bietet eine Erklärung für das reduzierte Wachstum von Kardiomyozyten nach hypertropher Stimulation, wenn diese ERK2-Δ4 überexprimieren.

4.3 Monomeres ERK2 verringert ERK-vermittelte pathologische kardiale Hypertrophie ohne schädliche Auswirkungen zu haben

Zur Untersuchung der Folgen einer kardialen Überexpression von monomerem ERK wurden FVB/N-Mäuse mit einer herzspezifischen Expression von ERK2- Δ 4 mit wildtypischen FVB/N-Tieren (Wt) verglichen. Die kardiale Überexpression erfolgte unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors (Molkentin *et al.*, 1996).



Abbildung 17: Expressionskontrolle von ERK1/2 in wildtypischen und transgenen Mäusen

Repräsentative *Western Blot*-Analyse von Herzlysaten wildtypischer (Wt) und transgener Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von ERK2 ^{Δ 174-177} (kurz: ERK2- Δ 4). Detektiert wurden endogene Level von ERK1/2 und überexprimierte Level von ERK2- Δ 4 (ERK1: 44kDa, ERK2: 42kDa). n \geq 3 Tiere.

In Abbildung 17 ist ein repräsentativer Immunoblot von Herzlysaten ERK2- Δ 4 transgener und wildtypischer Mäuse dargestellt. Verglichen wurden die endogenen ERK1/2-Expressionslevel von nicht-transgenen Mäusen mit der Überexpression der transgenen ERK2- Δ 4-Mäuse. Während der *Western Blot* zeigt, dass die ERK1-Level zwischen den beiden Gruppen vergleichbar waren, kann für ERK2 eine klare Überexpression bei den transgenen Tieren ausgemacht werden.

Anschließend wurden die Mäuse der beiden Gruppen im Alter von acht Wochen miteinander verglichen und daraufhin zum Teil jeweils einer transversen Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen. Die TAC ist eine etablierte operative Methode zur Induktion pathologischer linksventrikulärer Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten. Dabei wird der Aortenbogen ligiert, wodurch es zu einem intrakardialen Druckanstieg kommt. Dieses Modell bietet somit eine sehr gute Möglichkeit, die Bedingungen einer Herzinsuffizienz nachzubilden, wie man sie beim Menschen beispielsweise aufgrund einer Hypertonie oder Aortenklappenstenose vorfindet (Breckenridge, 2010).

Die beiden Mausgruppen wurden einer sechswöchigen Ligation der Aorta unterzogen, gekennzeichnet mit TAC, und mit acht Wochen alten Tieren verglichen, welche mit „Kon“ gekennzeichnet sind.

Wie zuvor *in vitro* bei den NRCMs sollte nun auch *in vivo* die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten bestimmt werden, um den Grad des hypertrophen Wachstums zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Gewebeschnitte von isolierten Mausherzen mit der HE-Methode gefärbt und daraufhin die Querschnittsflächen einzelner Kardiomyozyten mikroskopisch betrachtet und analysiert.

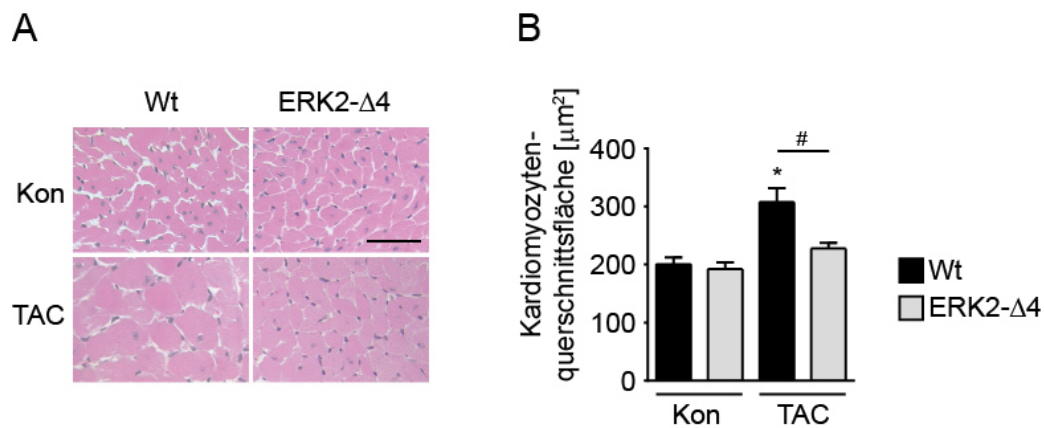


Abbildung 18: Die herzspezifische Überexpression von ERK2-Δ4 führt zu einer signifikanten Reduktion der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten nach TAC

Wildtyp (Wt)- bzw. ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transgene Tiere wurden im Alter von acht Wochen miteinander verglichen (Kontrolle, kurz: Kon) oder einer sechswöchigen TAC unterzogen und im Anschluss ihre Herzen entnommen. Die Gewebeschnitte dieser Herzen wurden HE-gefärbt und mikroskopisch analysiert. Abbildung A: repräsentative Ausschnitte der histologischen Sektionen (Maßstab: 50μm). Abbildung B: morphometrische Analyse der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten anhand der mikroskopischen Aufnahmen. n≥8 Tiere (≥120 Zellen pro Gewebeschnitt). *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

In Abbildung 18A sind repräsentative Ausschnitte von Aufnahmen solcher HE-gefärbter Schnitte dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Ligation des Aortenbogens in Wildtyp-Mäusen zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten führte. Dahingegen vergrößerten sich die Kardiomyozyten von ERK2-Δ4 transgenen Mäusen in deutlich geringerem Maße. Wie aus der morphologischen Auswertung der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten in Abbildung 18B entnommen werden kann, war das hypertrophe Wachstum nach sechswöchiger Aortenligatur in den Herzen ERK2-Δ4 transgener Tiere signifikant geringer.

Eine nichtinvasive, schonende Methode zur Diagnostik von Schäden am Herzen ist die transthorakale Echokardiographie. Sie liefert innerhalb kürzester Zeit wichtige Parameter für die Beurteilung der Morphologie und Funktion des Herzens. Dabei kann die globale diastolische Funktion des linken Ventrikels über die enddiastolischen septalen und posterioren Wanddicken bestimmt werden. Zur Ermittlung der globalen systolischen Funktion wurde die Verkürzungsfraction (FS, *Fractional shortening* – Berechnung siehe Abschnitt 3.7.5) betrachtet (Flachskampf, 2012).

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, nahmen sowohl die linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVHW) als auch die intraventrikuläre Septumdicke (IVS) nach TAC in Wildtyp-Mäusen zu. Im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen war der Anstieg der Wanddicken in den ERK2-Δ4 transgenen Mäusen signifikant geringer, was die histologischen Untersuchungen bestätigte.

Die Verkürzungsfraction kann als Maß für die Kontraktilität des Herzens betrachtet werden. Zwischen den Gruppen war hier kein Unterschied ersichtlich, was darauf schließen lässt, dass die Über-

expression von ERK2- Δ 4 die Herzfunktion nicht beeinträchtigt (Tabelle 2). Die Betrachtung der Herzfrequenz liefert Erkenntnisse über Veränderungen der Herzfunktion aufgrund hämodynamischer Belastungen. Auch hier nimmt die Überexpression von ERK2- Δ 4 keinen Einfluss.

Tabelle 2: Echokardiographische Auswertung von FVB/N-Mäusen vor und nach TAC

Parameter	Wt Kon	ERK2- Δ 4 Kon	Wt TAC	ERK2- Δ 4 TAC
LVHW, enddiastolisch, [mm]	0.77 (± 0.020)	0.80 (± 0.016)	1.1 (± 0.023)*	1.0 (± 0.016)*#
IVS, enddiastolisch, [mm]	0.75 (± 0.015)	0.78 (± 0.014)	1.2 (± 0.015)*	1.1 (± 0.014)*#
Systolische Verkürzungsfraction, [% der LVID]	38 (± 1.4)	41 (± 1.7)	36 (± 2.0)	37 (± 1.5)
Herzfrequenz [Schläge/min]	489 (± 15)	466 (± 8.9)	496 (± 8.8)	473 (± 9.8)

Echokardiographische Untersuchung wildtypischer (Wt) bzw. ERK2 ^{Δ 174-177} (kurz: ERK2- Δ 4) transgener Tiere bei acht Wochen alten Kontrolltieren (Kon) oder nach sechswöchiger TAC. LVHW: linksventrikuläre Hinterwand, IVS: intraventrikuläre Septumdicke, LVID: linksventrikulärer Innendurchmesser. Alle echokardiographischen Auswertungen wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. n \geq 8 Tiere, *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt (TAC), Mittelwert \pm S.E.M.

Um den Grad des pathologischen kardialen *Remodelings* nach TAC weiter zu untersuchen, wurde im Anschluss das Ausmaß der kardialen Fibrose in den Mausherzen analysiert. Hierfür wurden wieder histologische Methoden verwendet. Paraffinschnitte der entnommenen Myokardproben wurden mit Siriusrot gefärbt, um Kollagen zu visualisieren, welches von Myofibroblasten zur Kompensation der ansteigenden Muskelmasse sezerniert wurde. Eine übermäßige Einlagerung von Kollagen resultiert jedoch in einer Versteifung des Ventrikels und schließlich Verschlechterung der kardialen Kontraktilität (Burchfield *et al.*, 2013).

Während bei der Siriusrot-Färbung das Myokard (Muskelgewebe) gelb angefärbt wird, erscheint Bindegewebe (Kollagen) rot. Repräsentative Ausschnitte solcher angefärbter Gewebesektionen sind in Abbildung 19 zu erkennen. Die Herzschnitte ERK2- Δ 4 transgener Mäuse waren nach Aortenligation deutlich geringer rot angefärbt als bei den Wildtyp-Kontrolltieren (Abbildung 19). Eine quantitative Auswertung dieser Rotfärbungen ergab, dass der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant war (Abbildung 19).

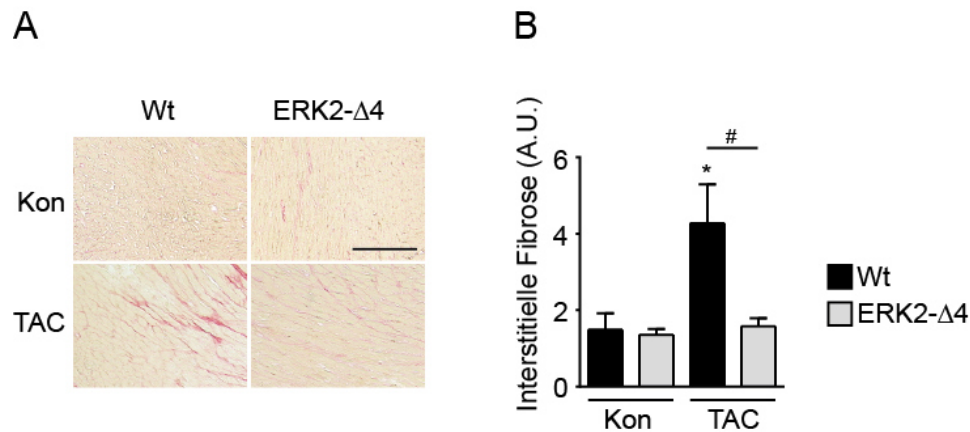


Abbildung 19: Die Überexpression von ERK2-Δ4 reduziert interstitielle Fibrose nach TAC

Wildtyp-FVB/N-Mäuse (Wt) bzw. ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transgene Tiere wurden im Alter von acht Wochen miteinander verglichen (Kontrolle, kurz: Kon) oder einer sechswöchigen TAC unterzogen und im Anschluss ihre Herzen entnommen. Die Gewebeschnitte dieser Herzen wurden Siriusrot-gefärbt und mikroskopisch analysiert. Abbildung A: repräsentative Ausschnitte der histologischen Sektionen (Maßstab: 200µm). Abbildung B: Quantifizierung der interstitiellen Fibrose anhand der mikroskopischen Aufnahmen. A.U.=arbitrary units. n≥7 Tiere. *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

Es sollte im Anschluss weiter bestätigt werden, dass eine deutlich geringere Fibrosierung des Gewebes in ERK2-Δ4 transgenen Mäusen stattfand. Dazu wurden die mRNA-Expressionslevel von Collagen Typ III, α 1 (kodierendes Gen: Col3a1), einer Hauptkomponente der extrazellulären Matrix, bestimmt. Die mRNA Expressionslevel von Collagen Typ III, α 1 stiegen in Wildtyp-Mäusen nach TAC deutlich an (Abbildung 20). Demgegenüber war die Expressionsrate in ERK2-Δ4 transgenen Tieren nach TAC signifikant geringer. Diese Ergebnisse korrelierten mit den histologischen Auswertungen SR-gefärbter Herzschnitte.

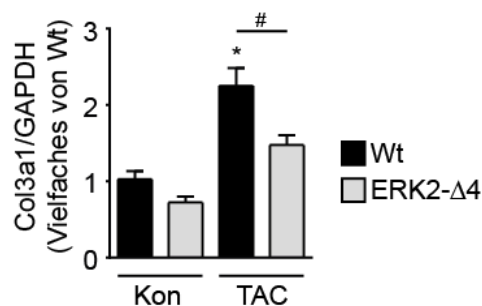


Abbildung 20: Die Level an Collagen III sind in ERK2-Δ4 transgenen Mäusen nach TAC deutlich verringert

Die Collagen III, α 1 mRNA-Expressionslevel von Herzlysaten wildtypischer (Wt) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transgener FVB/N-Mäuse vor (Kontrolle, kurz: Kon) und nach TAC wurden durch RT-PCR bestimmt. n≥6 Tiere. *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

Im Rahmen des *Remodeling*-Prozesses im Herzen sollte auch der myokardiale Zelltod untersucht werden. Eine pathologische Mehrbelastung löst Apoptose und Nekrose in Kardiomyozyten aus. Der Verlust von Kardiomyozyten führt zu einer exzessiveren Einlagerung von Kollagen und verschlechtert so das klinische Bild weiter (Diwan und Dorn, 2007).

Zur Analyse der Apoptoserate in den entnommenen Herzen wurde die Aktivität der Caspasen 3/7 in den Gewebelysaten gemessen, da sie zentrale Rollen im Weiterleiten apoptotischer Signale inne haben. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, brachte die durch TAC hervorgerufene pathologische Hypertrophie einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate mit sich. Die Überexpression der monomeren ERK-Mutante hatte weder vor noch nach der Ligation des Aortenbogens negativen Einfluss auf das Zellüberleben.

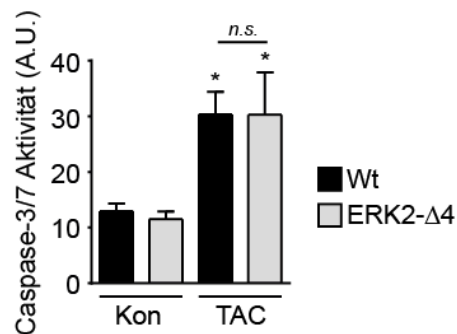


Abbildung 21: Die Überexpression von monomerem ERK2 hat keinen negativen Einfluss auf die Apoptoserate im Herzen

Die Aktivität der Caspasen 3/7 wurde von Herzlysaten wildtypischer (Wt) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transgener Mäuse ohne (Kontrolle, kurz: Kon) und nach TAC bestimmt. n≥5 Tiere. Dieser Versuch wurde von Dr. Catharina Ruppert durchgeführt. *, P<0,05 zu Wt (Kon), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

Pathologische kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz sind assoziiert mit der Induktion des fetalen Genprogramms. Darunter zählt u.a. auch das Nppb-Gen, welches für BNP kodiert. BNP ist ein Mitglied der Familie natriuretischer Peptide und wird hauptsächlich in kardialen Ventrikeln synthetisiert und sezerniert (Nakagawa *et al.*, 1995). Da die BNP-Konzentration während idiopathischer Kardiomyopathie, kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz stark ansteigt, wird sie in der Klinik gerne als diagnostischer Marker oder zur Verlaufskontrolle der jeweiligen Krankheit herangezogen (Dorn *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 1995). Die Quantifizierung dieses Biomarkers durch RT-PCR in den Herzproben der unterschiedlichen Mausgruppen kann somit Aufschluss darüber geben, ob die Mäuse durch TAC eine pathologische Hypertrophie entwickelt haben. Tatsächlich stiegen die Expressionslevel von BNP in Wildtyp-Mäusen nach TAC stark an (Abbildung 22). Im Vergleich dazu war der Anstieg der BNP mRNA-Level von ERK2-Δ4 transgenen Mäusen signifikant schwächer.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die kardiale Überexpression von monomerem ERK2 das Krankheitsbild der pathologischen Hypertrophie allgemein verbessert.

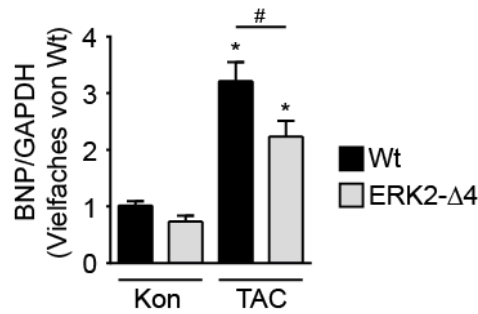


Abbildung 22: Die Überexpression von ERK2-Δ4 führt zu einem geringeren Anstieg der BNP-Level

Die BNP mRNA-Expressionslevel von Herzen wildtypischer (Wt) oder ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) transgener FVB/N-Mäuse vor (Kontrolle, kurz: Kon) und nach TAC wurden durch RT-PCR bestimmt. n≥6 Tiere. *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

4.4 Monomeres ERK hat keinen Einfluss auf physiologische Hypertrophie

Die Hypertrophie des Myokardiums entwickelt sich nicht nur aufgrund pathologischer Bedingungen, wie Hypertonie oder Myokardinfarkt. Sie kann auch als adaptiver physiologischer Mechanismus auftreten, was sich grundlegend von pathologischer kardialer Hypertrophie unterscheidet, da das Herz hier keinen krankhaften Zustand entwickelt, sondern sogar noch davon profitiert (Maillet *et al.*, 2013). Die physiologische Hypertrophie treibt das normale postnatale Herzwachstum, das Wachstums des mütterlichen Herzens während der Schwangerschaft sowie das Wachstums des Herzens eines gut konditionierten Athleten an. Dabei bleibt die Herzfunktion erhalten oder verbessert sich im Falle des Sportlerherzens sogar. Außerdem ist der Prozess nach Abklingen des Stimulus, wie Schwangerschaft oder Sport, reversibel (Bernardo *et al.*, 2010).

Da physiologische Hypertrophie also von außerordentlicher Bedeutung für den Organismus ist, sollte eine therapeutische Intervention, mit der die pathologische kardiale Hypertrophie verringert wird, keinen Einfluss auf physiologisches Herzwachstum nehmen. Um die Auswirkungen von monomeren ERK2 auf diese Form des Wachstums zu untersuchen, wurden wildtypische FVB/N-Mäuse und ERK2-Δ4-FVB/N-Mäuse im Hinblick auf die postnatale Entwicklung ihrer Herzen untersucht. Dazu wurden diese zwei Mausgruppen im Alter von neun Monaten miteinander verglichen.

So führte die kardiale Überexpression von ERK2-Δ4 weder bei der Auswertung des Verhältnisses von Herzgewicht zu Tibialänge (Abbildung 23A), noch bei der Betrachtung von HE-gefärbten histologischen Schnitten für die Analyse der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten (Abbildung 23B) zu einer Beeinflussung der jeweiligen Parameter. Diese Beobachtungen konnten mithilfe echokardiographischer Untersuchungen der Mäuse bestätigt werden. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen war bei ERK2-Δ4 transgenen Tieren sowohl bei der linksventrikulären Hinterwanddicke als auch bei der intraventrikulären Septumdicke kein Unterschied auszumachen (Tabelle 3). Gegensätzlich zu den pathologischen Zuständen die durch eine TAC bei Mäusen ausgelöst wurden entwickelten die Tiere durch normale postnatale Hypertrophie keine ernstzunehmende interstitielle Fibrose (Abbildung 19, Abbildung 23C). Die Auswertung von RT-PCR-Daten belegte zudem, dass es zwischen den beiden

Mausgruppen bezüglich der Expression von Collagen Typ III, $\alpha 1$ keinen Unterschied gab (Abbildung 23D). Außerdem wiesen die BNP-Expressionslevel sowie die echokardiographische Auswertung der Verkürzungsfraktion und Herzfrequenz darauf hin, dass im Rahmen der physiologischen Hypertrophie in beiden Gruppen die Herzfunktion erhalten blieb und die kardiale Überexpression von ERK2- $\Delta 4$ nicht zu einem Anstieg des Herzinsuffizienzmarkers BNP führte (Abbildung 23E, Tabelle 3).

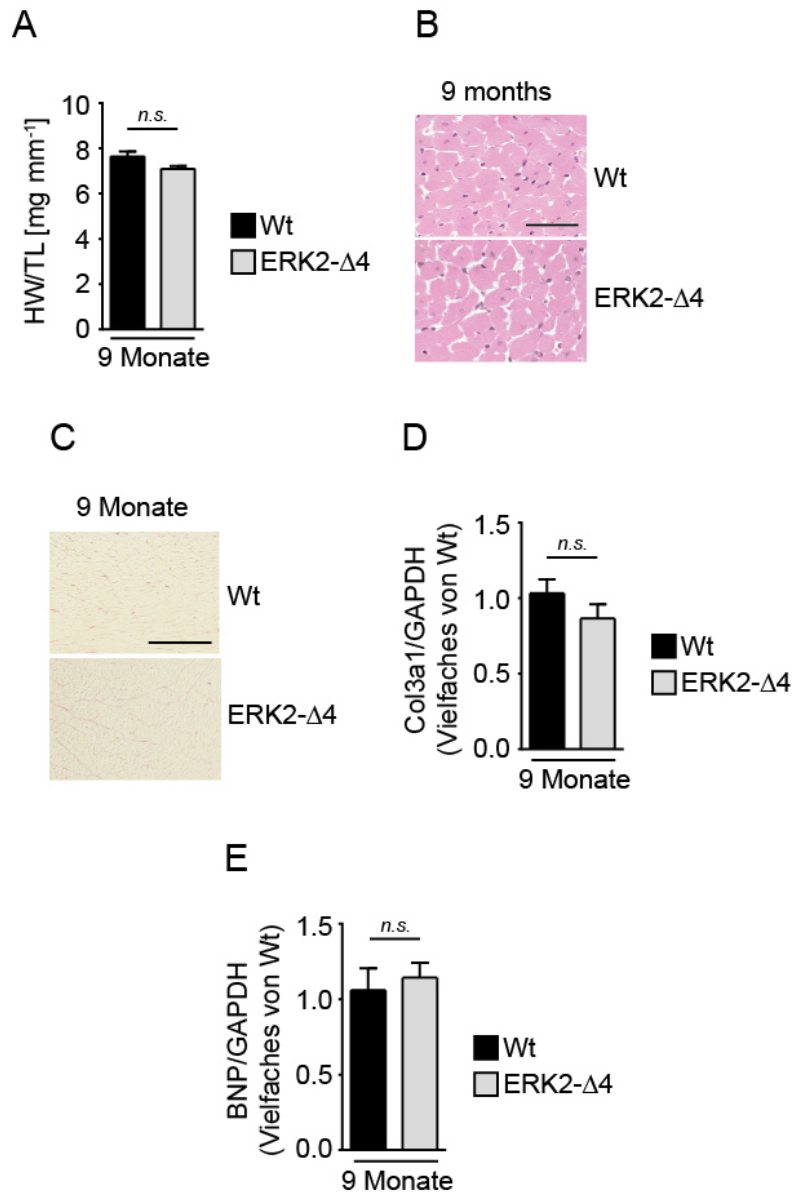


Abbildung 23: Der Einfluss einer ERK2- $\Delta 4$ -Überexpression auf physiologisches Herzwachstum

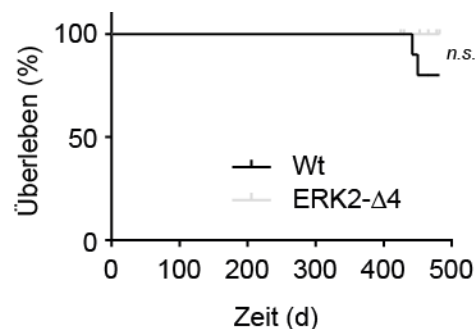
Wildtyp-FVB/N-Mäuse (Wt) und ERK2 ^{$\Delta 174-177$} (kurz: ERK2- $\Delta 4$) transgene Tiere wurden bis zu einem Alter von neun Monaten gezüchtet. Anschließend wurden ihre Herzen entnommen. Abbildung A: Herzgewicht/Tibiallänge. Abbildung B: repräsentative Aufnahmen HE-gefärbter histologischer Schnitte (Maßstab: 50 μ m). Abbildung C: repräsentative Aufnahmen SR-gefärbter histologischer Schnitte (Maßstab: 200 μ m). Abbildung D: Expressionslevel der mRNA von Collagen III, $\alpha 1$ bestimmt durch RT-PCR. Abbildung E: mRNA-Expressionslevel von Die BNP bestimmt mithilfe von RT-PCR. Für alle Versuche hier gilt: n=9 Tiere, n.s., nicht signifikant, Mittelwert \pm S.E.M.

Tabelle 3: Echokardiographische Charakterisierung von Mäusen im Alter von neun Monaten

Parameter	Wt 9 Monate	ERK2- Δ 4 9 Monate
LVHW, enddiastolisch, [mm]	0.89 (± 0.017)	0.79 (± 0.025)
IVS, enddiastolisch, [mm]	0.87 (± 0.016)	0.81 (± 0.036)
Systolische Verkürzungsfraction, [% der LVID]	38 (± 1.5)	35 (± 2.3)
Herzfrequenz [Schläge/min]	539 (± 8.5)	506 (± 16)

Echokardiographische Analyse von Wildtyp (Wt)- oder ERK2 Δ 174-177 (kurz: ERK2- Δ 4) transgenen Tieren im Alter von neun Monaten. LVHW: linksventrikuläre Hinterwand, IVS: intraventrikuläre Septumdicke, LVID: linksventrikulärer Innendurchmesser. Alle echokardiographischen Auswertungen wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. n=9 Tiere, Mittelwert \pm S.E.M.

Darüber hinaus soll darauf hingewiesen werden, dass das Überleben der Mäuse, die ERK2- Δ 4 kardial überexprimierten nicht unterscheidbar zu dem von wildtypischen Kontrolltieren war (Abbildung 24).

**Abbildung 24: Überlebenskurve von Wt- und ERK2-4-transgenen Mäusen**

Kaplan-Meier-Kurven von weiblichen wildtypischen Kontrolltieren (Wt) und weiblichen Mäusen mit kardialer Überexpression von ERK2 Δ 174-177 (kurz: ERK2- Δ 4). n \geq 13.

Zusammenfassend belegen die bisherigen Ergebnisse, dass ERK2- Δ 4 effektiv die Entwicklung pathologischer Hypertrophie, verbunden mit kardialem *Remodeling*, verhindern kann, ohne dabei schädliche Auswirkungen auf das Zellüberleben oder die Herzfunktion zu haben. Dies geschieht so spezifisch, dass physiologische Hypertrophie durch monomeres ERK nicht beeinflusst wird. Somit stellt die ERK-Dimerisierung tatsächlich eine potentielle Zielstruktur dar, mit der es möglich scheint, spezifisch das pathologische Herzwachstum zu unterbinden.

4.5 Charakterisierung eines Peptids zur Inhibition ERK-Dimerisierung

Soweit wurde in den bisherigen Versuchsansätzen eine katalytisch aktive Mutante überexprimiert, welche dominant negative Effekte auf die hypertrophe Signalweiterleitung von ERK1/2 ausübte und

darüber hinaus in Mausherzen gut vertragen wurde. Da die Inhibition der ERK-Dimerisierung also eine vielversprechende Strategie zur Verhinderung der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung und damit verbunden pathologischer kardialer Hypertrophie zu sein scheint, wurde mit dem C-terminalen Abschnitt von ERK2 weitergearbeitet. Dieser beinhaltet viele Aminosäuren des putativen ERK2-Dimer-Interfaces und sollte dazu dienen, die ERK-Dimerisierung endogen zu inhibieren (Wilsbacher *et al.*, 2006). Das verwendete Konstrukt wird im Folgenden als „Peptid“ bezeichnet und war N-terminal noch mit einer myc-Affinitätssequenz versehen (Abbildung 25).



Abbildung 25: Aminosäuresequenz des Peptids aus dem C-Terminus von ERK2 zur Inhibition der ERK-Dimerisierung

Aminosäuresequenz des ERK2 C-Terminus, genannt Peptid. Es beinhaltet die Aminosäureabfolge 309 bis 357 von murinem ERK2 und ist N-terminal mit einem myc-tag versehen.

Im Peptid sollten die Aminosäuren enthalten sein, welche den *Leucin-Zipper* im ERK2-Dimer bilden. Daher wurden die Aminosäuren Lys338 bis Glu353 mit eingeschlossen, welche die α -Helix α L16 im ERK2-Molekül formen (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1994).

Um die tatsächlichen Auswirkungen des Peptids auf die Dimerisierung von ERK zu untersuchen wurden *Proximity Ligation Assays* in COS7-Zellen durchgeführt. Diese Nachweismethode erkennt sehr selektiv und sensitiv Proteininteraktionen auf dem Level von Einzelmolekülen und amplifiziert das Signal 500-fach, so dass eine Interaktion mikroskopisch als ein fluoreszierender Punkt wahrgenommen werden kann. Da für die Reaktion die Bindung von zwei primären Antikörpern benötigt wird, liegt bei dieser Methode eine sehr hohe Spezifität vor.

Bevor diese Versuche durchgeführt wurden, sollte zuerst die Anwesenheit des Peptids in den Zellen kontrolliert werden. Da sich herausstellte, dass die Expression des Myc-Peptids (ca. 7kDa) anhand gängiger *Western Blot*-Analysen nicht nachzuweisen war, wurden andere Methoden verwendet, um die Anwesenheit des Peptids zu detektieren. Abbildung 26A zeigt einen repräsentativen *Dot Blot* welcher die Expression des Peptids im Vergleich zu einem Kontrollvektor in COS7-Zellen belegt.

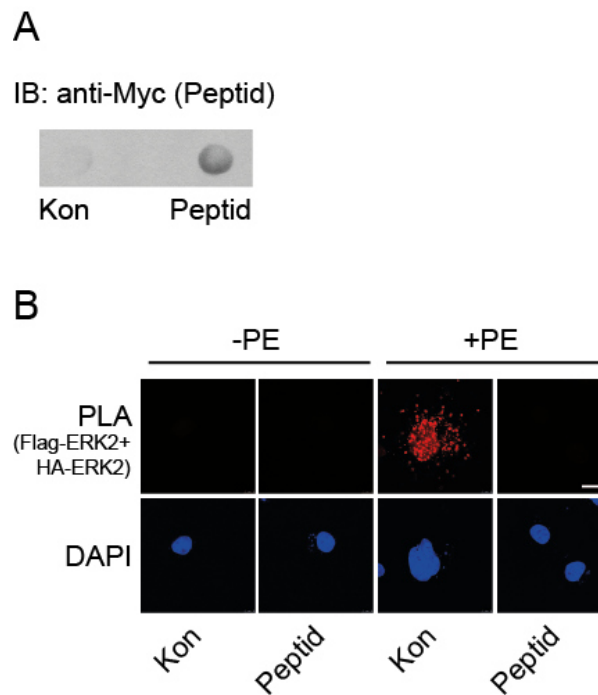


Abbildung 26: Das Peptid verhindert die Dimerisierung von ERK2

Abbildung A: repräsentativer *Dot Blot* mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) in COS7-Zellen. Die Zellen wurden dazu entweder mit pcDNA3 (Kontrolle, kurz: Kon) oder Peptid transient transfiziert und anschließend ein *Dot Blot* mit ihren Lysaten durchgeführt. $n \geq 3$. Abbildung B: Cos7-Zellen wurden mit HA-ERK2, Flag-ERK2 und dem α_1 -Rezeptor transient transfiziert und entweder mit dem pcDNA3-Kontrollvektor (Kon) oder mit dem Peptid kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PE stimuliert (10min, 4 μ M) und die Duolink®-Färbung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Gezeigt sind repräsentative konfokale Aufnahmen (Maßstab: 20 μ m). Diese Versuche wurden von Sofia Kramer mit Hilfestellung von Angela Tomasovic durchgeführt. $n \geq 3$ unabhängige Experimente (≥ 10 Zellen pro Bedingung und Experiment).

In Abbildung 26B sind repräsentative Aufnahmen der *Proximity Ligation Assays* dargestellt. Auf ihnen ist anhand der deutlichen Interaktion von Flag-ERK2 mit HA-ERK2 die Dimerisierung von ERK2 nach PE-Stimulation zu erkennen. In Anwesenheit des Peptids konnte nach Stimulation der COS7-Zellen mit PE allerdings kein Signal des Dimers ausgemacht werden. Unter basalen Bedingungen war weder in den Kontrollzellen, noch in den Zellen, welche mit dem Peptid transfiziert wurden eine Dimerisierung zu sehen. Dies bestätigt, dass ERK phosphoryliert vorliegen muss um dimerisieren zu können (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

Um herauszufinden, auf welchem Weg die Hemmung der Dimerisierung von ERK2 durch das Peptid stattfindet, wurden *Crosslinking*-Experimente in HEK293-Zellen durchgeführt. Diese dienten dazu, einen potentiellen direkten Effekt des Peptids auf ERK2 auszumachen.

