

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

**Hemmung pathologischer kardialer Hypertrophie über das Dimer-Interface von
ERK1/2**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sofia Kramer

aus Wonfurt-Steinsfeld

Würzburg, Juni 2020

Referent/Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiale Hypertrophie	1
1.2	Kardiales <i>Remodeling</i>	1
1.3	Aktuelle Therapie	2
1.4	Signalwege die zu Hypertrophie führen	2
1.4.1	Stimuli und Rezeptoren	2
1.4.2	Wichtige Signalkaskaden	3
1.5	ERK1/2	4
1.5.1	Raf-MEK-ERK-Kaskade	5
1.5.2	Aktivierung der Kaskade	5
1.5.3	Ras, Raf, MEK	8
1.5.4	ERK1/2-Aktivierung	9
1.5.5	Struktur von ERK2	11
1.5.6	Funktion und Zielproteine	14
1.5.7	Regulation.....	15
1.5.8	Lokalisation	16
1.6	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	Primäre Antikörper	20
2.1.3	Sekundäre Antikörper.....	20
2.1.4	Zell-Kultur-Materialien	21
2.1.5	Biologisches Material	21
2.1.6	Plasmidvektoren	22
2.1.7	Adenoviren	22
2.1.8	Peptide	23
2.1.9	Kits	23
2.1.10	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2	Zellbiologische Methoden	25

2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4	Fluoreszenzbasierte-Methoden.....	34
3	Ergebnisse	41
3.1	Dimerisierung	41
3.1.1	Induktion der Dimerisierung von HA- und Flag-markiertem ERK2 durch hypertrophe Stimuli.....	41
3.1.2	Einfluss der Dimerisierung auf die subzelluläre Lokalisation.....	44
3.1.3	Die Relevanz der ERK Thr188-Phosphorylierung für die zelluläre Lokalisation von ERK1/2.....	46
3.1.4	Effekte von ERK2- Δ 4 und ERK2- Δ 4D auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten.....	49
3.2	Interferenz mit der Dimerisierung	54
3.2.1	Interaktion des E2-Peptids mit ERK2	55
3.2.2	Beeinflussung der Dimerisierung durch das E2-Peptid.....	55
3.2.3	Untersuchung der Spezifität des E2-Peptids auf die Dimerisierung zwischen HA- und Flag-markiertem ERK2 und den Transkriptionsfaktoren MYC und MAX.....	57
3.2.4	Identifizierung einer kürzeren Peptid-Sequenz, welche mit dem ERK-Dimerisierungs <i>interface</i> interagiert.....	61
3.2.5	Einfluss von JOLU22 auf die ERK2-Dimerisierung.....	62
3.2.6	Einfluss von JOLU22 auf die ERK Thr188-Phosphorylierung.....	66
3.3	Mechanismus der Kerntranslokation mit Importin 7	68
3.3.1	Expression des E2-Peptids in HEK293-Zellen.....	68
3.3.2	Einfluss der Dimerisierung und der ERK Thr188-Phosphorylierung auf die Interaktion mit Importin 7	69
3.3.3	Einfluss des Peptides auf die Interaktion von ERK2 mit Importin 7	70
4	Diskussion	73
4.1	ERK1/2 als Vermittler von pathologischer kardialer Hypertrophie	73
4.2	Der Einfluss von ERK2- Δ 4 und ERK2- Δ 4D auf die subzelluläre Lokalisation	74
4.3	Selektive Hemmung von ERK1/2-Funktionen	75
4.4	Hemmung der Dimerisierung mit Peptiden	77
4.5	Einfluss der Dimerisierung und der ERK Thr188-Phosphorylierung auf den Kernimport.....	80
5	Zusammenfassung.....	85
6	Anhang	87

6.1	Abkürzungen.....	87
6.2.	Literaturverzeichnis	91
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	103

1 Einleitung

1.1 Kardiale Hypertrophie

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen mit 37% zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Zu diesen Erkrankungen zählen Herzinsuffizienz, Arrhythmien, koronare Herzkrankheit und Schlaganfall ¹. Ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung dieser Krankheiten ist die linksventrikuläre Hypertrophie, welche definiert ist als die Zunahme an Herzmasse durch Vergrößerung der Zellen ohne Zunahme der Zellzahl. Dabei reagiert das Herz auf erhöhte Druck- oder Volumenbelastungen, um noch die gleiche Herzleistung erbringen zu können und die erhöhte Wandspannung zu verringern ^{2,3}. Dies geschieht beim gesunden Menschen, zum Beispiel (z. B.) bei Ausdauersportlern oder Schwangeren, als Antwort auf erhöhte Belastung und ist als physiologische Hypertrophie reversibel, kein Gesundheitsrisiko und assoziiert mit normaler oder verbesserter kardialer Funktion. Im Gegensatz dazu steht die pathologische Hypertrophie, die unter anderem durch arterielle Hypertonie, Aortenklappenstenose oder Mitralklappeninsuffizienz ausgelöst werden kann. Anfänglich ist die Zunahme an Herzmuskelmasse zwar ein wirkungsvoller Kompensationsmechanismus, um das Herz-Zeit-Volumen aufrechtzuerhalten, auf Dauer ruft dies aber kardiales *Remodeling* herbei, welches die Herzfunktion weiter einschränkt und zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz führt ³⁻⁶.

1.2 Kardiales *Remodeling*

Auf zellulärer Ebene führt die neurohumorale Aktivierung und der ständige biomechanische Stress, durch die erhöhte Volumenbelastung, zu dauerhafter Kollagenasen-Aktivierung, Reorganisation der Sarkomere, gesteigerter Proteinsynthese und Vergrößerung von Kardiomyozyten und Fibroblasten. All dies trägt dazu bei, dass der Herzmuskel immer dicker wird und es gleichzeitig zu einer Steigerung des Kardiomyozyten-Zelltodes kommt. Zudem scheint die Aktivierung des fetalen Genprogramms eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hypertrophie zu spielen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Genen, die normalerweise nur im sich entwickelnden Herz aktiv sind und beim Erwachsenen unterdrückt werden ^{4,7-10}. Die durch Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangenen Kardiomyozyten werden durch

Kollagen ersetzt, was zu Fibrose führt. Die Fibrose versteift die Ventrikelwand, wodurch die Kontraktionsfähigkeit und das Relaxationsausmaß des Herzens verringert werden. Zudem wird die Entstehung von Arrhythmien erleichtert, da die elektrische Leitfähigkeit der Herzmuskelzellen behindert wird. Die Hypertrophie erhöht außerdem den myokardialen Sauerstoffverbrauch, während sie gleichzeitig auch die Koronarreserve reduziert. Dieses Missverhältnis begünstigt beim Patienten letztendlich die Entstehung von Angina pectoris, Myokardinfarkten und plötzlichem Herztod^{3,11,12}.

1.3 Aktuelle Therapie

Die gegenwärtige Therapie hat das Ziel diese Manifestationsformen der Hypertrophie hinauszuzögern und die Symptome zu lindern. Die Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) und AT₁ (Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1)-Rezeptorantagonisten gehören zu den Mitteln der 1. Wahl, da sie das kardiale *Remodeling* aufhalten, den Blutdruck erniedrigen und einen Rückgang bei linksventrikulärer Hypertrophie bewirken. In Kombination werden häufig β -Blocker eingesetzt, welche die Symptomatik der Patienten und deren Überlebensraten verbessern. Auch bei diesen Präparaten zeigt sich eine Reduktion der Hypertrophie, wenn auch eine geringere als bei ACE-Inhibitoren. Des Weiteren werden unter anderem Diuretika, Nitrate und Aldosteron-Antagonisten eingesetzt^{5,13}. Trotz dieser Therapiemöglichkeiten bleibt die Mortalität weiterhin hoch. Es besteht also großes Interesse daran, neue Bestandteile der biochemischen Signalwege, die der Hypertrophie zugrunde liegen, zu identifizieren, um neue Therapien zu entwickeln, welche die pathologische, jedoch nicht die physiologische Hypertrophie verhindern^{2,3}.

1.4 Signalwege die zu Hypertrophie führen

1.4.1 Stimuli und Rezeptoren

Zu den wichtigsten Auslösern der Hypertrophie zählen biomechanischer Stress, sowie neurohumorale Stimuli wie Hormone, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. So können Kardiomyozyten durch bestimmte Ionenkanäle und Integrine Deformation und Dehnung detektieren, die zum Beispiel bei erhöhter Volumenbelastung bei Aortenstenose entstehen. Hormone wie Angiotensin II, Endothelin 1 und Katecholamine lösen Hypertrophie durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der G_{αq}- und

$G_{\alpha s}$ -Subgruppe aus. Andere Stimuli wie IGF-I (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor), EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) und Neuregulin, die zu den Wachstumsfaktoren zählen, verursachen dies durch Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). All diese Stimuli und noch viele weitere führen zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die dann die Genexpression im Zellkern verändern, Protein-Translation verstärken, Protein-Abbau hemmen und so letztendlich die Entstehung kardialer Hypertrophie ermöglichen¹⁴.

1.4.2 Wichtige Signalkaskaden

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg

Eine zentrale Stellung unter den Signalkaskaden, die Hypertrophie auslösen, nimmt der Calcineurin/NFAT (*nuclear factor of activated-T-cells*)-Signalweg ein. Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die durch erhöhte Calcium-Konzentrationen aktiviert wird und daraufhin mit Calmodulin interagiert. Dann kann Calcineurin NFAT dephosphorylieren und damit dessen Transport in den Zellkern bewirken, was letztendlich zur Initiation prohypertropher Genexpression führt^{14,15}.

Der CaMKII/HDAC-Signalweg

Durch erhöhte Calcium-Konzentrationen in den Zellen wird auch die CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-abhängige Proteinkinase II) aktiviert, eine Kinase die eine zentrale Rolle bei der Vermittlung kardialer Hypertrophie einnimmt, u.a. (unter anderem) indem sie HDACs (Histon-Deacetylasen) inaktiviert. Da HDACs im aktiven Zustand Histone deacetylieren, damit eine Kondensation der DNA (Desoxyribonukleinsäure) bewirken und somit deren Transkription verhindern, wird durch die CaMKII die Transkription prohypertropher Gene ermöglicht. Zu diesen Genen zählt zum Beispiel der *myocyte enhancer factor 2*. Zusätzlich zu der Rolle von CaMKII bei der Inaktivierung von HDACs, scheint diese Proteinkinase direkt mit den Kinasen ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen 1/2) zu interagieren und darüber auch kardiale Hypertrophie zu verursachen¹⁶⁻¹⁸.

Der PI3K/Akt-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Auslöser für kardiale Hypertrophie ist die Aktivierung von Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3Ks), welche die Serin/Threonin Kinase Akt (auch unter

dem Namen PKB (Proteinkinase B) bekannt) aktivieren. Eine wichtige Zielstruktur dieser Kinase ist wiederum die GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase), welche durch Akt aktiviert wird. Dadurch kann die GSK3 β wichtige prohypertrophe Faktoren wie GATA4 (GATA Transkriptionsfaktor), β -catenin, c-Myc and NFAT nicht mehr hemmen¹⁹⁻²¹.

Der MAP-Kinasen-Signalweg

Auch die Familie der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein* Kinasen) spielt eine wichtige Rolle. Dieser Signalweg besteht aus drei Kinasen, die nacheinander durch duale Phosphorylierung aktiviert werden. Am Anfang steht die MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinase), dann die MAP2K (MAP-Kinase-Kinase) und am Ende die Effektor kinase MAPK. Die Effektor kinasen können wiederum in drei Untergruppen eingeteilt werden: die p38 Kinasen, die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) und die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERKs). Im aktivierten Zustand phosphorylieren diese eine Vielzahl von intrazellulären Ziel-Proteinen. Dazu zählen unter anderem Transkriptionsfaktoren, die die Reaktivierung der kardialen Genexpression induzieren^{14,22}.

Am intensivsten untersucht sind die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der hypertrophen Antwort des Herzens spielen und um die es im Folgenden gehen soll.

1.5 ERK1/2

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 zählen zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen und kommen ubiquitär in Eukaryoten vor. Die Sequenz der beiden Kinasen stimmt zu 83 % überein und beide haben nahezu identische Funktionen, weshalb sie auch ERK1/2 genannt werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Transkription, Entstehung von Entzündungsvorgängen und dem programmierten Zelltod²³⁻²⁵.

Wie wichtig diese beiden Kinasen bei der Vermittlung von Hypertrophie sind, zeigten Bueno et al. durch Überexpression einer aktiven Form von MEK (MAPK/ERK Kinase, *mitogen-activated protein kinase*) in transgenen Mäusen. Diese zeigten darauf eine spezifische Aktivierung von ERK1/2, nicht aber der anderen MAP-Kinasen JNKs und p38-Kinasen. In der Folge entwickelten diese Mäuse eine konzentrische Hypertrophie des Herzens, verbesserte kardiale Funktion und eine Resistenz für apoptotische Stimuli.

Dagegen bewirkte die Überexpression des *upstream regulator* dieser Kaskade, Ras (*rat sarcoma*), pathologische und letale kardiale Hypertrophie, unter anderem auch durch Aktivierung von JNKs und PI3K. Purcell et al. beschrieben, dass die Deletion von ERK1/2 in transgenen Mäusen das Herz für Herzversagen prädisponiert, für die Vermittlung von Hypertrophie dagegen nicht benötigt wird und eine protektive Funktion gegen pathologische Stimuli hat. Jedoch zeigten Lorenz et al., dass die Phosphorylierung von ERK2 an Threonin 188, die Phosphorylierung von nukleären Zielproteinen bewirkt, welche kardiale Hypertrophie verursachen. Passend dazu demonstrierten Cipolletta et al., dass eine Hemmung der Interaktion zwischen CaMKII mit ERK1/2 die Akkumulation der Kinasen im Nukleus verhindert und damit der Entstehung von pathologischer kardialer Hypertrophie entgegenwirkt. Viele teils widersprüchliche Studien zeigen also, dass ERK1/2 pathologische als auch physiologische Hypertrophie bewirken kann, oder auch keinen Einfluss auf die Hypertrophie-Entstehung hat. Dies verdeutlicht, dass die Entstehung von kardialer Hypertrophie im Zusammenhang mit ERK1/2 ein sehr komplexer Prozess ist, der genau untersucht werden muss^{17,22,26-30}.

1.5.1 Raf-MEK-ERK-Kaskade

Die Aktivierung von ERK1/2 wird durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Stress initiiert, welche sich dann über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen in der Raf-MEK-ERK-Kaskade (auch MAPK-Kaskade genannt) vereinigen. Zuerst wird durch die Rezeptoren das kleine G-Protein Ras aktiviert. Dadurch wird die MAP3Kinase Raf (*rapid activation of fibrosarcoma*; meist die Isoform Raf1), in den aktiven Zustand gebracht. Diese aktiviert wiederum durch duale Phosphorylierung die MAP2Kinasen MEK 1 und 2, welche dann ebenfalls ihre Zielproteine ERK1/2 dual phosphorylieren^{31,32}. Dieser Signalweg wird im Folgenden genauer beschrieben.

1.5.2 Aktivierung der Kaskade

GPCRs mit Unterformen

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind Rezeptoren, die Signale von einer Vielzahl von Stimuli in das Zellinnere übertragen. Sie sind charakterisiert durch sieben transmembranäre Helices, mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Diese Rezeptoren sind an GTP (Guanosintriphosphat)-

bindende Proteine gekoppelt. Von diesen Rezeptoren gibt es verschiedene Klassen, die G_s , die G_q und die G_i . Sie sind heterotrimer, bestehen also aus 3 Untereinheiten, der α -Untereinheit und dem $\beta\gamma$ -Dimer. Wenn ein Agonist an die Rezeptoren bindet, ermöglicht eine Konformationsänderung den Austausch von gebundenem GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP an der α -Untereinheit, was dann die Dissoziation von G_α und $G_{\beta\gamma}$ ermöglicht. Beide aktivieren dann unabhängig voneinander verschiedene intrazelluläre Signalwege³³.

Von den verschiedenen Subtypen von GPCRs sind vor allem G_q -gekoppelte Rezeptoren in der Lage, kardiale Hypertrophie auszulösen. Rezeptoren, die an G_q gekoppelt sind, sind unter anderem der Rezeptor für Angiotensin II, der Endothelin 1-Rezeptor und der α_1 -adrenerge Rezeptor. Nach Bindung des entsprechenden Liganden wie Angiotensin II, Endothelin 1 oder Noradrenalin wird über die α -Untereinheit die Phospholipase C aktiviert, welche dann die sekundären Botenstoffe Inositol [1, 4, 5]-trisphosphat (IP_3) und 2-Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bildet. IP_3 verursacht über die Bindung am sarkoplasmatischen Retikulum die Freisetzung von Ca^{2+} . DAG und Ca^{2+} aktivieren dann die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum verschiedene Zielproteine phosphoryliert. Ein wichtiges Target der PKC ist Raf1, welches dadurch in seiner Aktivität reguliert wird^{31,34,35}. Die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration bewirkt, nicht wie sonst erhöhte Kontraktilität, sondern über räumliche Beschränkung der Calcium-Freisetzung, eine Aktivierung von Hypertrophie-verursachenden Genen³⁶.

Auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von ERK1/2-Aktivität. Dies geschieht über Src (*sarcoma*), einer zytosolischen Kinase, die zu einer Familie von Tyrosin-Kinasen gehört. Sie phosphoryliert ein Membran-assoziiertes Struktur-Protein (entweder die *nonreceptor tyrosin kinase* PYK2 (Protein-Tyrosin-Kinase 2)) oder eine Rezeptortyrosinkinase, wie den EGF-Rezeptor, um damit den Shc (*src homology 2 domain containing protein*)-Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*)-Sos (*son of sevenless*)-Komplex an die Plasmamembran zu binden. Sos wiederum ermöglicht, wie weiter unten beschrieben, die Aktivierung von Ras³¹.

β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren aktivieren G_s -Proteine. Agonisten wie Isoprenalin oder Adrenalin bewirken über die α -Untereinheit die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), welche zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bildet. cAMP aktiviert dann die

Proteinkinase A (PKA), welche über diverse Zielproteine einen positiven chronotropen, inotropen und lusitropen Effekt am Herzen hat. Vidal et al. zeigten außerdem, dass die alleinige Aktivierung der AC nicht ausreicht, um Hypertrophie auszulösen. Stattdessen wird die Aktivierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit benötigt, welche die Threonin188 Phosphorylierung an ERK2 (beziehungsweise (bzw.) die Thr208 Phosphorylierung an ERK1) ermöglicht und damit Hypertrophie induziert. Die PKA hat wiederum einen hemmenden oder schwächenden Effekt auf die Bindung von Raf1 durch Ras, da sie Letzteres an verschiedenen Serin-Resten phosphorylieren kann. Dieser Effekt variiert allerdings von Zelltyp zu Zelltyp^{22,31,37-39}.

G_i -Aktivierung wird über kardiale muskarinische und α_2 - und β_2 -adrenerge-Rezeptoren vermittelt, was dann zur Inhibition der Adenylatcyclase führt. Es gibt aber Hinweise, dass G_i -Proteine ERK1/2 über die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktivieren können. Dabei spielt wohl auch die PI3K γ eine wichtige Rolle, da diese von $G_{\beta\gamma}$ an die Membran gebunden wird, dann PIP₃ (Phosphatidylinositol-1,4-5-trisphosphat) bildet und dies dann Src aktivieren kann^{8,31,40}.

Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind Rezeptoren, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommen. Alle 58 bekannten RTKs haben einen ähnlichen Aufbau aus einer extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne, einer einfachen transmembranären Helix und einer zytoplasmatischen Domäne mit Kinasefunktion. Liganden für diese Rezeptorform die ERK1/2 aktivieren können, sind unter anderem Wachstumsfaktoren wie z. B. der *epidermal growth factor* EGF oder der *Insulin-like growth factor* IGF-1. Wenn einer dieser Liganden an den Rezeptor bindet, löst dies eine Dimerisierung des Rezeptors aus. Daraufhin kommt es zur Autophosphorylierung von Tyrosinen in der zytoplasmatischen Domäne, was Bindestellen für Adaptorproteine entstehen lässt. So können Grb2 oder Shc über Phosphotyrosine binden und eine Verbindung zum dem Protein Sos schaffen. Dieses wiederum katalysiert den Austausch von GDP durch GTP von Ras^{31,32,41,42}.

1.5.3 Ras, Raf, MEK

Ras/Raf

Das kleine G-Protein Ras hat im Ruhezustand GDP gebunden. Wird es durch die oben erwähnten Rezeptoren über Zwischenschritte aktiviert, tauscht es das monomere G-Protein GDP durch GTP aus. In diesem Zustand bindet es an die *Ras-binding domain* von Raf. Da Ras an der inneren Membran der Zellmembran fixiert ist, rekrutiert es damit auch Raf an die Plasmamembran. Die weiteren Schritte zur Aktivierung von Raf sind sehr komplex und involvieren unter anderem die Bindung von Adaptorproteinen, Phosphorylierungen und eine Dimerisierung. Letztendlich kann Raf an MEK1/2 binden und die Serin-Reste Ser217 und Ser221 (von MEK1) in deren Aktivierungsschleife phosphorylieren.

MEK1/2

MEK1/2 sind Serin-Threonin- und Tyrosin-Kinasen und sowohl Aktivatoren als auch Gerüstproteine von ERK1/2. Nach Aktivierung phosphorylieren sie ihre einzigen bekannten Substrate ERK1/2, deren Aktivität damit um rund das 3000fache erhöht wird. In ruhenden Zellen befinden sich MEK1/2 im Zytoplasma. Grund dafür ist das *nuclear export signal* (NES) an ihrem N-terminalen Ende, welches einen schnellen Export aus dem Zellkern bewirkt. Außerdem werden sie durch Anker, wie β -Arrestin 2 und KSR (*kinase suppressor of Ras*), im Zytoplasma festgehalten. Letzteres ist auch mitverantwortlich für die Interaktion von MEK1/2 mit Raf1. Wenn Raf1 aktiviert ist, transloziert KSR mit MEK1/2 an die Plasmamembran und bringt sie damit in Reichweite von Raf1^{24,31,43-46}.

Raf kommt im Gegensatz zu MEK1/2 und ERK1/2 nur in geringen Mengen in Zellen vor. Der Schritt der Aktivierung von MEK1/2 durch Raf verstärkt damit das Signal in Richtung ERK1/2. Der zweite Schritt, also die Aktivierung von ERK1/2 durch MEK1/2, zeigt kein lineares Verhältnis zwischen MEK1/2 und ERK1/2 Aktivierung. Der Mechanismus der dualen Phosphorylierung generiert stattdessen ein sigmoides Aktivierungsverhältnis, was das Herausfiltern von unterschwelligen Signalen, die kooperative Aktivierung über verschiedene Signalwege und eine rasche Aktivierungskinetik von ERK1/2 ermöglicht^{31,47}.

1.5.4 ERK1/2-Aktivierung

Damit ERK1/2 aktiviert werden können, müssen sie von MEK1/2 an zwei Aminosäuren phosphoryliert werden. Dies sind das Threonin (Thr) an Position 183 und Tyrosin (Tyr) an Position 185 (in ERK2), wobei beide Aminosäuren phosphoryliert werden müssen, um volle ERK1/2-Aktivität zu erhalten. Tyr185 kann außerdem durch Autophosphorylierung von ERK2 phosphoryliert werden. Daraufhin können ERK1/2 dimerisieren und mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen interagieren. Als letzten Schritt findet dann die Autophosphorylierung des Threonins an Position 188 statt, welche ein Trigger für die Akkumulation der Kinasen im Nukleus zu sein scheint^{22,25,37,43}.

Die Aminosäuren Thr183 und Tyr185 befinden sich im TEY (Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin)-Motiv in der Phosphorylierungsschleife von ERK1/2. Robbins et al. demonstrierten durch Austausch von Thr183 durch Alanin und Tyr185 durch Phenylalanin, dass dies die Entstehung von aktiven ERK1/2 verhindert, da diese Aminosäuren nicht phosphoryliert werden können. Zuerst wird das Threonin phosphoryliert, was dann die Phosphorylierung von Tyrosin ermöglicht^{23,48,49}.

Nachdem ERK1/2 an beiden Stellen phosphoryliert wurden, können sie Homodimere bilden, sowohl mit phosphorylierten, als auch mit unphosphorylierten ERK1/2. Um dies zu beweisen, synthetisierten Khokhlatchev et al. eine Dimerisierungs-defiziente ERK2-Mutante, bei der die Aminosäuren P174 (Prolin174) – D177 (Aspartat177) entfernt wurden (im weiteren Verlauf dieser Arbeit ERK2- $\Delta 4$ genannt). Diese Mutante zeigte im Gegensatz zum Wildtyp kaum Interaktion mit ERK1/2 bei der Co-Immunpräzipitation^{23,43,49}.

Als nächsten Schritt erfolgt für eine volle ERK1/2-Aktivierung die Bindung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_q - oder G_s -gekoppelten Rezeptoren. Die Untereinheiten scheinen als Gerüstproteine und Modulatoren des ERK1/2-Dimers zu wirken. Zwar verändern sie nicht die katalytische Aktivität von ERK1/2, induzieren aber möglicherweise eine Konformationsänderung, welches die nachfolgende Autophosphorylierung erleichtert. So zeigten Vidal et al., dass die Überexpression des $G\beta\gamma$ -Scavengers β ARK-ct (β -adrenerge Rezeptor Kinase-Carboxyl-Terminus), die Autophosphorylierung von ERK1/2 inhibierte, nicht aber die ERK1/2-Aktivierung im TEY-Motiv. Lorenz et al. erarbeiteten außerdem, dass die Interaktion von ERK1/2 mit $G\beta\gamma$ über die vorangeschalteten Kinasen

Raf1 und MEK1/2 reguliert wird. So scheinen alle Kinasen der Raf-MEK-ERK-Kaskade mit der G β γ -Untereinheit einen Komplex zu bilden, ohne den die Autophosphorylierung von ERK1/2 nicht stattfinden kann. Also sind die G β γ -Untereinheiten *scaffold*-Proteine für die gesamte MAPK-Kaskade. Voraussetzung für die Bindung von G β γ ist außerdem die Bildung des ERK1/2-Dimers, da gezeigt werden konnte, dass monomeres ERK2- Δ 4 nicht mit der Untereinheit interagieren kann^{22,37}.

Als letzten Schritt findet die Autophosphorylierung von ERK1/2 an der Aminosäure Threonin an Position 188 statt. Diese wurde 2009 erstmals von Lorenz et al. beschrieben. Die Autophosphorylierung erwirkt die Lokalisation von ERK1/2 im Zellkern und ruft kardiale Hypertrophie hervor. Voraussetzungen dafür sind wie oben beschrieben, die Aktivierung der gesamten Raf-MEK-ERK-Kaskade durch einen hypertrophen Stimulus, die Phosphorylierung von ERK1/2 an Thr183 und Tyr185, die Dimerisierung und die daran anschließende Interaktion mit G β γ -Untereinheiten. Dies alles führt dann zum Kernimport von ERK1/2 und zur Phosphorylierung von Substraten wie Elk1 (*E twenty six-like 1 transcription factor*), MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase-1*) und c-Myc, welche bekanntermaßen an der Entstehung von kardialer Hypertrophie beteiligt sind⁵⁰⁻⁵³. Ruppert et al. konnten zeigen, dass der Austausch von Thr188 durch Alanin (ERK2^{T188A}), welches nicht phosphoryliert werden kann, erfolgreich kardiomyozytäre Hypertrophie bei transgenen Mäusen inhibiert, nicht aber die Apoptose der Zellen steigert oder physiologische Hypertrophie verhindert. Analog wurde die ERK2^{T188D}-Mutante generiert, bei der Threonin durch die phosphomimetische Aminosäure Aspartat ausgetauscht wurde. Diese führte bei transgenen Mäusen, bei denen zur Induktion von Hypertrophie eine transverse Aortenkonstriktion durchgeführt wurde, zu noch ausgeprägterer kardialer Hypertrophie, als bei Mäusen, welche wildtypisches ERK2 überexprimierten^{22,29}. Abbildung (Abb.) 1 zeigt eine schematische Übersicht über die Komponenten, die für ERK1/2-Aktivierung nötig sind.

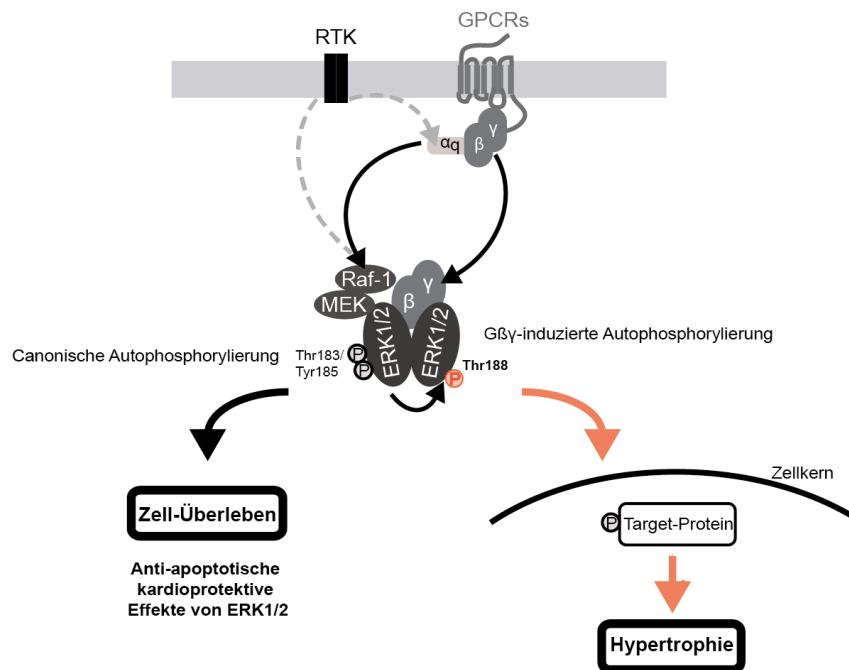


Abb. 1 Der ERK1/2 Signalweg zur Auslösung kardialer Hypertrophie

Ein hypertropher Stimulus aktiviert RTKs oder GPCRs, was die Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade bewirkt. Dies führt zur dualen Phosphorylierung im TEY-Motiv von ERK1/2. Dual phosphoryliertes ERK1/2 bildet Dimere, die mit der β -Untereinheit von G-Proteinen interagieren. Daraufhin findet die Autophosphorylierung von ERK1/2 an Thr188 statt, was die Akkumulation der Kinasen im Nukleus bewirkt und die Entstehung von Hypertrophie begünstigt. Modifiziert nach: Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15, 75-83, doi:10.1038/nm.1893 (2009). Lizenznummer: 4363141341575.

1.5.5 Struktur von ERK2

Die Struktur von ERK2 wurde mittlerweile von Cangarajah et al. und Khokhlatchev et al. gelöst. ERK2 besteht aus einer kleinen N-terminalen Domäne und einer großen C-terminalen Domäne. Dazwischen befindet sich eine tiefe Tasche, in der ATP (Adenosintriphosphat) binden kann, wohingegen ERK1/2-Substrate an der Oberfläche des Proteins binden. Die C-terminale Domäne ist größtenteils helikal aufgebaut und besteht aus den Aminosäuren von Position 109 bis 314. Sie enthält unter anderem die Aktivierungsschleife (L12), die auch Phosphorylierungslippe genannt wird. Dabei handelt es sich um eine Schleife an der Oberfläche, die das TEY-Motiv mit den phosphorylierbaren Aminosäuren Thr183 und Tyr185 beinhaltet. Wie in Abbildung 2 ersichtlich, besteht die N-terminale Domäne dagegen vor allem aus β -Faltblättern, der Helix C, die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt ist und außerdem der Helix α L16. Des Weiteren besitzt die N-terminale Domäne eine Glycin-reiche

Bindungsschleife zwischen dem β 1- und dem β 2-Strang, welche für die Bindung von ATP verantwortlich ist^{23,47,54}.

MAP-Kinasen sind Prolin-gerichtete Kinasen, das heißt sie phosphorylieren nur Substrate, die ein Prolin an der P+1 Position haben. Die P+1 Erkennungssequenz von ERK1/2 ist allerdings beim inaktiven Enzym verborgen, was einerseits ihre niedrige Aktivität im Ruhezustand erklärt, aber auch zeigt, dass es zu ausgeprägten Konformationsänderungen kommen muss, um die Erkennungssequenz zu aktivieren. Wenn Thr183 phosphoryliert wird, bildet es insgesamt acht Verbindungen mit anderen Aminosäuren, entweder über Wasserstoffbrückenbindungen oder über ionische Kontakte. Unter anderem bildet es ionische Verbindungen zu drei Argininen aus, die sich in der Helix C, in der katalytischen Schleife und in der Aktivierungsschleife befinden, was die Orientierung der Domänen zueinander beeinflusst. Tyr185 ist im unphosphorylierten Zustand tief im Enzym versteckt. Nach Phosphorylierung rotiert es seine Seitenkette an die Oberfläche und bildet dort dann mit Val186 (Valin186) und Arg192 (Arginin192) die P+1 Erkennungssequenz. Nach der Phosphorylierung rotieren die N- und die C-terminale Domäne aufeinander zu und bilden das aktive Zentrum, welches C-terminal aus Asp147 (Aspartat147) - Asp165 besteht, während das N-terminale Ende seine Glycin-reiche Phosphatbindestelle bereitstellt.

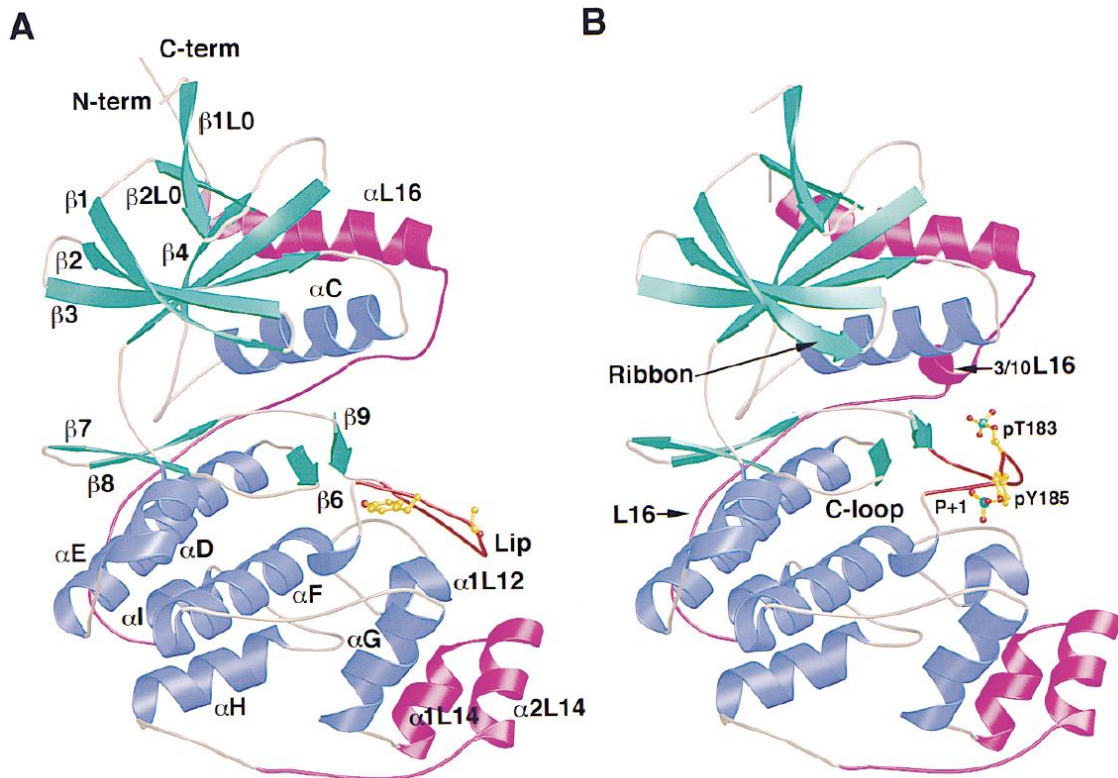


Abb. 2 Konformationsänderung von unphosphoryliertem und dual phosphoryliertem ERK2

Bändermodell von unphosphoryliertem (A) und phosphoryliertem ERK2 (B). Die N-terminale Domäne besteht größtenteils aus β -Faltblättern (grün) und den zwei Helices C (blau) und α L16 (magenta). Die C-terminale Domäne ist vor allem helical (blau) aufgebaut und enthält die Phosphorylierungslippe (rot) und die MAP Kinasen Insertion (magenta), die die P+1 Erkennungssequenz beinhaltet. Vergleicht man die Abbildungen A und B, zeigt sich unter anderem, dass die duale Phosphorylierung zu Strukturänderungen der Phosphorylierungslippe, L16 und an der MAP Kinasen Insertion führt. 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. Lizenz-Nummer: 4363140477002.

Diese Konformationsänderungen ermöglichen auch die Dimerisierung, die auf die Phosphorylierung folgt. Diese erfolgt durch die Interaktion von Leu 333 (Leucin333), Leu 336 und Leu 344 von zwei nahe beieinanderliegenden ERK2 Molekülen. Die Aminosäuren liegen in der Verlängerung des C-Terminus (L16). Zwar befinden sich diese Aminosäuren bereits im inaktiven Enzym an der Oberfläche, aber erst die erheblichen Konformationsänderungen des Enzyms ermöglichen dann die Bildung des sogenannten *Leucin zippers* (Reißverschluss), der durch hydrophobe Interaktion der Leucin-Reste beider beteiligten Enzyme entsteht. Zusätzlich trägt die Bildung eines Ionenpaars zwischen Histidin an Position 176 aus der Aktivierungsschleife und Glutamat an Position 343 in L16 zur Bildung des Dimer-Interfaces bei ^{23,43,54,55}.

1.5.6 Funktion und Zielproteine

ERK1/2 phosphorylieren ein Zielprotein durch Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf einen OH-Rest des *Targets*. Die durch Phosphorylierung von ERK1/2 bewirkte Konformationsänderung arrangiert die Wasserstoffbrückenbindungen an der Substratbinde-Domäne um, was dazu führt, dass pTyr (Phospho-Tyrosin) an die Oberfläche des Moleküls gelangt. Diese Prozesse bilden dann eine Tasche, die das Prolin an der P+1 Position des Substrates erkennt. Dies bringt den Serin- oder Threoninrest des Zielproteins an die richtige Position, sodass das γ -Phosphat auf die Aminosäure übertragen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyr185-Phosphorylierung für die ATP-Bindung verantwortlich ist, indem es die Affinität der Kinase für diesen Energieträger erhöht. Zudem wird die Phosphorylierung an Tyr185 und an Thr183 zur Stabilisierung des Substrates benötigt ^{56,57}.

Es gibt etwa 160 bekannte Substrate von ERK1/2, die in der gesamten Zelle verteilt sind. Viele davon befinden sich im Zellkern und scheinen an der Transkriptionskontrolle nach Stimulation beteiligt zu sein. Allerdings finden sich andere Substrate auch im Zytosol und anderen Zellorganellen, wo sie verantwortlich sind für Translation, Mitose und Verhinderung von Apoptose ^{58,59}.

Eines der am besten untersuchten nukleären Targets von ERK1/2 ist der Transkriptionsfaktor Elk1. Die Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren führt zur Phosphorylierung von Elk1 durch ERK1/2, woraufhin Elk1 verstärkt an die DNA binden kann. Elk1 zählt zu den *ternary complex factors*, die innerhalb weniger Minuten nach Stimulation der Zelle die Transkription von *immediate early genes*, wie *c-Fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog)* oder *c-Myc* initiieren können. Diese können ihrerseits die Expression von sogenannten *late-response* Genen induzieren, die an der Regulation des Zellüberlebens, der Zellteilung und der Zellmotilität, aber auch der Hypertrophieentstehung beteiligt sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 DNA direkt binden können und damit die Transkription direkt beeinflussen ^{25,58,60-62}.

Zu den zellulären Substraten von ERK1/2 zählen unter anderem die Proteine der RSK-Familie (ribosomale Protein-S6 Kinase), die eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade, die zu ERK1/2 führt, einnehmen und sowohl die nukleäre als auch die zytosolische Signalweiterleitung beeinflussen. Diese Serin-/Threonin-Kinasen werden nach

Stimulation mit Chemokinen, Neurotransmittern, Polypeptidhormonen oder Wachstumsfaktoren von ERK1/2 direkt phosphoryliert. Die RSK phosphoryliert wiederum mehr als 35 bisher bekannte Zielproteine, über die sie unter anderem antiapoptotisch wirkt. So kann sie zum Beispiel proapoptotische Proteine wie Bad (*Bcl-xL/Ccl-2 associated death promotor*) inaktivieren. Außerdem spielt die Kinase eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element-binding protein*). Sie verstärkt auch die Protein-Synthese durch Aktivierung des ribosomalen Proteins S6^{25,63}.

1.5.7 Regulation

ERK1/2 sind Enzyme ohne regulatorische Domänen oder autoinhibitorische Segmente. Trotzdem sind sie hochspezifisch bezüglich ihrer Substrate und Aktivierungsenzyme und ihre Aktivität wird streng kontrolliert.

Die Dauer und die Stärke des Signals, welches ERK1/2 aktiviert, sind Faktoren, welche die Spezifität von ERK1/2 erklären können. So zeigten Versuche, dass EGF-Stimulation nur eine transiente Aktivierung von ERK1/2 bewirkt, welche wichtig ist für die Proliferation der Zellen. Dagegen wurden durch Stimulation mit NGF (Nervenwachstumsfaktor) eine nachhaltige Aktivierung von ERK1/2 und deren nukleäre Akkumulierung erzeugt, die für Zell-Differenzierung benötigt werden. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass durch vorübergehende ERK1/2-Aktivierung c-Fos, ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activator protein 1*), transkribiert wird. Er wird aber nicht phosphoryliert und damit nicht stabilisiert. Wenn ERK1/2 dagegen lange aktiv sind, wird c-Fos phosphoryliert und dadurch stabilisiert, welches dann die Expression einer großen Bandbreite von Genen ermöglicht⁶⁴⁻⁶⁶.

Da ERK1/2 nur im dual-phosphorylierten Zustand aktiv sind, spielen auch MAPK-Phosphatasen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der ERK1/2-Regulation. So führt bereits die Entfernung eines der Phosphate an Thr 183 oder Tyr 185 zu einer merklichen Abnahme der Aktivität der Kinasen. Zum Beispiel kann die *dual specificity phosphatase* (DUSP) sowohl Phospho-Thyrosin, als auch Phospho-Serin-/Phospho-Threonin-Reste dephosphorylieren. DUSPs die selektiv an MAPK angreifen, werden auch MKPs (MAPK-Phosphatasen) genannt. Diese Enzyme können sowohl nukleär oder zytosolisch lokalisiert sein und werden ihrerseits auch durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert^{24,47,67}.

Außerdem spielen *Scaffold*-Proteine eine wichtige Rolle bei Kontrolle der ERK1/2-Aktivität. *Scaffold*-Proteine sind Proteine, die mehrere Komponenten einer Signalkaskade binden können, sie so in größere Nähe bringen und damit deren Interaktion erleichtern. Zudem ermöglichen sie den *Crosstalk* zwischen verschiedenen Signalwegen. Ein Beispiel ist die Proteinphosphatase 2A (PP2A). PP2A dephosphoryliert „desensibilisiertes“ Raf1 und KSR an inhibitorischen Domänen, nachdem die Zelle durch Wachstumsfaktoren stimuliert wurde. Dies ermöglicht dann die Aktivierung von Raf1 durch Ras. Durch *Scaffolds* kann auch die subzelluläre Lokalisation von ERK1/2 reguliert werden. Eines der am besten untersuchten *Scaffolds* ist KSR, der generell an Proteine wie MEK1/2, 14-3-3 Proteine und IMP (Inosinmonophosphat) im Zytosol gebunden ist. Nach Stimulation löst es sich von 14-3-3 und IMP und der Rest des Komplexes transloziert zur Plasmamembran, wo es aktiviertes Raf1 und ERK1/2 rekrutiert und damit die Signalweiterleitung erleichtert⁶⁸⁻⁷⁰.

Die β -Arrestine 1 und 2 sind auch *Scaffolds*, die Raf1 und MEK1/2-abhängige ERK1/2 Aktivierung verstärken und aktivierte ERK1/2 in endosomale Vesikel leiten^{71,72}. Auch andere *Scaffolds* wie MEK Partner 1 (MP1), und *similar expression to fgf genes* (Sef) ermöglichen die spezifische Lokalisation von ERK1/2 an bestimmten Zellorganellen und halten ERK1/2 somit im Zytosol fest. So fixiert auch das *Scaffold* Paxillin ERK1/2 am Zytoskelett^{24,31,58,73}.

1.5.8 Lokalisation

In ruhenden Zellen befindet sich ein Großteil der ERK1/2-Moleküle im Zytosol. Dies liegt vor allem an deren Interaktion mit Ankerproteinen wie MEK1/2, Sef1 und MP1. MEK1/2 besitzen im Gegensatz zu ERK1/2 eine nukleäre Exportsequenz, die deren schnellen Export aus dem Zellkern bewirkt. So kann die Kinase in großer Zahl unphosphoryliertes ERK1/2 effektiv binden, da die beiden Moleküle eine Vielzahl von Interaktionsstellen füreinander haben. Nach Stimulation der Zellen befinden sich dann aber 60-70 % aller ERK1/2-Moleküle im Nukleus. Dies lässt sich durch die große Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife von ERK1/2 erklären, was ihr Loslösen von den Ankerproteinen erzwingt. Die Dissoziation ermöglicht den Eintritt in den Kern von ERK1/2 und MEK1/2 separat voneinander, wo die Verweildauer von ERK1/2 von wenigen Minuten bis vielen Stunden variiert, aber MEK1/2 aufgrund ihrer

NES schnell wieder exportiert werden. Auch die Kinetik der ERK Thr188-Phosphorylierung spielt eine Rolle in der Lokalisation der Kinasen. Die Phosphorylierung an Thr188 steigt über die Zeit nach einem Stimulus langsam an, was zur Kumulation von phosphorylierten ERK1/2 im Kern führt^{22,43,54,58,74-82}.

Trotz der Wichtigkeit des Imports von ERK1/2 in den Zellkern ist der genaue Mechanismus der Kerntranslokation noch nicht völlig verstanden. Der Kern ist durch die Kernhülle vom Zytoplasma getrennt, die nur selektiv den Durchtritt von Proteinen in den Kern durch Kernporen zulässt. In den meisten Fällen gelangen Proteine mit einem nukleären Lokalisierungssignal (NLS) in den Kern, da das NLS die Interaktion mit den *Shuffle*-Proteinen Importin α oder β ermöglicht. Da ERK1/2 eine solche Sequenz aber nicht aufweisen können, muss die Kerntranslokation über einen anderen Mechanismus verlaufen. Adachi et al. zeigten 1999, dass es zwei Mechanismen für den Import der Kinase gibt: die passive Diffusion von Monomeren und der Stimulus-abhängige aktive Transport von ERK1/2-Dimeren. Außerdem wurde gezeigt, dass unphosphorylierte ERK1/2 durch einen Energie-unabhängigen Mechanismus in den Kern gelangen können, der durch direkte Interaktion mit Nukleoporinen ermöglicht wird. Auch die Rolle der Dimerisierung wird noch diskutiert. So gehen Adachi et al. davon aus, dass die Dimerisierung für die Translokation nicht notwendig ist. Auch Herrero et al. zeigten, dass ERK1/2 nach Stimulation dimerisieren, dies aber nur essenziell ist für die Aktivierung extranukleärer Substrate, nicht aber für die von nukleären Targets. Diesem Erklärungsmodell zufolge spielt die Dimerisierung damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytosolischen und nukleären Signalweiterleitung. Dagegen demonstrierten Khokhlatchev et al., mit der oben bereits erwähnten Dimerisierungsdefizienten ERK2- $\Delta 4$ -Mutante, dass die Translokation erst nach der Dimerisierung erfolgt, die durch duale Phosphorylierung ermöglicht wird. Ohne diese Dimerisierung kommt es demnach nicht zu dem von Lorenz et al. beschriebenen Binden der $\beta\gamma$ -Untereinheit und der Thr188-Autophosphorylierung an ERK1/2 und damit auch nicht zum Kernimport. Insgesamt lässt sich dadurch folgern, dass es wohl mehrere eigenständige Mechanismen gibt, die diese unterschiedlichen Erklärungsmodelle zulassen. So scheint die ERK1/2 Lokalisation und Aktivität sowohl von der Dauer und Intensität als auch von der Häufigkeit der Stimulation, abhängig zu sein^{22,23,43,83-88}.

Unabhängig vom genauen Aktivierungsmechanismus für den Kernimport von ERK1/2 zeigte Chuderland et al., dass ERK2 ein nukleäres Translokationssignal besitzt, welches aus den Aminosäuren Serin-Prolin-Serin besteht. Nach Stimulation wird dieses Segment phosphoryliert und kann dann mit dem *Shuffle*-Protein Importin 7 interagieren und in den Kern gelangen^{75,89}. Die genauen Umstände, die letztendlich zur Interaktion führen sind aber noch nicht geklärt.

Der Export aus dem Kern ist dann entweder durch MEK1/2-abhängigem Transport möglich oder durch Dephosphorylierung der Kinasen⁹⁰.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist den genaueren Mechanismus der Kerntranslokation herauszuarbeiten, wobei nochmal auf die Rolle der Dimerisierung eingegangen werden soll und auch versucht wird, die Rolle der ERK Thr188-Phosphorylierung weiter zu präzisieren. Dabei sollen auch genauer die Kerneffekte dieser Phosphorylierung untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll auch gezeigt werden, welchen Einfluss die Hemmung der ERK Thr188-Phosphorylierung auf die Zelle hat. Da einer der Schritte, die diese Phosphorylierung erst ermöglichen, die Dimerisierung von ERK1/2 ist, soll auch näher auf die Hemmung der Dimerisierung eingegangen werden. So wird die Fähigkeit von neu generierten Peptiden, die Dimerisierung von ERK1/2 zu verhindern, untersucht. Mit diesen Peptiden kann dann möglicherweise die hypertrophe Antwort von Kardiomyozyten reduziert werden. Da all die oben beschriebenen Schritte, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen, eine Akkumulation der Kinasen im Kern bewirken, soll der genaue Importmechanismus noch etwas genauer betrachtet werden. Dabei wird der Einfluss der Dimerisierung, der ERK Thr188-Phosphorylierung und eines der Peptide auf die Interaktion von ERK1/2 mit dem *Shuffle*-Protein Importin 7 analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, Roth, Sigma Aldrich und Merck bezogen.

Chemikalien	Hersteller
4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma Aldrich
Agarose	Peqlab
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Molecular Probes
Carbachol	Sigma Aldrich
Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran)	Pharmacia
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
30 % H ₂ O ₂	Merck
Luminol	Alexis
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure	AppliChem
Peqgold Proteinmarker III ®	Peqlab
Phenylephrin	Sigma Aldrich
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 (30 % (m/v) Acrylamid/ 0,8 % (m/v) Bisacrylamid)	Roth
Temed	AppliChem

2.1.2 Primäre Antikörper

	Spezies	Verdünnung für Western-Blot	Lösungsmittel für Western-Blot	Firma
c-MYC	Maus	1:3000	BSA	Sigma Aldrich
c-Myc-Tag	Maus	1:1000	Blockmilch	Cell Signaling
ERK	Kaninchen	1:1000	BSA	Cell Signaling
Flag	Maus	1:10.000	Blockmilch	Sigma Aldrich
HA (Hämagglutinin)	Kaninchen	1:2000	Blockmilch	Cell Signaling
Importin 7	Ziege	1:1000	BSA	Santa Cruz
MAX	Kaninchen	1:500	BSA	Santa Cruz
<i>Normal mouse</i> IgG	Maus	-	-	Santa Cruz

2.1.3 Sekundäre Antikörper

	Verdünnung für Western-Blot	Lösungsmittel für Western-Blot	Firma
Cy3 (Carbocyanin 3) Maus	-	-	Jackson ImmunoResearch
Cy3 Kaninchen	-	-	Jackson ImmunoResearch
Ziege	1:10.000	Blockmilch	Santa Cruz
Maus	1:10.000	BSA	Dianova
Kaninchen	1:10.000	BSA	Dianova

2.1.4 Zell-Kultur-Materialien

	Hersteller
MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	Sigma Aldrich
DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>) (ohne Magnesium und Calcium)	PANTM Biotech
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin (200 nM)	PANTM Biotech
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma Aldrich
Difco™ Trypsin 250	BD Biosciences
Desoxyribonuklease (DNase) I, RNase frei	Sigma Aldrich
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) (mit 4,5 g/l Glucose; Natriumpyruvat; 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L- Glutamin)	PANTM Biotech
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (0,05 % Trypsin; 0,02 % EDTA)	PANTM Biotech

2.1.5 Biologisches Material

	Zelltyp	Beschreibung	
COS7	Eukaryotische Zelle	Nierenzellen des Cercopithecus aethiops transformiert mit SV-40	Pharmakologie Würzburg ⁹¹
<i>E.coli</i> (<i>Escherichia coli</i>) <i>XL1-Blue</i>	Prokaryotische Zelle		Stratagene
HEK293	Eukaryotische Zelle	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit	Pharmakologie Würzburg ⁹²

		Adenovirus Typ 5 (Ad5)	
NRCM	Eukaryotische Zelle	Neonatale Rattenkardiomyozyten	Nadine Yurdagül- Hemmrich

2.1.6 Plasmidvektoren

	Bemerkung	Hersteller
pcDNA3		Invitogen
pcDNA3-Flag- ERK2	enthält N-terminalen Flag-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-Flag- ERK2-Δ4	enthält N-terminalen Flag-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-Flag- ERK2-Δ4D	Enthält N-terminalen Flag-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-HA-ERK2	enthält N-terminalen HA-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-YFP (gelb fluoreszierendes Protein)-ERK2	enthält N-terminalen YFP-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-YFP- ERK2-Δ4	Enthält N-terminalen YFP-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-YFP- ERK2-Δ4D	Enthält N-terminalen YFP-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
pcDNA3-α _{1B} - adrenerger-Rezeptor		K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg

2.1.7 Adenoviren

	Bemerkung	Referenz
AdV-Flag- ERK2	enthält N-terminalen Flag-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg

AdV-Flag-ERK2 (Δ 4D)	enthält N-terminalen Flag-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
---------------------------------	----------------------------------	---------------------------------------

2.1.8 Peptide

	Bemerkung	Hersteller
ERK2-Peptid	enthält N-terminalen myc-tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
Fluorescein-HIV-Tat (Humanes Immundefizienz- Virus- <i>Trans-Activator of</i> <i>Transcription</i>)		Jutta Eichler, Pharmazie, Erlangen
Fluorescein-Penetratin		Jutta Eichler, Pharmazie, Erlangen
Fluorescein-Penetratin- JOLU22		Jutta Eichler, Pharmazie, Erlangen
Penetratin		Innovagen Lund Sweden

2.1.9 Kits

	Firma
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Plasmid Plus Midi Kit [®]	Qiagen
The Duolink [®] In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit	Sigma Aldrich

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

	Firma
Ampuwa [®]	Fresenius
Autoradiographiefilme	Fuji Film
Deckgläser	Hartenstein
Fluoromount G [™] (<i>Mounting-Medium</i>)	SouthernBiotech

Immersionsöl Microscopy grade (fluoreszenzfrei)	AppliChem
nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare
Objektträger	Hartenstein
Polyvinylidendifluorid (PVDF)- Membran	Millipore Corporation
Zellkulturschalen	Sarstedt

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von *Escherichia Coli*

Für das Einbringen von DNA in *E.coli* (*Escherichia coli*) *XLI-Blue* Bakterien wurde die Hitzeschockmethode verwendet. Dabei werden die Bakterienzellen für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht, indem erst durch Kälte das Anhaften der DNA an der Oberfläche der Bakterien begünstigt wird und dann durch kurzzeitige Erhitzung auf 42 °C Poren in der Zellmembran gebildet werden, die dann den Eintritt der DNA in die Bakterien ermöglicht ⁹³.

Zuerst wurden 1 µg der DNA in einem pcDNA3-Vektor zu 100 µl Bakterien gegeben und 15 min (Minuten) lang auf Eis gekühlt. Dann erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 50 Sekunden. Die Bakterien wurden wieder für 1 Minute auf Eis gekühlt, dann mit 900 µl LB (*lysogeny broth*)-Medium versetzt und für 50 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium: 1,6 % (Masse/Volumen (m/v)) Pepton aus Casein; 1 % (m/v) Hefeextrakt; 0,5 % (m/v) NaCl

LB-Agarplatten: 1,2 % (m/v) Agar in LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin

2.2.1.2 Aufreinigung der DNA

Zur Aufreinigung der DNA wurde am nächsten Tag 80 ml LB-Medium mit 80 µl Ampicillin versetzt. Eine Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und über Nacht im LB-Medium auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die

weitere Aufreinigung der DNA erfolgte am nächsten Tag mit dem Plasmid Plus Midi Kit® nach dem Protokoll des Herstellers. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch mit dem NanoDrop (Thermo Scientific) ermittelt.

Ampicillin: 0,1mg/ml in H₂O

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Passagieren von Zelllinien

HEK293-Zellen und COS7-Zellen wurden bei 37 °C und 7% CO₂ im Inkubator in Kompletmedium auf Zellkulturplatten kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage mit ca. 80 % Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) gewaschen. Dann wurden 3,5 - 4,5 ml Trypsin/EDTA dazugegeben, um die Zelle von der Platte zu lösen. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2 bis 1:7 auf neue Zellkulturschalen gebracht.