Zunächst sollten dafür Expressionskontrollen in HEK293-Zellen die Anwesenheit des Peptids nach dessen Transfektion bestätigen. Die Aufreinigung von mRNA aus diesen Zellen und die daraus folgende cDNA-Synthese ermöglichten den Beleg mithilfe von PCR-Untersuchungen, dass das Peptid-Konstrukt in das Genom eingebaut wurde (Abbildung 27A). Abbildung 27B zeigt einen repräsentativen *Dot Blot*, welcher die Expression des Myc-Peptids im Vergleich zu einem Kontrollvektor darstellt.

Nachdem die Existenz des Peptids nach Transfektion in HEK293-Zellen bestätigt wurde, konnte das *Crosslinking* durchgeführt werden. Diese Methode dient dem Nachweis von Proteininteraktionen, indem ein Vernetzungsmittel (engl. *crosslinker*) zum Zelllysate hinzugegeben wird, wodurch zwischen interagierenden Proteinen die Entstehung kovalenter Bindungen begünstigt wird. War das Peptid mit Flag-ERK2 kotransfiziert, wurde nach Stimulation mit Carbachol (CCH) ein Anstieg des Molekulargewichts bei ERK2 festgestellt (Abbildung 27C). Dies war in Zelllysaten, welche mit leerem Kontrollvektor transfiziert waren, nicht der Fall, was darauf hindeutet, dass das Peptid mit ERK2 nach Stimulation interagiert.

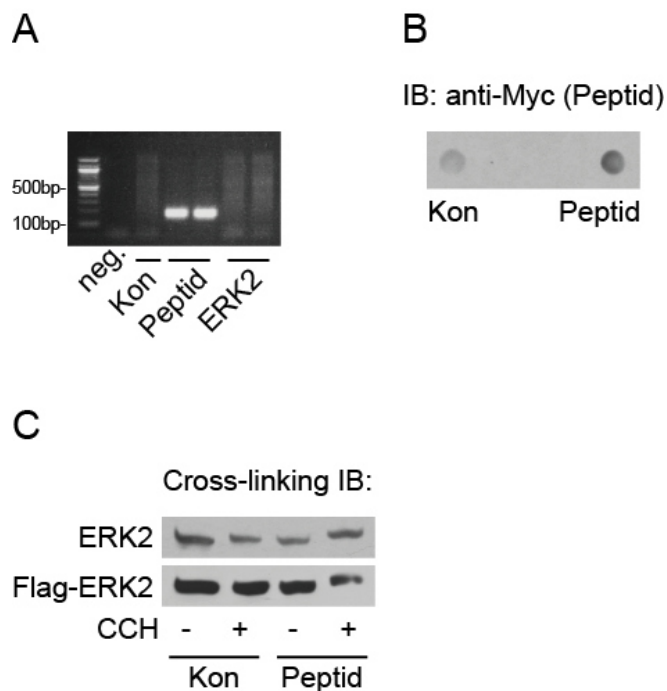


Abbildung 27: Detektion der Interaktion zwischen Flag-ERK2 und dem Peptid

Abbildung A: repräsentative Aufnahme einer PCR-Analyse von cDNA aus HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit pcDNA3 (Kontrolle, kurz: Kon), Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) oder Flag-ERK2 transient transfiziert und anschließend die mRNA aus ihnen extrahiert. Die mRNA wurde dann in cDNA umgeschrieben und damit eine PCR mit Primern, welche das Myc-Peptid erkennen, angesetzt. neg.=Negativkontrolle. n≥3. Abbildung B: repräsentativer *Dot Blot* mit dem Myc-Peptid in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden dazu entweder mit pcDNA3 (Kon) oder Peptid transient transfiziert und anschließend ein *Dot Blot* mit ihren Lysaten durchgeführt. n≥3. Abbildung C: HEK293-Zellen wurden transient mit Flag-ERK2 und zusätzlich entweder pcDNA3 (Kon) oder Peptid transfiziert. Nach Carbachol-Stimulation (CCH, 300µM, 10min) wurden die Zellen mit PFA fixiert (10min). Daraufhin wurden sie in RIPA-Puffer lysiert, mit 4fach Ladepuffer versetzt und *Western Blots* mit ERK2- und Flag-Antikörpern gemacht (ERK2: 42kDa, Flag-ERK2: 43kDa). Die Cross linking-Experimente wurden von Susanne Homann ausgeführt. n≥3.

Da das Peptid sehr effektiv die Dimerisierung von ERK durch eine direkte Interaktion mit ERK unterbinden kann, war nun von Interesse was das für die zur ERK-Aktivierung nötigen Phosphorylierungen im TEY-Motiv und die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung bedeutet.

Die Aktivität von ERK wurde mithilfe eines Kinaseassays mit MBP als Substrat evaluiert. MBP ist ein Zielmolekül vieler Kinasen, u.a. auch von ERK, und dessen Maß an Phosphorylierung kann indirekt

Rückschlüsse auf die Kinaseaktivität von ERK geben. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von MBP nach vorheriger Stimulation von ERK mit CCH zunimmt. In Anwesenheit des Peptids nimmt die MBP-Phosphorylierung um das gleiche Maß zu. Dies lässt den Schluss zu, dass das Peptid die Aktivierung bzw. Aktivität von ERK nicht beeinflusst.

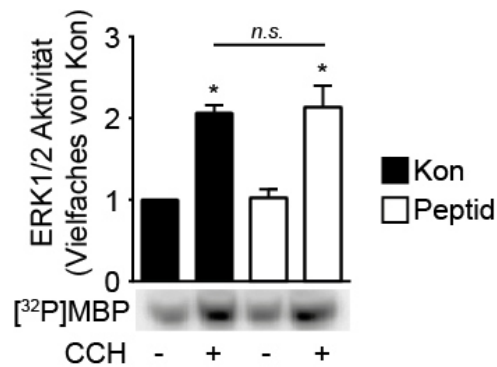


Abbildung 28: Das Peptid beeinflusst nicht die normale Kinaseaktivität von ERK

HEK293-Zellen wurden transient mit Flag-ERK2 und zusätzlich entweder pcDNA3 (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CCH stimuliert (300µM, 10min) und lysiert und das hineintransfizierte Flag-ERK2 immunpräzipitiert. Das präzipitierte Flag-ERK2 wurde in einem radioaktiven MBP-Phosphorylierungsansatz inkubiert und der gesamte Ansatz dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch ([³²P]MBP: 21kDa) entwickelt. Normiert gegen Kon unstimuliert. n=5 unabhängige Experimente. *, $P < 0,05$ zu Kon (unstimuliert), n.s., nicht signifikant, Mittelwert \pm S.E.M.

Western Blots von Flag-ERK2-Immunpräzipitationen aus HEK293-Zellen bestätigten das Ergebnis des Kinaseassays (Abbildung 29A, B). Auch hier ist bei der Betrachtung der Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv nach Stimulation mit CCH kein Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Peptid zu erkennen. Allerdings ist sowohl im repräsentativen *Western Blot*, welcher nach dem Phosphorylierungsstatus von Threonin 188 entwickelt wurde, als auch in der Auswertung dieser Versuche sehr wohl ein starker inhibitorischer Einfluss des Peptids auf diese Autophosphorylierungsstelle zu erkennen (Abbildung 29A, C). Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Dimerisierung von ERK eine Voraussetzung für das Auftreten der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung darstellt.

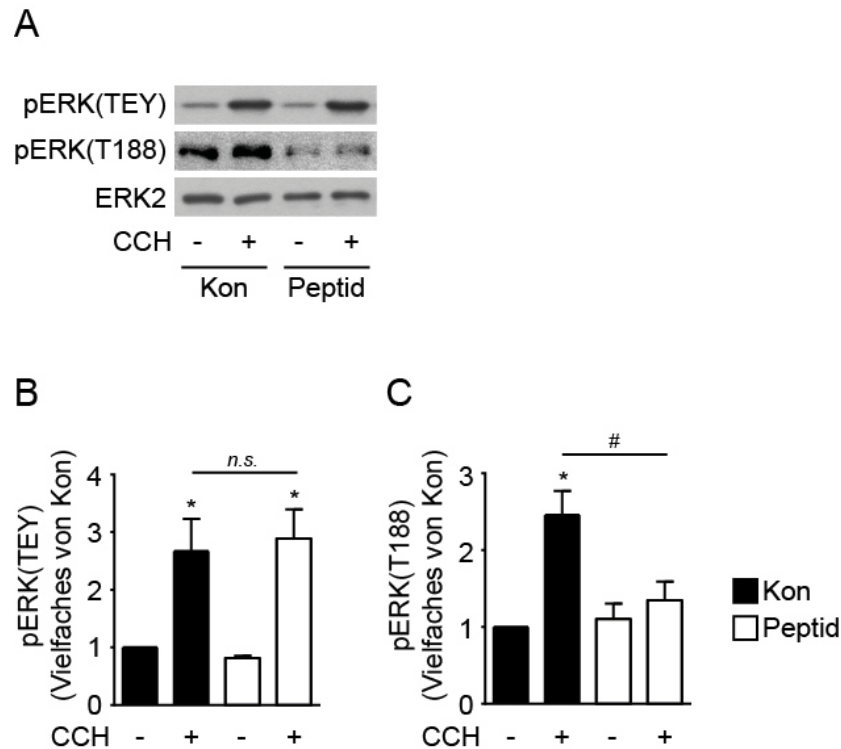


Abbildung 29: Während die TEY-Phosphorylierung durch das Peptid unbeeinflusst bleibt, wird die Thr188-Phosphorylierung reduziert

HEK293-Zellen wurden transient mit Flag-ERK2 und zusätzlich entweder pcDNA3 (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CCH stimuliert (300 μ M, 10min) und lysiert. Abbildung A: repräsentative Immunoblots (ERK1/pERK1: 44kDa, ERK2/pERK2: 42kDa). Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pERK(TEY)- und pERK(T188)-Blots (normiert gegen Kon unstimuliert). n \geq 5 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu Kon, #, P<0,05 zu Kon (stimuliert), Mittelwert \pm S.E.M.

In vitro und in Abwesenheit sonstiger zellulärer Bestandteile und Komponenten konnte ebenfalls ein direkter Effekt des Peptids auf ERK2 erreicht werden. Abbildung 30A zeigt einen beispielhaften *Western Blot* eines solchen *in vitro*-Experiments. Darauf ist klar ersichtlich, dass das Peptid die G β y induzierte ERK^{Thr188}-Phosphorylierung inhibierte. Die Auswertung dieser *Western Blot*-Experimente bestätigte die signifikant geringer auftretende Autophosphorylierung an Threonin 188 in Anwesenheit des Peptids (Abbildung 30B). Als weitere Nachweismethode der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung diente das *Phosphopeptide Mapping*. Diese Methode ermöglicht aufgrund zweidimensionaler Auftrennung die exakte Position posttranslational modifizierter, in diesem Fall phosphorylierter, Aminosäuren zu bestimmen (Boyle *et al.*, 1991; van der Geer und Hunter, 1994). Solch ein Versuch ist beispielhaft in Abbildung 30C dargestellt. Hier konnte auf einem entwickelten Film die Phosphorylierungsstelle an Tyrosin 185 (TEY-Motiv) von der an Threonin 188 abgegrenzt werden. Dabei war ersichtlich, dass die Phosphorylierung an Threonin 188 in Anwesenheit von G β y-Untereinheiten deutlich zunahm. Demgegenüber war sie in Anwesenheit des Peptids wieder stark reduziert. Die Phosphorylierung an Tyrosin 185 blieb durchgehend unverändert.

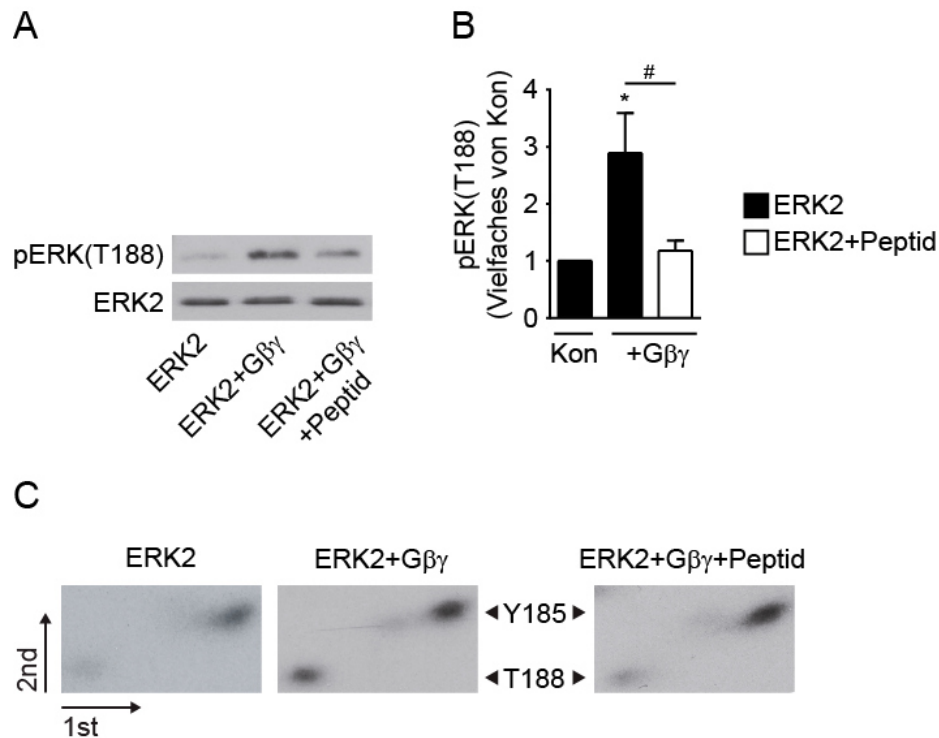


Abbildung 30: Das Peptid mindert die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung *in vitro*

Abbildung A/B: repräsentativer Immunoblot inklusive Auswertung: aufgereinigtes His₆-ERK2 wurde alleine oder mit aufgereinigten Gβγ-Untereinheiten ± aufgereinigtes GST-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) inkubiert (ERK2/pERK2: 42kDa). n=5 unabhängige Experimente (normiert gegen Kon). *, P<0,05 zu Kon, #, P<0,05 zu ERK2+ Gβγ, Mittelwert ±S.E.M. Abbildung C: Zweidimensionales *Phosphopeptide Mapping* von aufgereinigtem His₆-ERK2 alleine oder inkubiert mit Gβγ-Untereinheiten ± aufgereinigtes GST-Peptid. n≥5 unabhängige Experimente.

Da bekannt ist, dass die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung einen Trigger für die nukleäre Translokation von ERK darstellt, sollte nun geklärt werden, ob das Peptid durch die Reduktion dieser Autophosphorylierung auch die subzelluläre Lokalisation von ERK beeinflussen kann. Anhand der bisherigen Lokalisationsversuche mit der monomeren ERK2-Δ4-Mutante konnte schon beobachtet werden, dass die Dimerisierung von ERK1/2 auch mitentscheidend für deren Lokalisation in der Zelle ist (Abbildung 13). Wie sich herausstellte, war das Peptid tatsächlich in der Lage YFP-ERK2 nach PE-Stimulation am Translozieren in den Kern zu hindern (Abbildung 31). Dies verdeutlicht einmal mehr, wie mithilfe des Eingreifens in die Dimerisierung von ERK die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung sowie die darauffolgende nukleäre Translokation von ERK unterbunden werden kann.

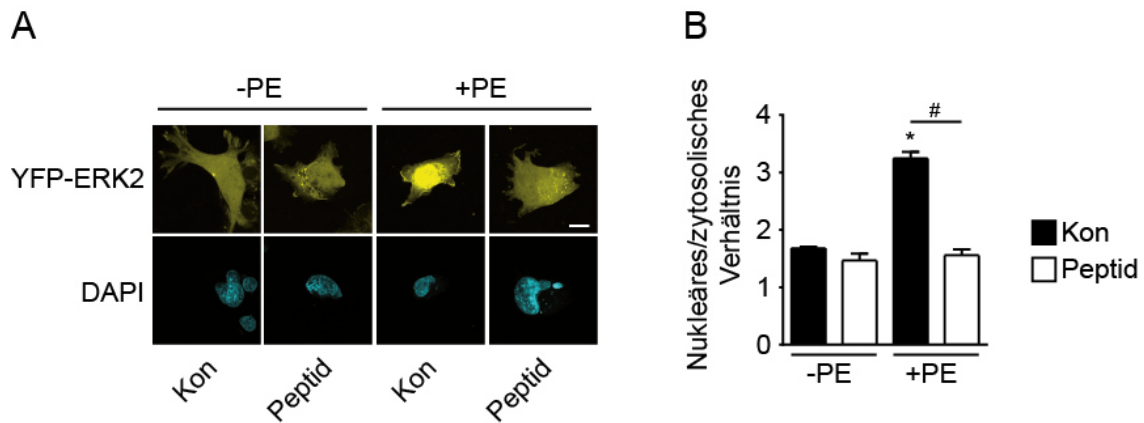


Abbildung 31: Das Peptid verhindert die nukleäre Translokation von ERK2

Für Lokalisationsversuche in COS7-Zellen wurden diese mit YFP-ERK2-wt und dem α_1 -adrenerger Rezeptor transient transfiziert und entweder mit leerem pcDNA3 Vektor (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) kotransfiziert und mit PE stimuliert (10min, 4 μ M). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Gezeigt sind repräsentative konfokale Aufnahmen (Maßstab: 20 μ m) (A) und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Zellkern zu Zytosol (B). $n \geq 3$ unabhängige Experimente (15 Zellen pro Bedingung und Experiment). *, $P < 0,05$ zu Kon (unstimuliert), #, $P < 0,05$ zu Kon (stimuliert), Mittelwert \pm S.E.M.

4.6 Das Peptid verringert ERK^{Thr188}-vermittelte Effekte in Kardiomyozyten

Um herauszufinden, ob die inhibitorischen Effekte des Peptids bezüglich der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung auf Kardiomyozyten übertragen werden können, wurden NRCMs mit dem Peptid transduziert. Zunächst wurden zur Untersuchung der Expression des Peptids wieder *Dot Blots* und PCR-Analysen durchgeführt, welche bestätigen konnten, dass das Peptid erfolgreich in NRCMs transduziert werden konnte (Abbildung 32).

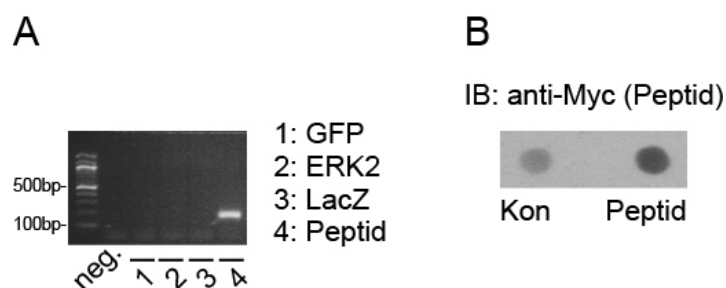


Abbildung 32: Expressionsnachweis des Peptids in NRCMs

Abbildung A: repräsentative Aufnahme einer PCR-Analyse von cDNA aus NRCMs. Die Zellen wurden mit GFP, Flag-ERK2, LacZ oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transient transduziert und anschließend die mRNA aus ihnen extrahiert. Die mRNA wurde dann in cDNA umgeschrieben und damit eine PCR mit Primern, welche das Myc-Peptid erkennen, angesetzt. neg.=Negativkontrolle. $n \geq 3$. Abbildung B: repräsentativer *Dot Blot* mit dem Myc-Peptid in NRCMs. Die Zellen wurden dazu entweder mit GFP (Kontrolle, kurz: Kon) oder Peptid transient transduziert und anschließend *Dot Blots* mit ihren Lysaten durchgeführt. $n \geq 3$.

Die *Western Blot*-Analyse von NRCMs-Lysaten ergab für Peptid-transduzierte Zellen keinen Unterschied in der Phosphorylierung des TEY-Motivs nach PE-Stimulation verglichen mit Kontrollbedingungen (Abbildung 33A, B). Das Peptid beeinflusste demnach, wie schon zuvor in HEK293-Zellen gezeigt, auch in NRCMs nicht die Aktivierung von ERK. Im Einklang mit den *in vitro*-Versuchen führte die Anwesenheit des Peptids allerdings zu signifikant geringeren Phosphorylierungsraten an Threonin 188 (Abbildung 33A, C).

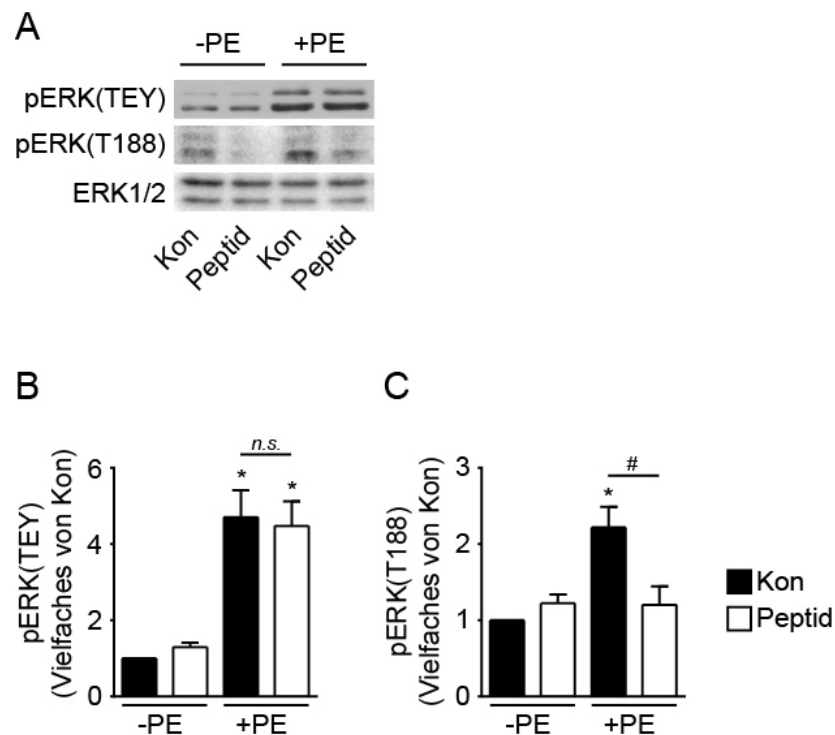


Abbildung 33: In NRCMs verringert das Peptid die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung ohne die TEY-Phosphorylierung zu beeinflussen

NRCMs wurden mit GFP (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) adenoviral transduziert und mit PE (10min, 4 μ M) stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert und daraufhin die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien von ERK mithilfe der angegebenen phosphospezifischen Antikörper im *Western Blot* untersucht. Abbildung A: repräsentative Immunoblots (ERK1/pERK1: 44kDa, ERK2/pERK2: 42kDa), Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pERK(TEY)- und pERK(T188)-Blots (normiert gegen Kon unstimuliert). n=8 unabhängige Experimente. *, $P < 0,05$ zu Kon (unstimuliert), #, $P < 0,05$ zu Kon (stimuliert), n.s. nicht signifikant, Mittelwert \pm S.E.M.

Es stellte sich nun die Frage, was diese Beobachtungen für ERK-vermittelte zelluläre Funktionen bedeuteten. Tatsächlich sah man anhand konfokaler mikroskopischer Aufnahmen von NRCMs, dass diese Zellen nach PE-Stimulation eine deutlich reduzierte Zellgröße aufwiesen, wenn sie mit dem Peptid vorbehandelt wurden (Abbildung 34A). Die Auswertung der Querschnittsfläche dieser Zellen verdeutlicht eine signifikant geringere Hypertrophie der Kardiomyozyten in Anwesenheit des Peptids verglichen mit Kontrollzellen (Abbildung 34B).

Bei der Auswertung der Apoptoseraten in NRCMs mithilfe der TUNEL-Methode war zu erkennen, dass zwar die Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid sowohl in Kontrollzellen als auch in

Zellen, welche mit dem Peptid behandelt wurden, zu einer Zunahme der Apoptoserate führte. Gegenätzlich zum MEK-Inhibitor PD98059 verursachte das Peptid allerdings keinen weiteren Anstieg der Apoptose (Abbildung 34C, Abbildung 14C).

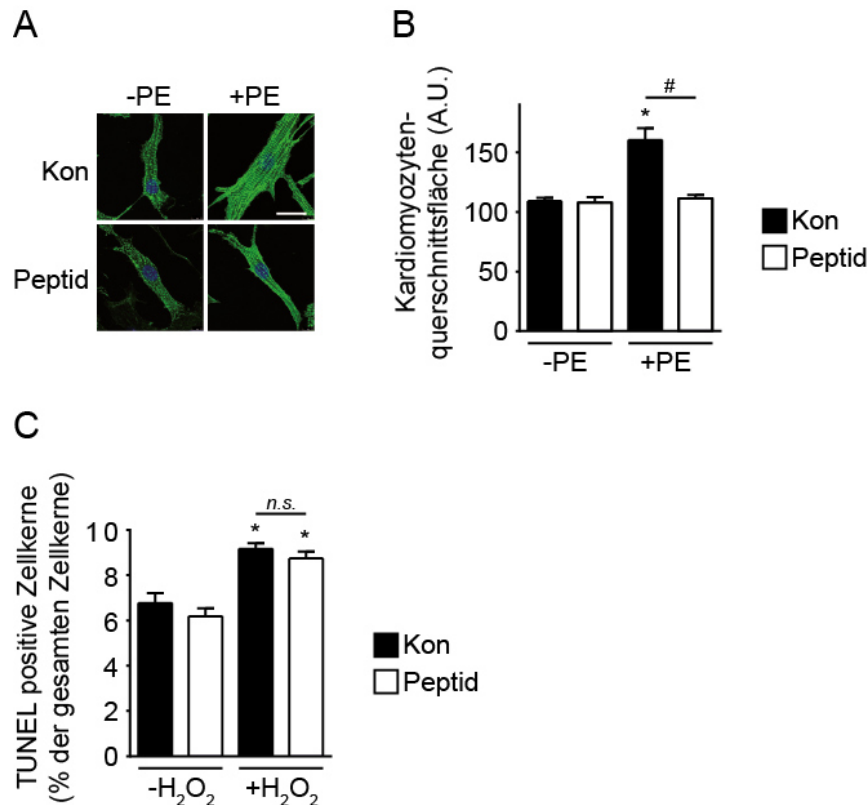


Abbildung 34: Das Peptid reduziert die hypertrophe Antwort in NRCMs ohne negativen Einfluss auf das Zellüberleben zu nehmen

Abbildung A: repräsentative konfokale Aufnahmen von NRCMs, welche mit Alexa Fluor® 488 markiertem Phalloidin gefärbt wurden. Der Zellkern wurde mit DAPI visualisiert. Die Zellen wurden zuvor entweder mit LacZ (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) adenoviral transduziert. Anschließend wurden sie mit PE (24h, 4µM) stimuliert (Maßstab: 20µm). Graph B: quantitative Auswertung der Querschnittsfläche. n=4 unabhängige Experimente (50 Zellen je Bedingung und Experiment). A.U.=arbitrary units. *, P<0,05 zu Kon (unstimuliert), #, P<0,05 zu Kon (stimuliert), Mittelwert ±S.E.M. Abbildung C: NRCMs wurden entweder mit LacZ (Kon) oder dem Peptid adenoviral transduziert (± H₂O₂, 60min, 100µM) und die DNA-Fragmentierung durch Apoptose dann mithilfe der TUNEL-Methode gefärbt und quantifiziert. n=4 unabhängige Experimente (≥100 Zellen je Bedingung und Experiment). *, P<0,05 zu Kon (ohne H₂O₂), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

Diese Beobachtungen weisen bisher auf eine durch das Peptid verursachte selektive Inhibition ERK^{Thr188}-vermittelter Effekte auf das Wachstum von Kardiomyozyten hin. Da auch schon bewiesen werden konnte, wie das Peptid die Translokation von ERK nach Stimulation in den Zellkern verhindert (Abbildung 31), sollte nun die Aktivierung zytosolischer und nukleärer Zielproteine in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Peptids untersucht werden. Einhergehend mit den bisherigen Beobachtungen hatte das Peptid tatsächlich keinen Einfluss auf die Aktivierung zytosolischer Substrate, wie es hier anhand der Phosphorylierung von Bim gezeigt ist (Abbildung 35A, B). Dennoch war die Phosphorylierung des nukleären Zielproteins Elk-1 signifikant reduziert (Abbildung 35A, C).

So bewirkt die Reduktion der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung eine geringere Translokation von ERK in den Zellkern und damit verbunden eine verminderte Aktivierung nukleärer, hypertropher ERK-Substrate, was insgesamt zu einer Verringerung der hypertrophen Reaktion in Kardiomyozyten führt. Dies kann über eine endogene Hemmung der Dimerisierung von ERK geschehen, wie es das Peptid verursacht, und zwar selektiv, also ohne Beeinträchtigung der anti-apoptotischen Eigenschaften von ERK.

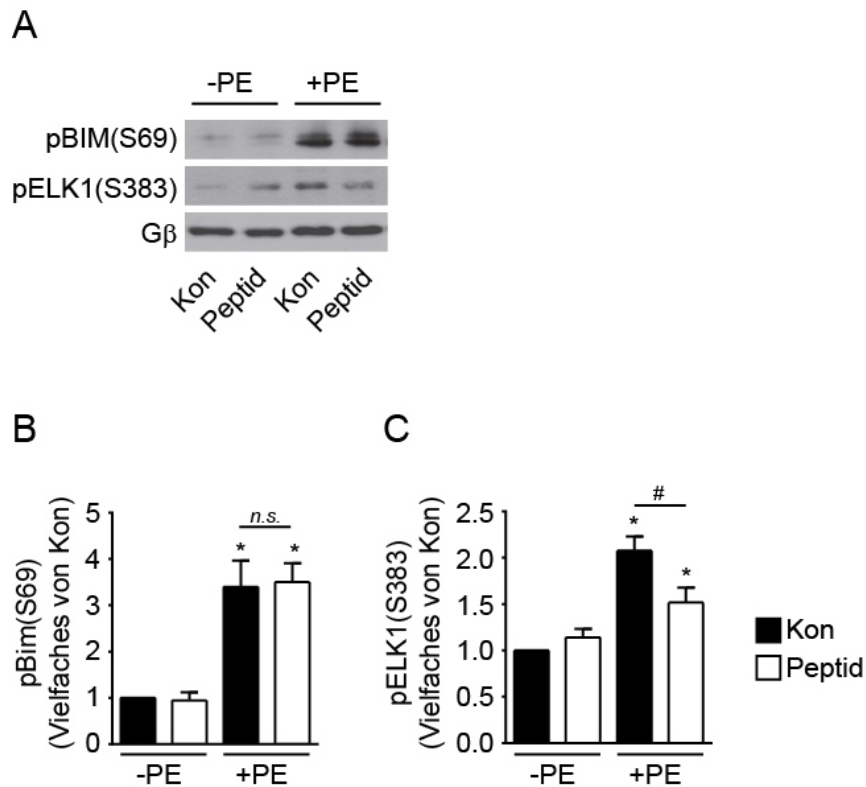


Abbildung 35: In Anwesenheit des Peptids werden nukleäre ERK-Zielproteine geringer aktiviert

NRCMs wurden entweder mit GFP (Kontrolle, kurz: Kon) oder mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transduziert und anschließend mit PE (10min, 4μM) stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Phosphorylierung von Bim an Ser69 bzw. Elk-1 an Ser383 mittels *Western Blot* nachgewiesen und quantifiziert. Abbildung A: repräsentative Immunoblots für pBim (26kDa) und pElk-1 (45kDa). Als Ladekontrolle diente Gβ (36kDa). Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pBim/pElk-1-Immunoblots, normiert gegen Kon (unstimuliert). n≥3 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu Kon (unstimuliert/-PE), #, P<0,05 zu Kon (stimuliert/+PE), n.s. nicht signifikant, Mittelwert ±S.E.M.

Es bleibt jedoch noch offen, wie selektiv das Peptid auf ERK reagiert. Das Interface des ERK-Dimers wird über einen nichthelikalen *Leucin-Zipper* von Stellen der C-Termini beider ERK-Moleküle gebildet (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Wilsbacher *et al.*, 2006). Tatsächlich ist die Hetero- bzw. Homodimerisierung mithilfe eines *Leucin-Zippers* nicht einzigartig für ERK. Viele DNA-bindende Proteine interagieren über vergleichbare Mechanismen mit dem Oberbegriff *Leucin-Zipper* (Landschulz *et al.*, 1988). So ist dies beispielsweise auch für den Transkriptionsfaktor Myc der Fall.