Kompletmedium: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (4,5 g/l Glukose); 10% (Volumen/Volumen (v/v)) FCS (fetales Kälberserum); 1% (v/v) L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

2.2.2.2 Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Präparation neonataler Ratten-Kardiomyozyten (NRCMs) wurde von Nadine Yurdagül-Hemmerich durchgeführt. Nachdem die Herzen aus 1-3 Tagen alten Sprague-Dawley-Ratten isoliert wurden, wurden Vorhöfe und Koronararterien entfernt und in kaltem CBFHH (*Ca²⁺- and bicarbonate-free Hank's buffer with HEPES*)-Puffer gesammelt. Anschließend wurden die Herzen mit DNase-haltiger Trypsinlösung 15 Minuten lang enzymatisch verdaut. Der Überstand mit den Erythrozyten wurde verworfen. Nun erfolgte der weitere Verdau in mehreren Runden, bei dem jeweils neue Trypsin-DNase-Lösung auf die noch nicht verdauten Zellen gegeben wurde, gefolgt von 10 Minuten Inkubation. Um den Verdau abzustoppen wurde die Suspension in Falcons mit FCS pipettiert. Diese Schritte wurden wiederholt, bis das gesamte Gewebe verdaut war. Danach wurde die gesamte Zellsuspension bei 800 g (Eppendorf Centrifuge 5804) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit *Preplating*-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf Zellkulturschalen verteilt und 1h (Stunde) bei 37 °C und 1% CO₂ vorinkubiert. Nach

Ablauf der Stunde wurde der Überstand mit den Kardiomyozyten abgenommen, mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und $0,3 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter in mit Poly-L-Lysin beschichteten 12-well Platten in 5 %- Kardiomyozytenmedium (5 % FCS) ausgesät. Nach 24h wurde das Medium auf 1 %-Kardiomyozytenmedium (1 % FCS) gewechselt.

CFBHH: 5,55 mM Dextrose; 20,06 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure); 137 mM NaCl; 0,34 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 5,36 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4 ; 0,81 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin; pH 7,4

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

Preplating-Medium: MEM (*Minimum Essential Medium*); 2 mM L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin; 5 % (v/v) FCS

Kardiomyozyten-Medium (5%/1%/0%): MEM; 1% (v/v) L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin; 30 µg/ml BrdU; 5%/1%/0% FCS (v/v)

2.2.2.3 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Um die Haftung der Zellen in den *Multiwell*-Schalen zu verbessern, wurde der Boden der Platten (bzw. die Deckgläser) für 15 Minuten mit Poly-L-Lysin bedeckt. Dieses wurde dann abgesaugt und durch DPBS ersetzt, bis die Zellen in die *wells* ausgesät wurden.

Poly-L-Lysin: 1:3 in DPBS

2.2.2.4 Zählen der Zellen mit der Neubauer-Zählplatte

Um in den *wells* der Zellkulturschalen jedes Mal eine exakte Zellzahl zu erreichen, wurden die COS7-Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Diese besteht aus vier großen Quadraten mit jeweils 16 kleineren Quadraten. Die Zellen wurden wie beim Passagieren von der Platte gelöst und in 10ml Kompletmedium suspendiert. Mit einer Pasteurpipette wurden einige Zellen in die Zählkammer eingebracht. Dort wurden jeweils vier kleine Quadrate in jedem der vier Großquadrate gezählt, die Zellzahl wurde mit 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

2.2.2.5 Transfektion

2.2.2.5.1 Ca²⁺-Phosphat-Transfektion

HEK293-Zellen wurden mit der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis von 1:4 bis 1:8 auf 10cm Platten ausgesät. Nach 4 – 6 Stunden wurde der Transfektionsmix angesetzt. Die folgende Tabelle gilt für 1ml Transfektionsmix der für jeweils eine Platte verwendet wurde:

	Menge
H ₂ O	450 µl
2,5 M CaCl ₂	50 µl
DNA	3 µg Flag-ERK2-Wildtyp (wt); 3 µg Flag-ERK2-Δ4; 3 µg Flag-ERK2-Δ4D; 3 µg pcDNA3; 10 µg ERK2-Peptid
2x BBS (<i>BES-buffered saline</i>)-Puffer	500 µl

Nachdem das BBS als Letztes dazugegeben wurde, wurde der Mix kräftig geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit bilden sich Calcium-Phosphat-Kristalle, an denen die negativ geladene DNA bindet. Diese werden dann von der Zelle per Endozytose aufgenommen⁹⁴. Am Ende wurde je 1 ml des Transfektionsmix auf eine Platte gegeben und dann über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2x BBS: 50 mM BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonsäure); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 6,95

2.2.2.5.2 DEAE-Dextran-Transfektion

COS7-Zellen wurden mit der DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran)-Methode transfiziert. Dafür wurden einen Tag vor der Transfektion ca. 50.000 Zellen pro Milliliter in 12-*well*-Platten ausgesät. Der Transfektionsmix für einen *well* einer 12-*well* Platte setzte sich wie folgt zusammen:

	Menge
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)-Puffer	100 μ l
DNA	0,4 μ g α_{1B} -Rezeptor; 1,4 μ g pcDNA3; 0,3 μ g YFP-ERK2-wt; 0,3 μ g YFP-ERK2- Δ 4; 0,3 μ g YFP-ERK2- Δ 4D; 0,6 μ g Flag-ERK2-wt; 0,6 μ g HA (Hämagglutinin)-ERK2-wt; 2 μ g E2-Peptid
DEAE	100 μ l

Die Substanzen wurden nacheinander zusammengemischt und der Transfektionsmix vorsichtig geschüttelt. Das Medium der *wells* wurde abgesaugt und dann mit 1 ml TBS pro *well* gewaschen. In jeden *well* wurden 200 μ l des Transfektionsmix gegeben und 15 Minuten bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Dabei bindet das positiv geladene DEAE-Dextran an die DNA und ermöglicht so die Interaktion mit der Zellmembran⁹⁵. Nach den 15 Minuten wurden 800 μ l Chloroquinmedium in die *wells* gegeben und dann 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und 500 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) für 30 - 60 Sekunden auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit 1 ml DPBS gewaschen. Nach der Zugabe von 1ml Komplettmedium zu den Zellen wurden diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Chloroquin und der DMSO-Schock bewirken eine Erhöhung der Transfektionseffizienz, wobei DMSO dies durch die Permeabilisierung der Zellmembran bewirkt und Chloroquin, indem es den Abbau der DNA in den Lysosomen aufhält⁹⁶⁻⁹⁹.

TBS: 25 mM Tris; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl₂; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM NaH₂PO₄; pH 7,4

DEAE: 1 mg/ml in TBS

Chloroquinmedium: DMEM mit 1 % Chloroquin (5 mg/ml in TBS) und 10 % FCS

DMSO: 10 % (v/v) in DPBS

2.2.2.5.3 Adenovirale Transduktion

Angela Tomasovic transduzierte die NRCMs mit Adenoviren 24 Stunden nach dem Mediumwechsel auf 1 % Kardiomyozytenmedium. Der jeweilige Virus wurde 1:2000 in

Kardiomyozytenmedium (0% FCS) verdünnt und 30 µl Flag-ERK2-wt oder 40 µl Flag-ERK2-Δ4D des Transduktionsmixes in die *wells* gegeben, um eine vergleichbare Überexpression zu erhalten. Nach 48 Stunden wurden die Zellen dann für die Versuche verwendet.

2.2.2.6 Hungern der Zellen

Einen Tag nach Transfektion wurden sowohl die COS7- als auch die HEK293-Zellen für 24 Stunden gehungert, damit sie empfindlich für die Stimulation am nächsten Tag werden. Dafür wurde das Kompletmedium abgesaugt und die entsprechende Menge Hungermedium auf die Zellen gegeben. Bei NRCMs wurde statt Hungermedium 0% Kardiomyozytenmedium (0% FCS) verwendet.

Hungermedium: DMEM (4,5 g/l Glukose); 1% (v/v) L-Glutamin; 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten für Western-Blot-Analyse

Für die Herstellung von Lysaten aus COS7-Zellen und NRCMs wurde das Medium der Zellen (die in 12-*well* Platten ausgesät waren) abgesaugt und 125 µl blauer Lysispuffer dazugegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit Hilfe der Pipette aus den *wells* gekratzt, in Eppendorfgläser gegeben, sonifiziert und die gesuchten Proteine mit Western-Blot detektiert oder bei -20 °C eingefroren.

Blauer Lysispuffer: 75% farbloser Lysispuffer; 25% 4x Laemmli-Puffer; PMSF 1:100 (v/v); PI 1:100 (v/v)

Farbloser Lysispuffer: 50% 2x TSE; 10% 10xIBx (2-Iodoxybenzoesäure); 1% Triton X; 39% H₂O

2x TSE: 100 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan); 600 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,02 mM NaN₃; pH 7,4

10x IBx: 500 mM NaF; 50 mM Na₄P₂O₇; 1 mM Na₃VO₄; 0,02% (v/v) NaN₃

4x Laemmli-Puffer: 40 mM Tris (pH 7,4); 277 mM SDS (Natriumdodecylsulfat); 40 % (m/v) Glycin; 0,75 mM Bromphenolblau; 2,85 M β -Mercaptoethanol

PI: Soybean/Trypsin 2 mg/ml; Benzamidin 6 mg/ml in 50 mM Tris; pH 7,4

PMSF: 17,4 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid in Ethanol

2.2.3.2 Immunpräzipitation

Ziel der Immunpräzipitation (IP) ist, die Interaktion von zwei Proteinen nachzuweisen. Dabei wird ein Antikörper, der gegen eines der beiden Proteine gerichtet ist, mit seinem Fc-Anteil über Protein A an kleine Kügelchen, sogenannte *beads*, gekoppelt. Zell-Lysate werden mit diesen *beads* inkubiert. Wenn die Proteine interagieren, wird das erste Protein über den Antikörper und das zweite Protein dann über das erste Protein an die *beads* gebunden. Durch Zentrifugations- und Waschschrte kommt man so an ein Gemisch, das idealerweise nur aus den *beads* und beiden Proteinen bestehen sollte, welche dann mit Western-Blot identifiziert werden können.

2.2.3.2.1 Vorbereitung der *beads*

Einen Tag vor der eigentlichen Immunpräzipitation wurden die *beads* vorbereitet. Dazu wurden in 1 ml DPBS 8 μ l nProteinA Sepharose *beads* pro Probe gegeben und zwei Mal für eine Minute bei 4 °C mit 14.000 rpm (*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) (Hettich Zentrifuge EBA 12 R) mit DPBS gewaschen. Pro Probe wurden 5 μ l Flag Maus oder 2 μ l IgG Maus Antikörper dazugegeben und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Drehen inkubiert.

2.2.3.2.2 Immunpräzipitation

Zwei Tage nach Transfektion, wurden die gehungerten HEK293-Zellen mit 100 μ M Carbachol für 15 Minuten bei 37 °C stimuliert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurde auf jede Platte 1 ml farbloser Lysepuffer (mit PI 1:100 und PMSF 1:100) gegeben und bei 4 °C für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann von den Platten gekratzt, in Eppendorfgefäße gegeben und für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. In dieser Zeit wurden die *beads* zwei Mal mit 1 ml DPBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Pro Probe wurden jeweils 55 μ l der *beads* in neue Eppendorfgefäße gegeben. 850 μ l des Überstandes der Zelllysate wurden dann für

2h bei 4 °C mit den *beads* inkubiert. Außerdem wurden 75 µl des restlichen Überstandes zu 25 µl 4x Laemmli gegeben, um mit Hilfe von Gelelektrophorese und Western-Blot sicherzustellen, dass die Transfektion funktioniert hat. Nach den 2 Stunden wurden die *beads* jeweils viermal mit 1 ml DPBS gewaschen, 2 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Dann wurden 25 µl 4xLaemmli-Puffer dazu gefügt und alles für 20 Minuten bei 40 °C gerüttelt, um die Proteine von den *beads* zu lösen. Die Proteine wurden bei -20 °C eingefroren oder gleich auf ein Gel aufgetragen und per Western-Blot mit Antikörper gegen Importin 7 und Flag identifiziert.

2.2.3.3 Gel-Elektrophorese

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde SDS-PAGE (Polyacrylamid) Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde ein diskontinuierliches Gel gegossen, welches aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Im Sammelgel wurden die Proteine erst konzentriert, um dann im Trenngel eine schärfere Trennung nach ihrem Molekulargewicht zu erhalten. Die folgenden Mengenangaben gelten für ein Hoefer-Gel (16 x 18 cm) oder 6 Mini-Gele (Biorad):

	Trenngel (12,5 % Acrylamid)	Sammelgel (4 % Acrylamid)
H ₂ O	10 ml	7,5 ml
4x Lower	7,5 ml	---
4x Upper	---	3ml
Rotiphorese® Gel 30	12,5 ml	1,5 ml
Temed	15 µl	12 µl
APS	195 µl	120 µl

Zuerst wurden jeweils Wasser, Lower und Acrylamid für das Trenngel vermischt und am Ende Temed und APS dazugegeben, welche die Polymerisierung starten. Die Mischung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Wasser abgegossen. Für das Sammelgel wurde genauso verfahren und dieses auf das Trenngel gegossen, zusätzlich wurde noch ein Kamm eingesetzt, um Taschen für das Auftragen der Proteine zu bilden ^{100,101}.

APS: 10 % (m/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O

4x Lower: 1,5 M Tris (pH 8,8); 0,4 % (m/v) SDS

4x Upper: 0,5 M Tris (pH 6,8); 0,4 % (m/v) SDS

Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde es in einen Tank mit SDS gestellt und 5-80 µl der Proteinlysate in die Taschen gefüllt. Eine Spannung wurde für 1 – 2 Stunden angelegt, um die Proteine im Trenngel aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanten 200 V für kleine Gele bzw. bei 70 mA pro Gel bei großen Gelen. Das SDS bewirkt das Aufbrechen der Proteine in ihre Polypeptidkette und damit die Trennung der Proteine nach ihrer Größe¹⁰². Um die ungefähre Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde zusätzlich noch der pepGOLD Protein Marker III (20-122 kDa) aufgetragen.

10x SDS-Puffer: 0,25 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (m/v) SDS

2.2.3.4 Elektrophoretischer Proteintransfer (Blotten)

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine im Gel, wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran kurz in Methanol aktiviert und mit dem Gel jeweils zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Schichten Filterpapier und Schwämmen gelegt und in eine Kassette eingebracht. Die Kassette wurde in einem mit kühlem Transferpuffer gefüllten Tank gestellt. Die Proteine wurden dann bei 100 V für 1 Stunde auf die PVDF-Membran übertragen.

Transferpuffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol

2.2.3.5 Immunodetektion der transferierten Proteine (Western-Blot)

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockmilch unter ständigem Schütteln gelegt, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Dann wurde die Milch abgeschüttet und der entsprechende Antikörper für das nachzuweisende Protein, gelöst in Blockmilch oder in BSA (Bovines Serum Albumin)-Waschpuffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Blockmilch: 100 mM NaCl; 5 % (m/v) Magermilchpulver; 10 mM Tris (pH 7,4); 0.1 % (v/v) Tween 20

BSA-Waschpuffer: 50 mM Tris (pH 7,6); 150 mM NaCl; 0,2 % (v/v) Nonidet P-40; 2,5 g/l Albumin Fraktion V BSA; pH 7,0

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten mit BSA-Waschpuffer oder Blockmilch abgewaschen und danach der an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper (der Spezies des Erstantikörpers entsprechend) auf die Membran gegeben und unter Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Zweitantikörper dreimal für 10 Minuten mit BSA-Waschpuffer abgewaschen. Die Membran wurde dann mit ca. 2 ml ECL (Elektrochemilumineszenz) inkubiert (entweder mit je 1 ml selbst gemachter Lösung A und B im Verhältnis 1:1 oder mit gekauftem Pierce® ECL Plus Western-Blotting Substrate von Thermo Scientific mit Lösung A und B im Verhältnis 40:1), welches Luminol als ein Substrat für die Meerrettich-Peroxidase enthält. Das dabei entstehende Signal wurde dann in der Dunkelkammer mit Autoradiographiefilmen detektiert.

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

Lösung B: 100 mM Tris (pH 8,3); 1,8 % (v/v) H₂O₂

2.2.3.6 Abwaschen der Antikörper (Strippen)

Um bereits entwickelte PVDF-Membranen zur Detektion weiterer Proteine zu verwenden, wurden die Membranen gestrippt. Dazu wurden sie kurz in Methanol aktiviert und dann zwei Stunden lang bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer geschwenkt. Im Anschluss daran wurde die Membran wie beim Western-Blot eine Stunde lang in Blockmilch geblockt und wie zuvor beschrieben erneut entwickelt.

Stripping-Puffer: 100 mM Glycin (pH 2,5); 0,1 % (m/v) SDS

2.2.3.7 Dot blot

Um sicherzustellen, dass HEK293-Zellen mit dem myc-ERK2-Peptid transfiziert wurden, wurde ein Dot blot durchgeführt. Anders als bei der Gel-Elektrophorese werden dabei Proteine nicht nach ihrer Größe aufgetrennt, sondern direkt auf eine PVDF-Membran aufgetragen, da das Peptid mit 7,1 kDa zu klein ist, um es mit normalem Western-Blot sicher nachzuweisen.

Um die mit pcDNA3, Flag-ERK2 oder Peptid transfizierten HEK293-Zellen zu lysieren, wurde pro Platte folgender Puffer hergestellt und nach dem Absaugen des Mediums auf die Platten gegeben:

	Menge
DPBS	300 μ l
10x IBx	30 μ l
PI	3 μ l
PMSF	3 μ l

Die Zellen wurden 10 Minuten bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem Puffer inkubiert, von den Platten gekratzt, sonifiziert und dann 10 Minuten bei 14.000 rpm (Hettich Zentrifuge EBA 12 R) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße gegeben und die Proteinkonzentration mit der BCA (Bicinchoninsäure)-Methode bestimmt. Dazu wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Methode beruht darauf, dass Kupferionen mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen reagieren, die dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Dieser kann bei 562 nm photometrisch gemessen werden und ist proportional zur Proteinkonzentration ¹⁰³. Die Proben wurden dann auf die kleinste der ermittelten Konzentrationen mit Ampuwa®-Wasser eingestellt und für den Dot blot verwendet.

95 μ l Proben wurden mit 5 μ l β -Mercaptoethanol vermischt. Auf eine PVDF-Membran wurden vorsichtig mit Bleistift drei geschlossene Kreise gezeichnet, die Membran mit Methanol aktiviert und auf drei, mit Transferpuffer befeuchteten Schichten Filterpapier gelegt, damit die Membran nicht austrocknet. In jeden Kreis wurde je ein Tropfen (10 μ l) der Proteinproben gegeben, 10 Minuten gewartet bis der Tropfen eingezogen war und nochmal ein Tropfen darauf gegeben. Die Membran wurde dann eine Stunde in Blockmilch geblockt und dann mit dem c-myc Antikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Signal wie beim Western-Blot detektiert.

2.2.4 Fluoreszenzbasierte-Methoden

2.2.4.1 Fixieren von Zellen

Um COS7-Zellen und NRCMs auf den Deckgläsern in ihrer Position zu fixieren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 500 μ l DPBS in den 12-well Platten

gewaschen. Dann wurden 500 μ l 4 % Paraformaldehydlösung (PFA) in die *wells* gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4 % (m/v) PFA: 4 % (m/v) Paraformaldehyd; 10 % 10x PBS

2.2.4.2 Färben des Zellkerns und mounten

Der Zellkern wurde mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) gefärbt. DAPI bindet an Adenin- und Thymin-reiche Sequenzen der DNA und bildet dort einen fluoreszierenden Komplex und kann so genutzt werden, um den Zellkern spezifisch anzufärben¹⁰⁴. Dazu wurden 300 μ l DAPI in die *wells* gegeben und 30 Minuten lang im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit 500 μ l DPBS auf dem Schüttler gewaschen und die Deckgläser dann mit der Oberseite nach unten mit Fluoromount GTM (SouthernBiotech) auf Objektträger *gemountet*. DAPI wurden mit dem Diode Laser bei 405 nm angeregt und zwischen 430 bis 453 nm gemessen.

DAPI: 700 ng/ml in H₂O

2.2.4.3 Analyse der nukleären zu zytosolischen Verteilung von YFP-ERK2

Um die Verteilung von YFP-ERK2 und seinen Mutanten im Zellkern und im Zytosol unter stimulierten und unstimulierten Bedingungen zu vergleichen, wurden COS7-Zellen in mit Poly-L-Lysin beschichteten 12-*well* Platten auf Deckgläser ausgesät (50.000 Zellen/ml). Die Zellen wurden mit α_{1B} -Rezeptor und YFP-markiertem ERK2-wt, ERK2- Δ 4 oder ERK2- Δ 4D transfiziert und am nächsten Tag für 24 Stunden gehungert. Danach wurden sie für 10 Minuten mit 10 μ M Phenylephrin bei 37 °C stimuliert. Die Zellen wurden zweimal mit 500 μ l DPBS gewaschen und mit 4 % PFA fixiert. Nachdem die Zellen dreimal mit 500 μ l DPBS gewaschen wurden, wurde der Zellkern mit DAPI gefärbt und dann auf Objektträger *gemountet*.

Die Zellen wurden mit einem Leica TCS SP5 Konfokal-Mikroskop (Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 OIL) analysiert. Das YFP-Signal wurde unter Verwendung von Fluoreszenz-freiem Immersionsöl mit dem Argon Laser bei 514 nm angeregt, zwischen 530 und 620 nm gemessen und mit dem DAPI-Signal abfotografiert. Alle Bilder wurden mit 2,3fachem Zoom aufgenommen, jeweils mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel.

Um das Verhältnis der Verteilung von YFP-ERK2 zwischen Zellkern und Zytosol zu analysieren wurden jeweils die Bilder des YFP-Signals und des DAPI-Signals im Image J Viewer geöffnet. Zuerst wurde der Zellkern umfahren und dann das Zytosol der Zelle unter Ausschluss des Zellkerns. Die mittlere Signalstärke des YFPs wurde dann von Zellkern und Zytosol gemessen und der Quotient aus beiden gebildet. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 6[®] ausgewertet.

2.2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung

Da für den Duolink[®] proximity ligation assay der COS7-Zellen Antikörper in ihrer optimalen Konzentration benötigt wurden, mussten zunächst Immunfluoreszenzfärbungen mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen, die in 12-*well* Schalen mit Deckgläsern ausgesät wurden (50.000 Zellen/ml), zweimal mit 500 µl DPBS gewaschen und dann mit 4 % PFA fixiert. Damit die Antikörper in die Zellen eindringen können, mussten die Zellen erst permeabilisiert werden. Dazu wurde 500 µl eiskaltes Aceton:Methanol (1:1) für 2 Minuten in die *wells* gegeben und dann wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen 30 Minuten lang mit 500 µl BSA-Blocklösung geblockt. Nachdem die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen wurden, wurden 25 µl der Antikörperlösungen (anti-Flag, anti-HA, anti-MYC oder anti-MAX) auf die Deckgläser gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden in einer Spanne von 1:10 bis 1:2000 in 1 %igem BSA gelöst. Der Antikörper wurde abgewaschen indem die *wells* dreimal für fünf Minuten mit 500 µl DPBS geschwenkt wurden. Als Zweitantikörper wurden 25 µl Cy3 (Carbocyanin3) Maus oder Cy3 Kaninchen 1:500 (verdünnt in 1 %igem BSA) verwendet. Diese wurden eine Stunde lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und alle ungebundenen Antikörper anschließend dreimal für fünf Minuten mit DPBS abgewaschen. Am Ende wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Deckgläser auf Objektträger *gemountet*.

Das Cy3 Signal wurde am Mikroskop mit dem Argon Laser bei 514 nm angeregt und zwischen 550 und 620 nm gemessen. Die optimalen Antikörperkonzentrationen wurden für den Duolink[®] Assay verwendet.

BSA-Blocklösung: 10 % (m/v) BSA; 0,01 % (v/v) Tween; 300 mM Glycin in DPBS

1%iges BSA: 1 % (m/v) BSA in DPBS

2.2.4.5 Duolink[®] proximity ligation assay

Der Duolink[®] proximity ligation assay ermöglicht die Detektion der Interaktion von zwei Proteinen am konfokalen Mikroskop. Zuerst werden zwei Antikörper gegen die beiden Proteine auf die Zellen gegeben, an die dann Spezies-entsprechende Zweitantikörper binden, an denen wiederum Oligonukleotide gekoppelt sind. Diese Zweitantikörper werden PLA (*proximity ligation assay*)-Proben genannt. Die Oligonukleotidketten werden im nächsten Schritt durch eine Ligase miteinander zu einem kontinuierlichen Kreis verknüpft, sofern sich die Proteine in enger Nähe (maximaler Abstand 40nm) zueinander befinden. Als Letztes wird dann eine Polymerase zusammen mit Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden auf die Proben gegeben. Die Polymerase repliziert die DNA, sodass ein Biopolymer aus repetitiver DNA entsteht. Die fluoreszierenden Oligonukleotide können an dieses Produkt binden, welches dann mit dem Laser detektiert werden kann¹⁰⁵.

50.000 COS7-Zellen wurden pro Milliliter auf Deckgläser ausgesät, transfiziert und gehungert. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden sie mit 10 µM Phenylephrin für 10 Minuten bei 37 °C stimuliert. Danach wurden die *wells* zweimal mit 250 µl DPBS gewaschen und mit 250 µl 4 % PFA fixiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit DPBS gewaschen und mit eiskaltem Aceton:MeOH (1:1) für zwei Minuten permeabilisiert. Nachdem sie 30 Minuten lang mit BSA-Blocklösung geblockt wurden, wurden 20 µl der Antikörper in 1 % BSA auf die Deckgläser gegeben und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Flag (Maus) 1:200 mit HA (Kaninchen) 1:500 oder MYC (Maus) 1:350 mit MAX (Kaninchen) 1:200.

Danach wurden die *wells* zweimal für 5 Minuten mit 250 µl Duolink[®] *In Situ Wash Buffer A* gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden im Einklang mit dem Protokoll des Herstellers für das Duolink[®] *In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit* durchgeführt. Für jedes *well* wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Lösungen hergestellt. Für die PLA-Proben wurde 4 µl PLA MINUS Probe und 4 µl PLA PLUS Probe zu 12 µl 1 %igem BSA gegeben und die Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 20 µl der Lösung auf jedes Deckglas gegeben und für eine Stunde in einer feuchten Kammer

bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder zweimal mit *Wash Buffer A* gewaschen. Um die Ligations-Lösung herzustellen wurden 4 µl des 5x *Ligation stock* in 15,5 µl Ampuwa[®]-Wasser verdünnt. Kurz bevor die Lösung auf die Zellen gegeben wurde, wurden 0,5 µl der Ligase dazugegeben. Dann wurden die Zellen damit für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Während die *wells* dann zweimal für zwei Minuten mit 250 µl *Wash Buffer A* gewaschen wurden, wurde die Amplifizierungs-Lösung hergestellt. 4 µl des 5x *Amplification stock* wurden zu 15,75 µl Ampuwa[®]-Wasser dazugegeben. Kurz bevor die Lösung auf die Deckgläser aufgetragen wurde, wurden noch 0,25 µl Polymerase dazugegeben. Die darauffolgende Inkubation wurde für 100 Minuten im Dunkeln bei 37 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Danach wurde die Amplifikationslösung zweimal für 10 Minuten mit 1x *Wash Buffer B* abgewaschen und dann noch einmal für eine Minute mit 0,01x *Wash Buffer B*. Anschließend wurden die Deckgläser mit Duolink[®] *In Situ Mounting Medium*, welches bereits DAPI enthält auf Objektträger *gemountet* und über Nacht im Dunkeln trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser auf dem Objektträger mit klarem Nagellack fixiert und bei -20 °C aufbewahrt bis sie am Mikroskop untersucht wurden. Das Signal wurde mit dem HeNe Laser bei 594 nm angeregt und zwischen 604 bis 656 nm aufgenommen.

2.2.4.6 Transfektion mit Zell-penetrierenden Peptiden

Um die richtige Konzentration der Zell-penetrierenden Peptide für spätere Versuche zu finden, wurden zunächst die Peptide Fluorescein-Penetratin und Fluorescein-HIV Tat (Humanes Immundefizienz-Virus-*Trans-Activator of Transcription*) in den Konzentrationen von 1-7 µM in HKR (*HEPES-buffered Krebs-Ringer solution without BSA*) gelöst. COS7-Zellen wurden am Tag zuvor in 12-*well* Platten auf Deckgläser ausgesät (50.000 Zellen/ml). Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und durch 200 µl der Peptidlösungen ersetzt. Dann wurden sie für 30 Minuten bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die *wells* zweimal mit 500 µl HKR gewaschen. Danach wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und auf Objektträger mit Fluoromount GTM *gemountet*.

Am Mikroskop wurde das an die Peptide gekoppelte Fluorescein mit dem Argonlaser bei 514 nm angeregt und mit 500 bis 540 nm detektiert.

HKR: 5 mM HEPES; 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 2,05 mM MgCl₂ * 6H₂O; 1,8 mM CaCl₂ * 2 H₂O; 1 g/l Glucose

2.2.4.7 Duolink[®] proximity ligation assay mit Zell-penetrierenden Peptiden

Für den Duolink[®] proximity ligation assay mit dem an Penetratin gekoppelten Peptid JOLU22, wurde der Duolink[®] genau wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle wurde Fluorescein-Penetratin verwendet. Vor der Stimulation wurden die Peptide in einer Konzentration von 4 µM in HKR gelöst. Jeweils 100 µl der Peptidlösungen wurden in die *wells* gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 500 µl DMEM-Medium (auf 37 °C gewärmt) auf die Zellen gegeben und dann wie oben beschrieben stimuliert.

2.2.4.8 Phalloidin-Färbung

Für die Phalloidin-Färbung wurden NRCMs auf Deckgläser in 12-*well* Platten ausgesät, mit den Adenoviren Flag-ERK2-wt und Flag-ERK2-Δ4D transduziert und am nächsten Tag für 24 Stunden gehungert. Im Anschluss wurden sie wiederum für 24 Stunden mit 4 µM Phenylephrin stimuliert. Am nächsten Tag wurden die *wells* dreimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen, für zwei Minuten mit eiskaltem Aceton:Methanol (1:1) permeabilisiert und für 20 Minuten mit 2 % (m/v) BSA in DPBS geblockt. Dann wurde das Zytoskelett mit dem Farbstoff Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin (Molecular Probes) gefärbt. Dazu wurde der Farbstoff in DPBS gelöst (5 U/ml). Jeweils 25 µl der Lösung wurden auf den Deckgläsern aufgetragen und 20 Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Phalloidin bindet dabei an F-Aktin und kann dann, da es mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 markiert ist, im konfokalen Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Die Zellen wurden noch einmal mit DPBS gewaschen und dann der Zellkern wie oben beschrieben mit DAPI gefärbt. Danach wurden die Deckgläser auf Objektträger *gemountet*.

Die Zellen wurden mit dem TCS SP5 Konfokalmikroskop (Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x 1.4 OIL) untersucht. DAPI wurde mit dem Diodenlaser bei 405 nm angeregt und zwischen 430 und 453 nm gemessen. Der Farbstoff Alexa 488 wurde mit dem Argonlaser bei 488 nm angeregt und zwischen 550 – 620 nm aufgenommen. Die Zellen wurden mit einfachem Zoom bei 1024 x 1024 Pixel aufgenommen und pro

Versuchstag und Bedingung ca. 60 Zellen ausgewertet. Dazu wurden die Zellen in Adobe Photoshop mit der Lasso-Funktion umfahren und die Pixel gezählt. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 6[®] ausgewertet.

2.2.4.9 Statistische Analyse

Statistische Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 6[®] durch *one-way* ANOVA und nachfolgendem Bonferroni's Test erfasst. Wahrscheinlichkeiten des Signifikanzwertes $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Dimerisierung

ERK1/2 werden durch die Kinasen MEK1/2 durch duale Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin183 und Tyrosin185 aktiviert. Dies führt zu Konformationsänderungen und ermöglicht die Homo- und Heterodimerisierung von ERK 1 und 2. Im Anschluss daran kommt es zur Rekrutierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit und Autophosphorylierung an Threonin188, welches für die nukleären Funktionen von ERK1/2 benötigt wird^{22,37}.

3.1.1 Induktion der Dimerisierung von HA- und Flag-markiertem ERK2 durch hypertrophe Stimuli

Da die Dimerisierung einen wichtigen Schritt in der Aktivierungskaskade von ERK1/2 darstellt, wurde der Einfluss des hypertrophen Stimulus Phenylephrin auf die Dimerisierung von ERK2 genauer untersucht. Dazu sollte ein Duolink[®] proximity ligation assay mit Hämagglutinin (HA)- und Flag-markiertem ERK2 durchgeführt werden. Der Duolink[®] ermöglicht dabei die Detektion der Interaktion von zwei Proteinen am konfokalen Mikroskop, wie im Kapitel 2.2.4.5 in den Methoden genauer beschrieben. Zunächst sollte sichergestellt werden, dass die verwendeten Antikörper spezifisch genug sind, um wirklich nur die Interaktion von HA-ERK2 und Flag-ERK2 im Duolink[®]-Assay zu zeigen. Dazu wurden mittels der DEAE-Dextran-Methode COS7-Zellen mit HA- und Flag-markiertem ERK2 transfiziert, lysiert und mit Western-Blot analysiert. Es zeigte sich ähnliche Expressionslevel von Flag-ERK2 und HA-ERK2 unter stimulierten und unstimulierten Bedingungen (Abb. 3 A). Außerdem konnten im abgebildeten Bereich keine unspezifisch markierten Banden detektiert werden.

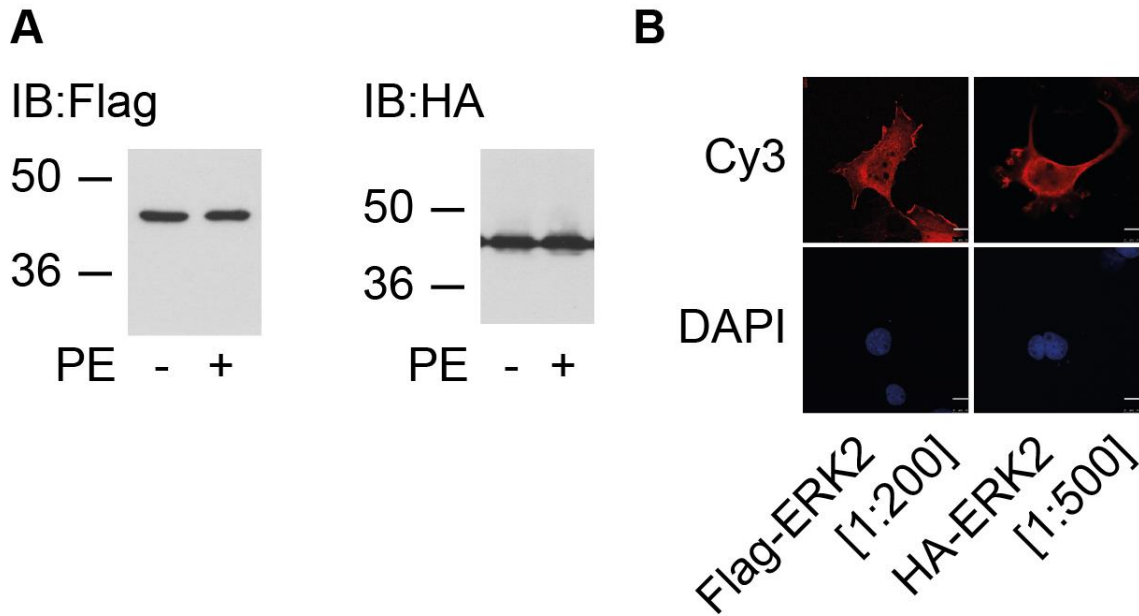


Abb. 3 Auswahl und Konzentration der für den Duolink[®] verwendeten Antikörper:

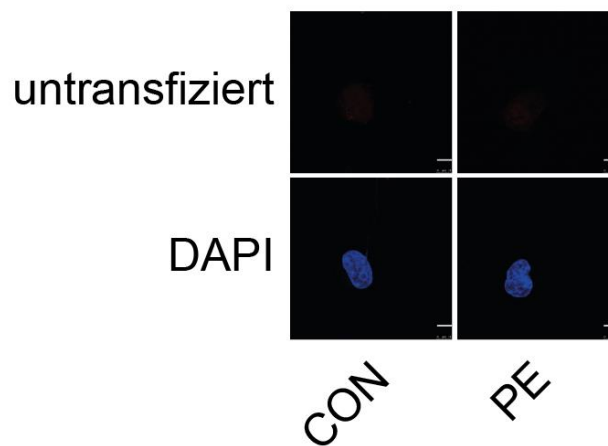
COS7-Zellen wurden mit α_{1B} -Rezeptor und HA- oder Flag-ERK2 transfiziert. Abbildung A zeigt in einem repräsentativen Western-Blot (IB) die Spezifität der Antikörper und Expression von ERK2 unter stimulierten (+) (mit Phenylephrin = PE; 10 μ M, 10min) oder unstimulierten (-) Bedingungen. Antikörper: Anti-Flag oder anti-HA. Anzahl durchgeführter Experimente: n = 2. Abbildung B zeigt repräsentative konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-HA- oder anti-Flag-Antikörpern mit Carbocyanin (Cy3) als fluoreszierender Zweitantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n = 2.

Um die optimale Konzentration der Antikörper zu finden, die später für den Duolink[®] eingesetzt werden sollen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurden wieder COS7-Zellen mit HA- oder Flag-ERK2 transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen (von 1:20 bis 1:1000) des anti-Flag- oder anti-HA-Antikörpers inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein Cy3-Antikörper verwendet, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy3) markiert ist. Der Zellkern wurde mit DAPI, einem DNA-Interkalator gefärbt. Am Mikroskop wurden von allen Konzentrationen repräsentative Zellen abfotografiert (Daten hier nicht dargestellt) und die jeweilige Konzentration ausgewählt, in der die Färbung der Zelle möglichst stark und einheitlich, aber auch mit möglichst wenig Hintergrundsignal zu sehen war. Außerdem wurde versucht, die Konzentration der jeweiligen Antikörper so zu wählen, dass sowohl für Flag, als auch für HA annähernd gleich starke Signale zu detektieren waren. Letztendlich wurde für den anti-Flag-Antikörper eine Konzentration von 1:200 und für anti-HA eine Konzentration von 1:500 ausgewählt (Abb. 3 B).

Für den Duolink[®] wurden COS7-Zellen mit HA- und Flag-markiertem ERK2 und dem α_{1B} -Rezeptor transfiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen nur mit α_{1B} -Rezeptor

(und nicht mit HA- und Flag-ERK2) transfiziert. Die Zellen wurden mit Phenylephrin als α_1 -Adrenozeptor-Agonist stimuliert, dann fixiert und der Duolink[®]-Assay mit den Antikörpern gegen HA und Flag anhand des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Zum Schluss wurden die Kerne mit DAPI gefärbt. Die Deckgläser wurden am Konfokalmikroskop komplett abgefahren und dabei die Zellen auf das Duolink[®]-Signal abgesehen. Das Aufleuchten von einzelnen roten Punkten wurde jeweils als Interaktion von einem Flag-ERK2-Molekül mit einem HA-ERK2-Molekül gewertet.

A



B

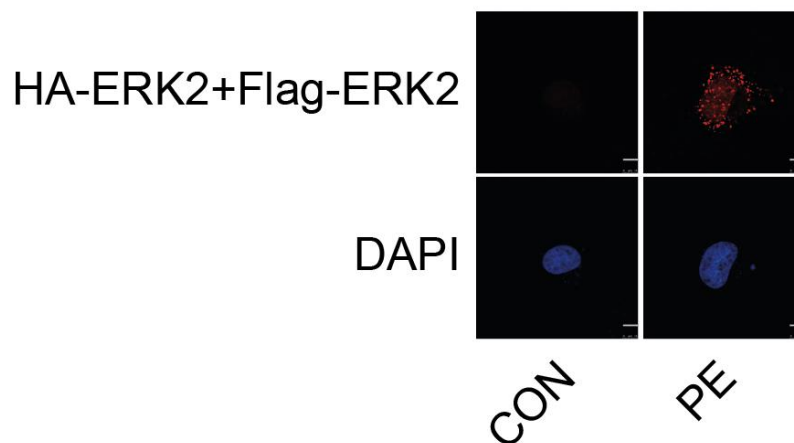


Abb. 4 Dimerisierung von ERK2 unter Einfluss von Phenylephrin

A zeigt repräsentative Konfokalbilder des Duolink[®] proximity ligation assay mit α_{1B} -Rezeptor-transfizierten COS-7 Zellen unter Einfluss von Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10min). B zeigt repräsentative Konfokalbilder vom Duolink[®] proximity ligation assay mit COS-7 Zellen, die zusätzlich zum α_{1B} -Rezeptor mit HA- und Flag-ERK2 transfiziert wurden, unter Einfluss von Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10min). Kontrolle = CON = unstimuliert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n = 5.

In nur mit α_{1B} -Rezeptor transfizierten Zellen konnte kein Duolink[®]-Signal festgestellt werden (Abb. 4 A). COS-7 Zellen, die mit HA- und Flag-markierten ERK2 transfiziert wurden, zeigten unter unstimulierten Bedingungen nur geringfügig Interaktionen zwischen den ERK-Molekülen (Abb. 4 B), wohingegen unter Einfluss von Phenylephrin die Interaktion von HA- mit Flag-markiertem ERK2, als das Aufleuchten der roten Punkte in den Zellen detektiert werden konnte (Abb. 4 B). Dies bestätigt, dass ERK1/2 unter dem Einfluss von Phenylephrin dimerisieren. Die dimerisierten ERK1/2 waren sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus lokalisiert, wobei im Zytosol der leicht überwiegende Teil der Signale detektierbar war.

3.1.2 Einfluss der Dimerisierung auf die subzelluläre Lokalisation

Um den Einfluss, den die Dimerisierung auf die Aktivität von ERK1/2 hat, genauer zu untersuchen, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von monomerem ERK2 nach Stimulation näher betrachtet. Für diesen Zweck wurde die monomere Variante ERK2 $\Delta^{174-177}$ (ERK2- $\Delta 4$), die zuvor schon von Khokhlatchev et al. beschrieben wurde, verwendet. Diese ist aufgrund von vier fehlenden Aminosäuren im Dimerisierungs*interface* nicht mehr in der Lage, mit anderen ERK1/2-Molekülen Dimere zu bilden^{22,23}.

Die Versuche wurden in COS7-Zellen durchgeführt, welche mit den mit YFP-markierten Konstrukten ERK2 oder ERK2- $\Delta 4$ transfiziert wurden. Dabei dient YFP als Fluorophor zur Detektion der ERK2-Moleküle in den Zellkompartimenten am konfokalen Mikroskop. Als Kontrolle wurde außerdem der leere Vektor pcDNA3 transfiziert, um zu erkennen wie sich Zellen, in denen ERK2 nicht überexprimiert ist, darstellen (Daten hier nicht dargestellt). Um die Zellen stimulieren zu können, wurde zusätzlich zum jeweiligen Konstrukt der α_{1B} -Rezeptor mittransfiziert. Die Zellen wurden mit Phenylephrin stimuliert und nachfolgend fixiert. Für die Detektion der Kerne, wurde die DNA mittels DAPI angefärbt. Am Konfokalmikroskop konnte anschließend die Lokalisation von ERK2 mit Hilfe des YFP-Signals detektiert werden. Mittels ImageJ wurde dann das Verhältnis der nukleären zu zytosolischen Verteilung von ERK2 analysiert. In Western-Blots mit unter den gleichen Bedingungen transfizierten und stimulierten COS7-Zellen zeigte sich für jeden Versuchstag jeweils eine etwa gleich starke Expression der Konstrukte (Abb. 5).

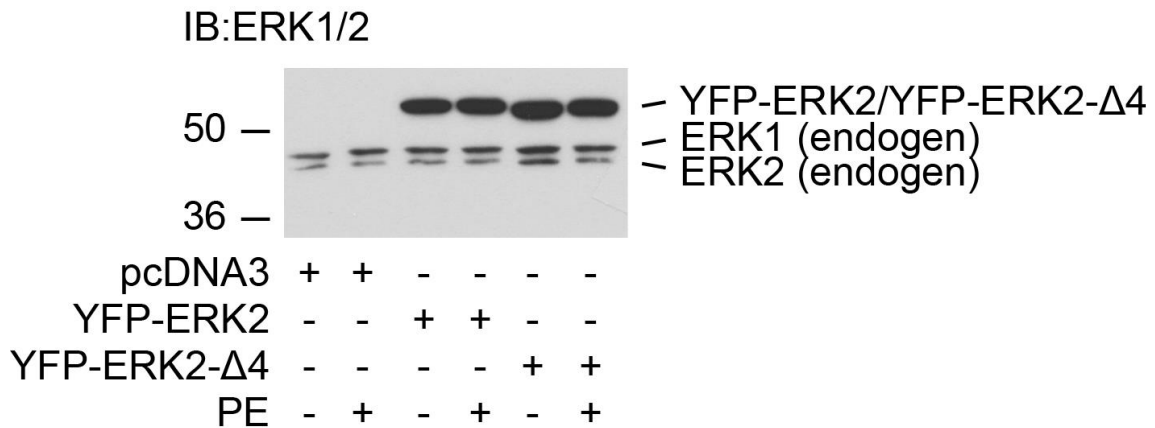


Abb. 5 Expressionskontrolle der YFP-ERK2-Konstrukte mittels Western-Blot

Repräsentativer Blot von COS7-Zellen, die mit α_{1B} -Rezeptor und pcDNA3-Vektor, YFP-ERK2 oder YFP-ERK2-Δ4 transfiziert und mit Phenylephrin (PE; 10 μ M, 10min) stimuliert wurden. Antikörper: ERK1/2. n = 6.

Abbildung 6 zeigt repräsentative Aufnahmen von COS7-Zellen (A) und das Verhältnis der nukleären zu zytosolischen Verteilung von ERK2 unter den verschiedenen Bedingungen (B). Unter unstimulierten Bedingungen zeigte sich weder beim YFP-ERK2-Wildtyp, noch bei der YFP-ERK2-Δ4-Mutante eine relevante nukleäre Ansammlung der Konstrukte. Die Stimulation mit Phenylephrin bewirkte beim Wildtyp eine deutliche Akkumulation im Zellkern, wo die Kinasen in Folge verschiedene nukleäre Zielproteine phosphorylieren könnte. Dagegen zeigte das Dimerisierungs-defiziente YFP-ERK2-Δ4 keine solche Akkumulation. Daraus lässt sich schließen, dass die Hemmung der Dimerisierung den Import von ERK1/2 in den Zellkern, unter den genannten Versuchsbedingungen, verhindert.

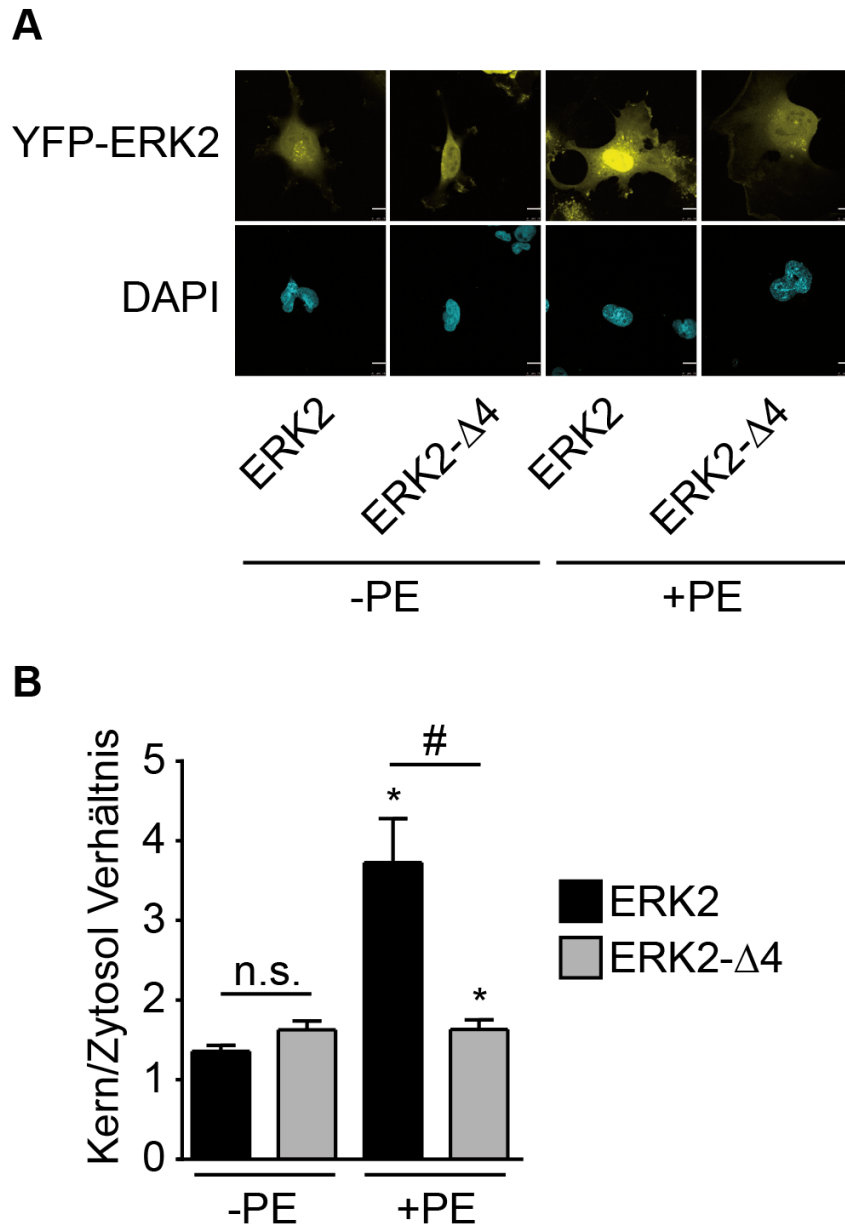


Abb. 6 ERK2-Δ4 verhindert die nukleäre Akkumulation von ERK2

Abbildung A zeigt repräsentative Konfokalbilder von COS7-Zellen, die mit YFP-ERK2-Wildtyp oder YFP-ERK2-Δ4 und α_{1B} -Rezeptor transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10min) stimuliert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. Abbildung B zeigt die quantitative Analyse des Verhältnisses von nukleärer zu zytosolischer Verteilung von YFP-markiertem ERK2 bzw. ERK2-Δ4. n.s. = nicht signifikant. n = 6 mit 10-15 Zellen pro Bedingung pro Experiment. */# $P < 0,01$.

3.1.3 Die Relevanz der ERK Thr188-Phosphorylierung für die zelluläre Lokalisation von ERK1/2

Die Versuche zu Abb. 6 zeigen zumindest zum Teil den mechanistischen Hintergrund, der zum Import von ERK1/2 in den Zellkern führt. Wie aber Lorenz et al. bereits beschrieben, wird für die vermehrte Kernlokalisation der Kinase nach der Dimerisierung

die Autophosphorylierung an ERK Thr188 benötigt. Um die Relevanz dieser Phosphorylierung für die Kerntranslokation von ERK2 näher zu untersuchen, wurde die ERK2- Δ 4D-Mutante generiert, welche Dimerisierungs-defizient ist, aber gleichzeitig die phosphomimetische Aminosäure Aspartat an Position 188 enthält.

So wurden analoge Versuche zu den oben beschriebenen Lokalisationsversuchen zu ERK2-wt und ERK2- Δ 4, mit ERK2- Δ 4D durchgeführt, um festzustellen inwiefern die ERK Thr188-Phosphorylierung ursächlich für die Kertranslokation ist.

Es wurden wieder COS7-Zellen mit α_{1B} -Rezeptor und YFP-ERK2- Δ 4D oder YFP-ERK2 oder pcDNA3 als Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden mit Phenylephrin stimuliert, fixiert und der Kern mit DAPI gefärbt. Zur Expressionskontrolle wurden auch wieder Western-Blots mit Zelllysaten durchgeführt, welche annähernd gleiche Expressionslevel der Konstrukte zeigten (Abb. 7).

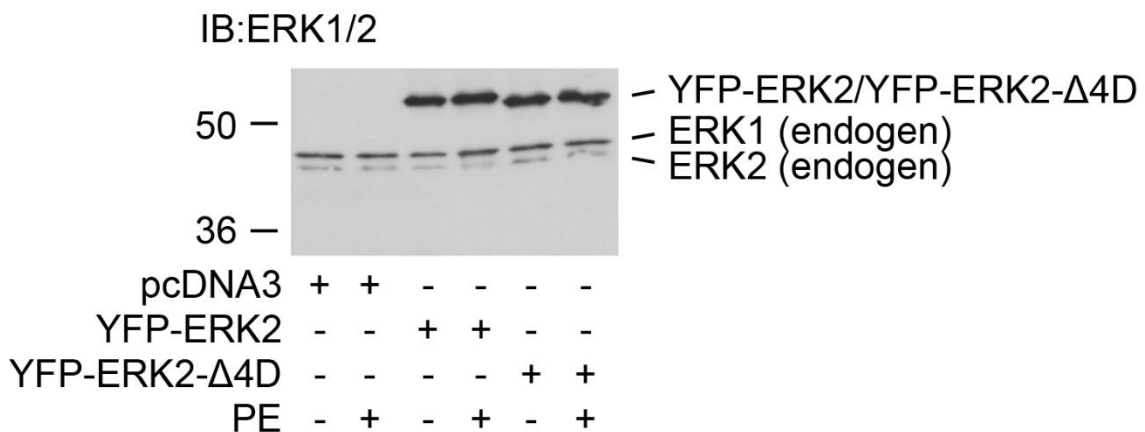


Abb. 7 Expressionskontrolle der YFP-ERK2-Konstrukte mittels Western-Blot
 Repräsentativer Blot von COS7-Zellen, die mit α_{1B} -Rezeptor und pcDNA3-Vektor, YFP-ERK2 oder YFP-ERK2- Δ 4D transfiziert und mit Phenylephrin (PE; 10 μ M, 10 min) stimuliert wurden. Antikörper: ERK1/2. n = 5.

Am Mikroskop zeigte sich ohne Stimulation, übereinstimmend mit den Versuchen zu Abbildung 6, eine gleichmäßige Verteilung von YFP-ERK2 im Zytoplasma. Nach Stimulation dagegen kam es, im Gegensatz zu den Versuchen mit der YFP-ERK2- Δ 4-Mutante, zur Translokation von ERK2 in den Zellkern in Zellen, welche die YFP-ERK2- Δ 4D-Mutante exprimierten. Die Translokation fand dabei sogar in einem ähnlichen Ausmaß, wie in Zellen mit dem YFP-ERK2-Wildtyp statt. Abb. 8 A zeigt dabei veranschaulichende Aufnahmen von Zellen zu den einzelnen Versuchsbedingungen. Abb. 8 B zeigt wiederum das Kern-zu-Zytosol-Verhältnis von ERK2.