Myc dient als Regulator der Transkription. Zur Ausübung seiner biologischen Funktionen benötigt es die Heterodimerisierung mit MAX. Beide Proteine besitzen eine C-terminale *basic region/helix-*

loop-helix/leucine zipper (bHLHZip)-Domäne, welche die sequenzspezifische DNA-Bindung bestimmt und essentiell für die biologische Funktion von Myc ist (Luscher und Larsson, 1999). Um zu testen, ob das Peptid auf die Interaktion von Myc und MAX Einfluss nimmt, wurden *Proximity Ligation Assays* in COS7-Zellen durchgeführt (Herrero *et al.*, 2015). Es war eine klare Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit PE zu erkennen (Abbildung 36). Anders als bei ERK nahm das Peptid hier jedoch keinen Einfluss. Dies demonstriert, dass das Peptid nicht generell mit allen Proteininteraktionen des Typs *Leucin-Zipper* interagiert.

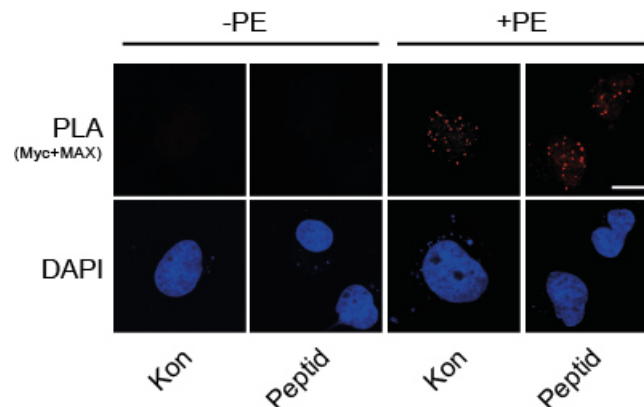


Abbildung 36: Das Peptid hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Myc und MAX

Cos7-Zellen wurden transient mit dem α_1 -Rezeptor transfiziert und entweder mit dem pcDNA3-Kontrollvektor (kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PE stimuliert (10min, 4 μ M) und die Duolink®-Färbung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Gezeigt sind repräsentative konfokale Aufnahmen (Maßstab: 20 μ m). Diese Versuche wurden von Sofia Kramer mit Hilfestellung von Angela Tomasovic durchgeführt. n \geq 3 unabhängige Experimente (\geq 10 Zellen pro Bedingung und Experiment).

4.7 Die AAV9-Peptid Gentherapie bewahrt vor einer durch Überlast hervorgerufene Herzinsuffizienz

Kardiale Hypertrophie kann die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beschleunigen (Artham *et al.*, 2009). Im Folgenden sollte daher das Potential des Peptids bezüglich einer Therapie der durch Druckbelastung hervorgerufenen Herzinsuffizienz untersucht werden. Insofern wurde getestet, ob ein Gentransfer des Peptids mithilfe adeno-assoziiierter Viren des Serotyps 9 (AAV9) C57Bl/6J-Mäuse vor dem Entstehen einer TAC-induzierten Herzinsuffizienz schützen kann (Pleger *et al.*, 2011). Für dieses Modell wurden C57Bl/6J-Mäuse gewählt, da sich insbesondere bei diesem Mausstamm eine Herzinsuffizienz innerhalb von drei bis vier Wochen nach Aortenligation manifestiert (Barrick *et al.*, 2007). Da sie spezifisch und effizient das Myokardium transduzieren, wurden für diesen Zweck AAV des Serotyps 9 verwendet (Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006). Unmittelbar nach der TAC-Operation wurde acht Wochen alten, wildtypischen C57Bl/6J-Mäusen entweder ein AAV9-Vektor in die Schwanzvene injiziert, welcher das Peptid kodiert (Wt+AAV9-Peptid), oder AAV9-GFP (Wt+AAV9-GFP), welcher als Kontrollvektor diente.

Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, führte die Injektion des AAV9-Peptid-Konstruktes zu einer deutlichen Expression der mRNA des Peptids.

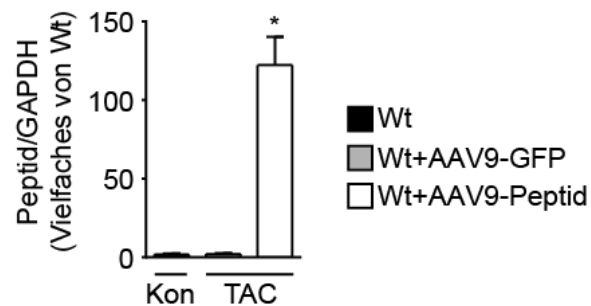


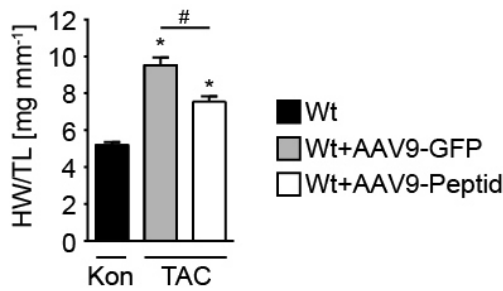
Abbildung 37: Das AAV9-Peptid-Konstrukt transduziert erfolgreich das Myokardium

Die mRNA-Expressionslevel des Peptids in Herzen wildtypischer C57Bl/6J-Mäuse (Wt) vor (Kontrolle, kurz: Kon) und nach vierwöchigem TAC und Injektion von entweder AAV9-GFP oder AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) wurden mithilfe einer RT-PCR bestimmt. n≥7 Tiere. *, P<0,05 zu Wt (Kon), Mittelwert ±S.E.M.

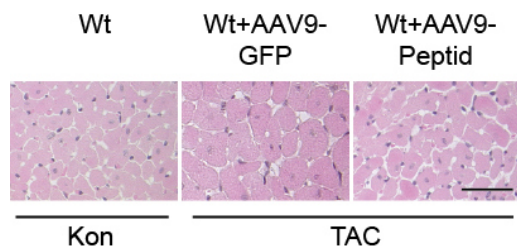
Verglichen mit Mäusen, welche den Kontrollvektor injiziert bekamen, resultierte die Behandlung der operierten Mäuse mit dem AAV9-Peptid-Vektor sowohl bei der Betrachtung der Herzgewichtsdaten (Abbildung 38A) als auch bei der morphometrischen Analyse der Kardiomyozytengröße anhand histologischer Schnitte (Abbildung 38B, C) in einer signifikanten Protektion wildtypischer Mäuse vor pathologischer kardialer Hypertrophie.

Genauso konnte auch die Zunahme der linksventrikulären Hinterwanddicke (LVHW) sowie der intra-ventrikulären Septumdicke (IVS) nach TAC durch das AAV9-Peptid Konstrukt gemindert werden (Tabelle 4).

A



B



C

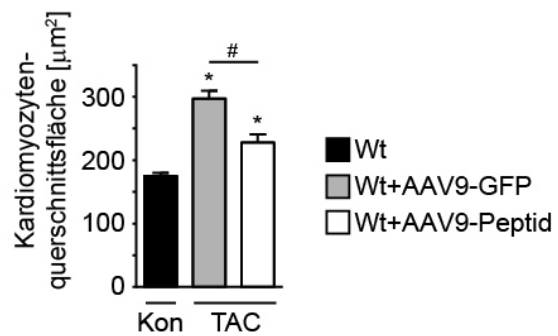


Abbildung 38: Die AAV9-Peptid Behandlung reduziert kardiale Hypertrophie

Wildtypische (Wt) C57Bl/6J-Mäuse (Kontrolle, kurz: Kon) und Tiere, die einer TAC-Operation mit anschließender Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) unterzogen wurden, wurden nach vierwöchiger Aortenligatur die Herzen entnommen. Abbildung A: Herzgewicht/Tibiallänge. Abbildung B/C: Gewebeschnitte dieser Herzen wurden HE-gefärbt und mikroskopisch analysiert. Abbildung B: repräsentative Ausschnitte der histologischen Sektionen (Maßstab: 50µm). Abbildung C: morphometrische Analyse der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten anhand der mikroskopischen Aufnahmen. n≥11 Tiere (≥120 Zellen pro Gewebeschnitt). *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

Tabelle 4: Echokardiographische Untersuchung von C57Bl/6J-Mäusen im Gentherapiemodell

Parameter	Wt (Kon)	Wt+AAV9-GFP (TAC)	Wt+AAV9-Peptid (TAC)
LVHW, enddiastolisch, [mm]	0,69 (±0.014)	0,99 (±0.030)*	0,82 (±0.0090)*#
IVS, enddiastolisch, [mm]	0,64 (±0.013)	1,0 (±0.024)*	0,80 (±0.019)*#
Systolische Verkürzungsfraktion, [% der LVID]	35 (±1.7)	22 (±1.2)*	36 (±1.5)#
Herzfrequenz [Schläge/min]	509 (±12)	499 (±18)	531 (±19)

Echokardiographische Analyse von wildtypischen (Wt) C57Bl/6J-Tieren vor (Kontrolle, kurz: Kon) und nach TAC+AAV9-Therapie. LVHW: linksventrikuläre Hinterwand, IVS: intraventrikuläre Septumdicke, LVID: linksventrikulärer Innendurchmesser. Alle echokardiographischen Auswertungen wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. n≥11 Tiere, *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

Vielmehr waren sogar alle Parameter, welche mit kardialer Funktion und kardialem *Remodeling* assoziiert sind, in Mäusen, die mit dem Peptid behandelt wurden, gegenüber Kontrollmäusen verbessert.

Parameter, welche die Herzfunktion beschreiben, sind beispielsweise die systolische Verkürzungsfraction (Tabelle 4) und die Lungenstauung, gemessen am Gesamtgewicht der Lunge (Abbildung 39). Sowohl die Abnahme der Verkürzungsfraction, als auch eine Zunahme des Lungengewichtes sprechen für eine manifestierte Herzinsuffizienz. Der Rückstau des Blutes in die Lungengefäße ist dabei ganz charakteristisch für eine verminderte Pumpfunktion aufgrund einer Linksherzinsuffizienz. In beiden Fällen konnte die Verabreichung des AAV9-Peptid-Vektors den pathologischen Phänotypen verhindern.

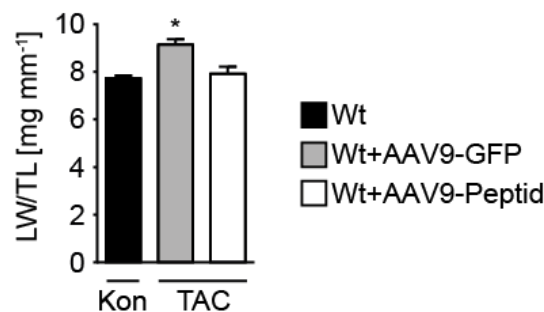


Abbildung 39: Die TAC-induzierte Lungenstauung ist in AAV9-Peptid-behandelten Mäusen geringer

Wildtypische (Wt) C57Bl/6J-Mäuse (Kontrolle, kurz: Kon) und Tiere, die einer TAC-Operation mit anschließender Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) unterzogen wurden, wurden nach vierwöchiger Aortenligatur die Lungen entnommen und gewogen. Das Lungengewicht wurde zur Analyse gegen die Tibialänge des jeweiligen Tieres normiert. *, $P < 0,05$ zu Wt (Kon), Mittelwert \pm S.E.M.

Als ein Maß für kardiales *Remodeling* wurde der Umfang der Fibrosierung des Herzgewebes untersucht (Abbildung 40). Diese nahm, wie zuvor auch am Modell mit FVB/N-Mäusen gezeigt (Abbildung 19), in den Herzen der C57Bl/6J-Kontrollmäuse nach TAC zu (Abbildung 40A, B). Demgegenüber konnte die Behandlung mit dem Peptid-Konstrukt die Entstehung der interstitiellen Fibrose signifikant reduzieren, oder sogar verhindern.

Die mRNA-Expressionsanalyse von Collagen III, $\alpha 1$ bestätigte diese Beobachtungen zusätzlich. Mit AAV9-Peptid behandelte Mäuse exprimierten deutlich weniger mRNA von diesem Bestandteil der extrazellulären Matrix (Abbildung 40C).

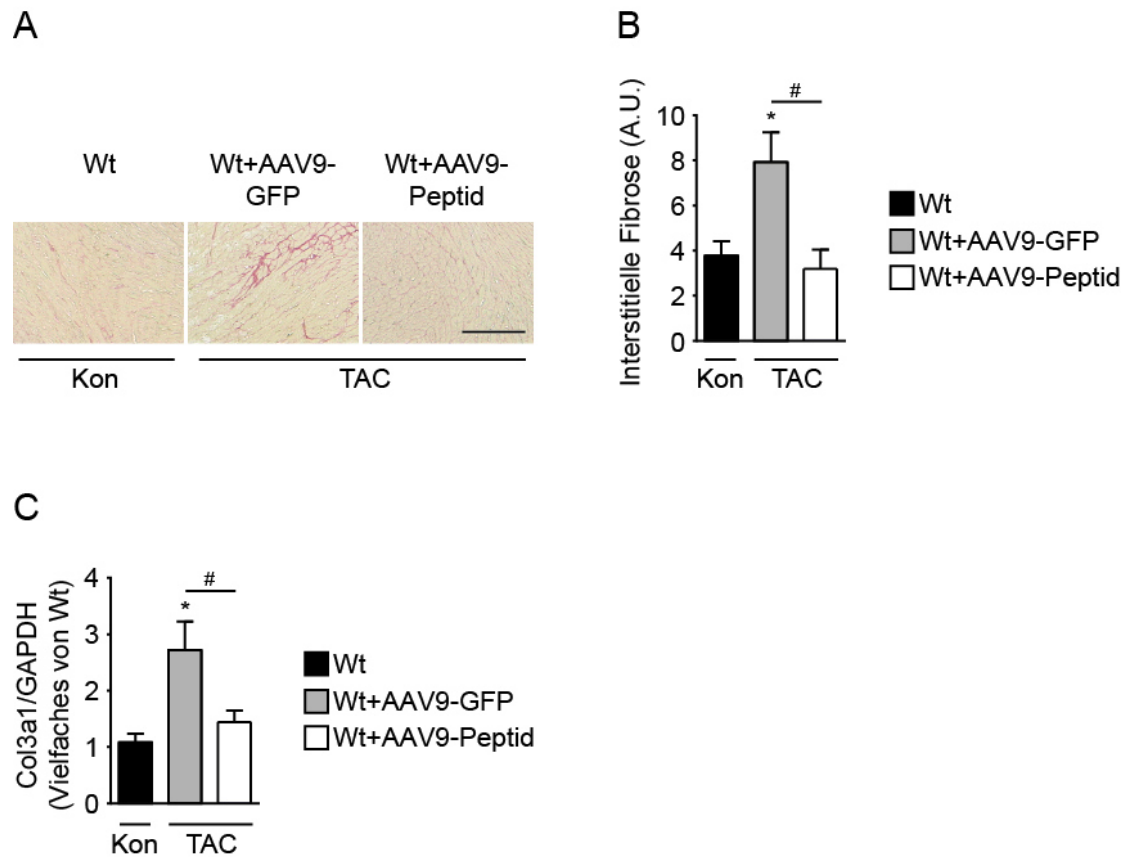


Abbildung 40: Die Behandlung mit dem AAV9-Peptid Vektor reduziert interstitielle Fibrose

Wildtypische (Wt) C57Bl/6J-Mäuse (Kontrolle, kurz: Kon) und solche, bei denen eine vierwöchige Aortenligatur inklusive Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) durchgeführt wurde, wurden die Herzen entnommen. Abbildung A: repräsentative Aufnahmen von Herzgewebeschnitten, welche mit Sirius Rot angefärbt wurden (Maßstab: 200µm). Abbildung B: Quantifizierung der interstitiellen Fibrose anhand der mikroskopischen Aufnahmen. A.U.=arbitrary units. n≥7 Mäuse. *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert ±S.E.M. Abbildung C: Die Collagen III, α 1 mRNA-Expressionslevel in diesen Mäuserherzen wurden mithilfe RT-PCR bestimmt. n≥8 Tiere. *, P<0,05 zu Wt (Kon), #, P<0,05 zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert ±S.E.M.

Im Rahmen der Betrachtung des *Remodeling*-Prozesses in Herzen von C57Bl/6J-Mäusen wurde auch der myokardiale Zelltod analysiert. Nach vierwöchiger Aortenligatur war in AAV9-GFP behandelten Mäusen ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate zu erkennen (Abbildung 41). Erstaunlicherweise führte die Behandlung mit dem AAV9-Peptid Vektor sogar zu einer signifikanten Reduktion dieser Form des myokardialen Zelltodes.

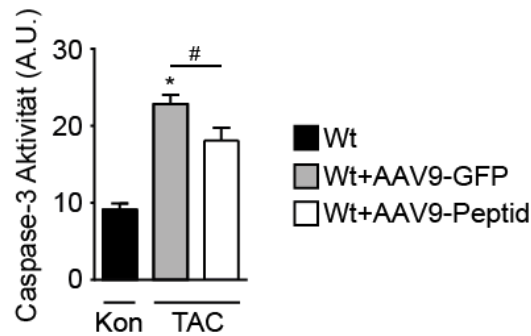


Abbildung 41: Die AAV9-Peptid Gentherapie reduziert myokardialen Zelltod

Die Aktivität der Caspasen 3/7 wurde von Herzlysaten wildtypischer C57Bl/6J-Mäuse (Wt) ohne Behandlung (Kontrolle, kurz: Kon) und solchen, bei denen eine vierwöchige Aortenligatur inklusive Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) durchgeführt wurde bestimmt. $n \geq 7$ Tiere. *, $P < 0,05$ zu Wt (Kon), #, $P < 0,05$ zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert \pm S.E.M.

Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen zur Gentherapie der TAC-induzierten Hypertrophie führte die Verbesserung aller Parameter hinsichtlich Hypertrophie, Herzfunktion und *Remodeling* in C57Bl/6J-Mäusen, welche nach TAC das AAV9-Peptid-Konstrukt appliziert bekamen, insgesamt auch zu einer signifikant reduzierten Expression des Herzinsuffizienzmarkers BNP (Abbildung 42A). Dies führte darüber hinaus zu einem leicht verbesserten (nicht signifikanten) Überleben dieser Mäuse gegenüber denen, die nur den Kontrollvektor injiziert bekamen (Abbildung 42B).

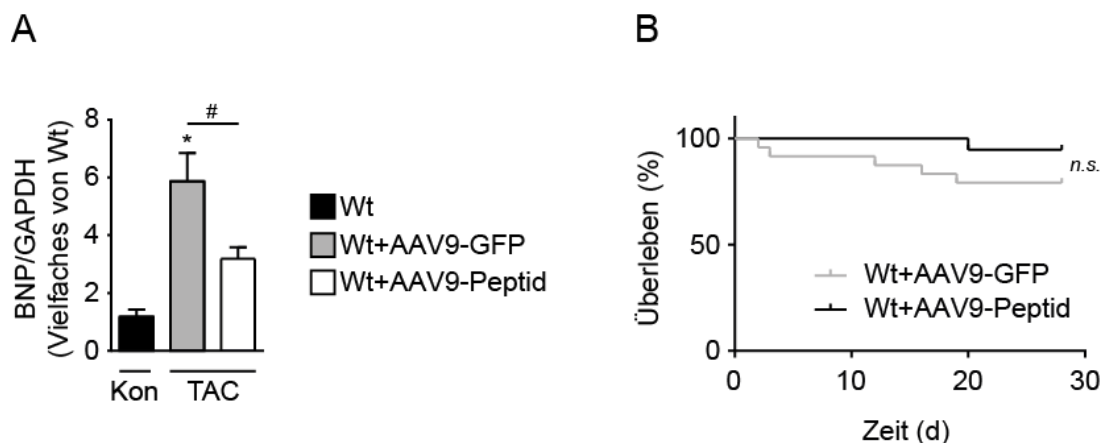


Abbildung 42: Die Therapie mit dem AAV9-Peptid Vektor reduziert die Expression des Herzinsuffizienzmarkers BNP und nimmt keinen negativen Einfluss auf die Mortalität der Mäuse

Abbildung A: Die BNP mRNA-Expressionslevel von Herzen wildtypischer C57Bl/6J-Mäuse (Wt) ohne Behandlung (Kontrolle, kurz: Kon) und solchen, bei denen eine vierwöchige Aortenligatur inklusive Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) durchgeführt wurde wurden mithilfe RT-PCR bestimmt. $n \geq 7$ Tiere. *, $P < 0,05$ zu Wt (Kon), #, $P < 0,05$ zu Wt+AAV9-GFP (TAC), Mittelwert \pm S.E.M. Abbildung B: Kaplan-Meier-Kurven TAC-operierter C57Bl/6J-Mäuse. Zusätzlich wurde den Mäusen nach der Operation entweder AAV9-GFP oder AAV9-Peptid in die Schwanzvene injiziert. $n \geq 19$.

Um den mechanistischen Hintergrund dieser *in vivo*-Beobachtungen zu klären, wurden Lysate von Mausherzen dieses Gentherapieversuchs mittels *Western Blot* im Hinblick auf die einzelnen Phosphorylierungsstadien von ERK und der Aktivierung nukleärer und zytosolischer ERK-Zielproteine untersucht.

Wie schon in neonatalen Kardiomyozyten gezeigt werden konnte, nahm das Peptid im Herzen keinen Einfluss auf die TEY-Phosphorylierung von ERK, welche für die Aktivierung der Kinase notwendig ist (Abbildung 43A, B). Nach TAC und Verabreichung des Peptid-Vektors konnte ERK trotzdem noch genauso aktiviert werden wie in den Herzen von operierten, kontrollbehandelten Mäusen. Betrachtet man allerdings den Phosphorylierungsstatus an Threonin 188, ist zu erkennen, dass in Herzen von Mäusen, welche das AAV9-Peptid Konstrukt verabreicht bekamen, diese Autophosphorylierung nach TAC zu einem deutlich geringeren Maß auftrat als in den Herzen von Tieren mit dem Kontrollvektor (Abbildung 43A, C).

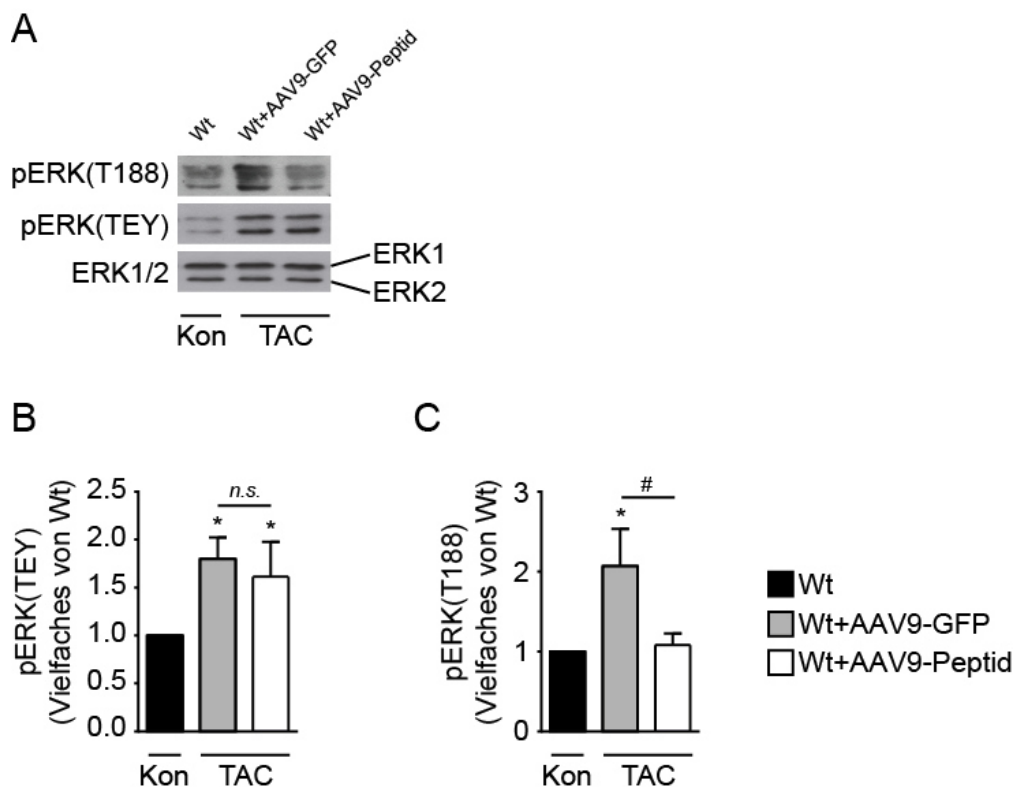


Abbildung 43: In Herzen wird die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung durch das AA9-Peptid Konstrukt verringert ohne die normale TEY-Aktivierung zu beeinflussen

Wildtypische (Wt) C57Bl/6J-Mäuse (Kontrolle, kurz: Kon) und solche, bei denen eine vierwöchige Aortenligatur (TAC) inklusive Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP) durchgeführt wurde, wurden die Herzen entnommen und lysiert. Danach wurden die Expression von ERK1/2 sowie deren Phosphorylierungsstadien mittels *Western Blot* untersucht. Abbildung A: Repräsentative *Western Blot*-Analyse dieser Herzlysate. Detektiert wurden ERK1/2 (ERK1: 44kDa, ERK2: 42kDa), pERK1/2(TEY) und pERK(T188). Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pERK(TEY)- und pERK(T188)-Blots normiert gegen Wt (Kon) unstimuliert. n≥5 unabhängige Experimente. *, $P < 0,05$ zu Wt (Kon), #, $P < 0,05$ zu Wt+AAV9-GFP (TAC), n.s. nicht signifikant, Mittelwert \pm S.E.M.

Nun stellte sich die Frage, was die verminderte ERK^{Thr188}-Phosphorylierung für die Aktivierung verschiedener Substrate von ERK in den Herzen der Mäuse aus dem Gentherapiemodell bedeutete. Dazu wurden wieder die Phosphorylierungen hypertroph sowie anti-apoptotisch wirkender Zielproteine von ERK mithilfe von *Western Blot* Untersuchungen analysiert. Als nukleäres Substrat wurde, wie schon zuvor, Elk-1 betrachtet, als anti-apoptotisches Zielprotein in diesem Versuchsansatz p90RSK.

Die Mitglieder der RSK-Familie sind eine Gruppe stark verwandter Serin-/Threonin-Kinasen und vermitteln diverse Effekte wie Zellwachstum, Proliferation und Zellüberleben. Sie werden direkt von ERK1/2 aufgrund diverser Stimuli aktiviert (Romeo *et al.*, 2012). Die Phosphorylierung durch ERK führt dazu, dass p90RSK das pro-apoptotische Bad phosphoryliert und so dessen Interaktion mit dem anti-apoptotischen Bcl-2 verhindert wird, wodurch die Weiterleitung des Apoptosesignals gestoppt wird (Shimamura *et al.*, 2000).

Wie in Abbildung 44 dargestellt ist, führte die Therapie mit dem AAV9-Peptid Konstrukt nach TAC zu einer mit der Gabe des Kontrollvektors vergleichbaren Aktivierung von p90RSK in Herzen (Abbildung 44A, B). Bei der Untersuchung des nukleären, hypertrophen Substrates Elk-1 war allerdings zu erkennen, wie inhibitorisch das Peptid auf dessen Aktivierung wirkte (Abbildung 44A, C). Die Herzen der Mäuse, welche nach der TAC-Operation den Peptid-Vektor bekamen, wiesen eine signifikant geringere Phosphorylierung von Elk-1 auf.

Zusammenfassend konnten mit dem Modell der Gentherapie einer TAC-induzierten pathologischen Hypertrophie die vorherigen Ergebnisse aus den Versuchen mit der monomeren ERK-Mutante und mit dem Peptid in NRCMs weiter bekräftigt werden. Die Gentherapie mit dem AAV9-Peptid-Vektor ermöglichte eine Reduktion der pathologischen Hypertrophie sowie eine Verbesserung aller Parameter, welche mit kardialer Funktion und kardialem *Remodeling* in Verbindung stehen. Mechanistisch gesehen griff das AAV9-Peptid-Konstrukt in die nukleäre, also hypertrophe, Signalweiterleitung von ERK1/2 ein, indem die Autophosphorylierung von ERK an Threonin 188 verhindert wurde. Dabei blieb die normale Kinaseaktivität von ERK unbeeinflusst, daher konnte die anti-apoptotische Signalweiterleitung von ERK im Herzen weiter funktionieren.

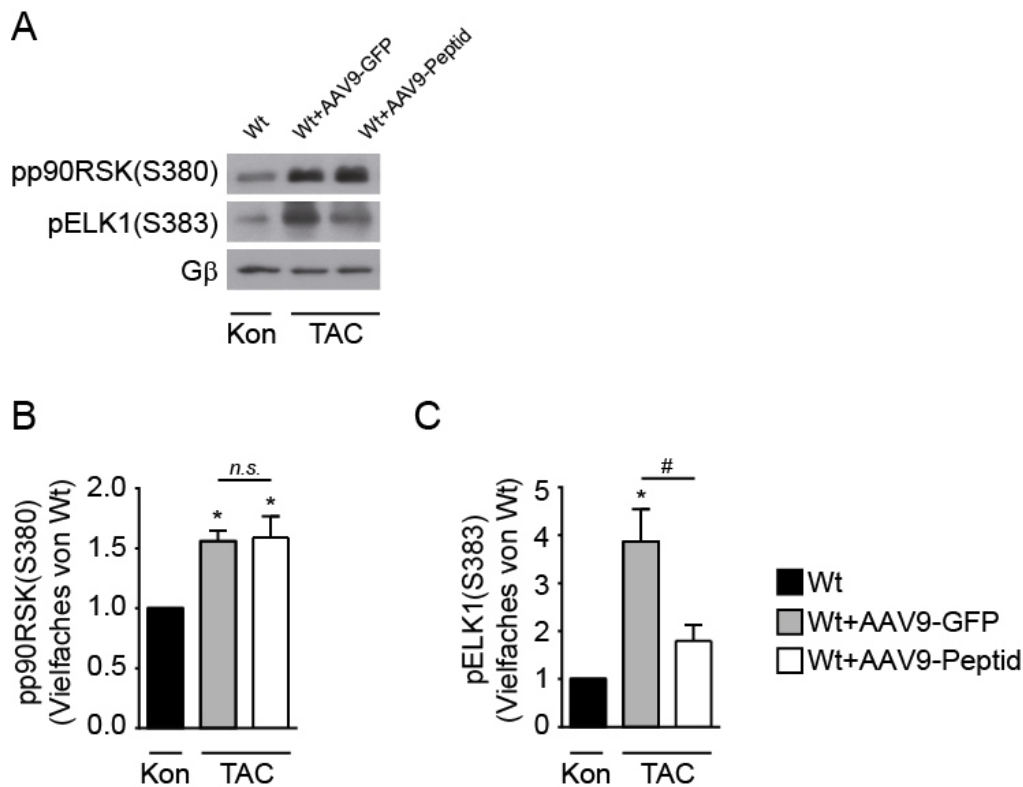


Abbildung 44: Die Aktivierung anti-apoptotischer ERK-Zielproteine bleibt durch den AAV9-Peptid Vektor unbeeinflusst, wohingegen nukleäre ERK-Substrate vermindert aktiviert werden

Wildtypische (Wt) C57Bl/6J-Mäuse (Kontrolle, kurz: Kon) und Tiere mit einer vierwöchigen Aortenligatur (TAC) inklusive Injektion des jeweiligen AAV9-Vektors (Wt+AAV9-Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, kurz: Peptid oder Wt+AAV9-GFP), wurden die Herzen entnommen und lysiert. Danach wurden die Phosphorylierungen von p90RSK an Ser380 und Elk-1 an Ser383 mittels *Western Blot* untersucht. Abbildung A: repräsentative Immunoblots für pp90RSK (83kDa) und pElk-1 (45kDa). Als Ladekontrolle diente G β (36kDa). Abbildung B/C: quantitative Auswertung der pp90RSK/pElk-1-Immunoblots, normiert gegen Wt (Kon). $n \geq 6$ unabhängige Experimente. *, $P < 0,05$ zu Wt (Kon), #, $P < 0,05$ zu Wt+AAV9-GFP (TAC), n.s. nicht signifikant, Mittelwert \pm S.E.M.

4.8 Das Peptid als potenter Inhibitor der von MAPK-Signalwegen geleiteten Tumorzellproliferation

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg erhielt bisher therapeutisch betrachtet die meiste Aufmerksamkeit in der Behandlung von Krebserkrankungen, da fast 50% aller bösartigen Tumore eine Dysregulation in dieser Signalkaskade aufweisen (Matallanas und Crespo, 2010). Dies weckte schon in der Vergangenheit großes Interesse in Wissenschaft und Industrie und führte zur Entwicklung einer Reihe von Raf- und MEK-Inhibitoren welche bereits auf dem Markt erhältlich sind (siehe Abschnitt 1.2.1).

Mitentscheidend für die große Bedeutung dieses Signalwegs in der Tumorentstehung und -progression ist die nukleäre Translokation von ERK1/2, welche eine entscheidende Voraussetzung für die Induktion der Zellproliferation darstellt (Formstecher *et al.*, 2001). Dabei kann eine Vermeidung der nukleären Translokation von ERK1/2 effektiv die Proliferation ERK-abhängiger Tumorzellen hemmen (Plotnikov *et al.*, 2015).

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass das Peptid über eine Hemmung der ERK1/2-Dimerisierung auch deren nukleäre Translokation unterbindet. Daher sollten im Folgenden dessen Effekte auf die Proliferation von Krebszellen getestet werden. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Krebszelllinien aus kolorektalen Adenokarzinomen für die Analysen herangezogen. Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist von außerordentlicher Bedeutung in der Therapie kolorektaler Karzinome, da diese Tumore eine Prävalenz von 33-59% für K-Ras Mutationen und 8-12,6% für B-Raf Mutationen aufweisen (Röcken, 2008). Die verwendeten Krebszelllinien Colo320, LS174T und HT29 wurden so gewählt, dass unter ihnen sowohl beide als auch keine Mutationen vertreten waren (Ahmed *et al.*, 2013). Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Zelllinien und ihren jeweiligen Mutationsstatus.

Tabelle 5: Kolorektale Adenokarzinomzelllinien und deren jeweiliger Mutationsstatus

Zelllinie	K-Ras-Mutation	B-Raf-Mutation
Colo320	wt	wt
LS174T	G12D	wt
HT29	wt	V600E

Zunächst wurde die Effizienz der adenoviralen Transduktion des Peptids im Vergleich zum Kontrollvirus, welches für LacZ kodiert, in diesen Krebszelllinien getestet. In Abbildung 45 ist dargestellt, wie die Verwendung des adenoviralen Peptid-Konstruktes zu einer deutlichen mRNA-Expression des Myc-Peptids in den jeweiligen Zelllinien führte.

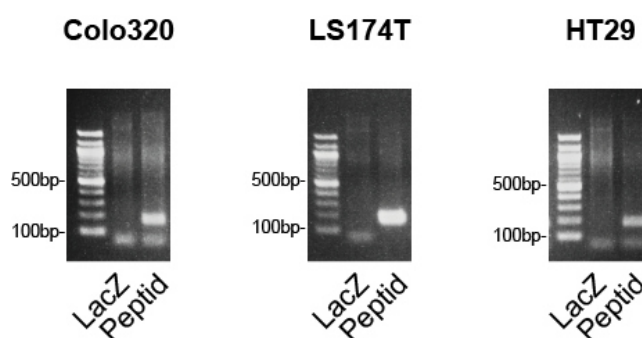


Abbildung 45: RNA-Expressionskontrolle des Peptids in verschiedenen Krebszelllinien

Repräsentative Aufnahmen von PCR-Analysen von cDNA aus den Krebszelllinien Colo320, LS174T und HT29. Die Zellen wurden entweder mit LacZ oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transient transduziert und anschließend die mRNA aus ihnen extrahiert. Die mRNA wurde dann in cDNA umgeschrieben und damit eine PCR mit Primern, welche das Myc-Peptid erkennen, angesetzt. $n \geq 3$.

Um die Proliferationsrate der Krebszelllinien bestimmen zu können, wurde der [³H]-Thymidin-Einbau mit ihnen durchgeführt. Da das mit Tritium radioaktiv markierte Nukleosid Thymidin während der S-

Phase in Zellen eingebaut wird, können über das Maß an radioaktiver Strahlung indirekt Rückschlüsse auf die Proliferationsrate von Zellen gezogen werden (Rajewsky, 1966).

Dabei wurde der Einfluss des Peptids auf die Proliferation der Krebszellen im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen, zum MEK-Inhibitor PD98059 und zum EGF-Rezeptor Antagonist Cetuximab untersucht (Abbildung 46).

Interessanterweise war Cetuximab in dieser Versuchsreihe nicht in der Lage die Proliferationsraten der unterschiedlichen Krebszelllinien zu beeinflussen. Dies könnte möglicherweise erklären, warum der Antikörper bei kolorektalen Karzinomen selten in einer Monotherapie angewandt wird. Außerdem decken sich diese Beobachtungen mit dem Befund, dass Cetuximab eine geringe bis keine Wirksamkeit in Patienten aufweist, wenn deren kolorektale Tumore eine K-Ras-Mutation beinhalten (Lievre *et al.*, 2008).

Neben Cetuximab konnte der MEK-Inhibitor PD98059 bei LS174T- und HT29-Zellen, also die Zelllinien, welche aktivierende Mutationen für den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg beinhalten, zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsraten führen (Abbildung 46). Allerdings reichte dessen inhibitorische Wirkung nicht für die wildtypische Zelllinie Colo320 aus. Hier hatte PD98059 keinen Effekt.

Im Kontrast zu Cetuximab und PD98059 zeigte das Peptid die markantesten Auswirkungen auf die Proliferation der Krebszellen. Ungeachtet des Mutationsstatus war das Peptid in der Lage bei allen drei Zelllinien die Proliferation um mindestens 50% zu reduzieren. Dies war nicht nur im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollbedingung deutlich geringer, sondern auch gegenüber den Zellen, welche mit PD98059 oder Cetuximab behandelt wurden. Das Peptid ist demnach imstande effektiv die Proliferation von Krebszellen zu verhindern und das sogar besser als PD98059 oder das in der Therapie angewandte Cetuximab. Außerdem scheint der Mutationsstatus der ERK-Kaskade für das Peptid keine Rolle zu spielen.

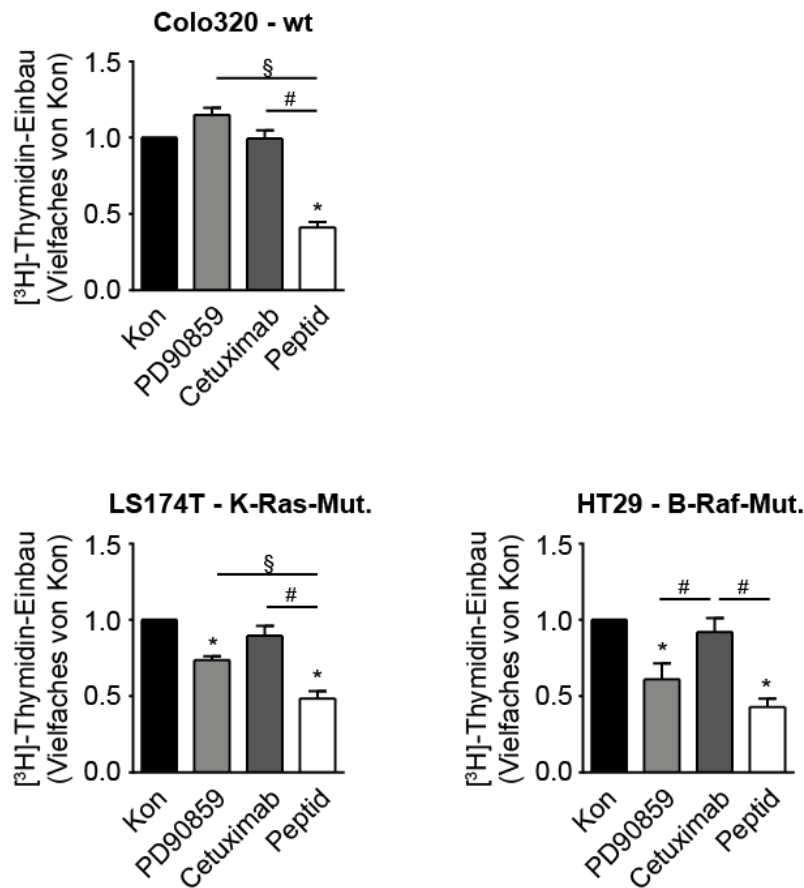


Abbildung 46: Proliferationsraten der drei Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen

Colo320-, LS174T- und HT29- Zellen wurden entweder mit LacZ (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transient transduziert und zusätzlich mit PD98059 (30µM, 24h) oder Cetuximab (0,2µg/µl, 24h) behandelt. Anschließend wurde [³H]-Thymidin in das Zellmedium dazugegeben und dessen Einbau in den Zellkern mithilfe eines β-Zählers gemessen. Die erhaltenen Werte wurden gegen die LacZ-Kontrolle (Kon) der jeweiligen Zelllinie normiert. n=7 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu Kon, #, P<0,05 zu Cetuximab, §, P<0,05 zu PD98059, Mittelwert ±S.E.M.

Um zu klären, ob diese Beobachtungen auf eine verminderte ERK-Aktivität aufgrund geringerer Phosphorylierung am TEY-Motiv zurückzuführen waren, wurde das Maß der ERK(TEY)-Phosphorylierung in diesen Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen mittels *Western Blot* untersucht (Abbildung 47).

Bei der Betrachtung der Auswertung für die Zelllinie Colo320 (wildtypisch) wird deutlich, dass obwohl das Peptid, wie zuvor gezeigt, die Proliferation dieser Zellen verminderte, dies nicht an einer reduzierten Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv lag. Zwischen den einzelnen Bedingungen ist kein Unterschied auszumachen. Im Einklang mit den Proliferationsversuchen nahmen PD98059 und Cetuximab auch keinen Einfluss auf die ERK-Aktivierung in Colo320-Zellen.

In LS174T-Zellen (K-Ras-Mutation) beeinträchtigte das Peptid genauso wenig die Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv trotz seiner inhibitorischen Wirkung auf die Proliferation dieser Zellen (Abbildung 47). Dahingegen führte der MEK-Inhibitor PD98059 zu einer Reduktion der ERK-Aktivierung, was aufgrund der bisherigen Versuchsreihen zu erwarten war. Interessanterweise hatte Cetuximab

zwar keinen Einfluss auf die Proliferationsrate dieser Zellen, führte aber verglichen mit der Kontrollbedingung zu einer signifikant verringerten ERK-Phosphorylierung am TEY-Motiv.

Passend zu den Proliferationsdaten führte PD98059 in HT29-Zellen (B-Raf-Mutation) auch zu einer Reduktion der ERK(TEY)-Phosphorylierung. Cetuximab hatte, wie zuvor schon bei der Proliferation, auch keinen Effekt auf die Phosphorylierung von ERK. Darüber hinaus zeigte das Peptid keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK in HT29-Zellen, obwohl es überaus effektiv deren Proliferationsrate senken konnte.

Zusammenfassend zeigen die Versuche zum Ausmaß der ERK-Phosphorylierung am TEY-Motiv, dass PD98059 durch eine Hemmung der ERK-Aktivität die Proliferation K-Ras- und B-Raf-mutierter Zellen verringert. Demgegenüber inhibiert das Peptid die Proliferationsraten sowohl wildtypischer als auch mutierter Zelllinien, ohne Einfluss auf die normale ERK-Phosphorylierung zu nehmen. Cetuximab hat trotz der reduzierten ERK-Phosphorylierung in LS174T-Zellen keinerlei Auswirkungen auf die Proliferation der verwendeten Krebszelllinien.

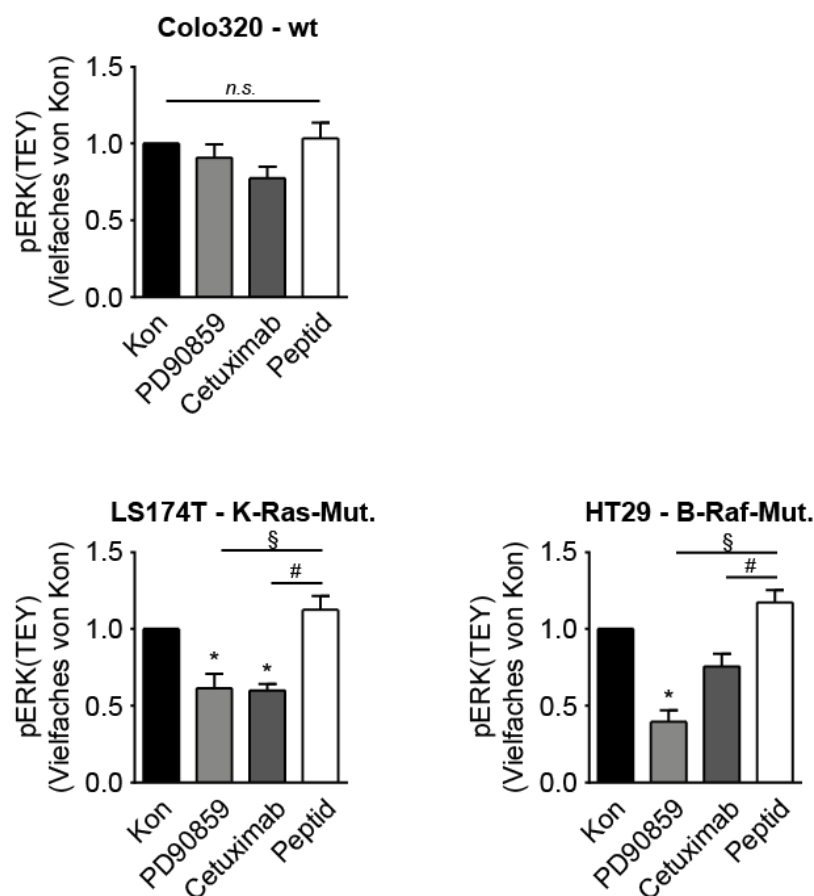


Abbildung 47: Die ERK(TEY)-Phosphorylierung der Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen

Colo320-, LS174T- und HT29- Zellen wurden entweder mit LacZ (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transient transduziert und zusätzlich mit PD98059 (30µM, 24h) oder Cetuximab (0,2µg/µl, 24h) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungsstatus von ERK am TEY-Motiv mithilfe eines phosphospezifischen Antikörpers im *Western Blot* untersucht. Die bei quantitativen Auswertung erhaltenen Werte wurden gegen die LacZ-Kontrolle (Kon) der jeweiligen Zelllinie normiert. n≥7 unabhängige Experimente. *, P<0,05 zu Kon, #, P<0,05 zu Cetuximab, §, P<0,05 zu PD98059, n.s. nicht signifikant Mittelwert ±S.E.M.

Weiterhin ist auch das Zellüberleben ein elementares Thema in der Tumorthherapie, da eine der entscheidenden negativen Eigenschaften von Tumorzellen das Versagen des induzierten Zelltodes ist. Es war daher von großem Interesse herauszufinden, wie sich die in diesen Versuchsreihen verwendeten Substanzen auf die Apoptose der drei untersuchten Krebszelllinien auswirken.

Zu diesem Zweck wurden TUNEL-Analysen durchgeführt und die Effekte des MEK-Inhibitors PD98059, des monoklonalen Antikörpers Cetuximab und des Peptids gegenüber einer Kontrollbehandlung und miteinander verglichen (Abbildung 48).

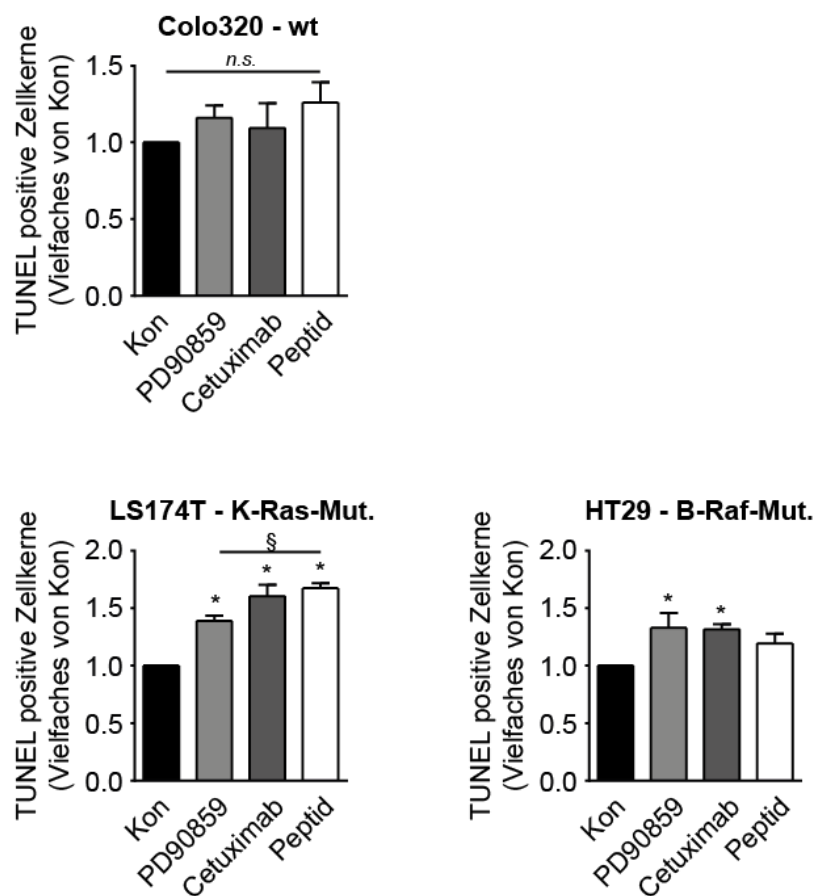


Abbildung 48: Die Apoptoserate der drei Krebszelllinien unter verschiedenen Bedingungen

Colo320-, LS174T- und HT29- Zellen wurden entweder mit LacZ (Kontrolle, kurz: Kon) oder Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (kurz: Peptid) transient transduziert und zusätzlich mit PD98059 (30µM, 24h) oder Cetuximab (0,2µg/µl, 24h) behandelt. Anschließend wurde DNA-Fragmentierung durch Apoptose mithilfe der TUNEL-Methode visualisiert und quantifiziert. Die bei der quantitativen Auswertung erhaltenen Werte wurden gegen die LacZ-Kontrolle (Kon) der jeweiligen Zelllinie normiert. n≥4 unabhängige Experimente (≥100 Zellen je Bedingung und Experiment), *, P<0,05 zu Kon, #, P<0,05 zu Cetuximab, §, P<0,05 zu PD98059, n.s. nicht signifikant Mittelwert ±S.E.M.

Bei der Zelllinie Colo320, welche keine aktivierende Mutation in der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade trägt, hatte keine der verwendeten Substanzen Auswirkungen auf die Apoptoserate der Krebszellen im Vergleich zur Kontrolle.

Demgegenüber waren bei den LS174T-Zellen (K-Ras-Mutation) verglichen mit der Kontrollbedingung alle Substanzen in der Lage Apoptose auszulösen. Erstaunlicherweise induzierte das Peptid sogar signifikant mehr Apoptose als PD98059.

Obwohl Cetuximab bisher in HT29-Zellen (B-Raf-Mutation) keinerlei Effekte bezüglich Proliferation und ERK-Phosphorylierung hatte, wies es nun bei der Betrachtung der Apoptoserate eine signifikante Steigerung dieser auf. Genauso konnte auch PD98059 in diesen Zellen Apoptose im Vergleich zur Kontrolle induzieren. Das Peptid hatte hier keinen Einfluss (Abbildung 48).

4.9 Die Auswirkungen von Cetuximab auf die ERK(TEY)-Phosphorylierung und das Zellüberleben in NRCMs

Das Therapieschema bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen hat in den vergangenen Dekaden einen starken Umschwung erfahren. Mit Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen (EGFR, VEGFR), wie beispielsweise Cetuximab, wurde eine neue Klasse von Therapeutika entwickelt, welche einen Zusatznutzen zur bisherigen Behandlung leistet (Tol und Punt, 2010). Das Ziel einer gerichteten Therapie mit solchen Inhibitoren ist eine verbesserte Wirkung gegen Tumore mit weniger Nebenwirkungen als traditionelle Krebstherapeutika. Dennoch berichten diverse Studien von unerwarteten Nebenwirkungen solcher zielgerichteter Substanzen, einschließlich linksventrikulärer Dysfunktion und Herzinsuffizienz (Chu *et al.*, 2007; Kerkela *et al.*, 2006; Slamon *et al.*, 2001).

Um den Aspekt der Kardiotoxizität von Tyrosinkinase-Inhibitoren in dieser Arbeit zu untersuchen wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit Cetuximab inkubiert und anschließend deren Apoptoserate sowie ERK(TEY)-Phosphorylierung untersucht (Abbildung 49).



Abbildung 49: Cetuximab erhöht die Apoptose in NRCMs aufgrund einer verringerten ERK-Aktivierung

NRCMs wurden mit Cetuximab (0,2µg/µl) oder einfachem Maus-Immunglobulin G (IgG, 0,016µg/µl) als Kontrolle (kurz: Kon) für 24 Stunden inkubiert. Abbildung A: Bestimmung der DNA-Fragmentierung aufgrund von Apoptose mithilfe der TUNEL-Methode. n=6 unabhängige Experimente (≥100 Zellen je Bedingung und Experiment). *, $P < 0,05$ zu Kon, Mittelwert \pm S.E.M. Graph B/C: Lysate dieser Zellen wurden mittels *Western Blot* aufgetrennt und nach ERK1/2 und pERK1/2(TEY) detektiert. Gβ diente als Ladekontrolle. Abbildung B zeigt jeweils repräsentative Immunoblots (ERK1/pERK1: 44kDa, ERK2/pERK2: 42kDa, Gβ: 36kDa) und Abbildung C die quantitative Auswertung von pERK(TEY) normiert gegen Kon. n=9 unabhängige Experimente. Kon=Kontrolle, *, $P < 0,05$ zu Kon, Mittelwert \pm S.E.M.

In Abbildung 49A ist zu erkennen, wie deutlich Cetuximab in NRCMs die Apoptoserate im Vergleich zu einem Kontroll-Immunglobulin G (IgG) signifikant steigerte. Um herauszufinden, ob dieser Effekt zum Teil durch eine Beeinflussung der ERK-Kaskade ausgelöst wird, wurde das Maß der ERK(TEY)-Phosphorylierung in NRCMs nach Inkubation mit Cetuximab untersucht. Tatsächlich ist anhand der repräsentativen Immunoblots und der quantitativen Auswertung zu erkennen, dass Cetuximab in Kardiomyozyten die normale ERK-Aktivierung vermindert (Abbildung 49B, C).

5 Diskussion

5.1 Die Hemmung der ERK-Aktivität als zweischneidiges Schwert in Bezug auf pathologische kardiale Hypertrophie

Die primäre Reaktion des Herzens auf eine gesteigerte Arbeitslast, um dem Verlust der Herzfunktion entgegenzuwirken, ist das Wachstum von Kardiomyozyten. Dies reduziert die Wandspannung im Ventrikel und kompensiert damit die gesteigerte hämodynamische Belastung (Hill und Olson, 2008). Es sind diverse Trigger bekannt, welche kardiale Hypertrophie initiieren können. Allerdings entscheidet die Art des Stimulus über einen adaptiven oder maladaptiven Ausgang des hypertrophen Wachstums. Während postnatales Wachstum des Herzens, Schwangerschaft und Sport eine physiologische Form der Hypertrophie induzieren, führen krankheitsbezogene Reize, wie beispielsweise hervorgerufen durch Hypertonie, Aortenklappenstenose oder Myokardinfarkt, zu der Entstehung pathologischer Hypertrophie (Bernardo *et al.*, 2010). Im Gegensatz zum physiologischen Wachstum des Herzens ist die pathologische Hypertrophie gekennzeichnet durch intensives kardiales *Remodeling*, welches mitunter die Akkumulation von interstitiellem Kollagen und einen Anstieg des Zellto-des beinhaltet. Dabei sind all diese Prozesse zusammengenommen starke Risikofaktoren für das Auftreten von Arrhythmien und kardiovaskulären Ereignissen (Kang, 2006).

Eine weit verbreitete Hypothese war, dass hypertrophes Wachstum von Kardiomyozyten aufgrund pathologischer Umstände ein unabdingbarer kompensatorischer Mechanismus zur Beibehaltung der Herzfunktion sei, um dem Entstehen einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken (Grossman *et al.*, 1975). Allerdings konnte die Zunahme der linksventrikulären Masse aufgrund pathologischer Bedingungen mit einem Anstieg an Morbidität und Mortalität assoziiert werden. So existieren immer mehr Belege dafür, dass die Inhibition von hypertrophem Wachstum die Entstehung einer kardialen Dysfunktion verhindert (Esposito *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 1990; Schiattarella und Hill, 2015). Somit wäre das therapeutische Eingreifen in pathologische kardiale Hypertrophie von großem Vorteil und das Finden neuer Zielstrukturen diesbezüglich von außerordentlicher Bedeutung. Dabei ist es eine besonders anspruchsvolle Aufgabe, spezielle Merkmale in pathologisch hypertrophen Signalwegen zu identifizieren, welche es erlauben, spezifisch maladaptive Mechanismen zu unterbinden.

Es existieren zahlreiche Signalmechanismen, welche die hypertrophe Gentranskription beeinflussen (siehe Abschnitt 1.1.2). Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade ein. Viele Studien belegen die Beteiligung der einzelnen Komponenten dieser MAPK-Kaskade beim Vorantreiben des hypertrophen Wachstums (Bueno *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1995; Lorenz *et al.*, 2009a; Rapacciuolo *et al.*, 2001; Ruppert *et al.*, 2013; Sanna *et al.*, 2005). Daher wird die Raf/MEK/ERK-Kaskade schon seit längerer Zeit als mögliches therapeutisches Ziel zur Behandlung einer pathologischen kardialen Hypertrophie diskutiert.

Damit einhergehend und in Übereinstimmung mit anderen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit unter Zuhilfenahme des MEK1/2-Inhibitors PD98059 die Relevanz der ERK1/2-Aktivierung für das hypertrophe Wachstum von Kardiomyozyten belegt werden (Kodama *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2000; Ruppert *et al.*, 2013). Die Hemmung der katalytischen ERK1/2-Aktivierung durch den pharmakologischen Inhibitor PD98059 führte zu einer signifikanten Reduktion der hypertrophen Antwort von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCMs) auf den Stimulus Phenylephrin (PE) (Abbildung 14A, B).

Demgegenüber wird in der Fachliteratur ebenso auf eine protektive Rolle des MEK-ERK-Signalwegs in Kardiomyozyten, bezogen auf das Zellüberleben, hingewiesen. Eine Stimulation der Raf/MEK/ERK-Kaskade bewirkt eine Reduktion der Apoptoserate von Kardiomyozyten resultierend aus einer gesteigerten ERK-Aktivität (De Windt *et al.*, 2000; Parrizas *et al.*, 1997; Ruppert *et al.*, 2013; Sheng *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1999). Die Untersuchungen zur Apoptose von NRCMs in dieser Arbeit bestätigen vorausgehende Literaturdaten. Die Inkubation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 führte nicht nur zu einem verminderten hypertrophen Wachstum, sondern auch zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Kardiomyozyten (Abbildung 14). Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Studien, in denen ebenso eine Induktion des apoptotischen Zelltodes nach Hemmung der ERK-Aktivität durch den pharmakologischen Inhibitor PD98059 in Kardiomyozyten beobachtet wurde (Ruppert *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 1999).

Soll nun die ERK-vermittelte pathologische kardiale Hypertrophie therapeutisch unterbunden werden, so steht man vor der großen Herausforderung, mit einer reduzierten ERK1/2-Aktivität neben der effektiven Hemmung des hypertrophen Wachstums gleichzeitig einen Verlust an Kardiomyozyten aufgrund von apoptotischem Zelltod herbeizuführen. Die Inhibition der kompletten ERK1/2-Aktivität ist somit schädlich und kann keinesfalls das Ziel einer gerichteten Therapie kardialer Hypertrophie darstellen.

5.2 Die ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung als Trigger für nukleäre ERK-Effekte

Eine Möglichkeit zur Lösung des Problems, ERK-vermitteltes hypertrophes Wachstum zu unterbinden ohne dabei apoptotischen Zelltod in Kardiomyozyten auszulösen, liefert die Studie von Lorenz *et al.*

Darin wird eine neuartige regulatorische Autophosphorylierungsstelle von ERK2 an der Position Threonin 188 (Thr208 in murinem ERK1) beschrieben, welche die MAPKs dazu leitet nukleäre ERK-Substrate, welche dafür bekannt sind kardiale Hypertrophie zu vermitteln, zu phosphorylieren (Lorenz *et al.*, 2009a). Die Autophosphorylierung an Thr188 ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ursächlich für das Entstehen kardialer Hypertrophie, indem ERK durch die Phosphorylierung an dieser Stelle in den Nukleus dirigiert wird und dort hypertrophe Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, aktiviert. Es ist daher nicht verwunderlich, dass nur hypertrophe Stimuli zu der Autophosphorylierung an Thr188

führen und nicht-hypertrophe Stimulanzen diese nicht verursachen. Dabei beeinflusste die Autophosphorylierungsstelle in dieser Studie nicht die Kinaseaktivität von ERK1/2, was essentiell für ihre protektive Rolle im Herzen ist. Im Gegenteil trat sie tatsächlich nur auf, wenn ERK1/2 im TEY-Motiv phosphoryliert und somit als aktive Kinasen vorlagen. Die vorliegende Arbeit konnte diese Beobachtungen weiter bekräftigen. Trotz einer Interferenz mit der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung konnte die Erhaltung der Kinaseaktivität von ERK belegt werden (Abbildung 28). Eine weitere Studie, in der ERK2 aus Bakterien isoliert wurde, konnte das Auftreten der Autophosphorylierung an Threonin 188 unter gewissen Umständen genauso beobachten (McReynolds *et al.*, 2016). Allerdings führten Mutationen an dieser Position in diesem Fall zu einem Verlust der Aktivität des Enzyms gegenüber einigen Substraten, was sich auch mit einer weiteren Studie deckt, in welcher der Bereich der Aktivierungsschleife in der ERK-Struktur untersucht wurde (Emrick *et al.*, 2006; McReynolds *et al.*, 2016). Es kann somit sein, dass ERK2 aufgrund der Phosphorylierung an Thr188 die Fähigkeit erlangt nur gewisse Substrate zu phosphorylieren. Dies würde die tragende Rolle dieser Autophosphorylierung speziell bei der Entstehung pathologischer kardialer Hypertrophie und der Aktivierung der damit verbundenen Substrate/Transkriptionsfaktoren erklären.

Das Auftreten der Autophosphorylierung von ERK an Threonin 188 bedarf indes eines bestimmten Mechanismus, welcher auch einige Protein-Interaktionen beinhaltet (Lorenz *et al.*, 2009a; Vidal *et al.*, 2012). Zunächst ist die Stimulation der Raf/MEK/ERK-Kaskade über G_q- bzw. G_s-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen erforderlich. Die Aktivierung der Kaskade bewirkt die duale Phosphorylierung von ERK1/2 durch MEK1/2 am TEY-Motiv. Aktivierte ERK1/2 dimerisieren anschließend, was die Interaktion mit freien Gβγ-Untereinheiten ermöglicht. Die Vereinigung all dieser signalbezogenen Ereignisse führt letztendlich zur ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung (Lorenz *et al.*, 2009a).

Im Vergleich zu den Phosphorylierungen am TEY-Motiv ist die Autophosphorylierung von langanhaltender Natur (Lorenz *et al.*, 2009a), was nahelegt, dass sie gewissermaßen resistent gegenüber einer Dephosphorylierung durch Phosphatasen ist. Diese Hypothese muss zwar noch durch gezielte Versuche validiert werden, würde aber mit der Rolle, welche die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung in kardialer Hypertrophie spielt, übereinstimmen.

Tatsächlich ist die räumliche und zeitliche Regulation der Signalweiterleitung von ERK1/2 ein ausschlaggebender Faktor zur spezifischen Steuerung der vielfältigen biologischen Funktionen, welche diese Kinasen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli innehaben (siehe Abschnitt 1.2.4.2). Die Translokation von aktivierten ERK1/2 in den Nukleus ist dabei essentiell für eine Wachstumsfaktor-induzierte Genexpression, beispielsweise eingeleitet über eine Aktivierung von Elk-1, und den Wiedereintritt in den Zellzyklus (Brunet *et al.*, 1999; Pouyssegur *et al.*, 2002).

Nach Aktivierung translozieren ERK1/2 bekanntermaßen in den Nukleus, wobei ungefähr die Hälfte von endogenem ERK2 im Zytoplasma verweilt, da es dort u.a. an zytoplasmatische Anker assoziiert ist (Chen *et al.*, 1992; Reszka *et al.*, 1995). Weiterhin belegen diverse Studien die Akkumulation einer phosphomimetischen ERK^{Thr188}-Mutante, ERK^{T188D}, nach Stimulation im Nukleus. Bei dieser Mutante

wurde das Threonin an Position 188 gegen Asparaginsäure ausgetauscht, welche wie ein Phosphatrest negativ geladen vorliegt. Demgegenüber akkumulierten phosphorylierungsdefiziente Mutanten, wie ERK^{T188S} oder ERK^{T188A}, nach Stimulation nicht im Zellkern (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Somit wurde mit der Autophosphorylierungsstelle an Threonin 188 ein Trigger für die Lokalisation von ERK1/2 im Zellkern identifiziert. Bis jetzt ist allerdings immer noch unklar über welchen Mechanismus diese Autophosphorylierung die nukleäre Akkumulation begünstigt. Entweder fördert sie die Retention von ERK1/2 im Nukleus, oder sie erleichtert die nukleäre Translokation der MAPKs.

Untersuchungen mit den phosphomimetischen bzw. phosphodefizienten ERK^{Thr188}-Mutanten bezüglich pathologischer kardialer Hypertrophie belegen, wie überaus relevant diese räumliche und zeitliche Kontrolle der Signalweiterleitung von ERK1/2 für ein klinisches Erscheinungsbild sein kann.