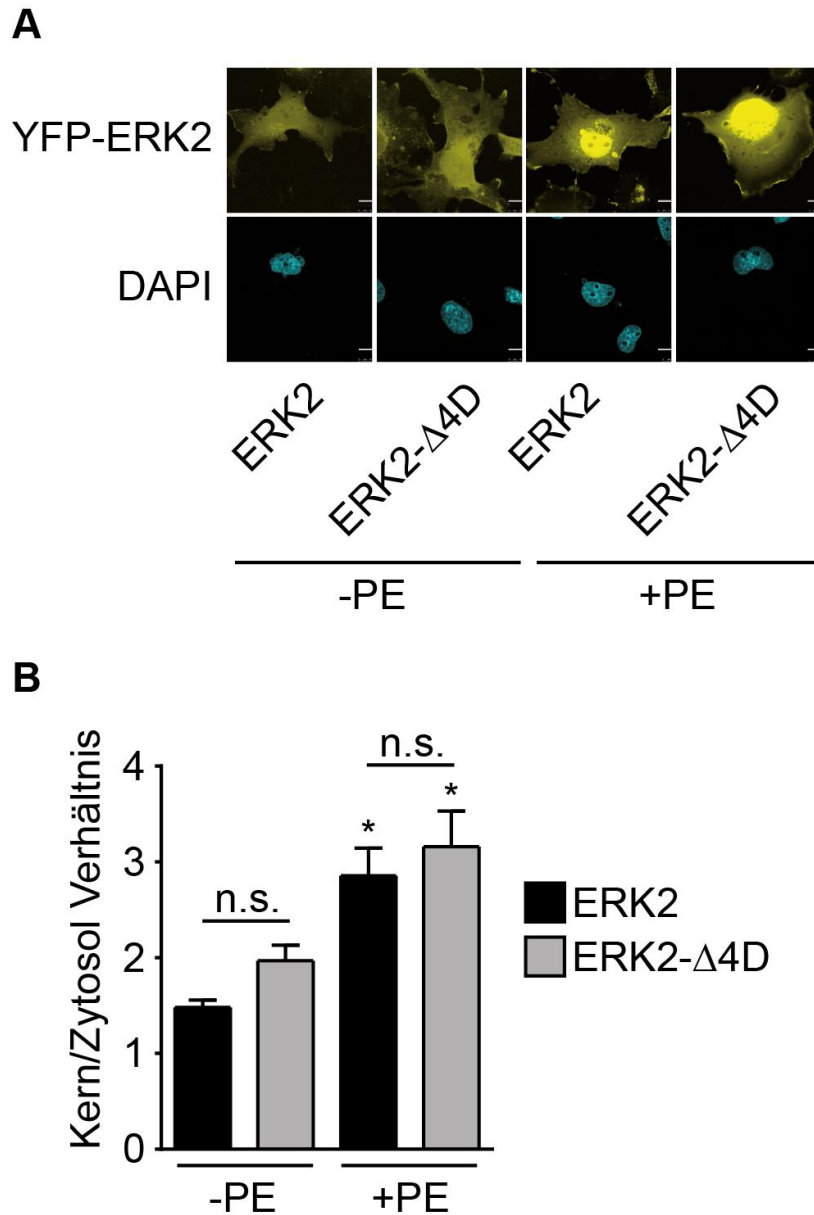


Abb. 8 ERK2-Δ4D akkumuliert im Nucleus nach Stimulation

Abbildung A zeigt repräsentative Konfokalbilder von COS7-Zellen, die mit YFP-ERK2-Wildtyp oder YFP-ERK2-Δ4D und α_{1B} -Rezeptor transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10 min) stimuliert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. Abbildung B zeigt die quantitative Analyse des Verhältnisses von nukleärer zu zytosolischer Verteilung von YFP-markiertem ERK2 bzw. ERK2-Δ4D. n.s. = nicht signifikant. n = 5 mit 10-15 Zellen pro Bedingung pro Experiment. * $P < 0,05$ gegenüber allen anderen Bedingungen. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kerntranslokation von ERK1/2 durch Blocken der Dimerisierung verhindert werden kann, es jedoch möglich ist, diesen Effekt

durch Imitation der Phosphorylierung an ERK Thr188 aufzuheben. Lorenz et al. beschrieben, dass die ERK2-Dimerisierung ein notwendiger Schritt für das Binden der $\beta\gamma$ -Untereinheit und der folgenden ERK Thr188-Phosphorylierung ist und dass diese Autophosphorylierung die Ansammlung der Kinasen im Nukleus bewirkt²². Diese Daten zeigen indirekt zusammen mit den hier gezeigten Ergebnissen, die Notwendigkeit der Dimerisierung für die ERK Thr188-Autophosphorylierung und weiterführend, dass die ERK Thr188-Phosphorylierung einen essenziellen Schritt für den Kernimport der Kinase darstellt.

3.1.4 Effekte von ERK2- Δ 4 und ERK2- Δ 4D auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten

In den vorherigen Kapiteln wurden die mechanistischen Hintergründe der ERK1/2-Aktivierung und -Kerntranslokation näher beleuchtet. Nun stellt sich die Frage, welchen Einfluss die beschriebenen ERK2-Mutanten auf die hypertrophen Effekte von ERK1/2 haben.

Die Vergrößerung von Kardiomyozyten, welche zur Zunahme der Herzmasse beiträgt, ist charakteristisch für kardiale Hypertrophie. Dabei kommt es sowohl zur Zunahme der Querschnittsfläche, als auch zur Umorganisation des Zytoskeletts. Eine Möglichkeit die Hypertrophie von Zellen zu beurteilen, besteht daher in der Messung der Querschnittsflächen von Zellen, die mit dem Alexa Fluor 488-markierten Phalloidin gefärbt sind. Phalloidin bindet an das Zytoskelettprotein Aktin und kann dann mit Alexa Fluor 488 detektiert werden. Somit kann das Zytoskelett einer Zelle dargestellt werden und das Ausmaß der Hypertrophie analysiert werden.

Zunächst wurde dazu der Einfluss von ERK2- Δ 4 auf hypertrophe Reaktionen von NRCMs anhand deren Querschnittsfläche überprüft. Susanne Homann führte dazu Phalloidin-färbungen mit ERK2- Δ 4 transduzierten NRCMs durch. Dazu wurden NRCMs adenoviral mit Flag-markiertem ERK2- Δ 4 oder Flag-ERK2 transduziert und für 24h mit Phenylephrin stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und das Aktin-Zytoskelett mittels Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin gefärbt. Der Kern wurde mit DAPI markiert. Um die Ergebnisse zu quantifizieren wurden die Zellen mit einem konfokalen Mikroskop abfotografiert und die Zellgröße mittels Pixel-Zählen mit Adobe Photoshop CS6 bestimmt.

Bei unstimulierten Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen der Zellgröße von NRCMs, die mit ERK2-Wildtyp oder ERK2- Δ 4 transfiziert wurden. Nach Stimulation mit Phenylephrin jedoch kam es zu einer signifikanten hypertrophen Reaktion der Zellen, welche ERK2-Wildtyp überexprimierten. Dimerisierungs-defizientes ERK2- Δ 4 reduzierte dagegen signifikant die Hypertrophie im Vergleich zum Wildtyp nach Stimulation (Abb. 9) ^{106,107}.

A

AlexaFluor488-Phalloidin + DAPI

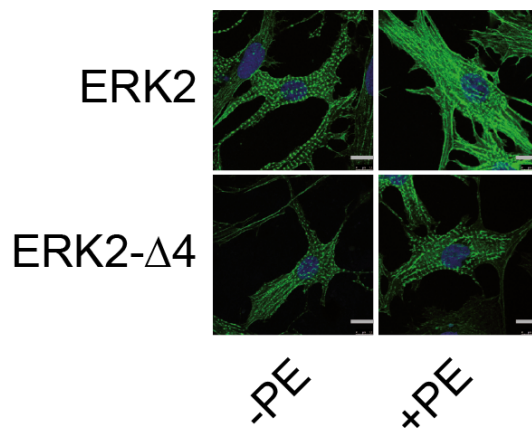
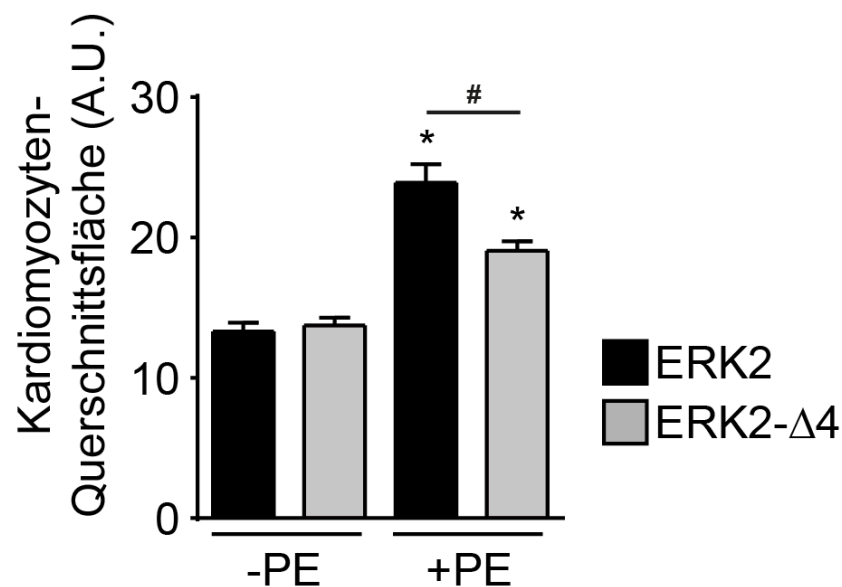
**B****Abb. 9 Monomeres ERK2 reduziert die Phenylephrin-induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie**

Abbildung A zeigt repräsentative Konfokalbilder von NRCMs, die mit ERK2-Wildtyp oder ERK2-Δ4 adenoviral transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Phenylephrin (=PE; 4 μM, 24h) stimuliert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Maßstab: 7,5 μm¹⁰⁷. Abbildung B zeigt die quantitative Analyse der Zellgröße, der mit Phalloidin gefärbten Zellen. A.U. = arbitrary units. n = 4 mit 50 Zellen pro Bedingung pro Experiment. */# P < 0,05. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Im Vergleich dazu sollte der Effekt von ERK2-Δ4D auf kardiale Hypertrophie untersucht werden, um herauszufinden, ob es durch Imitation der ERK Thr188-Phosphorylierung zu einer Aufhebung der in Abb. 9 gezeigten Hemmung der Hypertrophie kommt. Die

Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen wie für Abb. 9 beschrieben ausgeführt, jedoch wurden die Zellen von Angela Tomasovic nicht mit dem Flag-ERK2- Δ 4-Konstrukt, sondern stattdessen mit Flag-ERK2- Δ 4D transfiziert.

A

AlexaFluor488-Phalloidin + DAPI

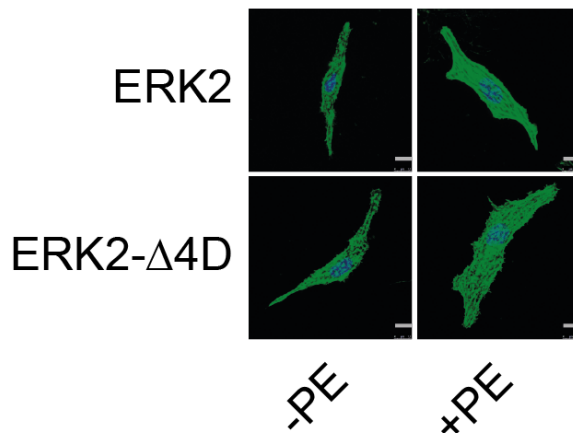
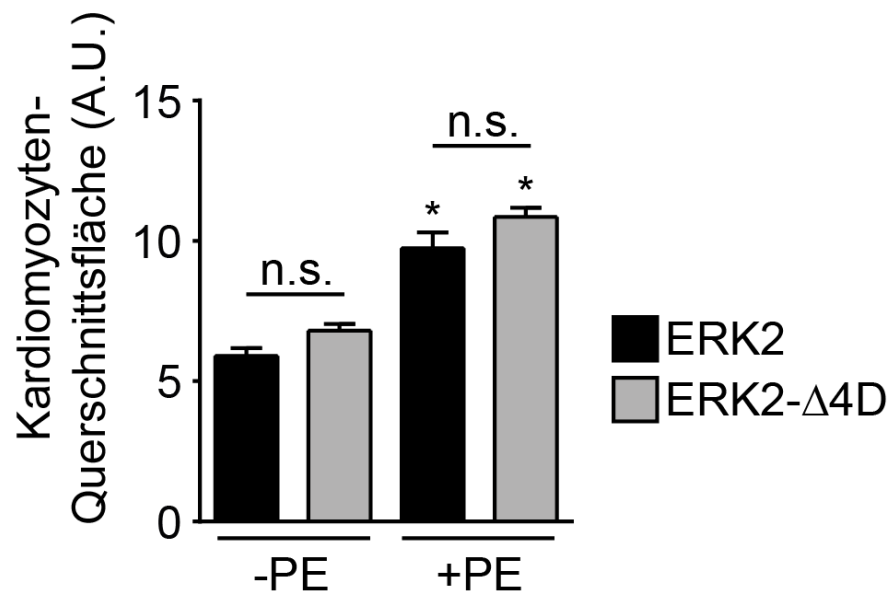
**B**

Abb. 10 Kardiomyozyten mit ERK2-Δ4D zeigen eine ähnlich ausgeprägte Hypertrophie wie ERK2-Wildtyp nach Phenylephrin-Stimulation

Abbildung A zeigt repräsentative Konfokalbilder von NRCMs, die mit ERK2-Wildtyp oder ERK2-Δ4D adenoviral transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Phenylephrin (=PE; 4 μM, 24h) stimuliert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Maßstab: 7,5 μm. Abbildung B zeigt die quantitative Analyse der Zellgröße der mit Phalloidin gefärbten Zellen. n.s. = nicht signifikant. A.U. = *arbitrary units*. n = 5 mit 50-60 Zellen pro Bedingung pro Experiment. * $P < 0,05$ gegenüber allen anderen Bedingungen. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

In Abb. 10 A sieht man repräsentative Bilder von NRCMs, die mit Phalloidin gefärbt wurden. Dabei zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zellgröße nach Langzeitstimulation mit Phenylephrin im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen. Sowohl der Wildtyp als auch ERK2- Δ 4D bewiesen dabei im Experiment eine ähnlich ausgeprägte Fähigkeit zur Hypertrophie-Induktion nach Stimulation.

Zusammengenommen mit den Experimenten aus Kapitel 3.1.3 zu Abb. 8 zeigt dies, dass die ERK Thr188-Phosphorylierung für den Kernimport essentiell ist und es daraufhin zur Zunahme der Zellgröße, als Ausdruck der kardialen Hypertrophie, kommt.

Monomeres ERK2 begrenzte also die Fähigkeit der Kardiomyozyten hypertroph zu werden, wohingegen Zellen durch die Einführung der phosphomimetischen Aminosäure Aspartat an Position 188 des monomeren Konstrukts ERK2- Δ 4D diese Fähigkeit zurückerlangten. Dies zeigt wiederum die Notwendigkeit der Autophosphorylierung an ERK Thr188 für die Entwicklung der Hypertrophie und bestätigt die Dimerisierung als fundamental wichtigem Schritt für diese Autophosphorylierung.

Außerdem lässt sich daraus schließen, dass die Retention von monomerem ERK2 (vgl. Versuche Kapitel 3.1.2, Abb. 6) mit der Reduktion der hypertrophen Antwort von Zellen nach einem Hypertrophie-induzierenden Stimulus korreliert. Folglich wäre ein möglicher Ansatz für therapeutische Interventionen bei kardialer Hypertrophie, die Verhinderung der ERK1/2-Dimerisierung.

3.2 Interferenz mit der Dimerisierung

Die Dimerisierung scheint also eine wichtige Voraussetzung für die ERK1/2-Autophosphorylierung an Thr188 und damit auch für die Vermittlung von kardialer Hypertrophie zu sein. Die Deletion von vier Aminosäuren im Dimerisierungs*interface* der Kinase reduzierte die hypertrophen Reaktionen von Zellen, die das ERK2- Δ 4-Konstrukt exprimierten. So könnte die Interferenz mit der ERK1/2-Dimerisierung eine wirkungsvolle Therapiestrategie darstellen.

Deswegen wurde in der Arbeitsgruppe ein Peptid generiert, welches mit endogenen ERK1/2 interagieren soll, um die Dimerisierung mit anderen ERK1/2-Molekülen zu verhindern. Das Peptid besteht aus der C-terminalen Aminosäuresequenz (Aminosäuren

309-357) von ERK2 und enthält zusätzlich am N-terminalen Ende eine myc-Markierung, um die Detektion des ERK2-Peptids (im Folgenden E2-Peptid genannt) zu ermöglichen.

3.2.1 Interaktion des E2-Peptids mit ERK2

Um festzustellen, ob das E2-Peptid an ERK2 bindet, untersuchte Susanne Homann die Interaktion von Flag-markiertem ERK2 mit dem Peptid in HEK293-Zellen. Flag-ERK2 und das Peptid wurden überexprimiert und die Zellen anschließend mit Carbachol stimuliert. Im Western-Blot mit ERK1/2- und Flag-Antikörpern zeigte sich eine Verschiebung der Proteinbanden zu größeren Werten in Zellen, die mit dem Peptid transfiziert und stimuliert wurden, im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 11). Dies zeigt, dass das Peptid in der Lage ist nach Stimulation mit ERK1/2 zu interagieren^{106,107}.

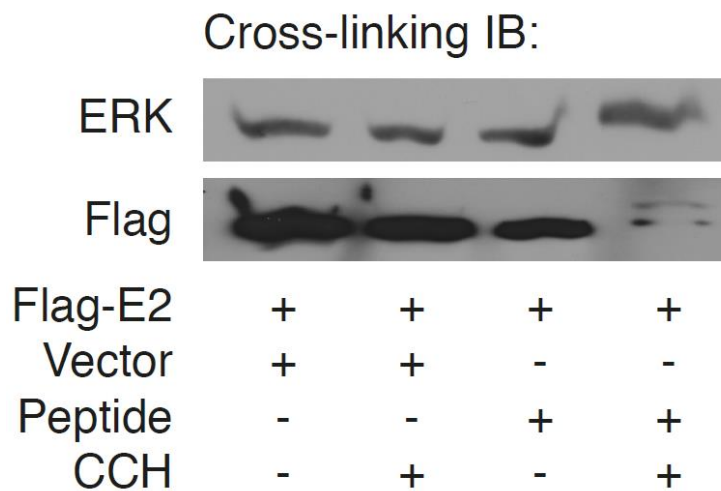


Abb. 11 Das E2-Peptid bindet an ERK2

Repräsentativer Blot der Detektion der Interaktion zwischen E2-Peptid (= Peptide) und ERK2 (= Flag-E2) durch das *Cross-linking* der Proteine in HEK293-Zellysaten mittels PFA-Fixierung. Vector = pcDNA3 als Kontrolle. Die Zellen wurden mit Carbachol stimuliert (CCH; 300 µM, 10 min). ERK2 wurde mit ERK1/2- und Flag-Antikörpern detektiert. ERK2: 42kDa, Flag-ERK2: 43kDa. Obere Bande: n = 3, untere Bande: n = 3. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733. doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

3.2.2 Beeinflussung der Dimerisierung durch das E2-Peptid

In Kapitel 3.1.1 konnte bereits gezeigt werden, dass ERK1/2 Dimere nach Stimulation bilden, wie zuvor schon von Lorenz et al. und Khokhlatchev et al. beschrieben^{22,23,29}. Um herauszufinden, ob das E2-Peptid diese Dimerisierung verhindern kann, wurden Co-

Immunpräzitationen (Susanne Homann) und Duolink[®]-Experimente (diese Arbeit) durchgeführt.

Die Co-Immunpräzitationen wurden mit HEK293-Zell-Lysaten durchgeführt, welche mit HA- und Flag-markiertem ERK2 und dem Peptid oder leerem Vektor transfiziert waren. Nach Stimulation mit Carbachol zeigte sich in den Kontrollen mit leerem Vektor, die Bindung von HA-ERK2 und Flag-ERK2, was die Dimerisierung der beiden Moleküle veranschaulicht. Wenn stattdessen das E2-Peptid transfiziert wurde, war die Menge des präzitierten HA-ERK2 deutlich geringer (Abb. 12). Dies deutet darauf hin, dass das E2-Peptid die Interaktion von zwei ERK2-Molekülen verhindert oder zumindest verringert.

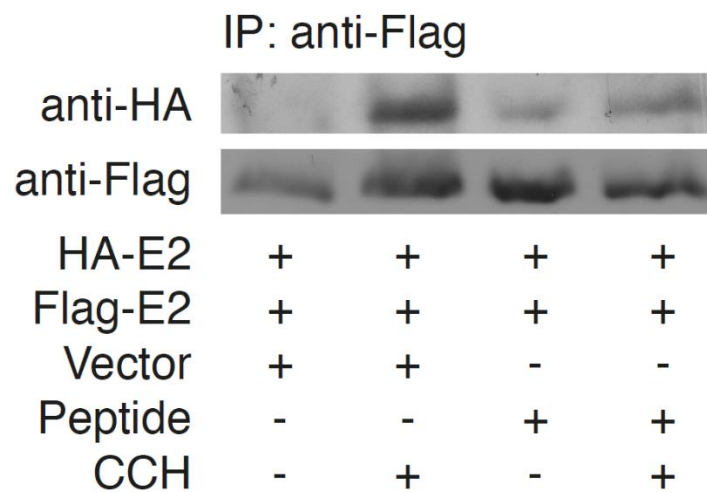


Abb. 12 Das E2-Peptid verhindert die Dimerisierung von ERK2

Repräsentative Blots von Co-Immunpräzitationen mit HEK293-Zellen, die mit HA-ERK2 (HA-E2) und Flag-ERK2 (Flag-E2) und dem E2-Peptid (Peptide) transfiziert wurden. Nach Stimulation mit Carbachol (CCH; 300 μ M, 10 min) wurden die Zellen lysiert und mit Flag-beads präzitiert. Für die Detektion der Dimere wurden HA-ERK2-Antikörper verwendet. HA-ERK2: 43kDa, Flag-ERK2: 43kDa. n = 6. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Um den in der Immunpräzitation gezeigten Effekt des Peptides in intakten Zellen zu validieren, wurde der Duolink[®] proximity ligation assay verwendet. Dazu wurden COS7-Zellen mit α_{1B} -Rezeptor, HA- und Flag-markiertem ERK2 und dem E2-Peptid mittels DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Als Kontrolle wurden COS7-Zellen die nur α_{1B} -Rezeptor, HA- und Flag-ERK2 überexprimierten verwendet. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit Phenylephrin stimuliert und das Duolink[®]-Experiment durchgeführt.

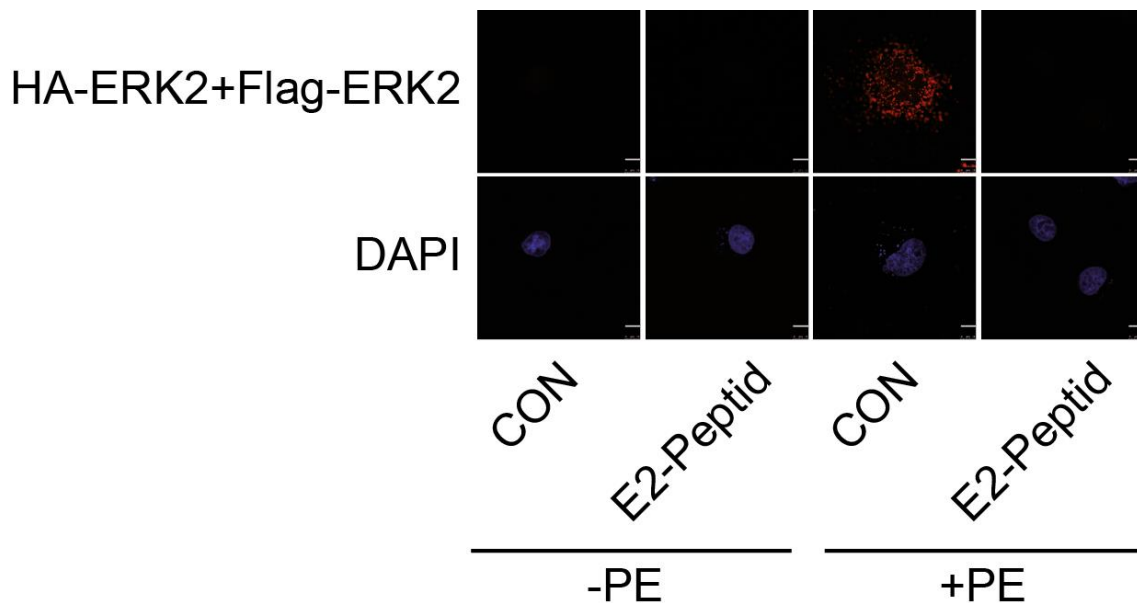


Abb. 13 Das E2-Peptid verhindert die Dimerisierung von ERK2

Repräsentative Konfokalaufnahmen des Duolink[®] proximity ligation assay mit α_{1B} -Rezeptor, HA- und Flag-ERK2 und dem E2-Peptid transfizierten COS-7 Zellen unter Einfluss von Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10min). CON = COS7-Zellen nur mit α_{1B} -Rezeptor, HA- und Flag-ERK2 ohne Peptid. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n=5. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Wie bei den Duolink[®]-Versuchen zuvor, zeigte sich nach der Stimulation von HA- und Flag-ERK2 mit Phenylephrin die Dimerisierung der Kinasen in Form von rot leuchtenden Punkten am Konfokalmikroskop (Abb. 13). Dagegen konnten in Anwesenheit des E2-Peptids kaum Punkte detektiert werden. Dies bestätigt, dass das Peptid in der Lage zu sein scheint, mit der ERK2-Homodimerisierung zu interferieren.

3.2.3 Untersuchung der Spezifität des E2-Peptids auf die Dimerisierung zwischen HA- und Flag-markiertem ERK2 und den Transkriptionsfaktoren MYC und MAX

Wenn das E2-Peptid in der Lage ist, die Homodimerisierung von ERK2 zu verhindern, stellt sich die Frage, wie spezifisch das Peptid ist und ob es auch andere Proteine an deren Dimerisierung hindern kann oder an diese bindet. Das Peptid wurde auf Basis der Kristallstruktur des ERK2-Dimers generiert. So besteht es aus der Aminosäuresequenz, die für den Aufbau des nicht helikalen Leucin-Zippers verantwortlich ist. Dieser liegt in der Verlängerung der C-terminalen Domäne (L16), wo drei Leucin-Reste über hydrophobe

Wechselwirkungen mit den entsprechenden Leucinen eines zweiten ERK1/2-Moleküls für die Dimerisierung sorgen. Das E2-Peptid besteht also aus den Aminosäuren, die auch die α -Helix L16 aufbauen, nämlich den Aminosäuren von Lys338 bis Glu353^{23,54}. So verhindert es möglicherweise über die Bildung dieses Leucin-Zippers die Dimerisierung eines ERK1/2s mit anderen ERK1/2-Molekülen. Der Leucin-*Zipper* ist jedoch ein konserviertes Motiv, welches bei vielen Protein-Interaktionen eine Rolle spielt¹⁰⁸.

So auch bei der Heterodimerisierung der Proteine MYC und MAX. MYC ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und der Zelldifferenzierung^{109,110}. Nach Aktivierung bildet es einen Dimer mit MAX, ebenfalls einem Transkriptionsfaktor, was dann das Binden von DNA ermöglicht und deren Transkription erlaubt^{111,112}.

Die Sequenz die eben jene Dimerisierung ermöglicht, ist die *basic region/helix-loop-helix/leucine zipper*-Domäne, die wie der Name sagt, aus einer basalen Region (die für die DNA-Bindung erforderlich ist), einem Motiv aus zwei Helices, die durch eine Schleife verbunden sind und einem Leucin-„Reißverschluss“ besteht. Diese Domäne ist weit verbreitet und findet sich in der Zelle bei vielen Transkriptionsfaktoren. Sie existiert sowohl bei MYC, als auch bei MAX am C-terminalen Ende^{113,114}. Da der Leucin-*Zipper* von MYC/MAX dem Leucin-*Zipper* der L16-Domäne von ERK2 strukturell ähnelt, wäre es interessant herauszufinden, inwieweit das E2-Peptid auch Einfluss auf die Heterodimerisierung von MYC und MAX hat, da das Peptid ja möglichst spezifisch wirken soll, um andere zelluläre Signalkaskaden nicht zu beeinträchtigen.

Deswegen wurde wiederum ein Duolink[®] proximity ligation assay durchgeführt, um die Auswirkungen des E2-Peptids auf die endogene Heterodimerisierung von MYC/MAX zu testen. Wie zuvor mit dem Duolink[®] für HA- und Flag-ERK2 wurde vorher die Spezifität der verwendeten Antikörper mittels Western-Blot und die nötige Konzentration der Antikörper mit Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Dazu wurden COS7-Zellen mittels der DEAE-Dextran-Methode mit dem α_{1B} -Rezeptor transfiziert. Für die Bestimmung der Spezifität der Antikörper wurden die Zellen mit Phenylephrin stimuliert, im Anschluss lysiert und für Western-Blots mit anti-MYC und anti-MAX-Antikörpern verwendet. Dabei zeigten sich bei MYC (40 kDa), abgesehen von der Bande die auf das gesuchte Protein hinweist, noch eine leichtere unspezifische Bande im gezeigten Bereich.

Bei MAX zeigte sich auf einer Höhe von etwa 32 kDa eine Bande, deren Ursprung nicht geklärt werden konnte, zusätzlich zur Bande von MAX (26 kDa) (Abb. 14 A). Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen einen Tag nach Transfektion mit 4 % PFA fixiert, dann verschiedene Konzentrationen von entweder MAX- oder MYC-Antikörper auf die Zellen gegeben und danach mit dem Cy3-Antikörper weiterinkubiert. Die Zellen wurden am Konfokalmikroskop untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass es beim Cy3-Signal möglichst wenig Hintergrundleuchten gab und die Antikörpersignale gleichmäßig und etwa gleich stark bei beiden Antikörpern in der Zelle verteilt waren. Es konnten kaum Signale der Antikörper im Zytosol detektiert werden, die Signale fanden sich fast ausschließlich im Nukleus, was ein Hinweis für die Spezifität der Antikörper ist. Für MYC wurde sich für eine Konzentration von 1:200 entschieden, bei MAX für 1:350 (Abb. 14 B).