Mithilfe des *in vivo* Mausmodells der TAC konnte der schädliche Einfluss dieser Autophosphorylierung bei der Entwicklung pathologischer kardialer Hypertrophie demonstriert werden. Mäuse, welche die phosphomimetische Mutante ERK^{T188D} kardial überexprimierten entwickelten gegenüber wildtypischen Mäusen oder solchen, die wildtypisches ERK kardial überexprimierten, einen signifikant schwerwiegenderen Phänotypen nach sechswöchiger Aortenligation (Lorenz *et al.*, 2009a). Dies äußerte sich nicht nur in einem gesteigerten hypertrophen Wachstum, sondern auch in einer Verschlechterung anderer Parameter des kardialen *Remodelings*, wie einer erhöhten Fibrose. Dieser pathologische Phänotyp konnte in Mäusen, welche die phosphorylierungsdefizienten Mutanten ERK^{T188S} oder ERK^{T188A} kardial überexprimierten, verhindert werden. Es gelang sogar eine deutliche Verbesserung aller Werte im Vergleich zu wildtypischen und ERK^{T188T}-transgenen Tieren (kardiale Überexpression von wildtypischem ERK2) (Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Außerdem wurde mechanistisch bewiesen, dass die Autophosphorylierung in den Herzen dieser Mäuse die Aktivierung nukleärer Zielproteine von ERK nach TAC begünstigt (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013). Interessanterweise verhinderte die kardiale Überexpression von ERK^{T188A} zwar die Progression einer pathologischen Hypertrophie, beeinflusste allerdings weder die anti-apoptischen Eigenschaften von ERK1/2 noch das physiologische Herzwachstum eines alternden Herzens oder das nach physischem Training (Ruppert *et al.*, 2013).

Zusammenfassend stellt die ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung einen entscheidenden pathologischen Trigger dar, welcher die nukleäre Lokalisation und Signalweiterleitung von ERK1/2 fördert. Die bisherigen Studien legen nahe, dass eine Interferenz mit dieser Phosphorylierung von großem therapeutischen Nutzen sein könnte. Anhand des bisher beschriebenen Mechanismus zum Auftreten der Autophosphorylierung lassen sich zwei Möglichkeiten erkennen, um diese Phosphorylierung zu verhindern. Beide Möglichkeiten zielen auf eine Verhinderung von Protein-Interaktionen. Eine Option liegt in der Inhibition der Dimerisierung von aktiviertem ERK, die andere in der Hemmung der ERK/Gβγ-Interaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde für eine tiefergehende Untersuchung die Hemmung der Dimerisierung und die damit verbundenen Auswirkungen näher analysiert.

5.3 Die Hemmung der ERK-Dimerisierung zur Inhibition pERK(Thr188)-vermittelter Effekte

Oberste Priorität bei der Therapie einer ERK1/2-vermittelten pathologischen kardialen Hypertrophie ist die Beibehaltung der normalen Kinaseaktivität von ERK1/2. Dieses Ziel dient der Vermeidung eines damit einhergehenden Anstiegs der Apoptoserate.

Mit der Autophosphorylierungsstelle an Threonin 188 von ERK wurde ein Mechanismus identifiziert, über dessen Hemmung selektiv nukleäre und somit hypertrophe Effekte von ERK1/2 unterbunden werden können. Die Interferenz mit dieser Phosphorylierungsstelle lässt die MEK1/2-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 am TEY-Motiv unbeeinflusst und erhält dadurch die zytosolische, also unter anderem auch anti-apoptotische Signalweiterleitung von ERK (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013).

Eine der Voraussetzungen für das Zustandekommen dieser Autophosphorylierung ist die Dimerisierung von aktivierten ERK1/2. Unter Verwendung der dimerisierungsdefizienten ERK2-Mutante ERK2^{Δ174-177} (kurz: ERK2-Δ4) konnten Lorenz *et al.* schon beweisen, dass die Verhinderung der Dimerisierung eine reduzierte Bindung von ERK an Gβγ-Untereinheiten und eine verminderte ERK^{Thr188}-Phosphorylierung mit sich führt (Lorenz *et al.*, 2009a). Damit bietet das ERK-ERK Interface eine vielversprechende Zielstruktur, um mit der Autophosphorylierung an Threonin 188 zu interferieren.

5.3.1 Die Relevanz der Dimerisierung und Thr¹⁸⁸-Autophosphorylierung für die Lokalisation von ERK2

Die Dimer-Dissoziationskonstante von phosphoryliertem ERK2 ist mit 7,5nM rund 3000-fach geringer als für unphosphorylierte ($K_D=20\mu\text{M}$) Dimere (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Diese Tatsache legt nahe, dass aktiviertes ERK2 als Dimer in Zellen vorliegt. Außerdem erleichtert die Dimerisierung eines phosphorylierten ERK2 mit einem unphosphorylierten ERK2 dessen Import in den Zellkern. Dies geht einher mit den Beobachtungen in dieser Arbeit. Die dimerisierungsdefiziente ERK2-Mutante ERK2-Δ4 akkumulierte nach Stimulation mit Phenylephrin deutlich geringer im Zellkern als wildtypisches ERK2 (Abbildung 13).

Allgemein ist der Mechanismus der Lokalisation von ERK und dessen Abhängigkeit von extrazellulären, intrazellulären und molekularen Gegebenheiten ein äußerst komplexes Feld.

MEK1/2 sind mitunter die wichtigsten zytoplasmatischen Anker von ERK1/2 und deren nukleäre Exportsequenz ist zum Teil auch für den Export von ERK1/2 aus dem Nukleus zuständig (Adachi *et al.*, 2000). Demgegenüber zeigte sich, dass die Stimulus-induzierte nukleäre Akkumulation von ERK die Synthese von kurzlebigen nukleären Anker benötigt, welche ERK von MEK fernhalten und so die Termination des ERK-Signals im Zellkern fokussieren (Volmat *et al.*, 2001).

Der genaue Mechanismus des Transportes von ERK durch die Poren des Zellkernes ist allerdings noch nicht gänzlich geklärt. ERKs besitzen keine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), daher wurde bezüglich ihrer Translokation schon länger eine Abhängigkeit von anderen Proteinen, die eine solche NLS-Region tragen, vermutet (Brunet *et al.*, 1999). Aber obwohl NLS-abhängige Mechanismen energieabhängig sind, ist bekannt, dass ERKs auch in Abwesenheit einer Energiequelle direkt an FxFG-Sequenzen von Nukleoporinen im Lumen des Kernporenkomplexes binden (Matsubayashi *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2007; Whitehurst *et al.*, 2002). Dabei ist dieser energieunabhängige Transport von ERK über den Kernporenkomplex für unphosphoryliertes und aktiviertes ERK möglich (Yazicioglu *et al.*, 2007).

Neben dem Mechanismus der Translokation von ERK-Monomeren wurde in der Vergangenheit auch der von ERK-Dimeren untersucht. Ausschlaggebend ist hier ein aktiver Transport, welcher den Dimeren den Eintritt in den Kern ermöglicht (Adachi *et al.*, 1999). Die Relevanz der Dimerisierung von ERK1/2 für deren Lokalisation wird in Fachkreisen dennoch stark diskutiert. Obwohl in vielen Arbeiten eine Akkumulation von ERK-Dimeren im Zellkern beschrieben wird, existieren genauso Studien, in denen postuliert wird, dass die Dimerisierung nicht entscheidend für die nukleäre Translokation von ERK1/2 ist (Lidke *et al.*, 2010). Zudem weisen Casar *et al.* auf eine essentielle Rolle von ERK-Dimeren bei der Aktivierung zytosolischer, aber nicht nukleärer ERK-Substrate hin (Casar *et al.*, 2008). Diese kontroversen Beobachtungen legen die Existenz eines weiteren Schrittes bzw. Mechanismus nahe, welcher am Ende ausschlaggebend für den Eintritt von ERK in den Zellkern ist. Die Befunde zur ERK^{Thr188}-Phosphorylierung liefern dazu eine mögliche Erklärung. Die Relevanz dieser Autophosphorylierung für die nukleäre Lokalisation von ERK wurde bereits belegt (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013). Weiterhin untermauern hier nicht gezeigte Lokalisationsversuche mit einer monomeren, Thr¹⁸⁸-phosphomimetischen ERK2-Mutante, dass die Dimerisierung von ERK tatsächlich nicht der finale Trigger für die nukleäre Translokation ist, sondern vielmehr die Autophosphorylierung an Threonin 188. Denn obwohl die monomere Mutante ERK2- $\Delta 4$ nach Stimulation nicht im Zellkern akkumuliert (Abbildung 13), reicht die Einbringung einer einzigen Punktmutation an Position 188 (ERK2 ^{$\Delta 174-177, T188D$} , kurz: ERK2- $\Delta 4D$) um diesen Effekt wieder aufzuheben (Daten nicht gezeigt, Sofia Kramer). Die beobachteten Effekte der monomeren ERK2-Mutante beruhen demnach primär auf einer verminderten ERK^{Thr188}-Phosphorylierung.

5.3.2 Der Einfluss einer Hemmung der ERK-Dimerisierung auf die Entwicklung pathologischer kardialer Hypertrophie

Bei der Überexpression von monomerem ERK2- $\Delta 4$ zeigte sich sowohl in NRCMs als auch *in vivo* in Mäusen eine inhibitorische Wirkung dieser Mutante auf das hypertrophe Wachstum nach Stimulation mit Phenylephrin oder sechswöchiger Aortenligation (TAC) (Abbildung 15, Abbildung 18, Tabelle 2). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen von Glennon *et al.* Mithilfe von *antisense* Oligo-

nukleotiden demonstrierten sie die Relevanz der ERK-Signalweiterleitung für eine effektive Phenylephrin-induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten (Glennon *et al.*, 1996). Genauso entwickelten MEK1- und Ras-transgene Mäuse einen hypertrophen Phänotyp (Bueno *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1995). Die Analyse von NRCMs, welche die zuvor erwähnte monomere, Thr¹⁸⁸-phosphomimetische ERK2-Mutante ERK2-Δ4D überexprimierten, ergab bei diesen Zellen ein mit ERK2-wt vergleichbares hypertrophes Wachstum (Daten nicht gezeigt, Sofia Kramer). Obwohl ERK2-Δ4 effektiv hypertrophes Wachstum reduzieren kann, ist die Autophosphorylierung allein demnach tatsächlich funktionell ausreichend, um die hypertrophe Signalweiterleitung von ERK zu triggern.

Die Hemmung der ERK-Aktivität mit dem MEK-Inhibitor PD98059 reduzierte zwar die hypertrophe Signalweiterleitung von ERK, verursachte aber auch einen Anstieg der Apoptose (Abbildung 14) (Ruppert *et al.*, 2013). Interessanterweise beeinträchtigte die Überexpression von ERK2-Δ4 verglichen mit der Überexpression von ERK2-wt oder Kontrolltieren indes nicht die anti-apoptotische Signalweiterleitung von ERK in Kardiomyozyten (Abbildung 15, Abbildung 21). Die Überexpression von monomerem ERK ist somit nicht schädlich für das Herz, sondern reduziert über eine Vermeidung der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung spezifisch die maladaptiven Funktionen dieser MAPK-Kaskade. Aufgrund einer fehlenden Dimerisierung kommt es nicht zur Phosphorylierung an Threonin 188 (Abbildung 12). Damit reduziert sich die nukleäre Akkumulation von ERK (Abbildung 13), was eine verminderte Aktivierung hypertropher Zielproteine mit sich führt (Abbildung 16). Dabei bleibt die Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv bestehen und ermöglicht dadurch eine normale Kinaseaktivität und folglich die Aktivierung zytosolischer Substrate. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den bisherigen Studien zur Interferenz mit der Thr188-Autophosphorylierung und verdeutlichen, dass es tatsächlich möglich ist, die Dimerisierung von ERK als Zielstruktur zur Vermeidung der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung zu verwenden (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012).

5.3.3 Eine fehlende ERK2-Dimerisierung bei physiologischer Hypertrophie

Obwohl eine Verhinderung der ERK2-Dimerisierung das Entstehen einer pathologischen kardialen Hypertrophie effektiv reduzieren kann, übt sie dennoch keinen Einfluss auf physiologisches Herzwachstum aus, sei dies nun bedingt durch postnatales Wachstum (Abbildung 23, Tabelle 3) oder physisches Training (Daten nicht gezeigt, Martin Hümmert). Diese Versuchsansätze erhärten die Beobachtungen einer anderen Studie, in der die Auswirkungen einer Interferenz mit der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung auf physiologisches Herzwachstum untersucht wurde (Ruppert *et al.*, 2013). Auch hier konnte keine Minderung dieser Form der Hypertrophie ausgemacht werden.

Die Erhaltung eines physiologischen Herzwachstums ist von essentieller Bedeutung zur Gewährleistung einer adäquaten Herzfunktion und sollte bei einer möglichen Therapie der pathologischen Hypertrophie unter keinen Umständen beeinträchtigt werden. Es hat sich gezeigt, dass die Interferenz mit einer ERK-vermittelten Signalweiterleitung das physiologische Herzwachstum nicht in Mitleidenschaft zieht. Dies deutet auf eine geringe Rolle des Raf/MEK/ERK-Signalweges bei der Initiation

von physiologischem Herzwachstum hin (siehe Abschnitt 1.1.4) und bekräftigt die Anwendbarkeit dieser Signalkaskade zur Verhinderung von pathologischem Herzwachstum (McMullen *et al.*, 2003).

5.4 Die endogene ERK-Dimerisierungshemmung als Therapieansatz pathologischer kardialer Hypertrophie

Der Ansatz, die katalytisch aktive Kinase ERK2- $\Delta 4$ zu überexprimieren, lieferte wertvolle Erkenntnisse zum mechanistischen Verständnis der ERK-vermittelten Signalweiterleitung, insbesondere bei der Betrachtung kardialer Hypertrophie. Indes bestätigen die Ergebnisse mit der monomeren ERK2-Mutante die Beobachtungen von Ruppert *et al.* und Lorenz *et al.* In beiden Versuchsansätzen wurden ebenso katalytisch aktive Mutanten von ERK2 *in vitro* und *in vivo* überexprimiert. Dabei zeigte sich in diesen Studien eine Verhinderung pERK^{Thr188}-vermittelter kardialer Hypertrophie durch die Überexpression phosphodefizienter ERK2-Mutanten (ERK^{T188A} und ERK^{T188S}) (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013). Die Versuche mit der monomeren Mutante ERK2- $\Delta 4$ zeigen, dass die Therapie einer ERK1/2-vermittelten pathologischen Hypertrophie tatsächlich möglich ist und dies dem Herzen nicht schadet. Vielmehr bleiben trotz einer Hemmung der Dimerisierung wichtige Funktionen der Raf/MEK/ERK-Kaskade im Herzen erhalten und es wird nur selektiv in die hypertrophen Signale eingegriffen. Es sollte allerdings vermieden werden eine Therapie mit der Überexpression einer dominant negativ agierenden, aktiven Kinase anzustreben. Um die bisherigen Feststellungen in eine anwendungsbezogene Richtung zu lenken wurde daher der Ansatz verfolgt, die Dimerisierung von endogenem ERK2 mithilfe des Peptids zu unterbinden (Abbildung 26). Interessanterweise interagiert das Peptid nicht unter basalen Bedingungen mit ERK2, sondern nur nach Stimulation (Abbildung 27). Die Phosphorylierung von ERK2 ist demnach eine Voraussetzung für eine Bindung des Peptids an ERK2.

Das Peptid kristallisierte sich in NRCMs als potenter Inhibitor einer ERK-vermittelten hypertrophen Reaktion heraus (Abbildung 34), indem es die Entstehung der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung und damit einhergehend die nukleäre Akkumulation von ERK2 reduzierte (Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31). Die Verhinderung der nukleären Translokation von ERK2 durch das Peptid ist ein Indiz dafür, dass die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung wohl die Translokation von ERK in den Zellkern begünstigt. Es ist demnach möglich, die Dimerisierung von ERK2 mit einem Inhibitor zu unterbinden und auf diesem Weg die Autophosphorylierung von ERK zu beeinträchtigen, ohne die Aktivität der Kinase komplett auszuschalten (Abbildung 28).

Bei der Testung eines möglichen Inhibitors, unabhängig der zu blockierenden zellulären Prozesse, ist es elementar zu wissen, wie spezifisch das gewünschte Zielmolekül erkannt wird. So stellte sich diese Frage auch im Rahmen dieser Arbeit.

Wie bereits erläutert, bildet der *Leucin-Zipper* eine entscheidende Interaktionsstelle bei der Ausbildung des ERK2-Dimers. Allerdings sind ERK1/2 nicht die einzigen Proteine, die mithilfe eines Leucin-

Zippers interagieren. Beispielsweise hetero- und homodimerisieren auch viele DNA-bindende Proteine über einen vergleichbaren Mechanismus mit dem Oberbegriff *Leucin-Zipper*. (Landschulz *et al.*, 1988). Darunter fällt auch der Transkriptionsfaktor *Myc*, welcher mit MAX heterodimerisiert und so seine biologischen Funktionen ausübt (Luscher und Larsson, 1999). In der Tat verhindert das Peptid nicht die Interaktion dieser beiden Transkriptionsfaktoren (Abbildung 36). Herrero *et al.* testeten ebenfalls schon einen niedermolekularen Inhibitor der ERK2-Dimerisierung in Bezug auf eine unspezifische Hemmung der *Myc*/MAX-Interaktion und beobachteten auch hier keine Beeinträchtigung dieser Wechselwirkung (Herrero *et al.*, 2015). Eine Interferenz mit der ERK-Dimerisierung ist demnach so spezifisch, dass dadurch nicht alle Proteininteraktionen, welche auf einem Leucin-Zipper beruhen, beeinträchtigt werden. Selbstverständlich ist dies nicht der endgültige Beweis der Spezifität des Peptids im Hinblick auf eine Hemmung der ERK2-Dimerisierung. Da sich MAPKs in vielen Sequenzabschnitten und Funktionen sehr ähnlich sein können ist eine Bindung des Peptids an andere MAPKs außer ERK1/2 auch sehr gut möglich. Es sollte daher in der Zukunft noch bezüglich einer Interaktion mit anderen MAPKs untersucht werden. Massenspektrometrische Untersuchungen könnten in diesem Fall sehr hilfreich sein und einen allgemeinen Aufschluss über die Interaktionspartner des Peptids liefern. Darüber hinaus könnten Versuche zu möglichen Effekten des Peptids in der Abwesenheit von ERK2 auch hilfreiche Informationen über eventuelle Nebenwirkungen aufgrund unbekannter Interaktionspartner erbringen.

Mithilfe des Mausmodells der AAV9-vermittelten Gentherapie einer TAC-induzierten pathologischen Hypertrophie konnte das Vermögen des Peptids hinsichtlich einer Therapie *in vivo* unter Beweis gestellt werden. Die Therapie mit dem Peptid ermöglichte eine signifikante Reduktion des Herzwachstums als Antwort auf den pathologischen Trigger der Nachlasterhöhung, ausgelöst durch die Aortenligation (Abbildung 38, Tabelle 4). Auch andere Parameter des kardialen *Remodelings* sowie die allgemeine Herzfunktion konnten mithilfe des Peptids signifikant verbessert werden (Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 42, Tabelle 4).

Folglich ist eine gezielte Gentherapie der pERK^{Thr188}-vermittelten pathologischen Hypertrophie möglich. Die *in vivo*-Daten des AAV9-Gentherapiemodells belegen die Anwendbarkeit einer Hemmung der ERK2-Dimerisierung in einem therapeutischen Ansatz. Es ist tatsächlich möglich in die endogene Signalweiterleitung von ERK2 einzugreifen, auf so spezifische Art und Weise, dass die normale Kinasaktivität von ERK gewahrt bleibt und nur selektiv die Autophosphorylierung von ERK verhindert wird.

Dessen ungeachtet ist der Mechanismus über den die Translokation von ERK stattfindet bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Vor allem bleibt trotz alledem die Frage offen, wie genau die Thr188-Phosphorylierung zur nukleären Akkumulation von ERK2 beiträgt.

Obwohl ERKs nicht über eine klassische nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) für den Transport in den Kern verfügen, konnte dennoch eine Sequenz ausgemacht werden, welche wie eine NLS funktioniert, die Serin-Prolin-Serin (SPS)-Domäne. Diese Domäne wird nach Stimulation phosphoryliert und

vermittelt autonom die nukleäre Lokalisation, indem sie an das nukleäre Translokationsprotein Importin7 bindet (Chuderland *et al.*, 2008). Dabei scheint dieser Mechanismus sowohl für den passiven als auch den aktiven Transport von ERK von Bedeutung zu sein. Da nun Importin7 ein wichtiges Schlüsselement für die nukleäre Translokation von ERK zu sein scheint, könnte es auch in Verbindung mit der Thr188-Phosphorylierung stehen. Um dies zu untersuchen wurde die Bindung von ERK2 an Importin7 über Immunopräzipitationen analysiert. Tatsächlich zeigte sich verglichen mit ERK2-wt bei der monomeren Mutante ERK2- Δ 4 eine reduzierte Bindung an Importin7 (Daten nicht gezeigt, Sofia Kramer). Die monomere, aber Thr188-phosphomimetische Mutante ERK2- Δ 4D wies jedoch eine gesteigerte Bindung zu Importin7 auf. Weitere Versuche mit dem Peptid bestätigten dies. In Anwesenheit des Peptids konnte ERK2-wt deutlich geringer mit Importin7 interagieren (Daten nicht gezeigt, Sofia Kramer).

Diese Versuche sind erste Hinweise zu dem mechanistischen Hintergrund der pERK^{Thr188}-vermittelten nukleären Akkumulation von ERK. Die Interaktion von ERK1/2 mit Importin7 scheint in der Tat von der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung abhängig zu sein. Die erhöhte Bindung an Importin7 zieht folglich eine gesteigerte nukleäre Translokation von ERK1/2 mit sich. Eine Studie, in der mithilfe eines Peptides die Interaktion zwischen ERK und Importin7 unterbunden wurde, bestätigt die Hypothese dieser Arbeit. Die verminderte Bindung an Importin7 reduzierte dabei signifikant die nukleäre Translokation von ERK und damit einhergehend die Proliferation von Krebszellen (Plotnikov *et al.*, 2015). Hier sollte weiterführend mit Strukturanalysen angesetzt werden, um herauszufinden, wie genau die Autophosphorylierung von ERK dessen Interaktion mit Importin7 fördert. Darüber hinaus wäre es von Vorteil die Interaktionsstelle der beiden Proteine zu kennen, da dies ebenso als therapeutischer Angriffspunkt zur Vermeidung der nukleären Translokation von ERK genutzt werden könnte.

5.5 Die Relevanz der ERK-Dimerisierung in der Tumorthherapie

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist in der Humanmedizin vor allem im Hinblick auf eine Tumorthherapie von sehr hoher Relevanz. Nahezu 50% aller bösartigen Tumore weisen eine Dysregulation in diesem Signalweg auf (Matallanas und Crespo, 2010). Ein gestörter Verlauf der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung, dem Verlauf und der Aufrechterhaltung einer Malignität. Eine konstitutive Aktivierung des ERK-Signalwegs kann einerseits über eine Liganden-induzierte Stimulation von Membran-assoziierten Rezeptortyrosinkinasen geleitet sein oder einem Liganden-unabhängigen Mechanismus zugrunde liegen, wie beispielsweise durch eine mutierte Aktivierung von Proteinen dieser Kaskade. Insbesondere die Mitglieder der Ras- und Raf-Familien sind oft aktiv mutiert. Darunter treten die bekanntesten und häufigsten Mutationen bei H-Ras, N-Ras, K-Ras und B-Raf auf (Montagut und Settleman, 2009).

5.5.1 Kardiotoxizität und Feedbackmechanismen bei Kinaseinhibitoren

Es ist schwer vorherzusagen, welches Mitglied der ERK-Kaskade das nützlichste Ziel einer Krebstherapie darstellt. Aufgrund der gut dokumentierten, vielseitigen Funktionen jedes einzelnen Mitglieds dieser Kaskade in einer Vielzahl physiologischer Prozesse, würde es nicht verwundern, eine Inhibition dieser Enzyme mit toxischen Reaktionen verbunden zu sehen. Faktisch hat sich die Kardiotoxizität von Krebstherapeutika, insbesondere bei einer Behandlung mit Kinaseinhibitoren, als signifikantes Problem herausgestellt, welches weiterbestehen wird, solange es keine verlässlichen präklinischen Untersuchungsmethoden diesbezüglich gibt (Cheng *et al.*, 2011). Speziell bei einer gezielten Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren haben sich unerwünschte kardiale Nebenwirkungen herauskristallisiert, wie beispielsweise linksventrikuläre Dysfunktion und Herzinsuffizienz (Chu *et al.*, 2007; Kerkela *et al.*, 2006).

Wie bereits erläutert, nimmt der ERK-Signalweg eine herausragende Rolle in der Vermittlung des Überlebens von Kardiomyozyten ein. Die Vermutung liegt daher nahe, dass eine therapeutische Hemmung dieses Signalwegs einen übermäßigen Anstieg des kardialen Zelltodes auslösen könnte. Damit verbundene Kardiomyopathien sind für die Therapie mit MEK-Inhibitoren, wie Trametinib, belegt (Livingstone *et al.*, 2014).

Um einen ersten Eindruck über mögliche kardiotoxische Eigenschaften einer Substanz zu erlangen, eignen sich primäre Kardiomyozyten sehr gut (Cheng *et al.*, 2011). Es zeigte sich, dass der klinisch geprüfte monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab in NRCMs tatsächlich signifikant Apoptose auslöst (Abbildung 49). Da Cetuximab dabei gleichzeitig auch die TEY-Phosphorylierung, also die ERK1/2-Aktivierung durch MEK1/2, signifikant reduzierte, lässt sich schnell eine Verbindung zur gesteigerten Apoptoserate in NRCMs knüpfen. Der erhöhte Verlust an Kardiomyozyten beruht wohl auf einer verminderten ERK-Aktivität.

Raf-Inhibitoren, wie beispielsweise Vemurafenib, sind kompetitive Analoga von ATP. Da die ATP-Bindetasche unter Kinasen sehr stark konserviert ist, besitzen ATP-kompetitive Analoga von Natur aus ein gewisses Maß an Unspezifität (Breen und Soellner, 2015; Matallanas und Crespo, 2010). Es bestehen bei diesen Therapeutika daher sehr große Zweifel bezüglich ihrer *off-target*-Effekte. Teilweise sind die anti-onkogenen Eigenschaften dieser Substanzklasse gar nicht mehr auf eine Raf-Hemmung zurückzuführen. So hemmt Sorafenib neben B-Raf auch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-2, VEGF-3 und PDGF β und kann dadurch unabhängig einer B-Raf-Inhibition anti-onkogen wirken (Whittaker *et al.*, 2010).

Darüber hinaus ist sowohl für Raf- als auch für MEK-Inhibitoren bekannt, dass sich während der Therapie mit diesen Substanzen Resistenzen entwickeln, welche eine weitere Behandlung erschweren (Emery *et al.*, 2009; Pratilas und Solit, 2010). Der ERK-Signalweg ist unter normalen Bedingungen mithilfe inhibitorischer Signale ausbalanciert, wodurch die Dauer und Stärke des Signals limitiert wird. Die Signalkaskade unterliegt einer klassischen Feedbackschleife, in der ihre Negativregulatoren tran-

skriptionell durch ERK kontrolliert werden. In Tumorzellen ist dieser Feedbackmechanismus oft deaktiviert. So kommt es zu kontroversen Beobachtungen, wie einer tiefen MEK-Phosphorylierung in Tumorzellen, welche durch Rezeptortyrosinkinaseaktivierung und Ras-Mutation getrieben werden. Dies hat wohl eine Ablösung von der physiologischen Feedback-Inhibierung von MEK als Ursache (Pratilas und Solit, 2010). Auch Raf-Inhibitoren können gegensätzliche Effekte mit sich bringen. In Tumoren, welche eine K-Ras-Mutation beherbergen, kann die Gabe eines Raf-Inhibitors eine Ras-abhängige ERK-Aktivierung und folglich gesteigertes Tumorstadium auslösen (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010). Für Vemurafenib ist in der klinischen Anwendung beispielsweise eine Resistenzentwicklung innerhalb von durchschnittlich acht bis neun Monaten während einer Behandlung zu erwarten (Pratilas und Solit, 2010).

Aufgrund der beschriebenen Kardiotoxizität und Resistenzentwicklungen gängiger Therapeutika des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs wird intensiv nach Neuerungen in diesem Bereich der Therapie ERK-getriebener Karzinome gesucht. Eine noch gezieltere Therapie ist wünschenswert. Von Vorteil wäre eine Zielstruktur, mit der eine spezifische Hemmung einzelner Effekte einer Kinase unterbunden werden, ohne die Kinase dabei komplett auszuschalten. Bezüglich ERK1/2 konnte im Herzen gezeigt werden, dass es möglich ist nur selektiv in die Signalweiterleitung dieser Kinasen einzugreifen, indem das Zustandekommen der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung als Trigger hypertropher Effekte verhindert wird. Da die Autophosphorylierung mitunter die Akkumulation von ERK im Zellkern begünstigt, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung anderer nukleärer ERK-Funktionen, wie z.B. bei der Proliferation, einnimmt.

5.5.2 Die Rolle der ERK-Dimerisierung bei der Krebszellproliferation

Im Gegensatz zu den Anstrengungen in der Generierung von Raf- und MEK-Inhibitoren gab es bisher nur begrenzten Fortschritt in der Entwicklung von ERK1- und ERK2-selektiven Hemmstoffen. Dies liegt wohl zum Teil an der Vermutung, dass kein zusätzlicher Nutzen von einem ERK-Inhibitor zu erwarten wäre, da ERK das einzig bekannte Substrat von MEK darstellt. Zur Vermeidung der genannten Probleme in der Krebstherapie fehlen allerdings alternative Zielstrukturen im Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Die Erfahrungen mit den bisherigen Therapeutika veranlassen ein Umdenken. Zum einen könnten die negativen Feedbackschleifen je nach dem Modul, welches inhibiert wird, große Unterschiede aufweisen (Samatar und Poulikakos, 2014). Zum anderen beinhaltet eine Resistenz gegen Raf- und MEK-Inhibitoren oft die Regeneration der ERK-Signalweitergabe, was durch einen spezifischen Inhibitor womöglich besser unterdrückt werden könnte (Samatar und Poulikakos, 2014). Die Entwicklung eines solchen Arzneistoffes ist daher mit vielen Hoffnungen verbunden.

SCH772984 ist ein bereits existierender ATP-kompetitiver ERK1/2-Inhibitor, welcher mithilfe von *affinity-based high-throughput screens* für Substanzen, die an unphosphoryliertes (inaktives) ERK2 binden, detektiert wurde und schon in klinischen Studien getestet wird (Morris *et al.*, 2013). Allerdings zeigte sich in Zellen bei einer dauerhaften Therapie mit dieser Substanz eine Resistenzentwicklung

von ERK1 aufgrund einer Punktmutation, welche die Bindung von SCH772984 an ERK verhindert (Jha *et al.*, 2016). Dieser Fund betont die Notwendigkeit alternativer Zielstrukturen zur Hemmung der onkogenen Eigenschaften von ERK1/2.

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in dem Mechanismus, welcher die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung mit sich bringt, bietet die Inhibition der ERK-Dimerisierung eine vielversprechende neue Therapiemöglichkeit. Es ist bereits bekannt, dass eine Inhibition der ERK-Dimerisierung ausreichend ist, um die zelluläre Proliferation und Tumorprogression zu verhindern, ohne dabei die totalen Aktivierungslevel von ERK zu beeinflussen (Casar *et al.*, 2008). Tatsächlich wurde auch schon ein molekularer Inhibitor der ERK-Dimerisierung erfolgreich auf seine hemmenden Eigenschaften bezüglich der Tumorgenese kolorektaler Karzinome und Melanome *in vivo* getestet (Herrero *et al.*, 2015). Auch diese Substanz führte nicht zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK am TEY-Motiv.

Die Versuchsreihen in dieser Arbeit konnten die beschriebenen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen untermauern. Während der EGFR-Antikörper Cetuximab und der MEK-Inhibitor PD98059 auf die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien gar keinen oder nur teilweisen Einfluss nahmen, konnte eine Dimerisierungshemmung mithilfe des Peptids zu einer beachtlichen Minderung der Proliferationsrate dieser Zellen führen (Abbildung 46). Dies geschah sogar unabhängig vom Ras- oder Raf-Mutationsstatus der Krebszellen. *Western Blot* Analysen zeigten auch in dieser Versuchsreihe ein unverändertes Maß an ERK(TEY)-Phosphorylierung in Anwesenheit des Peptids (Abbildung 47). Paradoxerweise wiesen K-Ras-mutierte LS174T-Zellen nach Inkubation mit Cetuximab eine reduzierte ERK(TEY)-Phosphorylierung auf, obwohl sich dies unter den gegebenen Bedingungen in diesen Zellen allerdings nicht in einer Proliferationshemmung äußerte. Die LS174T-Zellen müssen demnach einen Regulationsmechanismus unabhängig von der ERK-Kaskade gefunden haben, um resistent gegen eine ERK-Aktivierungshemmung zu sein.

Die Untersuchung des apoptotischen Zelltodes der Krebszelllinien in dieser Arbeit lieferten gleichermaßen interessante Ergebnisse. In LS174T-Zellen (K-Ras-Mutation) induzierten alle Substanzen Apoptose, also auch das Peptid (Abbildung 48). Es löste sogar signifikant mehr apoptotischen Zelltod aus als der MEK-Inhibitor PD98059. In HT29-Zellen (B-Raf-Mutation) verursachten PD98059 und Cetuximab Apoptose, das Peptid jedoch nicht. Die verwendeten Substanzen konnten bei den wildtypischen Colo320-Zellen allerdings keinerlei Apoptose auslösen, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass der ERK-Signalweg nicht den treibenden onkogenen Mechanismus dieser Zellen darstellt. Diese Beobachtungen entsprechen nicht den Erwartungen, welche nach den Untersuchungen zum Zelltod von Kardiomyozyten bestanden. Die Studien von Casar *et al.* und Herrero *et al.* beschreiben genauso gegensätzlich zu den bisherigen Beobachtungen in dieser Arbeit die Relevanz von ERK-Dimeren für die Aktivierung zytosolischer und nicht nukleärer ERK-Substrate (Casar *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2015). Sie erklären das anhand der Tatsache, dass ERK unter basalen Bedingungen an zytosolische *Scaffolds* gebunden und so im Zytoplasma verankert ist. In ihren Versuchsvorhaben löst eine Interferenz mit der Dimerisierung eine Proliferationshemmung von Krebszellen aus und indu-

ziert zudem den apoptotischen Zelltod, was sie auf eine verminderte zytosolische ERK-Aktivität zurückführen. Es ist jedoch bekannt, dass ERK1/2 sich von den meisten ihrer zytoplasmatischen Anker nach Stimulation lösen und so wieder frei in der Zelle verfügbar sind (siehe Abschnitt 1.2.4.2). Verwunderlich ist allerdings, dass eine Dimerisierungshemmung in diesen Studien zur Auslösung von Apoptose in Krebszellen führte und dies mitunter auch in dieser Arbeit der Fall war. Eine Erklärung dafür liefert die Studie von Lorenz *et al.* Hier wird das Zustandekommen der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung als stimulusabhängig beschrieben (Lorenz *et al.*, 2009a). Demnach sollten es auch die mit dieser Autophosphorylierung verbundenen Effekte sein. Denn obwohl das hauptsächliche Zellüberleben steigernde Signal von ERK im Zytoplasma weitergegeben wird, könnte in Krebszellen der nukleäre Anteil dieser Signalweitergabe durchaus von größerer Bedeutung sein. Um dem näher auf den Grund zu gehen, fehlen derzeit noch ERK-Lokalisationsversuche sowie *Western Blot* Versuche zu Phosphorylierungen von ERK-Zielproteinen in Krebszellen. Die Analysen dazu könnten unter Umständen Korrelationen zu den Apoptose- und Proliferationsdaten dieser Zellen ergeben. Weiterhin könnten Genanalysen von Kardiomyozyten und Krebszellen, die jeweils mit dem Peptid behandelt wurden, einen Aufschluss darüber geben, welche Gene im Speziellen durch die Interaktion des Peptids mit ERK2 beeinflusst werden. Mögliche Unterschiede in der Genregulierung durch das Peptid zwischen den verschiedenen Zellarten könnten dabei eventuell auch eine Erklärung für die abweichenden Beobachtungen bezüglich der Apoptoserate liefern.

5.6 Ausblick

Das verwendete Peptid hat viele Vorteile gegenüber bisherigen Therapeutika, die auf eine verminderte Signalweitergabe von ERK1/2 zielen. Es interagiert nur mit aktiviertem ERK und kann somit gewisse ERK-Funktionen hemmen ohne die gesamte ERK-Aktivität zu beeinflussen. Durch ein spezifischeres Eingreifen in den Raf/MEK/ERK-Signalweg wird zudem die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen sowie Resistenzen verringert. Außerdem bietet sich hier eine einzigartige Möglichkeit, die Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie zu minimieren.

Obwohl sich das Peptid als selektiver ERK-Inhibitor für die Versuche in dieser Arbeit gut bewährt hat, ist es im Hinblick auf eine mögliche Therapie im Menschen aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften und Größe von ca. 7kDa selbst eher ungeeignet. Es ist daher zwingend nötig nach kleineren bzw. minimal notwendigen Strukturen innerhalb des vorhandenen Peptids zu suchen, welche trotzdem noch einen hemmenden Einfluss auf die Dimerisierung von ERK2 haben. Hierzu wurden schon erste Schritte unternommen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jutta Eichler vom Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden zwei weitere Peptide synthetisiert, welche nur halb so groß oder sogar noch kleiner als das hier verwendete Peptid sind. Es zeigte sich, dass beide kleine Peptide noch in der Lage sind das Zustandekommen der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung zu reduzieren (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist das kleine Peptid, welches auch Aminosäuren des ERK2-C-Terminus enthält, trotz seiner Größe von ca.

3kDa ein überaus potenter Inhibitor der Dimerisierung von ERK2, was wiederum dessen hemmenden Effekt auf die ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung erklärt (Daten nicht gezeigt, Sofia Kramer). Die Versuche mit den kleineren Peptiden zeigen, dass es durchaus möglich ist die Struktur des zuvor in dieser Arbeit verwendeten Peptids zu verkleinern und dabei trotzdem wirkungsvolle Moleküle zu erhalten. Diese kleineren Peptide sind dennoch nur ein erster Schritt zur Erlangung eines niedermolekularen Hemmstoffes. Das Ziel wird in Zukunft sein, die Aminosäuresequenz immer weiter zu verringern, bis die minimalste Struktur gefunden ist, welche immer noch inhibitorisch auf die ERK-Dimerisierung wirkt. Dazu wäre es hilfreich, die genaue Interaktionsstelle von ERK und dem Peptid zu identifizieren. Zur Lösung dieses Problems könnten wiederum massenspektrometrische Untersuchungen dienen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung als lokaler und zeitlicher Regulationsmechanismus von ERK verdeutlicht (Abbildung 50). Die Intervention mit der ERK-Dimerisierung zur Verhinderung dieser Autophosphorylierung hat sich als wertvolles Werkzeug zur Vermeidung nukleärer ERK-Effekte herausgestellt. Über diesen Ansatz ist es möglich selektiv pathologisch hypertrophes Herzwachstum zu verhindern, ohne dabei die kardioprotektiven anti-apoptischen Eigenschaften von ERK zu minimieren. Dabei konnte sich die Hemmung der ERK-Dimerisierung auch in der Behandlung von Krebszellen beweisen und deren Proliferation verringern. Somit wurde in dieser Versuchsreihe die Praktikabilität einer ERK-Dimerisierungshemmung herausgearbeitet, worüber selektiv nukleäre ERK-Signale unterbunden werden können, ohne die Aktivität von ERK1/2 und deren zytosolische Signalweiterleitung zu beeinflussen.

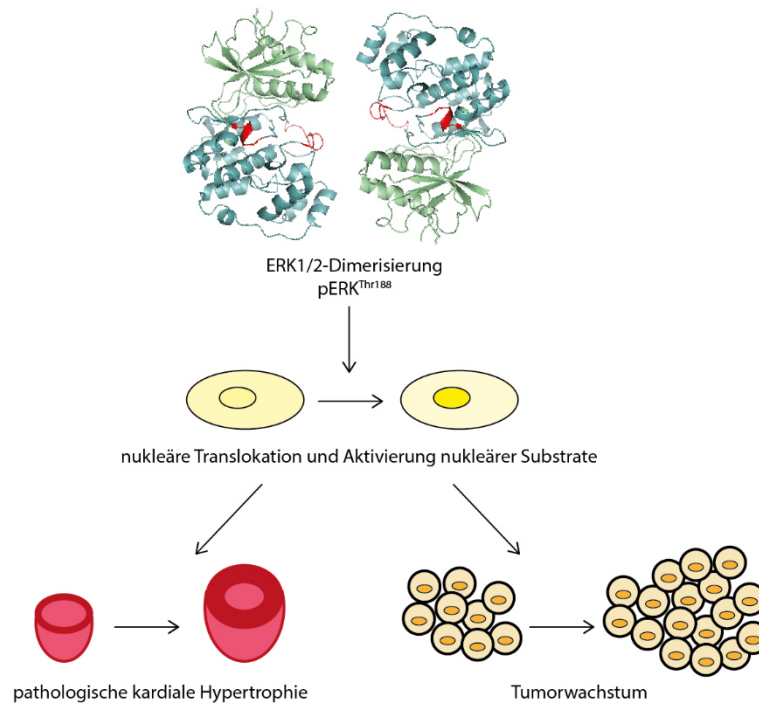


Abbildung 50: Mechanismus pathologischer ERK^{Thr188}-vermittelter Effekte

Die durch die Phosphorylierung von ERK1/2 am TEY-Motiv verursachten Konformationsänderungen erleichtern die Dimerisierung von ERK. Diese stellt einen wichtigen initialen Schritt für das Zustandekommen der Autophosphorylierung an Threonin 188 dar, welche die nukleäre Translokation von ERK1/2 begünstigt. All dies fördert die Aktivierung nukleärer ERK-Substrate, welche unter anderem pathologische kardiale Hypertrophie und Proliferation von Krebszellen vermitteln.

Im Übrigen geht aus den ermittelten Resultaten hervor, dass der Raf/MEK/ERK-Signalweg sehr viel mehr als nur aktivierende Phosphorylierungen umfasst. Es müssen zusätzlich noch weitere (Auto)Phosphorylierungen und Proteininteraktionen auftreten, um die Weitergabe des ERK-Signals im Organismus sowie deren Spezifität zu gewährleisten. Diese Proteininteraktionen/-modifikationen können attraktive und vielversprechende Ziele für zukünftige Therapeutika gegen pathologische kardiale Hypertrophie und Krebs sein. Zudem konnte mit der Inhibition der ERK-Dimerisierung die Relevanz zweier unterschätzter Therapiestrategien belegt werden:

- (1) die Blockade Lokalisations-spezifischer Sub-Signale im Gegensatz zur kompletten Signalhemmung und
- (2) die Beeinflussung regulatorischer Protein-Interaktionen anstatt der Hemmung katalytischer Aktivitäten zur Erlangung effektiver Therapeutika.

6 Zusammenfassung

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1 und 2) sind die Effektorinasen der Raf/MEK/ERK-Kaskade und verknüpfen externe Stimuli mit der intrazellulären Antwort, wodurch sie wichtige Schlüsselmoleküle der zellulären Signaltransduktion darstellen. Zahlreiche Studien belegen die Beteiligung von ERK1/2 an der Entstehung pathologischer kardialer Hypertrophie. Genauso ist bekannt, dass ERK1/2 anti-apoptotische, kardioprotektive Eigenschaften besitzen.

So führte, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Hemmung der katalytischen ERK1/2-Aktivität durch den MEK-Inhibitor PD98059 zu einer signifikanten Reduktion der hypertrophen Antwort von Kardiomyozyten auf den Stimulus Phenylephrin. Dies war allerdings mit einem Anstieg der Apoptoserate in diesen Zellen verbunden, wodurch sich eine Hemmung der totalen ERK-Aktivität als nicht praktikabel für die Behandlung pathologischer kardialer Hypertrophie herauskristallisierte. In früheren Untersuchungen wurde eine Autophosphorylierung von ERK an Threonin 188 (murines ERK2) entdeckt und als Trigger für ERK1/2-vermitteltes hypertrophes Wachstum identifiziert. Diese Autophosphorylierung steuert die nukleäre Lokalisation von ERK1/2 und ermöglicht so die Aktivierung nukleärer ERK-Zielproteine sowie hypertrophes Wachstum. Eine Interferenz mit der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung konnte schon *in vitro* und *in vivo* erfolgreich einer pathologischen Hypertrophie entgegenwirken, ohne Einfluss auf physiologisches Herzwachstum oder die zytosolischen, anti-apoptotischen Effekte von ERK1/2 zu nehmen. Einen initialen Schritt für das Zustandekommen dieser Autophosphorylierung an Threonin 188 stellt dabei die Dimerisierung von ERK dar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Inhibition der ERK-Dimerisierung im Hinblick auf die Behandlung ERK^{Thr188}-vermittelter pathologischer Hypertrophie untersucht. Dabei sollte die endogene ERK-Dimerisierung mithilfe eines selbst generierten Peptids unterbunden werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu einer dimerisierungsdefizienten ERK2-Mutante (ERK2- Δ 4) konnte das Peptid *in vitro* und *in vivo* erfolgreich pathologisch hypertrophes Herzwachstum mindern. Dabei führte es sogar zu einem Rückgang des apoptotischen Zelltodes, ausgelöst durch eine Aortenligation, führen. Es zeigte sich, dass das Peptid die nukleäre Translokation von ERK2 verhindert und dadurch nukleäre ERK-Substrate geringer aktiviert werden. Da eine Dysregulation in der Raf/MEK/ERK-Kaskade auch die Entstehung von Tumoren begünstigen kann, sollte schließlich untersucht werden, ob das Prinzip der Hemmung nukleärer ERK-Effekte auch die Proliferation von Krebszellen beeinflussen kann. Es stellte sich heraus, dass die Peptid-vermittelte Hemmung der ERK-Dimerisierung auch die Proliferation von Kolonkarzinomzelllinien mit unterschiedlichen Mutationsstadien der Raf/MEK/ERK-Kaskade reduziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit die Intervention mit der ERK-Dimerisierung als Target der ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung als translationale Strategie zur Reduktion nukleärer ERK-Effekte herausgearbeitet werden. Dies bietet die Möglichkeit ERK-vermittelte pathologische kardialer Hypertrophie und ERK-vermittelte Tumor-Proliferation zu behandeln, ohne kardiotoxische Nebenwirkungen zu verursachen.

Summary

The mitogen-activated protein kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2) link external stimuli with the intracellular response as the effector kinases of the Raf/MEK/ERK cascade. Therefore, they represent important key molecules in the context of cellular signal transduction. Numerous studies proof the involvement of ERK1/2 in the development of pathological cardiac hypertrophy. However, ERK1/2 have also cardio-protective, anti-apoptotic properties in the heart.

In this work, it could be shown that inhibition of catalytical ERK-activity using the MEK-inhibitor PD98059 leads to a reduced hypertrophic response in cardiomyocytes upon phenylephrine-stimulation. At the same time, treatment of cardiomyocytes with PD98059 increased apoptosis in those cells. Therefore, inhibition of total ERK-activity is not feasible for the treatment of pathological cardiac hypertrophy. Previous studies identified the autophosphorylation at threonine 188 (mouse ERK2) as a trigger for ERK-mediated hypertrophic growth. By increasing nuclear localization of ERK, this autophosphorylation leads to increased activation of nuclear ERK-targets and concomitant hypertrophy. Interference with ERK^{Thr188}-phosphorylation could already successfully reduce pathological hypertrophy *in vivo* and *in vitro* without influencing physiological heart growth or the cytosolic anti-apoptotic ERK-effects. One initial trigger of ERK^{Thr188}-phosphorylation is the dimerization of activated ERK. In this work, inhibition of ERK-dimerization and its consequences regarding pathological cardiac hypertrophy was tested. ERK-dimerization was endogenously inhibited using a self-generated peptide. In line with data obtained from a dimerization-deficient ERK2 mutant (ERK2-Δ4) the peptide was able to effectively reduce pathological cardiac hypertrophy *in vivo* and *in vitro*. Moreover, the peptide even reduced apoptotic cell death induced by ligation of the aorta. Mechanistically, the peptide reduces activation of nuclear ERK targets by inhibiting nuclear translocation of ERK. Since a dysregulation of the Raf/MEK/ERK cascade also promotes the development of tumors, the impact of inhibition of nuclear ERK effects on cancer cell proliferation was investigated. Interestingly, prevention of ERK-dimerization using the peptide efficiently reduced proliferation of colon cancer cell lines with different mutational levels.

In this work, intervention of ERK-dimerization to target ERK^{Thr188}-autophosphorylation could successfully be proven as a translational strategy to circumvent nuclear ERK effects. This offers the possibility for the treatment of ERK-mediated pathological cardiac hypertrophy and ERK-mediated tumor proliferation without inducing cardiotoxic side-effects.

7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziiertes Virus
AC	Adenylylzyklase
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AKT	Proteinkinase B
Ang II	Angiotensin II
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>arbitrary units</i> (Einheiten)
Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BAG1	<i>Bcl-2 associated athanogene-1</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBFHH-Puffer	<i>Ca²⁺-and bicarbonate-free Hanks' buffer with HEPES</i>
CCH	Carbachol
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DUSP	dualspezifische Phosphatase
DTT	Dithiothreitol

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Elk-1	<i>E twenty six-like 1 transkription factor</i>
Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
ET-1	Endothelin-1
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FS	systolische Verkürzungsfraction, <i>fractional shortening</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HDAC	CaMKII-Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IEG	<i>immediate early gene</i>
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVS	intraventrikuläre Septumdicke
JAK2	Janus-Kinase 2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
Kon	Kontrolle
KSR	<i>kinase suppressor of Ras</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVHW	linksventrikuläre Hinterwanddicke

LVID	linksventrikulärer Innendurchmesser
MAP-2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin-Basisches Protein
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MKP-1	MAPK-Phosphatase 1
MLC-2	<i>myosin light chain-2</i>
MLK3	<i>mixed-lineage protein kinase 3</i>
MP1	MEK Partner 1
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
n	Anzahl
NES	nukleäre Exportsequenz
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NRCM	neonataler Rattenkardiomyozyt
n.s.	nicht signifikant
<i>P</i>	Signifikanzwert
p	„Phospho-“
p90RSK	p90 ribosomale S6 Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

Pyk2	Pyruvatkinase 2
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Rap1	<i>Ras-related protein 1</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RGS2	<i>regulator of G-Protein signaling 2</i>
RKIP	Raf kinase inhibitorisches Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sef	<i>similar expression to fgf genes</i>
S.E.M.	Standardfehler
SERCA2a	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a</i>
SH2	<i>src homology 2</i>
Shc	<i>src homology 2 domain containing protein</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
TAC	transverse Aortenkonstriktion
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>Terminal dUTP Nick End-Labeling</i>
UBF	<i>upstream binding factor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Wt	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

8 Literaturverzeichnis

- ADACHI, M., FUKUDA, M., NISHIDA, E., 1999. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *The EMBO journal* 18(19), 5347-5358.
- ADACHI, M., FUKUDA, M., NISHIDA, E., 2000. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *The Journal of cell biology* 148(5), 849-856.
- ADAMS, J.W., SAKATA, Y., DAVIS, M.G., SAH, V.P., WANG, Y., LIGGETT, S.B., CHIEN, K.R., BROWN, J.H., DORN, G.W., 2nd, 1998. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(17), 10140-10145.
- ADDERLEY, S.R., FITZGERALD, D.J., 1999. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* 274(8), 5038-5046.
- AHMED, D., EIDE, P.W., EILERTSEN, I.A., DANIELSEN, S.A., EKNAES, M., HEKTOEN, M., LIND, G.E., LOTHE, R.A., 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2, e71.
- AHN, N.G., CAMPBELL, J.S., SEGER, R., JENSEN, A.L., GRAVES, L.M., KREBS, E.G., 1993. Metabolic labeling of mitogen-activated protein kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(11), 5143-5147.
- AHN, N.G., KREBS, E.G., 1990. Evidence for an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. Activation of serine peptide kinase activity by myelin basic protein kinases in vitro. *The Journal of biological chemistry* 265(20), 11495-11501.
- AIKAWA, R., KOMURO, I., YAMAZAKI, T., ZOU, Y., KUDOH, S., TANAKA, M., SHIOJIMA, I., HIROI, Y., YAZAKI, Y., 1997. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *The Journal of clinical investigation* 100(7), 1813-1821.
- ALESSI, D.R., CUENDA, A., COHEN, P., DUDLEY, D.T., SALTIEL, A.R., 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 270(46), 27489-27494.
- ALESSI, D.R., JAMES, S.R., DOWNES, C.P., HOLMES, A.B., GAFFNEY, P.R., REESE, C.B., COHEN, P., 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB* 7(4), 261-269.
- ALESSI, D.R., SAITO, Y., CAMPBELL, D.G., COHEN, P., SITHANANDAM, G., RAPP, U., ASHWORTH, A., MARSHALL, C.J., COWLEY, S., 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO journal* 13(7), 1610-1619.
- ALLAN, L.A., MORRICE, N., BRADY, S., MAGEE, G., PATHAK, S., CLARKE, P.R., 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology* 5(7), 647-654.
- ALLARD, M.F., SCHONEKESS, B.O., HENNING, S.L., ENGLISH, D.R., LOPASCHUK, G.D., 1994. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *The American journal of physiology* 267(2 Pt 2), H742-750.
- AMIT, I., CITRI, A., SHAY, T., LU, Y., KATZ, M., ZHANG, F., TARCIC, G., SIWAK, D., LAHAD, J., JACOB-HIRSCH, J., AMARIGLIO, N., VAISMAN, N., SEGAL, E., RECHAVI, G., ALON, U., MILLS, G.B., DOMANY, E., YARDEN, Y., 2007. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature genetics* 39(4), 503-512.
- AOYAGI, T., MATSUI, T., 2011. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Current pharmaceutical design* 17(18), 1818-1824.
- ARIMOTO, T., TAKEISHI, Y., TAKAHASHI, H., SHISHIDO, T., NIIZEKI, T., KOYAMA, Y., SHIGA, R., NOZAKI, N., NAKAJIMA, O., NISHIMARU, K., ABE, J., ENDOH, M., WALSH, R.A., GOTO, K., KUBOTA, I., 2006. Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase zeta prevents Gq protein-coupled receptor agonist-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 113(1), 60-66.

- ARTHAM, S.M., LAVIE, C.J., MILANI, R.V., PATEL, D.A., VERMA, A., VENTURA, H.O., 2009. Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Progress in cardiovascular diseases* 52(2), 153-167.
- ATCHISON, R.W., CASTO, B.C., HAMMON, W.M., 1965. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science (New York, N.Y.)* 149(3685), 754-756.
- BABU, G.J., LALLI, M.J., SUSSMAN, M.A., SADOSHIMA, J., PERIASAMY, M., 2000. Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32(8), 1447-1457.
- BACKS, J., SONG, K., BEZPROZVANNAYA, S., CHANG, S., OLSON, E.N., 2006. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 116(7), 1853-1864.
- BAINES, C.P., ZHANG, J., WANG, G.W., ZHENG, Y.T., XIU, J.X., CARDWELL, E.M., BOLLI, R., PING, P., 2002. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circulation research* 90(4), 390-397.
- BARRICK, C.J., ROJAS, M., SCHOONHOVEN, R., SMYTH, S.S., THREADGILL, D.W., 2007. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292(5), H2119-2130.
- BARRY, S.P., DAVIDSON, S.M., TOWNSEND, P.A., 2008. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(10), 2023-2039.
- BEEBE, S.J., 1994. The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Seminars in cancer biology* 5(4), 285-294.
- BENOVIC, J.L., STRASSER, R.H., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., 1986. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(9), 2797-2801.
- BERNARDO, B.C., WEEKS, K.L., PRETORIUS, L., MCMULLEN, J.R., 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics* 128(1), 191-227.
- BERS, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868), 198-205.
- BISHOP, J.E., LINDAHL, G., 1999. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovascular research* 42(1), 27-44.
- BISOGNANO, J.D., WEINBERGER, H.D., BOHLMAYER, T.J., PENDE, A., RAYNOLDS, M.V., SASTRAVAHA, A., RODEN, R., ASANO, K., BLAXALL, B.C., WU, S.C., COMMUNAL, C., SINGH, K., COLUCCI, W., BRISTOW, M.R., PORT, D.J., 2000. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32(5), 817-830.
- BOATRIGHT, K.M., RENATUS, M., SCOTT, F.L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I.M., RICCI, J.E., EDRIS, W.A., SUTHERLIN, D.P., GREEN, D.R., SALVESEN, G.S., 2003. A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* 11(2), 529-541.
- BOATRIGHT, K.M., SALVESEN, G.S., 2003. Caspase activation. *Biochemical Society symposium*(70), 233-242.
- BOGOYEVITCH, M.A., GLENNON, P.E., SUGDEN, P.H., 1993. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS letters* 317(3), 271-275.
- BOLUYT, M.O., BING, O.H., 2000. Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model. *Cardiovascular research* 46(2), 239-249.
- BOSHART, M., WEBER, F., JAHN, G., DORSCH-HASLER, K., FLECKENSTEIN, B., SCHAFFNER, W., 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41(2), 521-530.

- BOSSUYT, J., HELMSTADTER, K., WU, X., CLEMENTS-JEWERY, H., HAWORTH, R.S., AVKIRAN, M., MARTIN, J.L., POGWIZD, S.M., BERS, D.M., 2008. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circulation research* 102(6), 695-702.
- BOULTON, T.G., NYE, S.H., ROBBINS, D.J., IP, N.Y., RADZIEJEWSKA, E., MORGENBESSER, S.D., DEPINHO, R.A., PANAYOTATOS, N., COBB, M.H., YANCOPOULOS, G.D., 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65(4), 663-675.
- BOULTON, T.G., YANCOPOULOS, G.D., GREGORY, J.S., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J., COBB, M.H., 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, N.Y.)* 249(4964), 64-67.
- BOYLE, W.J., VAN DER GEER, P., HUNTER, T., 1991. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods in enzymology* 201, 110-149.
- BRANCACCIO, M., FRATTA, L., NOTTE, A., HIRSCH, E., POULET, R., GUAZZONE, S., DE ACETIS, M., VECCHIONE, C., MARINO, G., ALTRUDA, F., SILENGO, L., TARONE, G., LEMBO, G., 2003. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nature medicine* 9(1), 68-75.
- BRECKENRIDGE, R., 2010. Heart failure and mouse models. *Disease models & mechanisms* 3(3-4), 138-143.
- BREEN, M.E., SOELLNER, M.B., 2015. Small molecule substrate phosphorylation site inhibitors of protein kinases: approaches and challenges. *ACS chemical biology* 10(1), 175-189.
- BRENNAN, D.F., DAR, A.C., HERTZ, N.T., CHAO, W.C., BURLINGAME, A.L., SHOKAT, K.M., BARFORD, D., 2011. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature* 472(7343), 366-369.
- BRONDELLO, J.M., POUYSSEGUR, J., MCKENZIE, F.R., 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)* 286(5449), 2514-2517.
- BRUNET, A., ROUX, D., LENORMAND, P., DOWD, S., KEYSE, S., POUYSSEGUR, J., 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal* 18(3), 664-674.
- BUDAY, L., WARNE, P.H., DOWNWARD, J., 1995. Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos. *Oncogene* 11(7), 1327-1331.
- BUENO, O.F., DE WINDT, L.J., LIM, H.W., TYMITZ, K.M., WITT, S.A., KIMBALL, T.R., MOLKENTIN, J.D., 2001. The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circulation research* 88(1), 88-96.
- BUENO, O.F., DE WINDT, L.J., TYMITZ, K.M., WITT, S.A., KIMBALL, T.R., KLEVITSKY, R., HEWETT, T.E., JONES, S.P., LEFER, D.J., PENG, C.F., KITSIS, R.N., MOLKENTIN, J.D., 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* 19(23), 6341-6350.
- BUENO, O.F., MOLKENTIN, J.D., 2002. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circulation research* 91(9), 776-781.
- BURACK, W.R., SHAW, A.S., 2005. Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *The Journal of biological chemistry* 280(5), 3832-3837.
- BURACK, W.R., STURGILL, T.W., 1997. The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry* 36(20), 5929-5933.
- BURCHFIELD, J.S., XIE, M., HILL, J.A., 2013. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 128(4), 388-400.
- BURNETTE, W.N., 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 112(2), 195-203.

- CANAGARAJAH, B.J., KHOKHLATCHEV, A., COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J., 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90(5), 859-869.
- CASAR, B., PINTO, A., CRESPO, P., 2008. Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell* 31(5), 708-721.
- CASEY, L.M., PISTNER, A.R., BELMONTE, S.L., MIGDALOVICH, D., STOLPNIK, O., NWAKANMA, F.E., VOROBIOF, G., DUNAEVSKY, O., MATAVEL, A., LOPES, C.M., SMRCKA, A.V., BLAXALL, B.C., 2010. Small molecule disruption of G beta gamma signaling inhibits the progression of heart failure. *Circulation research* 107(4), 532-539.
- CATALANOTTI, F., REYES, G., JESENBERGER, V., GALABOVA-KOVACS, G., DE MATOS SIMOES, R., CARUGO, O., BACCARINI, M., 2009. A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nature structural & molecular biology* 16(3), 294-303.
- CAUNT, C.J., KEYSE, S.M., 2013. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* 280(2), 489-504.
- CHADEE, D.N., KYRIAKIS, J.M., 2004a. MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nature cell biology* 6(8), 770-776.
- CHADEE, D.N., KYRIAKIS, J.M., 2004b. A novel role for mixed lineage kinase 3 (MLK3) in B-Raf activation and cell proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 3(10), 1227-1229.
- CHEN, C., OKAYAMA, H., 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology* 7(8), 2745-2752.
- CHEN, H.J., ROJAS-SOTO, M., OGUNI, A., KENNEDY, M.B., 1998. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20(5), 895-904.
- CHEN, R.H., SARNECKI, C., BLENIS, J., 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology* 12(3), 915-927.
- CHEN, Z., GIBSON, T.B., ROBINSON, F., SILVESTRO, L., PEARSON, G., XU, B., WRIGHT, A., VANDERBILT, C., COBB, M.H., 2001. MAP kinases. *Chemical reviews* 101(8), 2449-2476.
- CHENG, H., KARI, G., DICKER, A.P., RODECK, U., KOCH, W.J., FORCE, T., 2011. A novel preclinical strategy for identifying cardiotoxic kinase inhibitors and mechanisms of cardiotoxicity. *Circulation research* 109(12), 1401-1409.
- CHENG, W., LI, B., KAJSTURA, J., LI, P., WOLIN, M.S., SONNENBLICK, E.H., HINTZE, T.H., OLIVETTI, G., ANVERSA, P., 1995. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *The Journal of clinical investigation* 96(5), 2247-2259.
- CHIONG, M., WANG, Z.V., PEDROZO, Z., CAO, D.J., TRONCOSO, R., IBACACHE, M., CRIOLLO, A., NEMCHENKO, A., HILL, J.A., LAVANDERO, S., 2011. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell death & disease* 2, e244.
- CHLOPICKOVA, S., PSOTOVA, J., MIKETOVA, P., 2001. Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 145(2), 49-55.
- CHU, T.F., RUPNICK, M.A., KERKELA, R., DALLABRIDA, S.M., ZURAKOWSKI, D., NGUYEN, L., WOULFE, K., PRAVDA, E., CASSIOLA, F., DESAI, J., GEORGE, S., MORGAN, J.A., HARRIS, D.M., ISMAIL, N.S., CHEN, J.H., SCHOEN, F.J., VAN DEN ABEELE, A.D., DEMETRI, G.D., FORCE, T., CHEN, M.H., 2007. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet (London, England)* 370(9604), 2011-2019.
- CHUDERLAND, D., KONSON, A., SEGER, R., 2008. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell* 31(6), 850-861.
- CHUDERLAND, D., SEGER, R., 2005. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Molecular biotechnology* 29(1), 57-74.
- CIGOLA, E., KAJSTURA, J., LI, B., MEGGS, L.G., ANVERSA, P., 1997. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Experimental cell research* 231(2), 363-371.
- CLAPHAM, D.E., NEER, E.J., 1997. G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37, 167-203.

- CLERK, A., KEMP, T.J., ZOUMPOULIDOU, G., SUGDEN, P.H., 2007. Cardiac myocyte gene expression profiling during H₂O₂-induced apoptosis. *Physiological genomics* 29(2), 118-127.
- CLERK, A., SUGDEN, P.H., 1999. Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. *The American journal of cardiology* 83(12a), 64h-69h.
- COBB, M.H., 1999. MAP kinase pathways. *Progress in biophysics and molecular biology* 71(3-4), 479-500.
- COOPER, J.A., 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* 105(4), 1473-1478.
- CREEMERS, E.E., PINTO, Y.M., 2011. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovascular research* 89(2), 265-272.
- CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W.F., GUTKIND, J.S., 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369(6479), 418-420.
- CREWS, C.M., ALESSANDRINI, A., ERIKSON, R.L., 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science (New York, N.Y.)* 258(5081), 478-480.
- DAUB, H., WEISS, F.U., WALLASCH, C., ULLRICH, A., 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379(6565), 557-560.
- DE ROOIJ, J., ZWARTKRUIS, F.J., VERHEIJEN, M.H., COOL, R.H., NIJMAN, S.M., WITTINGHOFER, A., BOS, J.L., 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396(6710), 474-477.
- DE WINDT, L.J., LIM, H.W., TAIGEN, T., WENCKER, D., CONDORELLI, G., DORN, G.W., 2nd, KITSIS, R.N., MOLKENTIN, J.D., 2000. Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circulation research* 86(3), 255-263.
- DEFEA, K.A., VAUGHN, Z.D., O'BRYAN, E.M., NISHIJIMA, D., DERY, O., BUNNETT, N.W., 2000a. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20), 11086-11091.
- DEFEA, K.A., ZALEVSKY, J., THOMA, M.S., DERY, O., MULLINS, R.D., BUNNETT, N.W., 2000b. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* 148(6), 1267-1281.
- DIEZ, C., SIMM, A., 1998. Gene expression in rod shaped cardiac myocytes, sorted by flow cytometry. *Cardiovascular research* 40(3), 530-537.
- DIKIC, I., TOKIWA, G., LEV, S., COURTNEIDGE, S.A., SCHLESSINGER, J., 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383(6600), 547-550.
- DIRKX, E., DA COSTA MARTINS, P.A., DE WINDT, L.J., 2013. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et biophysica acta* 1832(12), 2414-2424.
- DIWAN, A., DORN, G.W., 2nd, 2007. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda, Md.)* 22, 56-64.
- DORN, G.W., 2nd, BROWN, J.H., 1999. Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends in cardiovascular medicine* 9(1-2), 26-34.
- DORN, G.W., 2nd, ROBBINS, J., SUGDEN, P.H., 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research* 92(11), 1171-1175.
- DUBENDORFF, J.W., STUDIER, F.W., 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology* 219(1), 45-59.
- DUDLEY, D.T., PANG, L., DECKER, S.J., BRIDGES, A.J., SALTIEL, A.R., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(17), 7686-7689.
- EGHBALI, M., WEBER, K.T., 1990. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Molecular and cellular biochemistry* 96(1), 1-14.