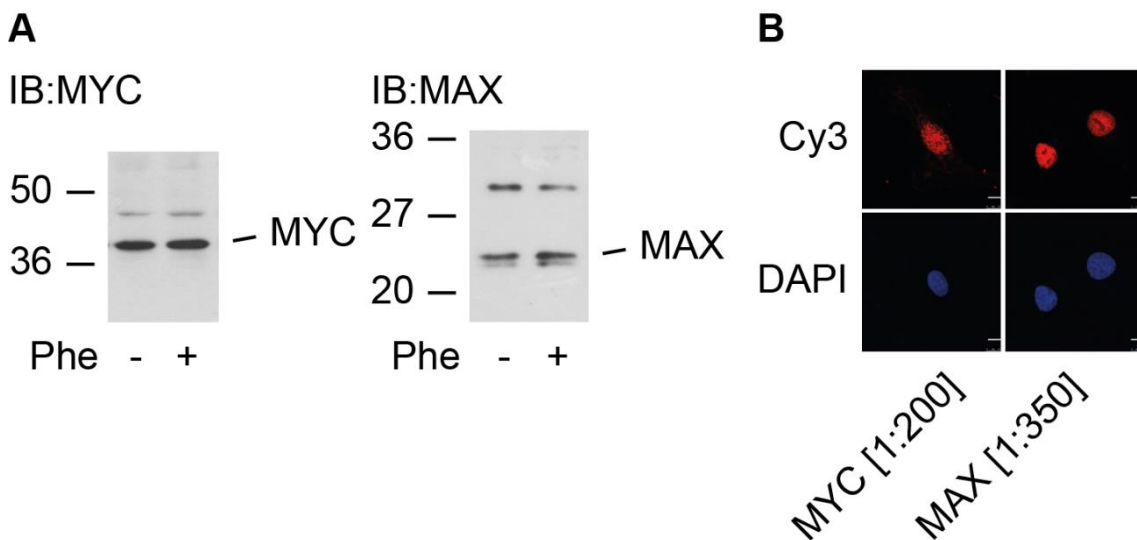


Abb. 14 Auswahl und Konzentration der für den Duolink[®] verwendeten Antikörper:
 COS7-Zellen wurden mit α_{1B} -Rezeptor transfiziert. Abbildung A zeigt im repräsentativen Western-Blot die Spezifität der Antikörper MYC bzw. MAX unter stimulierten (+) (mit Phenylephrin = PE; 10 μ M, 10min) oder unstimulierten (-) Bedingungen. Antikörper: Anti-MYC oder anti-MAX. n = 2. Abbildung B zeigt repräsentative konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-MYC- oder anti-MAX-Antikörpern, mit Carbocyanin (Cy3) als fluoreszierender Zweitantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n = 2.

Für den Duolink[®] proximity ligation assay wurden COS7-Zellen mit dem α_{1B} -Rezeptor und dem E2-Peptid transfiziert und zwei Tage später mit Phenylephrin stimuliert. Nach Fixation der Zellen, wurde der Duolink[®] proximity ligation assay mit anti-MYC- und anti-MAX-Antikörpern durchgeführt. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Deckgläser wurden am Konfokalmikroskop wieder komplett abgefahren und nach den roten Punkten, welche die Interaktion von MYC und MAX darstellen, abgesucht.

Abb. 15 zeigt repräsentative Bilder des beschriebenen Versuchs. Dabei konnte ohne Stimulation keine Interaktion detektiert werden. Dagegen zeigten sich interessanterweise, sowohl bei den Kontrollen ohne Peptid als auch in Anwesenheit des E2-Peptids die Interaktion von MYC/MAX als das Aufleuchten der roten Punkte in den Zellkernen. Also scheint das Peptid nicht mit der Dimerisierung von MYC und MAX zu interferieren.

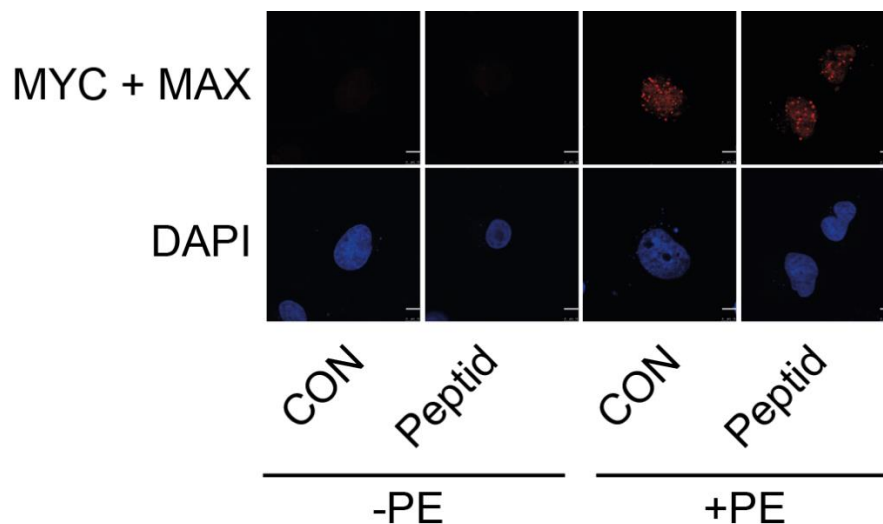


Abb.15 Das E2-Peptid interferiert nicht mit der Dimerisierung von MYC und MAX

Repräsentative Aufnahmen des Duolink® proximity ligation assay mit α_{1B} -Rezeptor und dem E2-Peptid transfizierten COS7-Zellen unter Einfluss von Phenylephrin (=PE; 10 μ M, 10min). CON = COS7-Zellen nur mit α_{1B} -Rezeptor ohne Peptid. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n = 4. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Das kann ein Hinweis darauf sein, dass das E2-Peptid möglicherweise über die Bildung eines Leucin-Zippers mit einem ERK2-Molekül, relativ spezifisch die Dimerisierung von ERK2 verhindern kann. Es hat zumindest keinen sichtbaren Einfluss auf den Leucin-Zipper als Bestandteil des *basic region/helix-loop-helix/leucine zipper*-Motivs von Transkriptionsfaktoren wie MYC und MAX. Das E2-Peptid interagiert also nicht grundsätzlich mit allen Leucin-Zippern und könnte damit als interessanter Ausgangspunkt für eine mögliche Therapie von ERK1/2-vermittelter Hypertrophie angesehen werden. Da das Peptid aber mit 7,1kDa zu groß ist, um tatsächlich für therapeutische Zwecke eingesetzt werden zu können, sollten kleinere Sequenzen gefunden werden, mit der man die gleichen Effekte erzielen kann, beziehungsweise sollte die relevante Struktur im Peptid identifiziert werden, die für die Hemmung verantwortlich ist.

3.2.4 Identifizierung einer kürzeren Peptid-Sequenz, welche mit dem ERK-Dimerisierungsinterface interagiert

Um eine kürzere Peptid-Sequenz zu finden, mit der man die Dimerisierung verhindern könnte und die damit einen spezifischeren Ansatz für die Therapie kardialer Hypertrophie möglich machen würde, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Jutta Eichler des Lehrstuhls für pharmazeutische Chemie der Universität Nürnberg-Erlangen zwei kleinere Peptide generiert. Die beiden Peptide wurden JOLU20 und JOLU22 genannt. JOLU22 besteht aus den Aminosäuren von Position 328 – 352 von ERK2 und ist damit mit ca. 3 kDa (Berechnung des Molekulargewichts: www.bioinformatics.org) ein Bruchstück des vorher verwendeten E2-Peptides. Das andere Peptid JOLU20 beinhaltet die Aminosäuren von Position 173 – 182, wo sich auch das Histidin (an Position 176) aus der Aktivierungsschleife befindet, welches bei der Dimerisierung ein Ionenpaar mit Glutamat (an Position 343) bildet und welche damit ebenfalls Teil des Dimer-Interfaces sind. Die Bindung des Peptids soll so die Bildung des Ionenpaars verhindern.

Um zu sehen, ob die beiden Peptide jeweils in der Lage sind an ERK1/2 zu binden, führte Jutta Eichler einen Biacore™ binding assay mit den Proteinen durch. Dieser Versuch beruht auf der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und ist ein Analyseverfahren, welches die Detektion von Proteininteraktionen mittels optischer Methoden ermöglicht (für genauere Informationen über das Verfahren siehe Patching, 2014).¹¹⁵ Bei dem Experiment wurden sowohl die Bindung der beiden einzelnen Peptide in verschiedenen Konzentrationen an ERK1/2 getestet, als auch die Interaktion des Ligationsprodukts der Peptide mit der Kinase. Letzteres wurde gemacht, da man sich vorher nicht sicher sein konnte, ob eine einzelne dieser kurzen Peptid-Sequenzen ausreicht, um letztendlich die Dimerisierung zu hemmen oder ob eventuell beide benötigt werden.

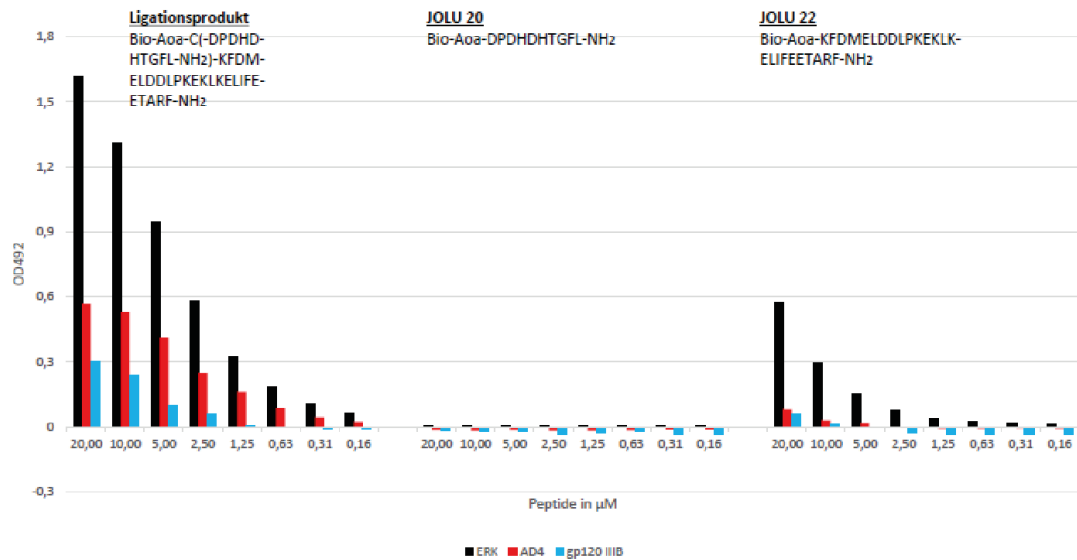


Abb.16 Das Ligationsprodukt und JOLU22 binden an ERK

Biacore™ binding assay mit ERK, JOLU20, JOLU22 und dem Ligationsprodukt der Peptide. OD492 = optische Dichte bei 492nm (Jutta Eichler, Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie, Universität Nürnberg-Erlangen).

Dabei zeigte sich die Spezifität der Bindung der Peptide an ERK anhand der OD (optische Dichte) bei 492nm als indirektes Maß für die Bindung. Beim Ligationsprodukt konnte die höchste Spezifität detektiert werden, welche mit Abnahme der Konzentration geringer wurde. Dagegen konnte JOLU20 selbst bei der höchsten Konzentration kaum an ERK1/2 binden. JOLU22 zeigte im Gegensatz dazu wieder vermehrt eine Interaktion mit ERK (Abb. 16). Da JOLU22 im Vergleich mit JOLU20 eine gut ausgeprägte Spezifität bei der Interaktion mit ERK zeigte, wurde dieses auf seinen Einfluss auf die Dimerisierung von ERK1/2 weiter untersucht.

3.2.5 Einfluss von JOLU22 auf die ERK2-Dimerisierung

JOLU22 ist mit ca. 3 kDa deutlich kleiner als das E2-Peptid, dennoch sind Peptide dieser Größe kaum in der Lage einfach passiv die Zellmembran zu durchdringen. Dies erschwert natürlich die Untersuchung des Einflusses von JOLU22 auf die ERK1/2-Dimerisierung in Zellen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist das Anhängen des Peptides an ein Zell-penetrierendes Peptid (CPP), welches in der Lage ist, daran gebundene Peptide in die Zelle zu transportieren.

CPPs sind kurze Peptide, welche die Zellmembran durch Protein-Transduktion spontan überwinden können. Diese Fähigkeit erlaubt die Einschleusung von Peptiden, welche an die CPPs gebunden sind, was sie zu interessanten Substanzen für die Pharmakotherapie

macht. Wichtige und häufig verwendete Vertreter der CPPs sind das HIV-Tat-Protein aus dem HIV-Virus und das Penetratin aus *Drosophila Antennapedia*. In der Literatur zeigt sich, dass CPPs verschiedene Transduktionsmechanismen verwenden, auch abhängig vom Zelltyp und vom gebundenen Peptid. Auch die Konzentration des verwendeten Peptides scheint eine Rolle bei der Aufnahme der Peptide in die Zelle zu spielen^{116,117}.

Deswegen sollte vor anderen Experimenten abgeklärt werden, welches der genannten CPPs und in welcher Konzentration sich möglichst gut in den verwendeten COS7-Zellen anreichert.

Um die richtige Konzentration und das optimale CPP zu wählen, wurden Penetratin und HIV-Tat an das Fluorophor Fluorescein gebunden. Dies ermöglicht dann die Detektion der Peptide über die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorescein am konfokalen Mikroskop. Dafür wurden COS7-Zellen auf Deckgläser ausgesät und einen Tag später mit Fluorescein-Penetratin oder Fluorescein-HIV-Tat in Konzentrationen von 1-7 μM in HKR transfiziert. Nach Inkubation mit den Peptiden wurden die Zellen gewaschen, fixiert und der Kern mit DAPI gefärbt. Am Konfokalmikroskop wurde das Fluorescein-Signal detektiert und dabei dann auf eine gleichmäßige Verteilung der Peptide in der Zelle mit möglichst wenig Hintergrundsignal geachtet. Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Auswahl von Zellen, die mit Penetratin oder HIV-Tat in verschiedenen Konzentrationen transfiziert wurden. Höhere Konzentrationen der Peptide zeigten ein zu starkes Signal und sind deshalb nicht dargestellt. Letztendlich ergab sich das beste Signal bei Fluorescein-Penetratin bei 4 μM , weshalb dieses Peptid dann für den nächsten Versuch an JOLU22 gekoppelt wurde.

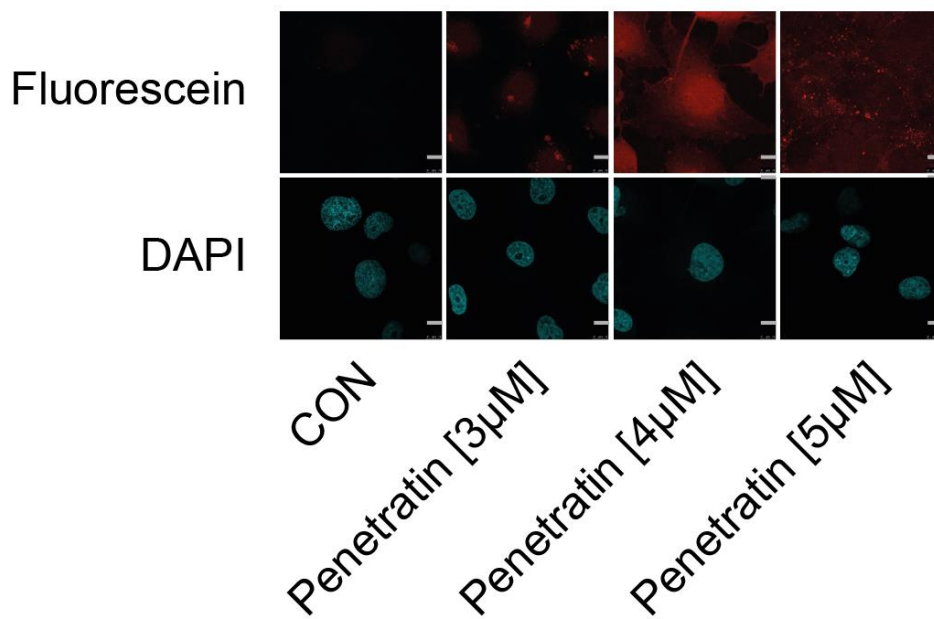
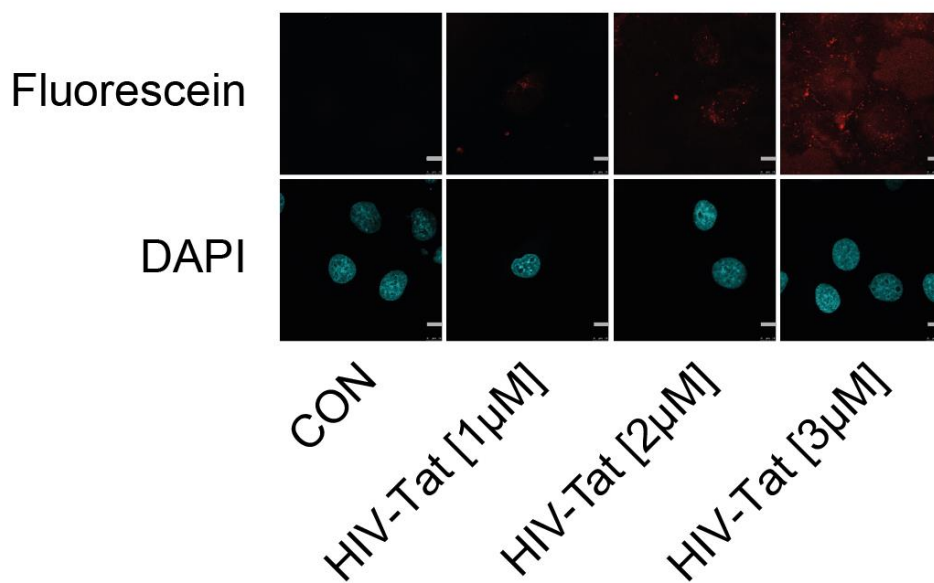
A**B**

Abb.17 Auswahl des Zell-penetrierenden Peptids und dessen Konzentration für spätere Versuche

COS7-Zellen wurden mit Fluorescein-markiertem Penetratin oder HIV-Tat transfiziert. Die Abbildung zeigt repräsentative konfokale Aufnahmen von Fluorescein-Penetratin (A) oder -HIV-Tat (B) in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. CON = untransfizierte COS7-Zellen als Kontrolle. Maßstab: 10 μ m. n = 2.

Nun soll analog zu den Versuchen zum E2-Peptid der Einfluss von JOLU22 auf die ERK1/2-Dimerisierung getestet werden. Dafür wurden COS7-Zellen mit Flag- und HA-markiertem ERK2 und dem α_{1B} -Rezeptor transfiziert. Zwei Tage später wurden die

Zellen mit Fluorescein-Penetratin-JOLU22 oder Fluorescein-Penetratin als Kontrolle transfiziert, dann mit Phenylephrin stimuliert und fixiert und anschließend der Duolink[®] proximity ligation assay mit anti-HA- und anti-Flag-Antikörpern, wie oben bereits beschrieben, durchgeführt. Am Konfokalmikroskop wurden die Deckgläser abgescannt und das Fluorescein-Signal detektiert, um zu sehen, ob die Zellen erfolgreich mit JOLU22 transfiziert wurden, parallel wurde das Duolink[®]-Signal dokumentiert. Um die Zellen in der Kernebene darzustellen wurden die Kerne mit DAPI gefärbt.

Abb. 18 zeigt repräsentative Aufnahmen des Experimentes. Unter unstimulierten Bedingungen zeigte sich weder unter Kontrollbedingungen, noch mit JOLU22 das Duolink[®]-Signal als Zeichen der Dimerisierung von HA- und Flag-ERK2. Nach Transfektion mit Fluorescein-Penetratin und Stimulation mit Phenylephrin konnte dagegen die Dimerisierung über den Duolink[®] dargestellt werden. Wenn vor Stimulation dagegen Fluorescein-Penetratin-JOLU22 verwendet wurde, zeigten sich kaum noch Duolink[®]-Signale. Dies deutet darauf hin, dass JOLU22, ähnlich wie das E2-Peptid in der Lage ist, mit ERK2 zu interagieren und so die ERK1/2-Dimerisierung zu hemmen.

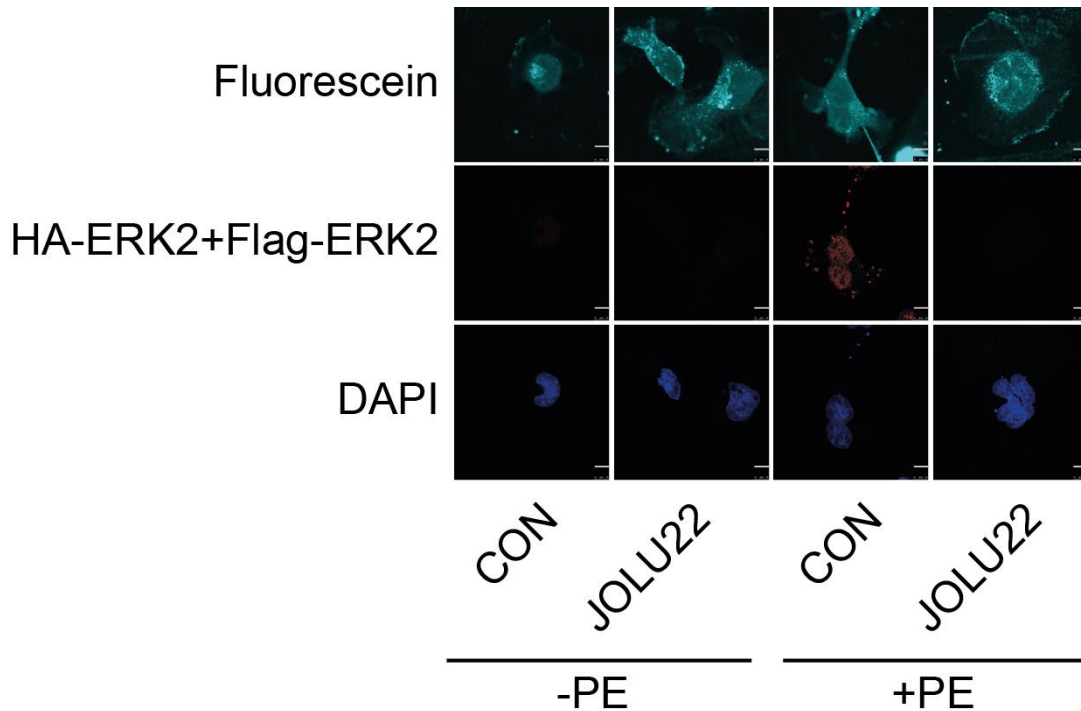
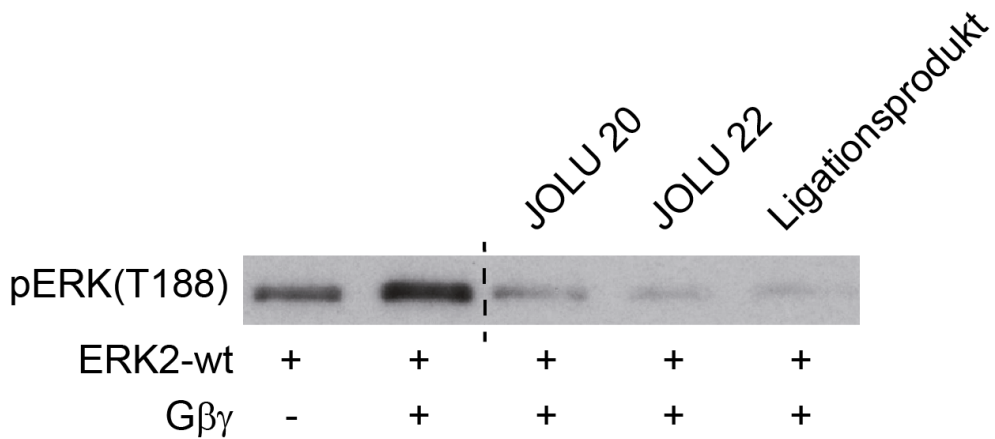
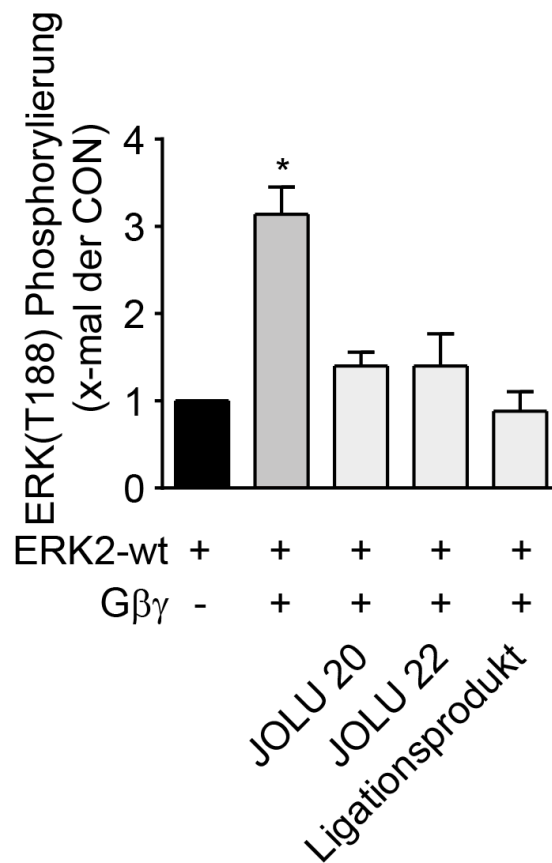


Abb. 18 JOLU22 verhindert die Dimerisierung von HA- und Flag-ERK2

Repräsentative Konfokalaufnahmen des Duolink[®] proximity ligation assay von COS7-Zellen transfiziert mit α_{1B} -Rezeptor, HA- und Flag-ERK2 mittels DEAE-Dextran-Methode ohne bzw. mit Phenylephrin-Stimulation (=PE; 10 μ M, 10min). Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit Fluorescein-Penetratin-JOLU22 (= JOLU22) oder Fluorescein-Penetratin (= CON) transfiziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 μ m. n = 6. Modifiziert nach: Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

3.2.6 Einfluss von JOLU22 auf die ERK Thr188-Phosphorylierung

Da die Dimerisierung von ERK1/2 die Interaktion mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen ermöglicht und nachfolgend zur Phosphorylierung von ERK Thr188 führt, sollte dann überprüft werden, ob Letztere durch JOLU22 auch verhindert wird. Dafür inkubierte Angela Tomasovic aufgereinigtes ERK2 mit G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und JOLU20, JOLU22 oder dem Ligationsprodukt der Peptide in einem Phosphorylierungspuffer. Zusätzlich wurden ATP und MgCl₂ dazugegeben, da die Reaktion stark Energie verbrauchend ist. Die Proteine wurden dann mittels Western-Blot aufgetrennt und die ERK Thr188-Phosphorylierung mit pERK(T188)-Antikörpern überprüft.

A**B****Abb. 19 JOLU22 verhindert die ERK Thr188-Phosphorylierung**

Aufgereinigtes ERK2-Wildtyp wurde mit Gβγ und JOLU20, JOLU22 oder dem Ligationsprodukt inkubiert. Abbildung A zeigt einen repräsentativen Immunoblot. Antikörper: pERK(T188). pERK(T188): 42kDa. Die gestrichelte Linie kennzeichnet zwei nicht relevante Banden, die entfernt wurden. Abbildung B zeigt die dazugehörige Quantifizierung der ERK Thr188-Phosphorylierung (pERK(T188)). CON = Kontrolle ohne Gβγ. * $P < 0,05$. Quelle: Angela Tomasovic, Dissertation ¹¹⁸.

Abb. 19 A zeigt ein repräsentatives Bild eines Western-Blots. In Abb. 19 B wird die Quantifizierung des Phosphorylierungsstandes von ERK1/2 dargestellt. Unter

Kontrollbedingungen (ohne G β γ) zeigte sich wenig ERK Thr188-Phosphorylierung. Mit G β γ dagegen kam es zu einem dreifachen Anstieg der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl JOLU20, JOLU22 als auch das Ligationsprodukt, führten dagegen zu einer starken Abnahme der ERK Thr188-Phosphorylierung.

Zusammengenommen mit dem Duolink[®] zeigt dies, dass JOLU22 über die Interferenz mit der ERK2-Dimerisierung die Phosphorylierung an ERK Thr188 verhindert. Da diese Phosphorylierung ein essentieller Schritt für die Entstehung kardialer Hypertrophie ist, könnte JOLU22 einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine mögliche Prävention oder Therapie dafür sein.