- ELLISON, G.M., WARING, C.D., VICINANZA, C., TORELLA, D., 2012. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart (British Cardiac Society)* 98(1), 5-10.
- EMERY, C.M., VIJAYENDRAN, K.G., ZIPSER, M.C., SAWYER, A.M., NIU, L., KIM, J.J., HATTON, C., CHOPRA, R., OBERHOLZER, P.A., KARPOVA, M.B., MACCONAILL, L.E., ZHANG, J., GRAY, N.S., SELLERS, W.R., DUMMER, R., GARRAWAY, L.A., 2009. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(48), 20411-20416.
- EMRICK, M.A., LEE, T., STARKEY, P.J., MUMBY, M.C., RESING, K.A., AHN, N.G., 2006. The gatekeeper residue controls autoactivation of ERK2 via a pathway of intramolecular connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48), 18101-18106.
- ENGELHARDT, S., HEIN, L., WIESMANN, F., LOHSE, M.J., 1999. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12), 7059-7064.
- ENGLISH, J., PEARSON, G., WILSBACHER, J., SWANTEK, J., KARANDIKAR, M., XU, S., COBB, M.H., 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Experimental cell research* 253(1), 255-270.
- ESPOSITO, G., RAPACCIUOLO, A., NAGA PRASAD, S.V., TAKAOKA, H., THOMAS, S.A., KOCH, W.J., ROCKMAN, H.A., 2002. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105(1), 85-92.
- FAGARD, R.H., 1995. Reversibility of left ventricular hypertrophy by antihypertensive drugs. *The Netherlands journal of medicine* 47(4), 173-179.
- FERGUSON, S.S., DOWNEY, W.E., 3rd, COLAPIETRO, A.M., BARAK, L.S., MENARD, L., CARON, M.G., 1996. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science (New York, N.Y.)* 271(5247), 363-366.
- FISCHER, A.H., JACOBSON, K.A., ROSE, J., ZELLER, R., 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols* 2008, pdb.prot4986.
- FISCHMANN, T.O., SMITH, C.K., MAYHOOD, T.W., MYERS, J.E., REICHERT, P., MANNARINO, A., CARR, D., ZHU, H., WONG, J., YANG, R.S., LE, H.V., MADISON, V.S., 2009. Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry* 48(12), 2661-2674.
- FLACHSKAMPF, F.A., 2012. *Kursbuch Echokardiographie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- FLOTTE, T.R., AFIONE, S.A., CONRAD, C., MCGRATH, S.A., SOLOW, R., OKA, H., ZEITLIN, P.L., GUGGINO, W.B., CARTER, B.J., 1993. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22), 10613-10617.
- FORMSTECHE, E., RAMOS, J.W., FAUQUET, M., CALDERWOOD, D.A., HSIEH, J.C., CANTON, B., NGUYEN, X.T., BARNIER, J.V., CAMONIS, J., GINSBERG, M.H., CHNEIWEISS, H., 2001. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Developmental cell* 1(2), 239-250.
- FREY, N., KATUS, H.A., OLSON, E.N., HILL, J.A., 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109(13), 1580-1589.
- FREY, N., OLSON, E.N., 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* 65, 45-79.
- FUKUDA, M., GOTOH, I., GOTOH, Y., NISHIDA, E., 1996. Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH2-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry* 271(33), 20024-20028.
- FUKUDA, M., GOTOH, Y., NISHIDA, E., 1997. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO journal* 16(8), 1901-1908.
- GAITS, F., LI, R.Y., BIGAY, J., RAGAB, A., RAGAB-THOMAS, M.F., CHAP, H., 1996. G-protein beta gamma subunits mediate specific phosphorylation of the protein-tyrosine phosphatase SH-PTP1 induced by lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 271(33), 20151-20155.

- GARDNER, A.M., VAILLANCOURT, R.R., LANGE-CARTER, C.A., JOHNSON, G.L., 1994. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Molecular biology of the cell* 5(2), 193-201.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 119(3), 493-501.
- GERTZ, E.W., WISNESKI, J.A., STANLEY, W.C., NEESE, R.A., 1988. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *The Journal of clinical investigation* 82(6), 2017-2025.
- GJESDAL, O., BLUEMKE, D.A., LIMA, J.A., 2011. Cardiac remodeling at the population level--risk factors, screening, and outcomes. *Nature reviews. Cardiology* 8(12), 673-685.
- GLENNON, P.E., KADDOURA, S., SALE, E.M., SALE, G.J., FULLER, S.J., SUGDEN, P.H., 1996. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circulation research* 78(6), 954-961.
- GLENNON, P.E., SUGDEN, P.H., POOLE-WILSON, P.A., 1995. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *British heart journal* 73(6), 496-499.
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., NAIRN, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36(1), 59-74.
- GROSSMAN, W., JONES, D., MCLAURIN, L.P., 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation* 56(1), 56-64.
- GUSTERSON, R., BRAR, B., FAULKES, D., GIORDANO, A., CHRIVIA, J., LATCHMAN, D., 2002. The transcriptional co-activators CBP and p300 are activated via phenylephrine through the p42/p44 MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* 277(4), 2517-2524.
- HAFNER, S., ADLER, H.S., MISCHAK, H., JANOSCH, P., HEIDECKER, G., WOLFMAN, A., PIPPIG, S., LOHSE, M., UEFFING, M., KOLCH, W., 1994. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Molecular and cellular biology* 14(10), 6696-6703.
- HARARY, I., FARLEY, B., 1963. In vitro studies on single beating rat heart cells. I. Growth and organization. *Experimental cell research* 29, 451-465.
- HARRIS, I.S., ZHANG, S., TRESKOV, I., KOVACS, A., WEINHEIMER, C., MUSLIN, A.J., 2004. Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 110(6), 718-723.
- HATANO, N., MORI, Y., OH-HORA, M., KOSUGI, A., FUJIKAWA, T., NAKAI, N., NIWA, H., MIYAZAKI, J., HAMAOKA, T., OGATA, M., 2003. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8(11), 847-856.
- HATZIVASSILIOU, G., SONG, K., YEN, I., BRANDHUBER, B.J., ANDERSON, D.J., ALVARADO, R., LUDLAM, M.J., STOKOE, D., GLOOR, S.L., VIGERS, G., MORALES, T., ALIAGAS, I., LIU, B., SIDERIS, S., HOEFELICH, K.P., JAISWAL, B.S., SESHAGIRI, S., KOEPPEN, H., BELVIN, M., FRIEDMAN, L.S., MALEK, S., 2010. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464(7287), 431-435.
- HAWES, B.E., LUTTRELL, L.M., VAN BIESEN, T., LEFKOWITZ, R.J., 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 271(21), 12133-12136.
- HAWKES, R., NIDAY, E., GORDON, J., 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical biochemistry* 119(1), 142-147.
- HAYSTEAD, T.A., DENT, P., WU, J., HAYSTEAD, C.M., STURGILL, T.W., 1992. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS letters* 306(1), 17-22.
- HEDIN, K.E., BELL, M.P., HUNTOON, C.J., KARNITZ, L.M., MCKEAN, D.J., 1999. Gi proteins use a novel beta gamma- and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 274(28), 19992-20001.

- HEINEKE, J., MOLKENTIN, J.D., 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(8), 589-600.
- HEINEKE, J., RUETTEN, H., WILLENBOCKEL, C., GROSS, S.C., NAGUIB, M., SCHAEFER, A., KEMPF, T., HILFIKER-KLEINER, D., CARONI, P., KRAFT, T., KAISER, R.A., MOLKENTIN, J.D., DREXLER, H., WOLLERT, K.C., 2005. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5), 1655-1660.
- HEISS, H.W., BARMAYER, J., WINK, K., HELL, G., CERNY, F.J., KEUL, J., REINDELL, H., 1976. Studies on the regulation of myocardial blood flow in man. I.: Training effects on blood flow and metabolism of the healthy heart at rest and during standardized heavy exercise. *Basic research in cardiology* 71(6), 658-675.
- HENGARTNER, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805), 770-776.
- HERRERO, A., PINTO, A., COLON-BOLEA, P., CASAR, B., JONES, M., AGUDO-IBANEZ, L., VIDAL, R., TENBAUM, S.P., NUCIFORO, P., VALDIZAN, E.M., HORVATH, Z., ORFI, L., PINEDA-LUCENA, A., BONY, E., KERI, G., RIVAS, G., PAZOS, A., GOZALBES, R., PALMER, H.G., HURLSTONE, A., CRESPO, P., 2015. Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer cell* 28(2), 170-182.
- HEXIMER, S.P., WATSON, N., LINDER, M.E., BLUMER, K.J., HEPLER, J.R., 1997. RGS2/GOS8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26), 14389-14393.
- HILL, J.A., OLSON, E.N., 2008. Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine* 358(13), 1370-1380.
- HOCH, B., MEYER, R., HETZER, R., KRAUSE, E.G., KARCZEWSKI, P., 1999. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research* 84(6), 713-721.
- HOCHULI, E., DOBELI, H., SCHACHER, A., 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of chromatography* 411, 177-184.
- HOLMSTROM, T.H., SCHMITZ, I., SODERSTROM, T.S., POUKKULA, M., JOHNSON, V.L., CHOW, S.C., KRAMMER, P.H., ERIKSSON, J.E., 2000. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *The EMBO journal* 19(20), 5418-5428.
- HU, J., YU, H., KORNEV, A.P., ZHAO, J., FILBERT, E.L., TAYLOR, S.S., SHAW, A.S., 2011. Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(15), 6067-6072.
- HUFF, J.P., GRANT, B.J., PENNING, C.A., SULLIVAN, K.F., 1990. Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *BioTechniques* 9(5), 570-572, 574, 576-577.
- HUNTER, J.J., TANAKA, N., ROCKMAN, H.A., ROSS, J., Jr., CHIEN, K.R., 1995. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 270(39), 23173-23178.
- IJIMA, Y., LASER, M., SHIRAISHI, H., WILLEY, C.D., SUNDARAVADIVEL, B., XU, L., MCDERMOTT, P.J., KUPPUSWAMY, D., 2002. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 277(25), 23065-23075.
- INAGAKI, K., FUESS, S., STORM, T.A., GIBSON, G.A., MCTIERNAN, C.F., KAY, M.A., NAKAI, H., 2006. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14(1), 45-53.
- ITO, A., SATOH, T., KAZIRO, Y., ITOH, H., 1995. G protein beta gamma subunit activates Ras, Raf, and MAP kinase in HEK 293 cells. *FEBS letters* 368(1), 183-187.
- IWAKI, K., SUKHATME, V.P., SHUBEITA, H.E., CHIEN, K.R., 1990. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *The Journal of biological chemistry* 265(23), 13809-13817.

- IWASE, M., BISHOP, S.P., UECHI, M., VATNER, D.E., SHANNON, R.P., KUDEJ, R.K., WIGHT, D.C., WAGNER, T.E., ISHIKAWA, Y., HOMCY, C.J., VATNER, S.F., 1996. Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circulation research* 78(4), 517-524.
- JAARO, H., RUBINFELD, H., HANOCH, T., SEGER, R., 1997. Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8), 3742-3747.
- JAMUR, M.C., OLIVER, C., 2010. Permeabilization of cell membranes. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 588, 63-66.
- JANSOHN, M., ROTHHÄMEL, S., 2012. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- JARVIUS, M., PAULSSON, J., WEIBRECHT, I., LEUCHOWIUS, K.J., ANDERSSON, A.C., WAHLBY, C., GULLBERG, M., BOTLING, J., SJOBLUM, T., MARKOVA, B., OSTMAN, A., LANDEGREN, U., SODERBERG, O., 2007. In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6(9), 1500-1509.
- JELINEK, T., CATLING, A.D., REUTER, C.W., MOODIE, S.A., WOLFMAN, A., WEBER, M.J., 1994. RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Molecular and cellular biology* 14(12), 8212-8218.
- JHA, S., MORRIS, E.J., HRUZA, A., MANSUETO, M.S., SCHROEDER, G.K., ARBANAS, J., MCMASTERS, D., RESTAINO, C.R., DAYANANTH, P., BLACK, S., ELSÉN, N.L., MANNARINO, A., COOPER, A., FAWELL, S., ZAWEL, L., JAYARAMAN, L., SAMATAR, A.A., 2016. Dissecting Therapeutic Resistance to ERK Inhibition. *Molecular cancer therapeutics* 15(4), 548-559.
- JUNQUEIRA, L.C., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* 11(4), 447-455.
- KABOORD, B., PERR, M., 2008. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 424, 349-364.
- KAMO, T., AKAZAWA, H., KOMURO, I., 2015. Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circulation research* 117(1), 89-98.
- KANG, Y.J., 2006. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death. *Toxicologic pathology* 34(1), 58-66.
- KAPUSCINSKI, J., 1990. Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 38(9), 1323-1329.
- KARLINER, J.S., KAGIYA, T., SIMPSON, P.C., 1990. Effects of pertussis toxin on alpha 1-agonist-mediated phosphatidylinositide turnover and myocardial cell hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Experientia* 46(1), 81-84.
- KEPP, O., GALLUZZI, L., LIPINSKI, M., YUAN, J., KROEMER, G., 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 10(3), 221-237.
- KERKELA, R., GRAZETTE, L., YACOBI, R., ILIESCU, C., PATTEN, R., BEAHM, C., WALTERS, B., SHEVTSOV, S., PESANT, S., CLUBB, F.J., ROSENZWEIG, A., SALOMON, R.N., VAN ETTEN, R.A., ALROY, J., DURAND, J.B., FORCE, T., 2006. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature medicine* 12(8), 908-916.
- KEYSE, S.M., 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer metastasis reviews* 27(2), 253-261.
- KHOKHLATCHEV, A.V., CANAGARAJAH, B., WILSBACHER, J., ROBINSON, M., ATKINSON, M., GOLDSMITH, E., COBB, M.H., 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93(4), 605-615.
- KIDGER, A.M., KEYSE, S.M., 2016. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in cell & developmental biology* 50, 125-132.
- KIM, Y.K., KIM, S.J., YATANI, A., HUANG, Y., CASTELLI, G., VATNER, D.E., LIU, J., ZHANG, Q., DIAZ, G., ZIEBA, R., THAISZ, J., DRUSCO, A., CROCE, C., SADOSHIMA, J., CONDORELLI, G., VATNER, S.F., 2003. Mechanism of

- enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt. *The Journal of biological chemistry* 278(48), 47622-47628.
- KIRCHHEFER, U., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., NEUMANN, J., 1999. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovascular research* 42(1), 254-261.
- KITTA, K., DAY, R.M., KIM, Y., TORREGROZA, I., EVANS, T., SUZUKI, Y.J., 2003. Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 278(7), 4705-4712.
- KLEE, C.B., REN, H., WANG, X., 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *The Journal of biological chemistry* 273(22), 13367-13370.
- KNIGHTON, D.R., ZHENG, J.H., TEN EYCK, L.F., ASHFORD, V.A., XUONG, N.H., TAYLOR, S.S., SOWADSKI, J.M., 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* 253(5018), 407-414.
- KNOLL, R., HOSHIIJIMA, M., CHIEN, K., 2003. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 81(12), 750-756.
- KNOWLTON, K.U., BARACCHINI, E., ROSS, R.S., HARRIS, A.N., HENDERSON, S.A., EVANS, S.M., GLEMBOTSKI, C.C., CHIEN, K.R., 1991. Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *The Journal of biological chemistry* 266(12), 7759-7768.
- KOCH, W.J., HAWES, B.E., ALLEN, L.F., LEFKOWITZ, R.J., 1994. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(26), 12706-12710.
- KODAMA, H., FUKUDA, K., PAN, J., SANO, M., TAKAHASHI, T., KATO, T., MAKINO, S., MANABE, T., MURATA, M., OGAWA, S., 2000. Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279(4), H1635-1644.
- KONG, P., CHRISTIA, P., FRANGOIANNIS, N.G., 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71(4), 549-574.
- KONSTANTINIDIS, K., WHELAN, R.S., KITSIS, R.N., 2012. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(7), 1552-1562.
- KORNEV, A.P., HASTE, N.M., TAYLOR, S.S., EYCK, L.F., 2006. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47), 17783-17788.
- KORNEV, A.P., TAYLOR, S.S., 2010. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochimica et biophysica acta* 1804(3), 440-444.
- KOSTIN, S., POOL, L., ELSASSER, A., HEIN, S., DREXLER, H.C., ARNON, E., HAYAKAWA, Y., ZIMMERMANN, R., BAUER, E., KLOVEKORN, W.P., SCHAPER, J., 2003. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circulation research* 92(7), 715-724.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., BRENNER, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87(1), 99-163.
- KUNAPULI, S., ROSANIO, S., SCHWARZ, E.R., 2006. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *Journal of cardiac failure* 12(5), 381-391.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- LANDSCHULZ, W.H., JOHNSON, P.F., MCKNIGHT, S.L., 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)* 240(4860), 1759-1764.
- LATEK, D., MODZELEWSKA, A., TRZASKOWSKI, B., PALCZEWSKI, K., FILIPEK, S., 2012. G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta biochimica Polonica* 59(4), 515-529.

- LATORRACA, N.R., VENKATAKRISHNAN, A.J., DROR, R.O., 2017. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical reviews* 117(1), 139-155.
- LAUGHLIN, M.H., BOWLES, D.K., DUNCKER, D.J., 2012. The coronary circulation in exercise training. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302(1), H10-23.
- LAURENT, A.C., BISSERIER, M., LUCAS, A., TORTOSA, F., ROUMIEUX, M., DE REGIBUS, A., SWIADER, A., SAINTE-MARIE, Y., HEYMES, C., VINDIS, C., LEZOUALC'H, F., 2015. Exchange protein directly activated by cAMP 1 promotes autophagy during cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular research* 105(1), 55-64.
- LAVAUUR, J., BERNARD, F., TRIFILIEFF, P., PASCOLI, V., KAPPES, V., PAGES, C., VANHOUTTE, P., CABOCHE, J., 2007. A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(52), 14448-14458.
- LEE, H.R., HENDERSON, S.A., REYNOLDS, R., DUNNMON, P., YUAN, D., CHIEN, K.R., 1988. Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 263(15), 7352-7358.
- LEEVERS, S.J., PATERSON, H.F., MARSHALL, C.J., 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369(6479), 411-414.
- LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J., LENORMAND, P., 2008. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and cellular biology* 28(1), 511-527.
- LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J., LENORMAND, P., 2009. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8(5), 705-711.
- LEGOCKI, R.P., VERMA, D.P., 1981. Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Analytical biochemistry* 111(2), 385-392.
- LEHMANN, L.H., WORST, B.C., STANMORE, D.A., BACKS, J., 2014. Histone deacetylase signaling in cardioprotection. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(9), 1673-1690.
- LEITE, M.F., PAGE, E., AMBLER, S.K., 1994. Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *The American journal of physiology* 267(6 Pt 2), H2193-2203.
- LEMMON, M.A., SCHLESSINGER, J., 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7), 1117-1134.
- LENORMAND, P., BRONDELLO, J.M., BRUNET, A., POUYSSEGUR, J., 1998. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *The Journal of cell biology* 142(3), 625-633.
- LEVY, D., GARRISON, R.J., SAVAGE, D.D., KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P., 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine* 322(22), 1561-1566.
- LEY, R., BALMANN, K., HADFIELD, K., WESTON, C., COOK, S.J., 2003. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *The Journal of biological chemistry* 278(21), 18811-18816.
- LI, S., SEDIVY, J.M., 1993. Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(20), 9247-9251.
- LI, X., HUANG, Y., JIANG, J., FRANK, S.J., 2008. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular signalling* 20(11), 2145-2155.
- LIANG, F., LU, S., GARDNER, D.G., 2000. Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 35(1 Pt 2), 188-192.

- LIANG, Q., WIESE, R.J., BUENO, O.F., DAI, Y.S., MARKHAM, B.E., MOLKENTIN, J.D., 2001. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Molecular and cellular biology* 21(21), 7460-7469.
- LIANG, Y., SHEIKH, F., 2016. Scaffold Proteins Regulating Extracellular Regulated Kinase Function in Cardiac Hypertrophy and Disease. *Frontiers in pharmacology* 7, 37.
- LIDKE, D.S., HUANG, F., POST, J.N., RIEGER, B., WILSBACHER, J., THOMAS, J.L., POUYSSEUR, J., JOVIN, T.M., LENORMAND, P., 2010. ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285(5), 3092-3102.
- LIEVRE, A., BACHET, J.B., BOIGE, V., CAYRE, A., LE CORRE, D., BUC, E., YCHOU, M., BOUCHE, O., LANDI, B., LOUVET, C., ANDRE, T., BIBEAU, F., DIEBOLD, M.D., ROUGIER, P., DUCREUX, M., TOMASIC, G., EMILE, J.F., PENAULT-LLORCA, F., LAURENT-PUIG, P., 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(3), 374-379.
- LIPS, D.J., BUENO, O.F., WILKINS, B.J., PURCELL, N.H., KAISER, R.A., LORENZ, J.N., VOISIN, L., SABA-EL-LEIL, M.K., MELOCHE, S., POUYSSEUR, J., PAGES, G., DE WINDT, L.J., DOEVENDANS, P.A., MOLKENTIN, J.D., 2004. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation* 109(16), 1938-1941.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4), 402-408.
- LIVINGSTONE, E., ZIMMER, L., VAUBEL, J., SCHADENDORF, D., 2014. BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management. *Chinese clinical oncology* 3(3), 29.
- LOHSE, M.J., 1993. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochimica et biophysica acta* 1179(2), 171-188.
- LOHSE, M.J., ANDEXINGER, S., PITCHER, J., TRUKAWINSKI, S., CODINA, J., FAURE, J.P., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., 1992. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry* 267(12), 8558-8564.
- LOHSE, M.J., BENOVIC, J.L., CODINA, J., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)* 248(4962), 1547-1550.
- LOHSE, M.J., HOFFMANN, C., 2014. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. *Handbook of experimental pharmacology* 219, 15-56.
- LONG, C.S., 1996. Autocrine and Paracrine Regulation of Myocardial Cell Growth in Vitro The TGFbeta Paradigm. *Trends in cardiovascular medicine* 6(7), 217-226.
- LONG, C.S., ORDAHL, C.P., SIMPSON, P.C., 1989. Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 83(3), 1078-1082.
- LORENZ, K., LOHSE, M.J., QUITTERER, U., 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426(6966), 574-579.
- LORENZ, K., SCHMITT, J.P., SCHMITTECKERT, E.M., LOHSE, M.J., 2009a. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15(1), 75-83.
- LORENZ, K., SCHMITT, J.P., VIDAL, M., LOHSE, M.J., 2009b. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(12), 2351-2355.
- LOYTER, A., SCANGOS, G., JURICEK, D., KEENE, D., RUDDLE, F.H., 1982. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Experimental cell research* 139(1), 223-234.
- LUCIANO, F., JACQUEL, A., COLOSETTI, P., HERRANT, M., CAGNOL, S., PAGES, G., AUBERGER, P., 2003. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22(43), 6785-6793.
- LUSCHER, B., LARSSON, L.G., 1999. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18(19), 2955-2966.

- LUTHMAN, H., MAGNUSSON, G., 1983. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic acids research* 11(5), 1295-1308.
- LYON, R.C., ZANELLA, F., OMENS, J.H., SHEIKH, F., 2015. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circulation research* 116(8), 1462-1476.
- MAILLET, M., VAN BERLO, J.H., MOLKENTIN, J.D., 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(1), 38-48.
- MAO, F., LEUNG, W.Y., XIN, X., 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC biotechnology* 7, 76.
- MARSHALL, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80(2), 179-185.
- MASON, J.T., O'LEARY, T.J., 1991. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39(2), 225-229.
- MATALLANAS, D., CRESPO, P., 2010. New druggable targets in the Ras pathway? *Current opinion in molecular therapeutics* 12(6), 674-683.
- MATHEW, J., SLEIGHT, P., LONN, E., JOHNSTONE, D., POGUE, J., YI, Q., BOSCH, J., SUSSEX, B., PROBSTFIELD, J., YUSUF, S., 2001. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation* 104(14), 1615-1621.
- MATSUBAYASHI, Y., FUKUDA, M., NISHIDA, E., 2001. Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *The Journal of biological chemistry* 276(45), 41755-41760.
- MATSUI, T., LI, L., WU, J.C., COOK, S.A., NAGOSHI, T., PICARD, M.H., LIAO, R., ROSENZWEIG, A., 2002. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* 277(25), 22896-22901.
- MATTIAZZI, A., BASSANI, R.A., ESCOBAR, A.L., PALOMEQUE, J., VALVERDE, C.A., VILA PETROFF, M., BERS, D.M., 2015. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 308(10), H1177-1191.
- MATTINGLY, R.R., MACARA, I.G., 1996. Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature* 382(6588), 268-272.
- MAURER, G., TARKOWSKI, B., BACCARINI, M., 2011. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30(32), 3477-3488.
- MAZIA, D., SCHATTEN, G., SALE, W., 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *The Journal of cell biology* 66(1), 198-200.
- MCKINSEY, T.A., ZHANG, C.L., OLSON, E.N., 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in biochemical sciences* 27(1), 40-47.
- McMULLEN, J.R., SHIOI, T., HUANG, W.Y., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., BISPING, E., SCHINKE, M., KONG, S., SHERWOOD, M.C., BROWN, J., RIGGI, L., KANG, P.M., IZUMO, S., 2004. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *The Journal of biological chemistry* 279(6), 4782-4793.
- McMULLEN, J.R., SHIOI, T., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., SHERWOOD, M.C., KANG, P.M., IZUMO, S., 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21), 12355-12360.
- McREYNOLDS, A.C., KARRA, A.S., LI, Y., LOPEZ, E.D., TURJANSKI, A.G., DIOUM, E., LORENZ, K., ZAGANJOR, E., STIPPEC, S., MCGLYNN, K., EARNEST, S., COBB, M.H., 2016. Phosphorylation or Mutation of the ERK2 Activation Loop Alters Oligonucleotide Binding. *Biochemistry* 55(12), 1909-1917.
- MEERSON, F.Z., 1961. On the mechanism of compensatory hyperfunction and insufficiency of the heart. *Cor et vasa* 3, 161-177.

- METRICH, M., LUCAS, A., GASTINEAU, M., SAMUEL, J.L., HEYMES, C., MOREL, E., LEZOUALC'H, F., 2008. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* 102(8), 959-965.
- MISCHAK, H., SEITZ, T., JANOSCH, P., EULITZ, M., STEEN, H., SCHELLERER, M., PHILIPP, A., KOLCH, W., 1996. Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Molecular and cellular biology* 16(10), 5409-5418.
- MITCHELL, S., OTA, A., FOSTER, W., ZHANG, B., FANG, Z., PATEL, S., NELSON, S.F., HORVATH, S., WANG, Y., 2006. Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiological genomics* 25(1), 50-59.
- MOCHIZUKI, N., OHBA, Y., KIYOKAWA, E., KURATA, T., MURAKAMI, T., OZAKI, T., KITABATAKE, A., NAGASHIMA, K., MATSUDA, M., 1999. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* 400(6747), 891-894.
- MOE, G.W., MARIN-GARCIA, J., 2016. Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart failure reviews* 21(2), 157-167.
- MOLKENTIN, J.D., JOBE, S.M., MARKHAM, B.E., 1996. Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28(6), 1211-1225.
- MOLKENTIN, J.D., LU, J.R., ANTOS, C.L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S.R., OLSON, E.N., 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2), 215-228.
- MONTAGUT, C., SETTLEMAN, J., 2009. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer letters* 283(2), 125-134.
- MORIMOTO, T., HASEGAWA, K., KABURAGI, S., KAKITA, T., WADA, H., YANAZUME, T., SASAYAMA, S., 2000. Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 275(18), 13721-13726.
- MORISCO, C., SETA, K., HARDT, S.E., LEE, Y., VATNER, S.F., SADOSHIMA, J., 2001. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 276(30), 28586-28597.
- MORRIS, E.J., JHA, S., RESTAINO, C.R., DAYANANTH, P., ZHU, H., COOPER, A., CARR, D., DENG, Y., JIN, W., BLACK, S., LONG, B., LIU, J., DINUNZIO, E., WINDSOR, W., ZHANG, R., ZHAO, S., ANGAGAW, M.H., PINHEIRO, E.M., DESAI, J., XIAO, L., SHIPPS, G., HRUZA, A., WANG, J., KELLY, J., PALIWAL, S., GAO, X., BABU, B.S., ZHU, L., DAUBLAIN, P., ZHANG, L., LUTTERBACH, B.A., PELLETIER, M.R., PHILIPPAR, U., SILIPHAIVANH, P., WITTER, D., KIRSCHMEIER, P., BISHOP, W.R., HICKLIN, D., GILLILAND, D.G., JAYARAMAN, L., ZAWEL, L., FAWELL, S., SAMATAR, A.A., 2013. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer discovery* 3(7), 742-750.
- MORRISON, D.K., 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of cell science* 114(Pt 9), 1609-1612.
- MULLER, J., ORY, S., COPELAND, T., PIWNICA-WORMS, H., MORRISON, D.K., 2001. C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Molecular cell* 8(5), 983-993.
- MURPHY, L.O., SMITH, S., CHEN, R.H., FINGAR, D.C., BLENIS, J., 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature cell biology* 4(8), 556-564.
- MUSLIN, A.J., 2008. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clinical science (London, England : 1979)* 115(7), 203-218.
- MUTLAK, M., KEHAT, I., 2015. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Frontiers in pharmacology* 6, 149.
- NAG, A.C., 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28(109), 41-61.
- NAKAGAWA, O., OGAWA, Y., ITOH, H., SUGA, S., KOMATSU, Y., KISHIMOTO, I., NISHINO, K., YOSHIMASA, T., NAKAO, K., 1995. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *The Journal of clinical investigation* 96(3), 1280-1287.

- NAOR, Z., BENARD, O., SEGER, R., 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 11(3), 91-99.
- NERI SERNERI, G.G., BODDI, M., MODESTI, P.A., CECIONI, I., COPPO, M., PADELETTI, L., MICHELUCCI, A., COLELLA, A., GALANTI, G., 2001. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circulation research* 89(11), 977-982.
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6), 255-262.
- NGUYEN, T.T., SCIMECA, J.C., FILLOUX, C., PERALDI, P., CARPENTIER, J.L., VAN OBBERGHEN, E., 1993. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* 268(13), 9803-9810.
- NICHOLS, A., CAMPS, M., GILLIERON, C., CHABERT, C., BRUNET, A., WILSBACHER, J., COBB, M., POUYSSEGUR, J., SHAW, J.P., ARKINSTALL, S., 2000. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *The Journal of biological chemistry* 275(32), 24613-24621.
- NICOL, R.L., FREY, N., OLSON, E.N., 2000. From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annual review of genomics and human genetics* 1, 179-223.
- NUBER, S., ZABEL, U., LORENZ, K., NUBER, A., MILLIGAN, G., TOBIN, A.B., LOHSE, M.J., HOFFMANN, C., 2016. beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature* 531(7596), 661-664.
- NUNES-XAVIER, C.E., TARREGA, C., CEJUDO-MARIN, R., FRIJHOFF, J., SANDIN, A., OSTMAN, A., PULIDO, R., 2010. Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester. *The Journal of biological chemistry* 285(34), 26417-26430.
- NUNN, C., ZOU, M.X., SOBIESIAK, A.J., ROY, A.A., KIRSHENBAUM, L.A., CHIDIAC, P., 2010. RGS2 inhibits beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cellular signalling* 22(8), 1231-1239.
- O'CONNOR, L., STRASSER, A., O'REILLY, L.A., HAUSMANN, G., ADAMS, J.M., CORY, S., HUANG, D.C., 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal* 17(2), 384-395.
- OGATA, K., ARAKAWA, M., KASAHARA, T., SHIOIRI-NAKANO, K., HIRAOKA, K., 1983. Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *Journal of immunological methods* 65(1-2), 75-82.
- OKA, T., AKAZAWA, H., NAITO, A.T., KOMURO, I., 2014. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circulation research* 114(3), 565-571.
- OLDHAM, W.M., HAMM, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(1), 60-71.
- OLSON, E.N., 2004. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nature medicine* 10(5), 467-474.
- PACAK, C.A., MAH, C.S., THATTALIYATH, B.D., CONLON, T.J., LEWIS, M.A., CLOUTIER, D.E., ZOLOTUKHIN, I., TARANTAL, A.F., BYRNE, B.J., 2006. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circulation research* 99(4), e3-9.
- PARRIZAS, M., SALTIEL, A.R., LEROITH, D., 1997. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry* 272(1), 154-161.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B.E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K., COBB, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22(2), 153-183.