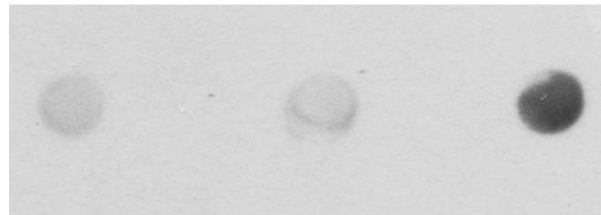
3.3 Mechanismus der Kerntranslokation mit Importin 7

ERK1/2-vermittelte kardiale Hypertrophie ist unter anderem abhängig von der Translokation der Kinasen in den Zellkern und der damit verbundenen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Allerdings ist der genaue mechanistische Hintergrund der Kerntranslokation von ERK2 noch nicht vollkommen bekannt, weshalb dies im Folgenden noch weiter untersucht werden soll. Es stellt sich die Frage, ob ERK1/2 als Dimere oder als Monomere importiert werden und welche Rolle die ERK Thr188-Phosphorylierung an ERK2 beim Kernimport spielt. Da Chuderland et al. herausfanden, dass ERK1/2 aktiv über Interaktion mit Importin 7 in den Zellkern transportiert wird, soll im Folgenden der Einfluss von ERK2- Δ 4 und ERK2- Δ 4D und dem E2-Peptid auf die Bindung von ERK2 an Importin 7 untersucht werden ^{75,89}. Dazu wurden Immunpräzipitationen durchgeführt.

3.3.1 Expression des E2-Peptids in HEK293-Zellen

Zuvor wurde sichergestellt, dass das Peptid exprimiert wird, da es mit einer berechneten Größe von 7,1 kDa degradiert werden kann ¹¹⁹. Dazu wurde ein Dot blot in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden entweder mit dem mit c-myc-markiertem E2-Peptid oder Flag-ERK2 oder pcDNA3 als Kontrollen transfiziert, lysiert und im Anschluss mit dem c-myc-Antikörper entwickelt. Es zeigte sich nur in Zellen, die mit dem Peptid transfiziert waren, ein deutliches Signal, was darauf hinweist, dass die Zellen in der Lage sind, das Peptid zu exprimieren (Abb. 20).

Dot blot: c-myc



ERK pcDNA3 E2-Peptide

Abb. 20 HEK293-Zellen exprimieren das E2-Peptid

Repräsentativer Dot blot von HEK293-Zellen, die mit Flag-ERK2, pcDNA3 oder dem E2-Peptid transfiziert, lysiert und mittels Dot blot mit c-myc-Antikörper detektiert wurden. n=3.

3.3.2 Einfluss der Dimerisierung und der ERK Thr188-Phosphorylierung auf die Interaktion mit Importin 7

Für die Immunpräzipitation wurden HEK293-Zellen mit Flag-ERK2, Flag-ERK2- Δ 4, Flag-ERK2- Δ 4D oder pcDNA3 als Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden mit dem M₃-Rezeptor-Agonist Carbachol stimuliert und im Anschluss lysiert. Flag-ERK2-wt, - Δ 4 bzw. - Δ 4D wurden mit Flag-beads immunpräzipitiert und mit Antikörpern gegen Flag und Importin 7 geblottet. Zusätzlich wurden Zelllysate für Western-Blots verwendet, um die Expression von Flag-ERK2 (und Importin 7) zu überprüfen, wobei sich diese als etwa gleich stark in allen Bedingungen präsentierte (Abb. 21 B). Abb. 21 A zeigt repräsentative Western-Blots der Immunpräzipitation. Interessanterweise war die Interaktion des monomeren ERK2- Δ 4, im Vergleich zu ERK2-wt mit Importin 7 reduziert. Die Imitation der ERK Thr188-Autophosphorylierung mit ERK2- Δ 4D hingegen, ermöglichte eine sogar etwas stärker ausgeprägte Bindung an Importin 7 als beim Wildtyp. Insgesamt verdeutlichen diese Experimente, dass die ERK2 Thr188-Phosphorylierung für die Interaktion mit Importin 7 nötig zu sein scheint, wohingegen die Hemmung der Dimerisierung und damit der ERK2 Thr188-Phosphorylierung diese Interaktion beeinträchtigt.

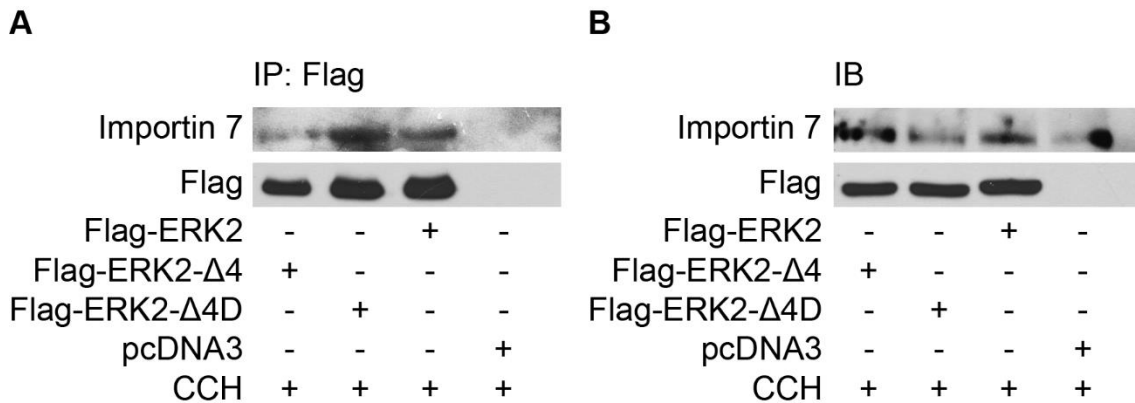


Abb. 21 ERK Thr188-Phosphorylierung ermöglicht die Interaktion von ERK2 mit Importin 7

Abbildung A zeigt eine repräsentative Immunpräzipitation (IP) von Flag-ERK2 mit Importin 7 in HEK293-Lysaten. Die Zellen wurden Flag-ERK2-wt, Flag-ERK2-Δ4, Flag-ERK2-Δ4D oder pcDNA3 transfiziert und mit Carbachol (CCH; 100 μM, 15 min) stimuliert. Die Lysate wurden mit Flag-Antikörpern präzipitiert und mit Importin 7-Antikörpern geblotet. Abbildung B zeigt repräsentativ die Expressionslevel von Flag-ERK2 und Importin 7 im Western-Blot (IB) mit Flag- und Importin 7-Antikörpern. Flag-ERK2: 43kDa, Importin 7: 120kDa. n = 3.

3.3.3 Einfluss des Peptides auf die Interaktion von ERK2 mit Importin 7

Als nächsten Schritt wurde der Einfluss des E2-Peptides auf die Bindung von Flag-ERK2 and Importin 7 getestet. Es wurden wieder HEK293-Zellen mit Flag-ERK2-wt und dem E2-Peptid transfiziert, mit Carbachol stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden mit Flag-beads präzipitiert. Hier zeigte sich, ähnlich wie bei den Versuchen mit Flag-ERK-Δ4, eine reduzierte Interaktion von Flag-ERK2 mit Importin 7 im Vergleich zu Flag-ERK2 ohne Peptid (Abb. 22 A). Die Expression von Flag-ERK2 war im zusätzlich durchgeführten Western-Blot und auch in der Immunpräzipitation in allen Bedingungen etwa gleich stark (Abb. 22 B).

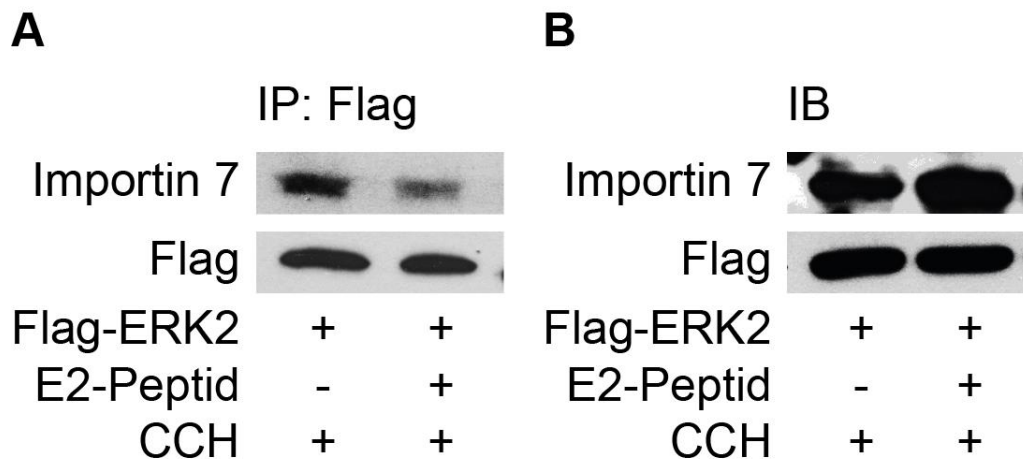


Abb. 22 Das Peptid verringert die Interaktion von Importin 7 mit ERK2

Abbildung A zeigt eine repräsentative Immunpräzipitation (IP) von Flag-ERK2 mit Importin 7 in HEK293-Lysaten. Die Zellen wurden mit Flag-ERK2 und dem ERK2-Peptid transfiziert und mit Carbachol (CCH; 100µM, 15 min) stimuliert. Die Lysate wurden mit Flag-Antikörpern präzipitiert und mit Importin 7-Antikörpern geblottet. Abbildung B zeigt die Expressionslevel von Flag-ERK2 und Importin 7 im repräsentativen Western-Blot (IB) mit Flag- und Importin 7-Antikörpern. Flag-ERK2: 43kDa, Importin 7: 120kDa. n=3.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass man über die Hemmung der Dimerisierung mit dem E2-Peptid die Bindung von ERK2 an Importin 7 reduzieren kann. Dies lässt vermuten, dass ohne die Dimerisierung die Bindung an Importin 7 deutlich vermindert ist. Die Versuche mit ERK2-Δ4D deuten darauf hin, dass auch die ERK Thr188- Phosphorylierung benötigt wird. Die Autophosphorylierung scheint daher für die Interaktion von ERK2 mit Importin 7 wichtig zu sein. Damit liefern diese Experimente einen weiteren Hinweis zum mechanistischen Hintergrund der Kerntranslokation der Kinase.

4 Diskussion

4.1 ERK1/2 als Vermittler von pathologischer kardialer Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie ist die Antwort des Herzens auf chronische Belastung des Herzmuskels. Biomechanischer Stress und neurohumorale Aktivierung führen zur Zunahme der Zellgröße, Fibrosierung und gesteigerter Apoptose im Herzen. Die daraus resultierende pathologische Hypertrophie ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von Arrhythmien, koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod^{2,12}. Umso wichtiger ist es, die der pathologischen kardialen Hypertrophie zugrundeliegenden Mechanismen näher zu verstehen, um diese als Angriffspunkt für wirkungsvolle Therapien nutzen zu können.

Neben einer Vielzahl anderer Signalwege ist auch die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 an der Vermittlung pathologischer kardialer Hypertrophie beteiligt. Auf die duale Phosphorylierung der Kinasen im TEY-Motiv folgt die Dimerisierung. Diese wiederum erlaubt die Bindung der $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen, woraufhin es zur Autophosphorylierung von ERK2 an Threonin188 kommt. Diese von Lorenz et al. neu entdeckte Autophosphorylierung stellt einen Regulationsmechanismus bei der ERK1/2 vermittelten Hypertrophie dar. In Patienten mit hochgradiger Aortenstenose (≥ 40 mmHg) kam es zu einer signifikanten Erhöhung der ERK Thr 188-Phosphorylierung, wohingegen die Phosphorylierung bei niedrig-gradienter Aortenstenose nicht signifikant erhöht war. Zudem zeigte sich, dass die Hemmung der ERK Thr 188-Phosphorylierung in transgenen Mäusen durch Austausch des Threonins durch Alanin der Hypertrophieentstehung entgegenwirkte. Dagegen wurden vorteilhafte ERK1/2-Funktionen, wie anti-apoptotische Effekte, nicht beeinträchtigt²². Dies zeigt, dass die ERK Thr188-Autophosphorylierung eine Schlüsselrolle bei der Entstehung kardialer Hypertrophie einnimmt, die erlaubt zwischen den maladaptiven Hypertrophie-vermittelnden Eigenschaften und die für das Überleben der Zellen protektiven Funktionen von ERK1/2 zu trennen. Über eine Hemmung der Autophosphorylierung könnte es somit eine Möglichkeit geben die ERK1/2 Aktivität gezielt zu hemmen bzw. regulieren.

4.2 Der Einfluss von ERK2-Δ4 und ERK2-Δ4D auf die subzelluläre Lokalisation

Lorenz et al. demonstrierten, dass die Dimerisierung von ERK1/2 und die Interaktion des Dimers mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit für die ERK Thr188-Autophosphorylierung notwendig sind. Für einen genaueren Einblick in die Folgen, die diese Vorgänge auf die Zellen haben, wurde der Einfluss einer Dimerisierungs-defizienten Mutante - ERK2-Δ4 - auf die subzelluläre Lokalisation und Zell-Hypertrophie untersucht.

Da sich die von ERK1/2 initiierten hypertrophen Signalwege im Zellkern abspielen (die antiapoptotischen dagegen hauptsächlich im Zytosol) war es interessant herauszufinden, wie sich die Lokalisation von monomerem ERK2 im Vergleich zu Wildtyp ERK2 verändert. Um das zu testen, wurden COS7-Zellen mit YFP-markiertem ERK2-wt oder ERK2-Δ4 transfiziert und die nukleäre-zu-zytosolische Verteilung von ERK2 vor und nach Phenylephrin-Stimulation untersucht. ERK2-wt akkumulierte im Zellkern nach Stimulation, während ERK2-Δ4 überwiegend im Zytosol verlief. Dies zeigt, dass die Dimerisierung für den Kernimport der Kinase benötigt wird. Dagegen konnten wir bei Wiederholung des Experiments mit der Mutante ERK2-Δ4D sehen, dass der Austausch von Threonin188 durch die phosphomimetische Aminosäure Aspartat, den Import von monomerem ERK1/2 nach Stimulation wiederum ermöglicht (siehe (s.) Abb. 6 und 8). Analog dazu war ERK2-Δ4D auch in der Lage, Hypertrophie in Kardiomyozyten auszulösen. Die Mutante induzierte nach Langzeit-Stimulation mit Phenylephrin eine Zunahme in der Querschnittsfläche in mit Phalloidin-gefärbten NRCMs. Im Gegensatz zu ERK2-Δ4D, kam es in NRCMs mit ERK2-Δ4 zu keiner signifikanten Zunahme der Zellgröße im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen (s. Abb. 9 und 10). Es stellt sich die Frage, wie die veränderte Lokalisation und Funktion von ERK2-Δ4D im Vergleich zu ERK2-Δ4 zu erklären ist. Möglicherweise führt die Deletion von vier Aminosäuren in Kombination mit der Simulation der ERK Thr188-Phosphorylierung zu einer veränderten Aktivität von ERK2-Δ4D. Um genauere Aussagen über die Aktivität von ERK2-Δ4 und ERK2-Δ4D machen zu können, stehen noch Experimente mit MBP (*myelin basic protein*)-Assays aus.

Unklar ist auch, ob die Threonin188-Phosphorylierung den Import der Kinase in den Zellkern bewirkt oder die nukleäre Verweildauer von ERK1/2 verlängert. Wahrscheinlich

ist, dass die Simulation der Autophosphorylierung eine vereinfachte Interaktion mit Kernimportproteinen induziert. Wie in dieser Arbeit gezeigt, könnte die ERK Thr188-Phosphorylierung die Interaktion mit dem *Shuffle*-Protein Importin 7 begünstigen. Dies würde die Überwindung der Kernmembran erleichtern und somit eher für die Hypothese sprechen, dass die Phosphorylierung eher den Kernimport ermöglicht, als die Verweildauer zu verlängern. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die ERK Thr188-Phosphorylierung langsamer zunimmt als die Phosphorylierung im TEY-Motiv, dafür aber länger persistiert, was mit der Rolle der ERK Thr188-Phosphorylierung in dem lange andauernden Prozess der kardialen Hypertrophie vereinbar ist ²². So könnte diese Autophosphorylierung die Kinase vor Phosphatasen im Kern schützen und damit die Kernverweildauer verlängern. Zukünftige Experimente müssen aber auf jeden Fall durchgeführt werden, um genauere Aussagen über die Verweildauer und -kinetik von Thr188 phosphoryliertem ERK2 machen zu können z.B. mittels der FRAP-Methode (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*).

Zusammengefasst zeigt sich daraus, dass die Autophosphorylierung an ERK Thr188 alleine ausreicht, um die nukleäre Translokation der Kinase zu induzieren. Über den Zellkern scheinen ERK1/2 dann ihre hypertrophen Effekte zu vermitteln. Die Dimerisierung ist damit nicht zwingend für den Kernimport nötig, allerdings Voraussetzung für die Autophosphorylierung, die dann den initialen Schritt für den Import darstellt. Von zentraler Bedeutung ist damit auch die Erkenntnis, dass man demzufolge über die Hemmung der Dimerisierung die Entstehung von Kardiomyozyten-Hypertrophie verhindert. So stellt sich die Frage, wie man die bisher gewonnenen Erkenntnisse nutzen kann, um durch ERK1/2 vermittelte Hypertrophie inhibieren zu können.

4.3 Selektive Hemmung von ERK1/2-Funktionen

Schaltet man die ERK1/2-Aktivität komplett aus, z.B. mit dem MEK-Inhibitor PD98059 resultiert dies in einer Reduktion der Stimulus-induzierten Hypertrophie, jedoch geht es auch mit einer Steigerung der Apoptoserate der Zellen einher. Auch bei Patienten die im Rahmen von Tumorthérapien mit MEK-Inhibitoren behandelt werden, zeigt sich ein Anstieg des Blutdrucks und eine Reduktion der Ejektionsfraktion ^{29,120}. Somit ist die Inhibition der katalytischen ERK1/2-Aktivität ungünstig, um Hypertrophie zu

verhindern. Es ist also oftmals eine Herausforderung Kinasen wie ERK1/2 zu hemmen, da sie zwar in vielen pathologischen, aber auch physiologischen Prozessen involviert sind¹²¹. Daher gestaltet es sich als kompliziert, spezifisch Signalkaskaden zu identifizieren, die nur an der pathologischen und nicht physiologischen Signalweiterleitung beteiligt sind. Also müssen Strukturen gefunden werden, die möglichst nur nukleäre Signalwege von ERK1/2 hemmen. Die selektive Hemmung der Thr188-Phosphorylierung oder ERK Dimerisierung ermöglicht im Gegensatz zur kompletten ERK1/2-Inhibition den Erhalt von vorteilhaften cytosolischen Funktionen unter Hemmung von maladaptiven Zellkern-basierter ERK-Aktivität¹²².

So könnte die Interferenz mit der Bindung der $\beta\gamma$ -Untereinheit an das ERK1/2-Dimer eine Möglichkeit bieten, die ERK Thr188-Phosphorylierung zu verhindern. Ruppert et al. beschrieben, dass die Überexpression des ERK1/2-*Scaffolds* β -Arrestin 2 die Interaktion von ERK2 mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit verhindert. Da diese Bindung eine Voraussetzung für ERK Thr188-Phosphorylierung ist, ermöglicht dieses *Scaffold* die nukleäre Aktivität der Kinase zu hemmen, ohne zytosolische Funktionen zu reduzieren, indem es ERK1/2 im Zytosol retiniert. Zusätzlich hält β -Arrestin als Ankerprotein ERK1/2 im Zytosol fest^{71,72,123,124}.

Also ermöglicht die Regulation der subzellulären Lokalisation selektiv hypertrophe ERK-Signale zu inhibieren²⁹. Auch Lorenzen et al. zeigten, dass ein Ansatzpunkt ERK1/2-Funktionen selektiv zu beeinflussen, die Verhinderung des Kerntransports der Kinase ist. Durch Hemmung der Expression von DIM-7, dem *Drosophila*-Homolog von Importin 7, konnte die nukleäre Translokation der Kinasen verhindert werden^{125,126}.

Eine andere Möglichkeit ERK1/2s nukleäre Signaltransduktion zu hemmen, ist die Interferenz mit der Dimerisierung. ERK2- $\Delta 4$ zeigte als monomeres ERK2, dass über die Hemmung der Dimerisierung die nukleäre Akkumulation der Kinase und somit Hypertrophie verhindert werden kann. Es konnte aufgedeckt werden, dass durch die Mutante die Phosphorylierung von zytoplasmatischen ERK1/2-Targets nicht beeinflusst war und somit ERK1/2s antiapoptotische Funktionen erhalten bleiben^{29,107,118}. Somit wäre die Interferenz mit der Dimerisierung ein mögliches *Target*, um selektiv ERK-vermittelte Hypertrophie zu verhindern.

4.4 Hemmung der Dimerisierung mit Peptiden

Die duale Phosphorylierung im TEY-Motiv von ERK2 induziert eine Konformationsänderung, welche die Dimerisierung von ERK2 ermöglicht. Das putative Dimerisierungsinterface besteht aus der Verlängerung des C-Terminus L16, einer α -Helix, die mit der entsprechenden Struktur eines zweiten ERK1/2-Moleküls einen Leucin-Zipper ausbildet. Der zweite Teil des Interfaces besteht aus der Formation eines Ionenpaars zwischen His167 und Glu343 (Abb. 23) ⁴³.

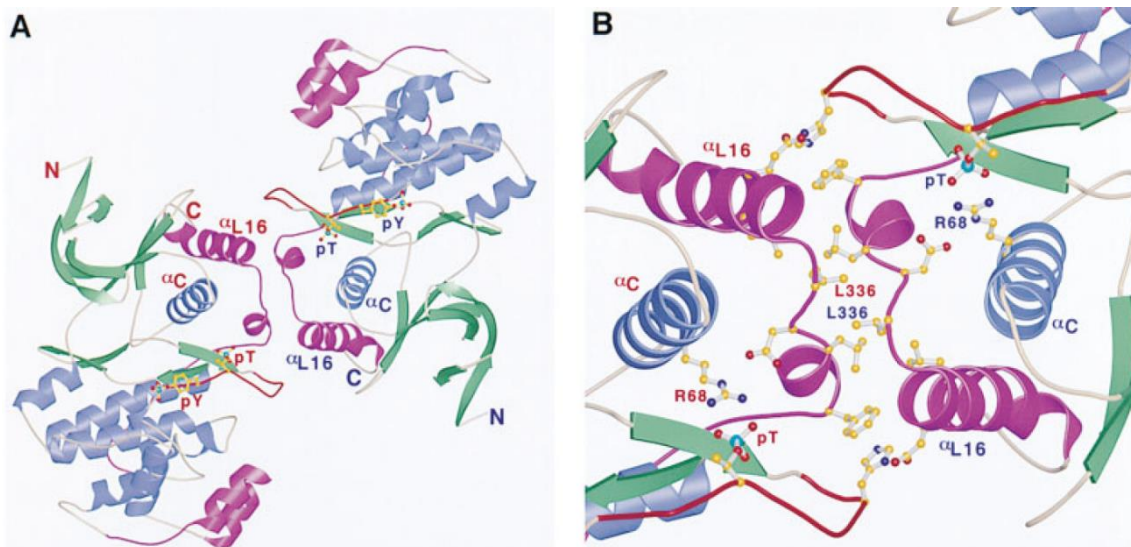


Abb. 23 Dimerisierung von ERK2

Die Struktur des ERK2 Dimers zeigt β -Faltblätter in grün, α -Helices in blau und L16 (und die MAP Kinase Insertion) in magenta. Phosphoryliertes Thr183 (pT) und Tyr185 (pY) sind in gelb markiert (A). Die Leucin-Reste 333, 336 und 344 in L16 berühren sich im Dimer und Histidin176 in der Phosphorylierungs-Lippe (rot) und Glutamat343 in L16 bilden ein Ionen-Paar (B). Khokhlathev, 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. Lizenz-Nummer: 4363151495879.

Basierend auf diesem Wissen hat die Arbeitsgruppe ein Peptid generiert, welches aus 49 Aminosäuren von L16 besteht, mit dem Ziel die Bildung des Dimers zu verhindern ohne die katalytische Aktivität von ERK2 zu beeinträchtigen. *Cross-linking* Experimente von Susanne Homann zeigten, dass das E2-Peptid in der Lage ist, an die Kinase zu binden (s. Abb. 11). Zudem konnte in Co-Immunpräzipitations-Experimenten gezeigt werden, dass das Peptid mit der Dimerisierung von ERK2 interferieren kann (s. Abb. 12). Diese Ergebnisse wurden mit Duolink[®] proximity ligation assays bestätigt (s. Abb. 13). Das Peptid scheint also ein effektives Mittel zu sein, um die ERK2-Dimerisierung zu verhindern.

Da der Leucin-*Zipper* allerdings ein konserviertes *Interface* ist, welches bei der Interaktion vieler Proteine eine Rolle spielt, wurde der Einfluss des Peptides auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren MYC und MAX überprüft. Die Dimerisierung der Proteine findet über die *basic region/helix-loop-helix/leucin zipper*-Domäne statt, wobei in Duolink[®] proximity ligation assays gezeigt werden konnte, dass diese Interaktion vom Peptid nicht verhindert wird (s. Abb. 15). Allerdings sollten weitere Experimente dies bestätigen und wenn möglich auch quantifizieren, da die Ergebnisse rein visuell erhoben wurden (ohne quantitative Auswertung). Insgesamt deutet das Experiment aber darauf hin, dass das Peptid spezifisch nur die Dimerisierung von ERK2 beeinflusst und nicht generell die anderer typischer Leucin-*Zipper*-Proteine wie MYC und MAX. Gründe dafür könnten abweichende Aminosäuresequenzen der Leucin-*Zipper* von verschiedenen Proteinen sein, da das Peptid anhand der spezifischen Sequenz von L16 generiert wurde.

Als nächsten Schritt erfolgte die Suche nach einer kleineren Aminosäuresequenz, die noch in der Lage ist, die ERK1/2-Dimerisierung zu hemmen. Dabei wurden zwei kleinere Peptide generiert, JOLU20 und JOLU22. JOLU20 sollte die Ausbildung der ionischen Bindung zwischen Histidin176 und Glutamat343 zwischen zwei ERK2-Molekülen verhindern. JOLU22 ist ein 25 Aminosäuren umfassendes Bruchstück des Originalpeptides, was damit auch im Bereich des Leucin-*Zippers* liegt. Angela Tomasovic zeigte, dass beide Peptide in ähnlichem Ausmaß in der Lage sind, die ERK Thr188-Phosphorylierung zu hemmen (vgl. Abb. 19). Mit dem Biacore[™] binding assay zeigte Jutta Eichler allerdings, dass JOLU20 nicht ausreichend an ERK2 binden kann, wohingegen JOLU22 gut mit der Kinase interagiert. Das JOLU20 nur im geringen Ausmaß an ERK bindet, mag vielleicht daran liegen, dass die entsprechende Aminosäuresequenz von ERK in Ruhe im Enzym verborgen ist und damit die Bindung erschwert wird. Auch wenn JOLU20 die Autophosphorylierung hemmen konnte, wurde aufgrund von Jutta Eichlers Ergebnissen sicherheitshalber JOLU22 für den Duolink[®] proximity ligation assay verwendet. Ähnlich wie das E2-Peptid, war es in der Lage mit der Dimerisierung von ERK2 zu interferieren (s. Abb. 18). Insgesamt ist JOLU22 einen Schritt näher an der minimalsten Sequenz, die in der Lage ist ERK1/2-Dimerisierung zu hemmen und damit auch näher an möglichen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten.

Wenn die Peptide in der Lage sind spezifisch die Dimerisierung von ERK2 zu verhindern, sollte folglich auch die ERK Thr 188-Autophosphorylierung reduziert sein. Tomasovic et al. bestätigte dies durch Inkubation von aufgereinigtem ERK2 und JOLU20 bzw. JOLU22 mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit in einem Phosphorylierungspuffer. Es zeigte sich, dass JOLU20 und JOLU22 die ERK Thr 188-Phosphorylierung abschwächen können (s. Abb. 19). Vergleichbare Ergebnisse konnten in gleichen Experimenten mit dem E2-Peptid erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich allerdings die Frage, warum JOLU20 in diesem Experiment die Phosphorylierung hemmen konnte, in dem Biacore™ binding assay von Jutta Eichler kaum Affinität zu ERK2 zeigte. Vielleicht lag bei den unterschiedlichen Experimenten eine veränderte Dauer der Interaktion von ERK2 mit JOLU20 vor, was dann Auswirkungen auf die inhibitorischen Effekte von ERK2 hat. Als Konsequenz aus der verringerten ERK Thr 188-Phosphorylierung ergab sich, dass auch die nukleäre Akkumulation von YFP-markiertem ERK1/2 in Lokalisations-Assays und die hypertrophe Antwort in NRCMs in Anwesenheit des E2-Peptides reduziert sind. Auch war die Phosphorylierung von nukleären ERK1/2 Targets wie Elk1 im Vergleich zu zytosolischen Targets reduziert. Weitere Experimente werden zeigen, ob man mit JOLU22 diese Effekte im selben Ausmaß reproduzieren kann ¹⁰⁷.