- PELLICCIA, A., MARON, B.J., SPATARO, A., PROSCHAN, M.A., SPIRITO, P., 1991. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *The New England journal of medicine* 324(5), 295-301.
- PELLICCIA, A., SPATARO, A., GRANATA, M., BIFFI, A., CASELLI, G., ALABISO, A., 1990. Coronary arteries in physiological hypertrophy: echocardiographic evidence of increased proximal size in elite athletes. *International journal of sports medicine* 11(2), 120-126.
- PERRINO, C., NAGA PRASAD, S.V., MAO, L., NOMA, T., YAN, Z., KIM, H.S., SMITHIES, O., ROCKMAN, H.A., 2006. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *The Journal of clinical investigation* 116(6), 1547-1560.
- PIERCE, K.L., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3(9), 639-650.
- PLEGER, S.T., SHAN, C., KSIENZYK, J., BEKEREDJIAN, R., BOEKSTEGERS, P., HINKEL, R., SCHINKEL, S., LEUCHS, B., LUDWIG, J., QIU, G., WEBER, C., RAAKE, P., KOCH, W.J., KATUS, H.A., MULLER, O.J., MOST, P., 2011. Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Science translational medicine* 3(92), 92ra64.
- PLOTNIKOV, A., FLORES, K., MAIK-RACHLINE, G., ZEHORAI, E., KAPRI-PARDES, E., BERTI, D.A., HANOCH, T., BESSER, M.J., SEGER, R., 2015. The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target. *Nature communications* 6, 6685.
- PONIKOWSKI, P., VOORS, A.A., ANKER, S.D., BUENO, H., CLELAND, J.G., COATS, A.J., FALK, V., GONZALEZ-JUANATEY, J.R., HARJOLA, V.P., JANKOWSKA, E.A., JESSUP, M., LINDE, C., NIHOYANNOPOULOS, P., PARISSIS, J.T., PIESKE, B., RILEY, J.P., ROSANO, G.M., RUILOPE, L.M., RUSCHITZKA, F., RUTTEN, F.H., VAN DER MEER, P., 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European journal of heart failure* 18(8), 891-975.
- POULIKAKOS, P.I., ZHANG, C., BOLLAG, G., SHOKAT, K.M., ROSEN, N., 2010. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464(7287), 427-430.
- POUYSSÉGUR, J., VOLMAT, V., LENORMAND, P., 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical pharmacology* 64(5-6), 755-763.
- PRATILAS, C.A., SOLIT, D.B., 2010. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16(13), 3329-3334.
- PRINEAS, R.J., RAUTAHARJU, P.M., GRANDITS, G., CROW, R., 2001. Independent risk for cardiovascular disease predicted by modified continuous score electrocardiographic criteria for 6-year incidence and regression of left ventricular hypertrophy among clinically disease free men: 16-year follow-up for the multiple risk factor intervention trial. *Journal of electrocardiology* 34(2), 91-101.
- PURCELL, N.H., WILKINS, B.J., YORK, A., SABA-ÉL-LEIL, M.K., MELOCHE, S., ROBBINS, J., MOKKENTIN, J.D., 2007. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(35), 14074-14079.
- RAJAKULENDRAN, T., SAHMI, M., LEFRANCOIS, M., SICHERI, F., THERRIEN, M., 2009. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 461(7263), 542-545.
- RAJEWSKY, M.F., 1966. [Cell proliferation in normal and malignant tissues: H3-thymidine incorporation in vitro under standard conditions]. *Biophysik* 3(1), 65-93.
- RAMAN, M., CHEN, W., COBB, M.H., 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26(22), 3100-3112.
- RAMOS, J.W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(12), 2707-2719.
- RAPACCIUOLO, A., ESPOSITO, G., CARON, K., MAO, L., THOMAS, S.A., ROCKMAN, H.A., 2001. Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 38(3), 876-882.

- RAY, L.B., STURGILL, T.W., 1987. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(6), 1502-1506.
- RESZKA, A.A., SEGER, R., DILTZ, C.D., KREBS, E.G., FISCHER, E.H., 1995. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19), 8881-8885.
- RITT, D.A., MONSON, D.M., SPECHT, S.I., MORRISON, D.K., 2010. Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Molecular and cellular biology* 30(3), 806-819.
- ROBBINS, D.J., ZHEN, E., OWAKI, H., VANDERBILT, C.A., EBERT, D., GEPPERT, T.D., COBB, M.H., 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268(7), 5097-5106.
- ROBERTS, P.J., DER, C.J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26(22), 3291-3310.
- RÖCKEN, C., 2008. Molekulare Targets beim Kolonkarzinom. *Der Pathologe* 29(2), 200-203.
- ROCKMAN, H.A., ROSS, R.S., HARRIS, A.N., KNOWLTON, K.U., STEINHELPER, M.E., FIELD, L.J., ROSS, J., Jr., CHIEN, K.R., 1991. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(18), 8277-8281.
- ROHINI, A., AGRAWAL, N., KOYANI, C.N., SINGH, R., 2010. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological research* 61(4), 269-280.
- ROMEO, Y., ZHANG, X., ROUX, P.P., 2012. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochemical journal* 441(2), 553-569.
- ROMERO-CALVO, I., OCON, B., MARTINEZ-MOYA, P., SUAREZ, M.D., ZARZUELO, A., MARTINEZ-AUGUSTIN, O., DE MEDINA, F.S., 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical biochemistry* 401(2), 318-320.
- ROSENTHAL, N., KORNHAUSER, J.M., DONOGHUE, M., ROSEN, K.M., MERLIE, J.P., 1989. Myosin light chain enhancer activates muscle-specific, developmentally regulated gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(20), 7780-7784.
- ROSKOSKI, R., Jr., 2012a. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* 66(2), 105-143.
- ROSKOSKI, R., Jr., 2012b. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 417(1), 5-10.
- ROSS, R.S., BORG, T.K., 2001. Integrins and the myocardium. *Circulation research* 88(11), 1112-1119.
- RUPPERT, C., DEISS, K., HERRMANN, S., VIDAL, M., OEZKUR, M., GORSKI, A., WEIDEMANN, F., LOHSE, M.J., LORENZ, K., 2013. Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(18), 7440-7445.
- RUSHWORTH, L.K., HINDLEY, A.D., O'NEILL, E., KOLCH, W., 2006. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and cellular biology* 26(6), 2262-2272.
- SABA-EL-LEIL, M.K., VELLA, F.D., VERNAY, B., VOISIN, L., CHEN, L., LABRECQUE, N., ANG, S.L., MELOCHE, S., 2003. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO reports* 4(10), 964-968.
- SABBAH, H.N., SHAROV, V.G., LESCH, M., GOLDSTEIN, S., 1995. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Molecular and cellular biochemistry* 147(1-2), 29-34.
- SADOSHIMA, J., IZUMO, S., 1993. Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circulation research* 73(3), 424-438.

- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239(4839), 487-491.
- SAMAK, M., FATULLAYEV, J., SABASHNIKOV, A., ZERIOUH, M., SCHMACK, B., FARAG, M., POPOV, A.F., DOHMEN, P.M., CHOI, Y.H., WAHLERS, T., WEYMANN, A., 2016. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Medical science monitor basic research* 22, 75-79.
- SAMATAR, A.A., POULIKAKOS, P.I., 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature reviews. Drug discovery* 13(12), 928-942.
- SANNA, B., BUENO, O.F., DAI, Y.S., WILKINS, B.J., MOLKENTIN, J.D., 2005. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Molecular and cellular biology* 25(3), 865-878.
- SCHAEFFER, H.J., CATLING, A.D., EBLEN, S.T., COLLIER, L.S., KRAUSS, A., WEBER, M.J., 1998. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science (New York, N.Y.)* 281(5383), 1668-1671.
- SCHENBORN, E.T., GOIFFON, V., 2000a. Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 130, 135-145.
- SCHENBORN, E.T., GOIFFON, V., 2000b. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 130, 147-153.
- SCHIATTARELLA, G.G., HILL, J.A., 2015. Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. *Circulation* 131(16), 1435-1447.
- SCHLESSINGER, J., 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2), 211-225.
- SCHMID, E., NEEF, S., BERLIN, C., TOMASOVIC, A., KAHLERT, K., NORDBECK, P., DEISS, K., DENZINGER, S., HERRMANN, S., WETTWER, E., WEIDENDORFER, M., BECKER, D., SCHAFFER, F., WAGNER, N., ERGUN, S., SCHMITT, J.P., KATUS, H.A., WEIDEMANN, F., RAVENS, U., MAACK, C., HEIN, L., ERTL, G., MULLER, O.J., MAIER, L.S., LOHSE, M.J., LORENZ, K., 2015. Cardiac RKIP induces a beneficial beta-adrenoceptor-dependent positive inotropy. *Nature medicine* 21(11), 1298-1306.
- SCHMIEDER, R.E., MESSERLI, F.H., STURGILL, D., GARAVAGLIA, G.E., NUNEZ, B.D., 1989. Cardiac performance after reduction of myocardial hypertrophy. *The American journal of medicine* 87(1), 22-27.
- SCHMITT, J.P., SEMSARIAN, C., ARAD, M., GANNON, J., AHMAD, F., DUFFY, C., LEE, R.T., SEIDMAN, C.E., SEIDMAN, J.G., 2003. Consequences of pressure overload on sarcomere protein mutation-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 108(9), 1133-1138.
- SEBOLT-LEOPOLD, J.S., 2008. Advances in the development of cancer therapeutics directed against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(12), 3651-3656.
- SEGER, R., KREBS, E.G., 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9(9), 726-735.
- SEGER, R., SEGER, D., LOZEMAN, F.J., AHN, N.G., GRAVES, L.M., CAMPBELL, J.S., ERICSSON, L., HARRYLOCK, M., JENSEN, A.M., KREBS, E.G., 1992. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *The Journal of biological chemistry* 267(36), 25628-25631.
- SHAUL, Y.D., SEGER, R., 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta* 1773(8), 1213-1226.
- SHENG, Z., KNOWLTON, K., CHEN, J., HOSHIJIMA, M., BROWN, J.H., CHIEN, K.R., 1997. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 272(9), 5783-5791.
- SHIMAMURA, A., BALLIF, B.A., RICHARDS, S.A., BLENIS, J., 2000. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Current biology* : CB 10(3), 127-135.
- SHIMIZU, I., MINAMINO, T., 2016. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 97, 245-262.

- SHIOI, T., KANG, P.M., DOUGLAS, P.S., HAMPE, J., YBALLE, C.M., LAWITTS, J., CANTLEY, L.C., IZUMO, S., 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *The EMBO journal* 19(11), 2537-2548.
- SHIOI, T., MCMULLEN, J.R., KANG, P.M., DOUGLAS, P.S., OBATA, T., FRANKE, T.F., CANTLEY, L.C., IZUMO, S., 2002. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 22(8), 2799-2809.
- SHIOJIMA, I., SATO, K., IZUMIYA, Y., SCHIEKOFER, S., ITO, M., LIAO, R., COLUCCI, W.S., WALSH, K., 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation* 115(8), 2108-2118.
- SIMON, M.I., STRATHMANN, M.P., GAUTAM, N., 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)* 252(5007), 802-808.
- SINGH, K., COMMUNAL, C., SAWYER, D.B., COLUCCI, W.S., 2000. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovascular research* 45(3), 713-719.
- SLAMON, D.J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., BASELGA, J., NORTON, L., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344(11), 783-792.
- SLUPSKY, J.R., QUITTERER, U., WEBER, C.K., GIERSCHIK, P., LOHSE, M.J., RAPP, U.R., 1999. Binding of Gbetagamma subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Current biology : CB* 9(17), 971-974.
- SMITH, D.B., JOHNSON, K.S., 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67(1), 31-40.
- SMITH, J.A., POTEET-SMITH, C.E., MALARKEY, K., STURGILL, T.W., 1999. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *The Journal of biological chemistry* 274(5), 2893-2898.
- SODERSTROM, T.S., POUKKULA, M., HOLMSTROM, T.H., HEISKANEN, K.M., ERIKSSON, J.E., 2002. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169(6), 2851-2860.
- SONTAG, E., FEDOROV, S., KAMIBAYASHI, C., ROBBINS, D., COBB, M., MUMBY, M., 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75(5), 887-897.
- SPINALE, F.G., 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiological reviews* 87(4), 1285-1342.
- STATISTISCHES BUNDEASAMT, 2014. <<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle/n/HaeufigsteTodesursachen.html>>.
- STATISTISCHES BUNDEASAMT, 2016. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online;jsessionid=3AA81870259F324F089D163DA102830B.tomcat_GO_1_2?operation=previous&levelindex=2&levelid=1472472800029&step=2> (accessed 29.08.2016).
- STEFANOVSKY, V.Y., PELLETIER, G., HANNAN, R., GAGNON-KUGLER, T., ROTHBLUM, L.I., MOSS, T., 2001. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Molecular cell* 8(5), 1063-1073.
- STOKOE, D., MACDONALD, S.G., CADWALLADER, K., SYMONS, M., HANCOCK, J.F., 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science (New York, N.Y.)* 264(5164), 1463-1467.
- SUGDEN, P.H., CLERK, A., 2006. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxidants & redox signaling* 8(11-12), 2111-2124.
- SUNAHARA, R.K., DESSAUER, C.W., GILMAN, A.G., 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 36, 461-480.

- SUSSMAN, M.A., LIM, H.W., GUDE, N., TAIGEN, T., OLSON, E.N., ROBBINS, J., COLBERT, M.C., GUALBERTO, A., WIECZOREK, D.F., MOKKENTIN, J.D., 1998. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science (New York, N.Y.)* 281(5383), 1690-1693.
- SUTTON, M.G., SHARPE, N., 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101(25), 2981-2988.
- SWYNGHEDAUW, B., 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 79(1), 215-262.
- TAKEISHI, Y., HUANG, Q., ABE, J., GLASSMAN, M., CHE, W., LEE, J.D., KAWAKATSU, H., LAWRENCE, E.G., HOIT, B.D., BERK, B.C., WALSH, R.A., 2001. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33(9), 1637-1648.
- TAKIMOTO, E., KOITABASHI, N., HSU, S., KETNER, E.A., ZHANG, M., NAGAYAMA, T., BEDJA, D., GABRIELSON, K.L., BLANTON, R., SIDEROVSKI, D.P., MENDELSON, M.E., KASS, D.A., 2009. Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *The Journal of clinical investigation* 119(2), 408-420.
- TAYLOR, S.S., KORNEV, A.P., 2011. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in biochemical sciences* 36(2), 65-77.
- TEIGER, E., THAN, V.D., RICHARD, L., WISNEWSKY, C., TEA, B.S., GABOURY, L., TREMBLAY, J., SCHWARTZ, K., HAMET, P., 1996. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *The Journal of clinical investigation* 97(12), 2891-2897.
- TEIS, D., WUNDERLICH, W., HUBER, L.A., 2002. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental cell* 3(6), 803-814.
- TERRY, L.J., SHOWS, E.B., WENTE, S.R., 2007. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science (New York, N.Y.)* 318(5855), 1412-1416.
- THAM, Y.K., BERNARDO, B.C., OOI, J.Y., WEEKS, K.L., MCMULLEN, J.R., 2015. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Archives of toxicology* 89(9), 1401-1438.
- THAVARAJAH, R., MUDIMBAIMANNAR, V.K., ELIZABETH, J., RAO, U.K., RANGANATHAN, K., 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 16(3), 400-405.
- THIEDEMANN, K.U., HOLUBARSCH, C., MEDUGORAC, I., JACOB, R., 1983. Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basic research in cardiology* 78(2), 140-155.
- TOHGO, A., PIERCE, K.L., CHOY, E.W., LEFKOWITZ, R.J., LUTTRELL, L.M., 2002. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry* 277(11), 9429-9436.
- TOL, J., PUNT, C.J., 2010. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clinical therapeutics* 32(3), 437-453.
- TORII, S., KUSAKABE, M., YAMAMOTO, T., MAEKAWA, M., NISHIDA, E., 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Developmental cell* 7(1), 33-44.
- TRAVERS, J.G., KAMAL, F.A., ROBBINS, J., YUTZEY, K.E., BLAXALL, B.C., 2016. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circulation research* 118(6), 1021-1040.
- TROPPEMIR, J., RAPP, U.R., 2003. Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochemical pharmacology* 66(8), 1341-1345.
- ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2), 203-212.

- VALKS, D.M., COOK, S.A., PHAM, F.H., MORRISON, P.R., CLERK, A., SUGDEN, P.H., 2002. Phenylephrine promotes phosphorylation of Bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase A. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34(7), 749-763.
- VAN BERLO, J.H., MAILLET, M., MOLKENTIN, J.D., 2013. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of clinical investigation* 123(1), 37-45.
- VAN BIESEN, T., LUTTRELL, L.M., HAWES, B.E., LEFKOWITZ, R.J., 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 17(6), 698-714.
- VAN BILSEN, M., VAN NIEUWENHOVEN, F.A., VAN DER VUSSE, G.J., 2009. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovascular research* 81(3), 420-428.
- VAN DEN HOFF, M.J., LABRUYERE, W.T., MOORMAN, A.F., LAMERS, W.H., 1993. Mammalian gene expression is improved by use of a longer SV40 early polyadenylation cassette. *Nucleic acids research* 21(21), 4987-4988.
- VAN DER GEER, P., HUNTER, T., 1994. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates. *Electrophoresis* 15(3-4), 544-554.
- VAN DER VUSSE, G.J., GLATZ, J.F., STAM, H.C., RENEMAN, R.S., 1992. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological reviews* 72(4), 881-940.
- VAN EMPER, V.P., BERTRAND, A.T., HOFSTRA, L., CRIJNS, H.J., DOEVENDANS, P.A., DE WINDT, L.J., 2005. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular research* 67(1), 21-29.
- VANLANGENAKKER, N., VANDEN BERGHE, T., KRYSKO, D.V., FESTJENS, N., VANDENABEELE, P., 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine* 8(3), 207-220.
- VASSALLI, G., BUELER, H., DUDLER, J., VON SEGESSER, L.K., KAPPENBERGER, L., 2003. Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *International journal of cardiology* 90(2-3), 229-238.
- VIDAL, M., WIELAND, T., LOHSE, M.J., LORENZ, K., 2012. beta-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gbetagamma/Erk-dependent pathway. *Cardiovascular research* 96(2), 255-264.
- VOLINSKY, N., KHOLODENKO, B.N., 2013. Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(8), a009043.
- VOLMAT, V., CAMPS, M., ARKINSTALL, S., POUYSSEGUR, J., LENORMAND, P., 2001. The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *Journal of cell science* 114(Pt 19), 3433-3443.
- WANG, L., GOUT, I., PROUD, C.G., 2001. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 276(35), 32670-32677.
- WANG, Y., 2001. Signal transduction in cardiac hypertrophy--dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach. *Current opinion in pharmacology* 1(2), 134-140.
- WANG, Y., 2007. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 116(12), 1413-1423.
- WARNE, P.H., VICIANA, P.R., DOWNWARD, J., 1993. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364(6435), 352-355.
- WASPE, L.E., ORDAHL, C.P., SIMPSON, P.C., 1990. The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *The Journal of clinical investigation* 85(4), 1206-1214.
- WEBER, C.K., SLUPSKY, J.R., KALMES, H.A., RAPP, U.R., 2001. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer research* 61(9), 3595-3598.
- WELLBROCK, C., KARASARIDES, M., MARAIS, R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(11), 875-885.
- WHELAN, R.S., KAPLINSKIY, V., KITSIS, R.N., 2010. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual review of physiology* 72, 19-44.

- WHITEHURST, A.W., WILSBACHER, J.L., YOU, Y., LUBY-PHELPS, K., MOORE, M.S., COBB, M.H., 2002. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(11), 7496-7501.
- WHITTAKER, S., KIRK, R., HAYWARD, R., ZAMBON, A., VIROS, A., CANTARINO, N., AFFOLTER, A., NOURRY, A., NICULESCU-DUVAZ, D., SPRINGER, C., MARAIS, R., 2010. Gatekeeper mutations mediate resistance to BRAF-targeted therapies. *Science translational medicine* 2(35), 35ra41.
- WILKINS, B.J., DE WINDT, L.J., BUENO, O.F., BRAZ, J.C., GLASCOCK, B.J., KIMBALL, T.F., MOLKENTIN, J.D., 2002. Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Molecular and cellular biology* 22(21), 7603-7613.
- WILKINS, B.J., MOLKENTIN, J.D., 2004. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications* 322(4), 1178-1191.
- WILSBACHER, J.L., JUANG, Y.C., KHOKHLATCHEV, A.V., GALLAGHER, E., BINNS, D., GOLDSMITH, E.J., COBB, M.H., 2006. Characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dimers. *Biochemistry* 45(44), 13175-13182.
- WOLF, I., RUBINFELD, H., YOON, S., MARMOR, G., HANOCH, T., SEGER, R., 2001. Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *The Journal of biological chemistry* 276(27), 24490-24497.
- WOLF, I., SEGER, R., 2002. The mitogen-activated protein kinase signaling cascade: from bench to bedside. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 4(8), 641-647.
- WORTZEL, I., SEGER, R., 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer* 2(3), 195-209.
- WU, X., NOH, S.J., ZHOU, G., DIXON, J.E., GUAN, K.L., 1996. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *The Journal of biological chemistry* 271(6), 3265-3271.
- WU, X., ZHANG, T., BOSSUYT, J., LI, X., MCKINSEY, T.A., DEDMAN, J.R., OLSON, E.N., CHEN, J., BROWN, J.H., BERS, D.M., 2006. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation* 116(3), 675-682.
- WUNDERLICH, W., FIALKA, I., TEIS, D., ALPI, A., PFEIFER, A., PARTON, R.G., LOTTSPEICH, F., HUBER, L.A., 2001. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *The Journal of cell biology* 152(4), 765-776.
- XIANG, Y., KOBILKA, B.K., 2003. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)* 300(5625), 1530-1532.
- XU, L., MASSAGUE, J., 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(3), 209-219.
- YAMAGUCHI, O., WATANABE, T., NISHIDA, K., KASHIWASE, K., HIGUCHI, Y., TAKEDA, T., HIKOSO, S., HIROTANI, S., ASAHI, M., TANIIE, M., NAKAI, A., TSUJIMOTO, I., MATSUMURA, Y., MIYAZAKI, J., CHIEN, K.R., MATSUZAWA, A., SADAMITSU, C., ICHIJO, H., BACCARINI, M., HORI, M., OTSU, K., 2004. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 114(7), 937-943.
- YANG, S.H., SHORE, P., WILLINGHAM, N., LAKEY, J.H., SHARROCKS, A.D., 1999. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *The EMBO journal* 18(20), 5666-5674.
- YAO, Y., LI, W., WU, J., GERMANN, U.A., SU, M.S., KUIDA, K., BOUCHER, D.M., 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(22), 12759-12764.
- YAO, Z., FLASH, I., RAVIV, Z., YUNG, Y., ASSCHER, Y., PLEBAN, S., SEGER, R., 2001. Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene* 20(52), 7588-7596.
- YAZICIOGLU, M.N., GOAD, D.L., RANGANATHAN, A., WHITEHURST, A.W., GOLDSMITH, E.J., COBB, M.H., 2007. Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry. *The Journal of biological chemistry* 282(39), 28759-28767.

- YEH, J.H., HSU, S.C., HAN, S.H., LAI, M.Z., 1998. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *The Journal of experimental medicine* 188(10), 1795-1802.
- YEUNG, K., JANOSCH, P., MCFERRAN, B., ROSE, D.W., MISCHAK, H., SEDIVY, J.M., KOLCH, W., 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Molecular and cellular biology* 20(9), 3079-3085.
- YOON, S., SEGER, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 24(1), 21-44.
- YORK, R.D., YAO, H., DILLON, T., ELLIG, C.L., ECKERT, S.P., MCCLESKEY, E.W., STORK, P.J., 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392(6676), 622-626.
- YOUN, H.D., CHATILA, T.A., LIU, J.O., 2000. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *The EMBO journal* 19(16), 4323-4331.
- YU, W., FANTL, W.J., HARROWE, G., WILLIAMS, L.T., 1998. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Current biology : CB* 8(1), 56-64.
- YUE, T.L., WANG, C., GU, J.L., MA, X.L., KUMAR, S., LEE, J.C., FEUERSTEIN, G.Z., THOMAS, H., MALEEFF, B., OHLSTEIN, E.H., 2000. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research* 86(6), 692-699.
- ZHANG, C.L., MCKINSEY, T.A., CHANG, S., ANTOS, C.L., HILL, J.A., OLSON, E.N., 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110(4), 479-488.
- ZHANG, F., STRAND, A., ROBBINS, D., COBB, M.H., GOLDSMITH, E.J., 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367(6465), 704-711.
- ZHANG, J., BIAN, H.J., LI, X.X., LIU, X.B., SUN, J.P., LI, N., ZHANG, Y., JI, X.P., 2010. ERK-MAPK signaling opposes rho-kinase to reduce cardiomyocyte apoptosis in heart ischemic preconditioning. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 16(7-8), 307-315.
- ZHANG, R., KHOO, M.S., WU, Y., YANG, Y., GRUETER, C.E., NI, G., PRICE, E.E., Jr., THIEL, W., GUATIMOSIM, S., SONG, L.S., MADU, E.C., SHAH, A.N., VISHNIVETSKAYA, T.A., ATKINSON, J.B., GUREVICH, V.V., SALAMA, G., LEDERER, W.J., COLBRAN, R.J., ANDERSON, M.E., 2005. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature medicine* 11(4), 409-417.
- ZHANG, T., JOHNSON, E.N., GU, Y., MORISSETTE, M.R., SAH, V.P., GIGENA, M.S., BELKE, D.D., DILLMANN, W.H., ROGERS, T.B., SCHULMAN, H., ROSS, J., Jr., BROWN, J.H., 2002. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *The Journal of biological chemistry* 277(2), 1261-1267.
- ZHANG, T., MAIER, L.S., DALTON, N.D., MIYAMOTO, S., ROSS, J., Jr., BERS, D.M., BROWN, J.H., 2003. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research* 92(8), 912-919.
- ZHANG, X., AZHAR, G., NAGANO, K., WEI, J.Y., 2001. Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts. *Journal of the American College of Cardiology* 38(7), 2055-2062.
- ZHENG, C.F., GUAN, K.L., 1993. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *The Journal of biological chemistry* 268(15), 11435-11439.
- ZHENG, C.F., GUAN, K.L., 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *The EMBO journal* 13(5), 1123-1131.
- ZHENG, M., DILLY, K., DOS SANTOS CRUZ, J., LI, M., GU, Y., URSITTI, J.A., CHEN, J., ROSS, J., Jr., CHIEN, K.R., LEDERER, J.W., WANG, Y., 2004. Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286(1), H424-433.
- ZHOU, B., ZHANG, Z.Y., 2002. The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *The Journal of biological chemistry* 277(16), 13889-13899.

ZHU, W., ZOU, Y., AIKAWA, R., HARADA, K., KUDOH, S., UOZUMI, H., HAYASHI, D., GU, Y., YAMAZAKI, T., NAGAI, R., YAZAKI, Y., KOMURO, I., 1999. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 100(20), 2100-2107.

ZIMMERMANN, S., MOELLING, K., 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science (New York, N.Y.)* 286(5445), 1741-1744.

ZOU, Y., AKAZAWA, H., QIN, Y., SANO, M., TAKANO, H., MINAMINO, T., MAKITA, N., IWANAGA, K., ZHU, W., KUDOH, S., TOKO, H., TAMURA, K., KIHARA, M., NAGAI, T., FUKAMIZU, A., UMEMURA, S., IIRI, T., FUJITA, T., KOMURO, I., 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature cell biology* 6(6), 499-506.

ZOU, Y., TAKANO, H., AKAZAWA, H., NAGAI, T., MIZUKAMI, M., KOMURO, I., 2002. Molecular and cellular mechanisms of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Endocrine journal* 49(1), 1-13.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

9.2 Publikationsverzeichnis

9.2.1 Publikationen

Cardiac RKIP induces a beneficial β -adrenoceptor-dependent positive inotropy.

Schmid E, Neef S, Berlin C, Tomasovic A, Kahlert K, Nordbeck P, Deiss K, Denzinger S, Herrmann S, Wettwer E, Weidendorfer M, Becker D, Schäfer F, Wagner N, Ergün S, Schmitt JP, Katus HA, Weidemann F, Ravens U, Maack C, Hein L, Ertl G, Müller OJ, Maier LS, Lohse MJ, Lorenz K.

Nat Med. 2015 Nov;21(11):1298-306. doi: 10.1038/nm.3972.

9.2.2 Konferenzbeiträge

VORTRÄGE

The dimer interface of ERK1/2 provides a potential strategy for selective inhibition of pathological cardiac hypertrophy

Tomasovic A, Kramer S, Hümmert M, Katus HA, Müller OJ, Lorenz K.

Heart Failure 2017 – 4th World Congress on Acute Heart Failure, Paris, Frankreich, 29.04-02.05.2017 (Young Investigator Award for Basic and Translational Science, 1. Platz)

The dimer interface of ERK1/2 provides a potential strategy for selectively separating the diverse ERK functions.

Tomasovic A, Hümmert M, Kramer S, Gruse T, Katus HA, Lohse MJ, Müller OJ, Lorenz K.

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin, Deutschland, 29.02.-03.03.2016

The dimer interface of ERK1/2 as potential strategy for targeting pathological cardiac hypertrophy.

Tomasovic A, Hümmert M, Ruppert C, Lohse MJ, Lorenz K.

81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland, 09.-11.04.2015 (Reisekostenstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie)

Monomeric ERK2 attenuates ERK1/2-mediated pathological cardiac hypertrophy.

Tomasovic A, Hümmert M, Ruppert C, Lohse MJ, Lorenz K.

80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Hannover, Deutschland, 01.-03.04.2014

POSTER

The dimer interface of ERK1/2 provides a potential strategy for selective inhibition of nuclear ERK functions.

Tomasovic A, Kramer S, Hümmert M, Lorenz K.

Keystone Symposium – *Kinases: Next-Generation Insights and Approaches*, Breckenridge, USA, 05.-09.03.2017 (GSLs-Reisekostenstipendium)

A new potential strategy for targeting pathological cardiac hypertrophy: the dimer interface of ERK1/2.

Tomasovic A, Hümmert M, Lorenz K.

Heart Failure Winter Research Meeting, Les Diablerets, Schweiz, 20.-23.01.2016

Characterization of a peptide that interferes with ERK1/2-mediated pathological cardiac hypertrophy.

Tomasovic A, Hümmert M, Ruppert C, Lorenz K.

81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Kiel, Deutschland, 09.03-12.03.2015

Overexpression of monomeric ERK2 reduces the development of pathological cardiac hypertrophy.

Tomasovic A, Hümmert M, Ruppert C, Lohse MJ, Lorenz K.

9. Internationales GSLs Symposium, Würzburg, Deutschland, 14.-15.10.2014 (Posterpreis-Finalistin)

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die ERK-ERK Interaktionsfläche als therapeutische Zielstruktur zur selektiven Inhibition nukleärer ERK1/2-Funktionen zum Schutz vor pathologischer kardialer Hypertrophie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „The ERK-ERK interface as a therapeutic target to selectively inhibit nuclear ERK1/2 functions for the prevention of pathological cardiac hypertrophy“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 10.05.2017

9.4 Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Kristina Lorenz für die Möglichkeit der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe. Ich verdanke ihr die Chance an einem spannenden, vielseitigen und anspruchsvollen Projekt in einem äußerst angenehmen Umfeld zu arbeiten. Dabei weiß ich ihre stetige Unterstützung und Betreuung in allen Belangen meiner Promotion sehr zu schätzen.

Prof. Dr. Manfred Gessler und Prof. Dr. Martin J. Lohse danke ich für die anregenden und kritischen Diskussionen im Rahmen der Betreuung meiner Doktorarbeit. Genauso danke ich Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich möchte mich auch überaus herzlich bei allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Kristina Lorenz, sei es in Würzburg oder Dortmund, bedanken. Jedem Einzelnen bin ich für seine Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre dankbar. Ganz speziell möchte ich Nadine, Martina, Marianne und Karina nennen, die mit ihrem Fachwissen und ihrer Kollegialität ganz erheblich zum Erfolg dieses Projektes beigetragen haben.

Ich danke auch allen meinen engen Freunden für ihre Unterstützung, ihr offenes Ohr und die Ablenkung, allen voran Anne und Matze. Ferner bin ich froh über jeden neuen Freund, den ich im Institut für Pharmakologie und Toxikologie dazu gewonnen habe. Insbesondere Annette, Gabriela, Evelyn und Sandra haben die Jahre dort zu einer wertvollen Zeit gemacht, die ich nicht missen möchte.

Meiner Familie verdanke ich so viel Unterstützung und Liebe und meine Dankbarkeit für das unendliche Verständnis, die Unterstützung und Liebe von Lukas ist nicht in Worte zu fassen.