Insgesamt demonstrieren die Experimente jedoch, dass die Peptide spezifisch über Interaktion mit dem ERK1/2-Dimer-*Interface* die Thr188-Phosphorylierung als Trigger für Hypertrophie verhindern können, ohne protektive ERK1/2-Funktionen zu beeinträchtigen. Stattdessen wird indirekt über die Hemmung der ERK Thr188-Phosphorylierung die nukleäre Signalweiterleitung der Kinase gehemmt. Auswirkungen einer Langzeitbehandlung von Zellen mit den Peptiden auf die zellulären Funktionen müssen noch untersucht werden. Insbesondere, da ERK1/2 im Nukleus noch andere Funktionen hat als die Hypertrophieinduktion, die über das Peptid eventuell gehemmt werden könnten und negative Konsequenzen für die Zelle haben könnten. Auch stellt sich die Frage, ob das E2-Peptid und JOLU22 noch andere Proteinfunktionen beeinflussen oder welche Auswirkungen sie auf die Funktion anderer Zelltypen abgesehen von Kardiomyozyten haben. Wichtig wäre außerdem die Darstellung der genauen Peptidstrukturen, um mögliche Interaktionen besser verstehen zu können.

4.5 Einfluss der Dimerisierung und der ERK Thr188-Phosphorylierung auf den Kernimport

Wie oben beschrieben, beruht die Interferenz mit ERK1/2-vermittelter Hypertrophie auf der Hemmung der nukleären Akkumulation. Bis heute ist allerdings der genaue Importmechanismus der Kinase noch nicht genau geklärt. Aktuell gibt es zwei von Adachi et. al. formulierte Hypothesen: Die passive Diffusion eines ERK1/2-Monomers und der aktive Import von Dimeren. Andere Arbeitsgruppen dagegen beschreiben, dass die Dimerisierung nicht am Kernimport und den nukleären Signalwegen beteiligt ist, sondern nur bei der Aktivierung von zytoplasmatischen Substraten involviert ist. ERK1/2 werden dieser Hypothese zufolge größtenteils als Monomere importiert, können aber zum Teil im Zellkern auch als Dimer vorliegen. Der Grund dafür ist aber noch unklar, da ERK1/2 Transkriptionsfaktoren nur in ihrer monomeren Form binden können^{83,84}. Im Gegensatz dazu zeigten Khokhlatchev et al., dass unphosphorylierte ERK1/2 passiv und als Monomer in den Zellkern gelangen können, aber rapide wieder in das Zytoplasma transferiert werden, wohingegen phosphorylierte ERK1/2 dimerisieren können. Da die Dimere für passive Kerntranslokation aber zu groß sind (84 kDa), müssen sie aktiv in den Kern transportiert werden. Der Export dauert dann länger als bei unphosphorylierten ERK1/2, möglicherweise weil im Dimer das Exportsignal maskiert wird. Es wurde weiterhin vermutet, dass die Dimere womöglich im Zytoplasma dissoziieren und nach dem aktiven Kernimport wieder reassoziieren²³. Nach Adachi et al. und Casar et al. müsste die ERK2-Δ4-Mutante im Zellkern akkumulieren, was allerdings bei unseren Lokalisations-Assays und auch bei Khokhlatchev et al. nicht der Fall war. Möglich wäre allerdings, dass die Monomere zu schnell aus dem Kern wieder heraustransportiert wurden, um detektiert zu werden^{23,84,127}. Unsere Experimente deuten aber darauf hin, dass es einen Mechanismus gibt, spezifisch für die aktivierte und dimerisierte Form von ERK1/2, der zu einer längerfristigen Akkumulation von ERK1/2 im Zellkern führt. Die Experimente mit ERK2-Δ4D lassen vermuten, dass der Zellkernimport über die von Lorenz et al. entdeckte ERK Thr188-Autophosphorylierung vermittelt wird. Es wäre daher wünschenswert weitere Proteine zu identifizieren, die an ERK1/2 nach der ERK Thr188-Phosphorylierung binden, um den Transportmechanismus genauer zu verstehen.

Lange war unklar, welche Region von ERK1/2 für die nukleäre Translokation verantwortlich ist. Von Chuderland et al. konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 ein nukleäres Translokationssignal (NTS) besitzt, bestehend aus den Aminosäuren Serin-Prolin-Serin. Aktivierte ERK1/2 werden dann am NTS phosphoryliert, was daraufhin die Bindung an Importin 7 erlaubt. In ruhenden Zellen wird diese Phosphorylierung durch Ankerproteine verhindert, die ERK1/2 im Zytosol sequestrieren. Importin 7 vermittelt dann den Kerntransport über Nukleoporene^{75,126}. Insgesamt wird die nukleäre Translokation also durch eine Vielzahl von Prozessen beeinflusst: Durch die Sequestration mit Ankerproteinen, Interaktion mit den Kernporen und die Bindung an Importin 7. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Dimerisierung und ERK Thr188 Phosphorylierung an diesen Vorgängen beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte mit Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass sowohl das E2-Peptid als auch ERK2-Δ4 die Interaktion mit Importin 7 verhindern. Dagegen war ERK2-Δ4D in der Lage an das Importprotein zu binden (s. Abb. 21 und 22). Damit liegt die Vermutung nahe, dass die ERK Thr188-Phosphorylierung einen Anteil am Importin 7-vermittelten Kernimport hat, während monomere ERK1/2 die ERK Thr188-Phosphorylierung verhindern und damit auch die Bindung an Importin 7 reduzieren. Zur Validierung der Ergebnisse sollten allerdings noch zusätzliche Versuche durchgeführt werden.

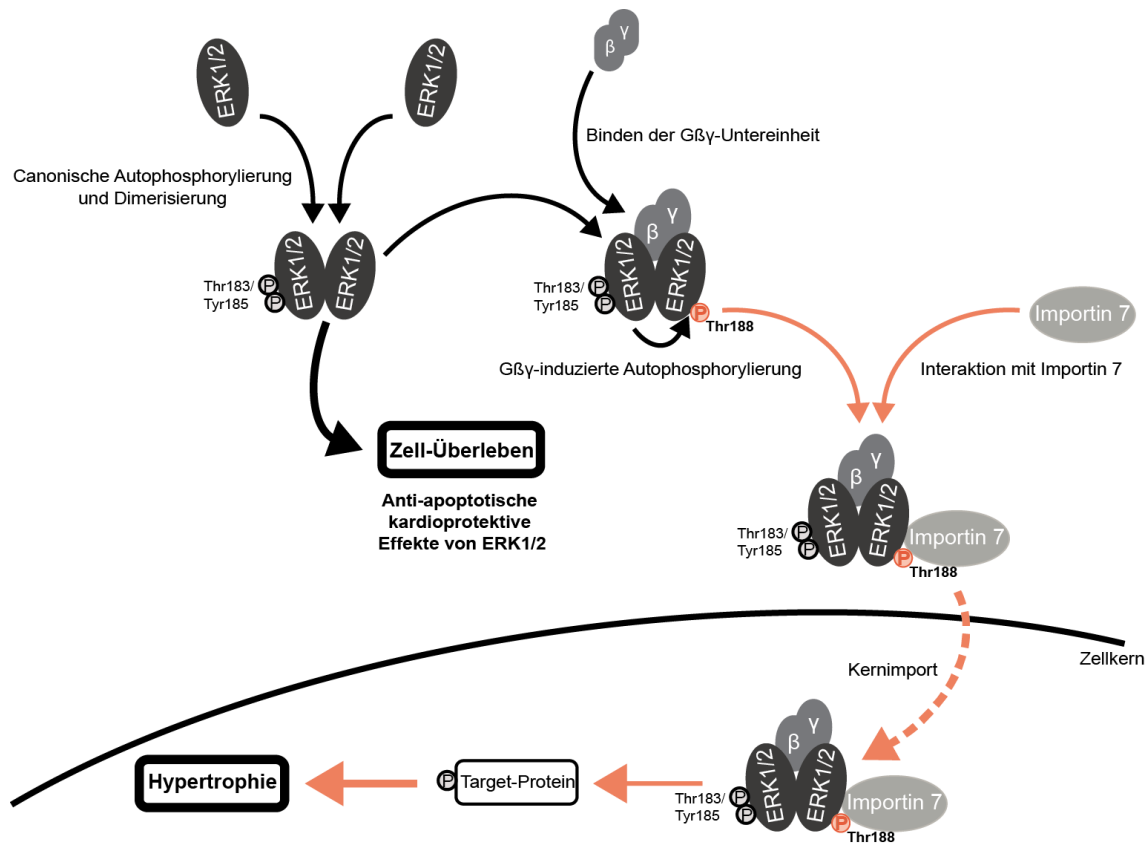


Abb. 24 ERK1/2 vermittelter Signalweg, der zu kardialer Hypertrophie führen könnte

Ein hypertropher Stimulus führt zur dualen Phosphorylierung im TERY-Motiv von ERK1/2. Dual phosphoryliertes ERK1/2 bildet Dimere, die mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen interagieren. Daraufhin findet die Autophosphorylierung von ERK1/2 an Thr188 statt, was die Interaktion mit Importin 7 und damit die Akkumulation der Kinasen im Nukleus bewirkt und damit möglicherweise die Entstehung von Hypertrophie begünstigt. Modifiziert nach: Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15, 75-83, doi:10.1038/nm.1893 (2009). Lizenznummer: 4363141341575.

Unklar ist auch noch die Rolle der Dimerisierung bei der Interaktion mit Importin 7. Chuderland et al. gehen nicht davon aus, dass die Dimerisierung für die nukleäre Translokation benötigt wird, wobei sie aber der Autophosphorylierung am SPS (Serin-Prolin-Serin-Sequenz) eine Rolle an der Translokation eingestehen⁷⁵. Unsere Ergebnisse deuten bisher aber eher darauf hin, dass die Dimerisierung eine Voraussetzung für die ERK Thr188-Phosphorylierung sein könnte und damit an der Interaktion mit Importin 7 und Kerntranslokation indirekt beteiligt ist (Abb. 24). Möglicherweise dissoziiert das Dimer nach Interaktion mit Importin 7 wieder und ERK1/2 werden als Monomere in den Kern transportiert. Im Duolink[®] proximity ligation assay wurde zwar der Großteil der Dimere im Zytosol detektiert, jedoch auch ein wesentlicher Anteil im Nukleus. Also könnte das Dimer dann, entsprechend der Vermutung von Khokhlatchev et al., im Zellkern wieder, falls es zuvor zu einer Dissoziation gekommen ist, reassoziieren. Hier

sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um den genauen Mechanismus besser verstehen zu können.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Threonin188-Autophosphorylierung der Trigger für die nukleäre Akkumulation von ERK1/2 ist. Voraussetzungen dafür sind die Dimerisierung und die Interaktion mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen. Aus diesem Grund haben wir die Interferenz mit der Dimerisierung untersucht, als Mittel, um ERK1/2-vermittelte kardiale Hypertrophie zu verhindern. In Duolink[®] proximity ligation assays konnte gezeigt werden, dass ERK1/2, wie bereits bekannt, nach Stimulation mit Phenylephrin dimerisieren. Die Überexpression der Dimerisierungs-defizienten ERK2-Mutante ERK2- $\Delta 4$ verhinderte in Lokalisationsassays die Translokation der Kinase in den Nukleus. In neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte aufgedeckt werden, dass eine Überexpression von ERK2- $\Delta 4$ zu einer effektiven Reduktion der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie in den Kardiomyozyten führt. Imitation der Thr188-Phosphorylierung bei monomerem ERK2 mit ERK2- $\Delta 4D$ stellte diese Fähigkeit der Kinase wieder her. In Lokalisationsassays war die Mutante in der Lage in den Zellkern zu translozieren und bewirkte in mit Phalloidin-gefärbten Rattenkardiomyozyten eine Hypertrophie der Zellen nach Stimulation mit Phenylephrin. Da es ohne die Dimerisierung nicht zur ERK Thr188-Phosphorylierung kommt, wurde das E2-Peptid generiert, welches spezifisch die endogene Dimerisierung und damit die Thr188-Phosphorylierung der Kinasen hemmen soll. In Immunpräzipitationen und Duolink[®] proximity ligation assays konnte gezeigt werden, dass das Peptid die Dimerisierung verhindern kann. Darüber hinaus konnte die Spezifität des Peptides in Duolink[®] proximity ligation assays mit MYC und MAX überprüft werden, deren Interaktion nicht durch das Peptid verhindert wurde. Eine kürzere Sequenz des Peptides - JOLU22 - welches mit dem Zell-penetrierenden Peptid Penetratin in die Zellen transfiziert wurde, war auch in der Lage, die Dimerisierung in Duolink[®] proximity ligation assays zu hemmen und konnte zudem die Thr188-Phosphorylierung an ERK2 reduzieren. Die beiden Peptide sind damit wertvolle Werkzeuge, um der Hypertrophieentstehung am Herzen eventuell später therapeutisch entgegenzuwirken. Schließlich konnte der noch kontrovers diskutierte Importmechanismus der Kinase über die Interaktion von Thr188-phosphoryliertem ERK2 mit Importin 7 etwas weiter aufgedeckt werden. Immunpräzipitationen zeigten, dass ERK2- $\Delta 4$ nicht mit Importin 7 interagieren konnte, ERK2- $\Delta 4D$ über Imitation der Thr188-Autophosphorylierung hingegen schon. Damit

scheint die Autophosphorylierung eine wichtige Komponente für den Importin 7-vermittelten Kernimport von ERK1/2 zu sein. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte das E2-Peptid das Binden von ERK2 and Importin 7 verhindern.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die Interferenz mit der Dimerisierung eine wirkungsvolle Strategie ist, um die Thr188-Phosphorylierung von ERK1/2 und damit die Kerntranslokation der Kinase und pathologische kardiale Hypertrophie zu verhindern.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A.U.	<i>arbitrary units</i>
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AP-1	<i>activator protein – 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	<i>adrenergic receptor</i>
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-xL/Ccl-2 associated death promotor</i>
βARK-ct	β-adrenerge Rezeptor Kinase-Carboxyl-Terminus
BBS	<i>BES-buffered saline</i>
BCA	Bicinochoninsäure
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c-Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
ca.	circa
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBFHH-Puffer	<i>Ca²⁺- and bicarbonate-free Hank's buffer with HEPES</i>
CCH	Carbachol
CON	Kontrolle
COS7-Zellen	Nierenzellen des <i>Cercopithecus aethiops</i>
CPP	Zell-penetrierendes Peptid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>

Cy	Carbocyanin
D	Aspartat
DAG	2-Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DIM-7	<i>Drosophila</i> -Importin 7
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline</i>
DUSP	dualspezifische Phosphatase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2	ERK2
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
Elk1	<i>E twenty six -like 1 transcription factor</i>
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GATA4	GATA Transkriptionsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIV-Tat	Humanes Immundefizienz-Virus- <i>Trans-Activator of Transcription</i>
HKR	<i>HEPES-buffered Krebs-Ringer solution without BSA</i>
IB	Immunoblot
IBx	2-Iodoxybenzoesäure
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IMP	Inosinmonophosphat
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol [1, 4, 5]-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KSR	<i>kinase suppressor of Ras</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu	Leucin
m/v	Masse pro Volumen
min	Minute
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MKP	MAPK-Phosphatase
MP1	<i>MEK partner 1</i>
MSK1	<i>Mitogen- and stress-activated protein kinase-1</i>
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NES	nukleäre Exportsequenz
NFAT	<i>nuclear factor of activated-T-cells</i>
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
NRCM	neonatale Rattenkardiomyozyten
OD	optische Dichte
<i>P</i>	Sigifikanzwert

P	Prolin
p	Phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PLA	<i>Proximity ligation assay</i>
PHE	Phenylephrin
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinasen
PIP ₃	Phosphatidylinositol-1, 4, 5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PYK2	Protein-Tyrosin-Kinase 2
Raf	<i>rapid activation of fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSK	ribosomale Protein-S6 Kinase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sef	<i>similar expression to fgf genes</i>
Ser	Serin
Shc	<i>src homology 2 domain containing protein</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
SPS	Serin-Prolin-Serin-Sequenz
Src	<i>sarcoma</i>
T	Threonin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEY-Motiv	Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin bzw. Thr183-Glu-Tyr185
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

6.2. Literaturverzeichnis

- 1 Bundesamt, s. *Todesursachen*, <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html> (2017).
- 2 Artham, S. M. *et al.* Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Progress in cardiovascular diseases* **52**, 153-167, doi:10.1016/j.pcad.2009.05.002 (2009).
- 3 Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics* **128**, 191-227, doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.005 (2010).
- 4 Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 569-582 (2000).
- 5 Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Revista espanola de cardiologia (English ed.)* **69**, 1167, doi:10.1016/j.rec.2016.11.005 (2016).
- 6 Shimizu, I. & Minamino, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **97**, 245-262, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.06.001 (2016).

- 7 Barry, S. P., Davidson, S. M. & Townsend, P. A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 2023-2039, doi:10.1016/j.biocel.2008.02.020 (2008).
- 8 Frey, N. & Olson, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* **65**, 45-79, doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243 (2003).
- 9 Heineke, J. & Molkentin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 589-600, doi:10.1038/nrm1983 (2006).
- 10 Janicki, J. S., Brower, G. L., Henegar, J. R. & Wang, L. Ventricular remodeling in heart failure: the role of myocardial collagen. *Advances in experimental medicine and biology* **382**, 239-245 (1995).
- 11 Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine* **322**, 1561-1566, doi:10.1056/nejm199005313222203 (1990).
- 12 Chatterjee, S. *et al.* Meta-analysis of left ventricular hypertrophy and sustained arrhythmias. *Am J Cardiol* **114**, 1049-1052, doi:10.1016/j.amjcard.2014.07.015 (2014).
- 13 Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., D. H. e. V. D. (Börm Bruckmeier, Grünwald, 2014).
- 14 Heineke, J. & Molkentin, J. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Molecular Cell Biology* **7**, 589 - 600 (2006).
- 15 Wilkins, B. J. & Molkentin, J. D. Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**, 1178 - 1191 (2004).
- 16 Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L. & Olson, E. N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4070-4075, doi:10.1073/pnas.080064097 (2000).

- 17 Cipolletta, E. *et al.* Targeting the CaMKII/ERK Interaction in the Heart Prevents Cardiac Hypertrophy. *PloS one* **10**, e0130477, doi:10.1371/journal.pone.0130477 (2015).
- 18 Mesubi, O. O. & Anderson, M. E. Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovascular research* **109**, 542-557, doi:10.1093/cvr/cvw002 (2016).
- 19 Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655 - 1657 (2002).
- 20 Proud, C. G. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy *Cardiovasc Res* **63**, 403 - 413 (2004).
- 21 Proud, C. G. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* **63**, 403-413, doi:10.1016/j.cardiores.2004.02.003 (2004).
- 22 Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* **15**, 75-83, doi:10.1038/nm.1893 (2009).
- 23 Khokhlatchev, A. V. *et al.* Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605-615 (1998).
- 24 Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-3112, doi:10.1038/sj.onc.1210392 (2007).
- 25 Roskoski, R., Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* **66**, 105-143, doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005 (2012).
- 26 Bueno, O. F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* **19**, 6341-6350, doi:10.1093/emboj/19.23.6341 (2000).
- 27 Molkenin, J. D. & Dorn, G. W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual Review of Physiology* **63**, 391 - 426 (2001).
- 28 Purcell, N. H. *et al.* 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**, 14074-14079, doi:10.1073/pnas.0610906104 (2007).
- 29 Ruppert, C. *et al.* 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**, 7440-7445, doi:10.1073/pnas.1221999110 (2013).
- 30 Mutlak, M. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation preserves cardiac function in pressure overload induced hypertrophy. *Int J Cardiol* **270**, 204-213, doi:10.1016/j.ijcard.2018.05.068 (2018).
- 31 English, J. *et al.* New insights into the control of MAP kinase pathways. *Experimental cell research* **253**, 255-270, doi:10.1006/excr.1999.4687 (1999).
- 32 Cobb, M. H., Boulton, T. G. & Robbins, D. J. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell regulation* **2**, 965-978 (1991).
- 33 Lohse, M. J., Krasel, C., Winstel, R. & Mayor, F., Jr. G-protein-coupled receptor kinases. *Kidney international* **49**, 1047-1052 (1996).
- 34 Capote, L. A., Mendez Perez, R. & Lymperopoulos, A. GPCR signaling and cardiac function. *European journal of pharmacology* **763**, 143-148, doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.019 (2015).
- 35 Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* **351 Pt 2**, 289-305 (2000).
- 36 Lymperopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation research* **113**, 739-753, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300308 (2013).
- 37 Vidal, M., Wieland, T., Lohse, M. J. & Lorenz, K. beta-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gbetagamma/Erk-dependent pathway. *Cardiovascular research* **96**, 255-264, doi:10.1093/cvr/cvs249 (2012).
- 38 Seidel, M. G., Klinger, M., Freissmuth, M. & Holler, C. Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**, 25833-25841 (1999).
- 39 Lorenz, K., Rosner, M. R., Brand, T. & Schmitt, J. P. Raf kinase inhibitor protein: lessons of a better way for beta-adrenergic receptor activation in the heart. *The Journal of physiology* **595**, 4073-4087, doi:10.1113/jp274064 (2017).
- 40 Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S. & Wetzker, R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science (New York, N.Y.)* **275**, 394-397 (1997).

- 41 Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134, doi:10.1016/j.cell.2010.06.011 (2010).
- 42 Li, X., Huang, Y., Jiang, J. & Frank, S. J. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular signalling* **20**, 2145-2155, doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.006 (2008).
- 43 Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869 (1997).
- 44 Hancock, J. F. Ras proteins: different signals from different locations. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 373-384, doi:10.1038/nrm1105 (2003).
- 45 Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 827-837, doi:10.1038/nrm1743 (2005).
- 46 Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 875-885, doi:10.1038/nrm1498 (2004).
- 47 Cobb, M. H. MAP kinase pathways. *Progress in biophysics and molecular biology* **71**, 479-500 (1999).
- 48 Robbins, D. J. *et al.* Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5097-5106 (1993).
- 49 Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 726-735 (1995).
- 50 Babu, G. J., Lalli, M. J., Sussman, M. A., Sadoshima, J. & Periasamy, M. 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**, 1447-1457, doi:10.1006/jmcc.2000.1185 (2000).
- 51 Lavour, J. *et al.* 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**, 14448-14458, doi:10.1523/jneurosci.2279-07.2007 (2007).

- 52 Li, T., Liu, Z., Hu, X., Ma, K. & Zhou, C. Involvement of ERK-RSK cascade in phenylephrine-induced phosphorylation of GATA4. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 582-592, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.12.009 (2012).
- 53 Chen, P. *et al.* MicroRNA 543 suppresses breast cancer cell proliferation, blocks cell cycle and induces cell apoptosis via direct targeting of ERK/MAPK. *OncoTargets and therapy* **10**, 1423-1431, doi:10.2147/ott.s118366 (2017).
- 54 Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704-711, doi:10.1038/367704a0 (1994).
- 55 Wilsbacher, J. L. *et al.* Characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dimers. *Biochemistry* **45**, 13175-13182, doi:10.1021/bi061041w (2006).
- 56 Wolf, I. & Seger, R. The mitogen-activated protein kinase signaling cascade: from bench to bedside. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* **4**, 641-647 (2002).
- 57 Prowse, C. N., Deal, M. S. & Lew, J. The complete pathway for catalytic activation of the mitogen-activated protein kinase, ERK2. *The Journal of biological chemistry* **276**, 40817-40823, doi:10.1074/jbc.M105860200 (2001).
- 58 Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* **24**, 21-44, doi:10.1080/02699050500284218 (2006).
- 59 Courcelles, M. *et al.* Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Molecular systems biology* **9**, 669, doi:10.1038/msb.2013.25 (2013).
- 60 Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P. & Graves, B. J. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry* **80**, 437-471, doi:10.1146/annurev.biochem.79.081507.103945 (2011).
- 61 Sugden, P. H. & Clerk, A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **76**, 725-746 (1998).
- 62 McReynolds, A. C. *et al.* Phosphorylation or Mutation of the ERK2 Activation Loop Alters Oligonucleotide Binding. *Biochemistry* **55**, 1909-1917, doi:10.1021/acs.biochem.6b00096 (2016).

- 63 Anjum, R. & Blenis, J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 747-758, doi:10.1038/nrm2509 (2008).
- 64 Marshall, M. S. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 1311-1318 (1995).
- 65 Murphy, L. O. & Blenis, J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences* **31**, 268-275, doi:10.1016/j.tibs.2006.03.009 (2006).
- 66 Owens, D. M. & Keyse, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203-3213, doi:10.1038/sj.onc.1210412 (2007).
- 67 Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K. & Sturgill, T. W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**, 651-653, doi:10.1038/343651a0 (1990).
- 68 Matheny, S. A. *et al.* Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* **427**, 256-260, doi:10.1038/nature02237 (2004).
- 69 Morrison, D. K. & Davis, R. J. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 91-118, doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942 (2003).
- 70 Brown, M. D. & Sacks, D. B. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular signalling* **21**, 462-469, doi:10.1016/j.cellsig.2008.11.013 (2009).
- 71 Luttrell, L. M. *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2449-2454, doi:10.1073/pnas.041604898 (2001).
- 72 Nuber, S. *et al.* beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature* **531**, 661-664, doi:10.1038/nature17198 (2016).

- 73 Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X. & Cantley, L. G. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Molecular cell* **12**, 1275-1285 (2003).
- 74 Fukuda, M., Gotoh, Y. & Nishida, E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO journal* **16**, 1901-1908, doi:10.1093/emboj/16.8.1901 (1997).
- 75 Chuderland, D., Konson, A. & Seger, R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell* **31**, 850-861, doi:10.1016/j.molcel.2008.08.007 (2008).
- 76 Pages, G. *et al.* Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8319-8323 (1993).
- 77 Chen, R. H., Sarnecki, C. & Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology* **12**, 915-927 (1992).
- 78 Rubinfeld, H., Hanoch, T. & Seger, R. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30349-30352 (1999).
- 79 Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. & Nishida, E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology* **2**, 110-116, doi:10.1038/35000065 (2000).
- 80 Wolf, I. *et al.* Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *The Journal of biological chemistry* **276**, 24490-24497, doi:10.1074/jbc.M103352200 (2001).
- 81 Pouyssegur, J., Volmat, V. & Lenormand, P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical pharmacology* **64**, 755-763 (2002).
- 82 Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A. & Seger, R. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology* **314**, 213-220, doi:10.1016/j.mce.2009.04.008 (2010).
- 83 Herrero, A. *et al.* Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer cell* **28**, 170-182, doi:10.1016/j.ccell.2015.07.001 (2015).

- 84 Adachi, M., Fukuda, M. & Nishida, E. 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**, 5347-5358, doi:10.1093/emboj/18.19.5347 (1999).
- 85 Whitehurst, A. W. *et al.* ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7496-7501, doi:10.1073/pnas.112495999 (2002).
- 86 Matsubayashi, Y., Fukuda, M. & Nishida, E. 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**, 41755-41760, doi:10.1074/jbc.M106012200 (2001).
- 87 Mutlak, M. & Kehat, I. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol* **6**, 149, doi:10.3389/fphar.2015.00149 (2015).
- 88 Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P. & Crepaldi, T. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20092164 (2019).
- 89 Plotnikov, A., Chuderland, D., Karamansha, Y., Livnah, O. & Seger, R. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology* **31**, 3515-3530, doi:10.1128/MCB.05424-11 (2011).
- 90 Adachi, M., Fukuda, M. & Nishida, E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *The Journal of cell biology* **148**, 849-856 (2000).
- 91 Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182 (1981).
- 92 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59-74, doi:10.1099/0022-1317-36-1-59 (1977).
- 93 Thieman, W. J. *Biotechnologie*. (Pearson Studium, 2007).
- 94 Buddecke, E. *Molekulare Medizin. Eine systematische Einführung*. (ecomed, 2002).

- 95 Schenborn, E. T. & Goiffon, V. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **130**, 147-153 (2000).
- 96 Kligman, A. M. Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide—Part 1. *The Journal of the American Medical Association* **193**, 551 - 554 (1965).
- 97 Luthman, H. & Magnusson, G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Research* **11**, 1295 - 1308 (1983).
- 98 Kligman, A. M. TOPICAL PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF DIMETHYL SULFOXIDE. 1. *Jama* **193**, 796-804 (1965).
- 99 Luthman, H. & Magnusson, G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic acids research* **11**, 1295-1308 (1983).
- 100 Schägger, H. & Von Jagow, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368 - 379 (1987).
- 101 Schagger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**, 368-379 (1987).
- 102 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 103 Smith, P. K. e. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76 - 85 (1985).
- 104 Kapuscinski, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* **70**, 220-233 (1995).
- 105 Merck, K. *Duolink® PLA Troubleshooting Guide*, <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/duolink-troubleshooting-guide.html>> (2018).
- 106 Homann, S. *Regulation of ERK1/2 signaling by subcellular localization* Master-thesis thesis, University of Würzburg, (2013).
- 107 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytosolic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* **11**, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020).

- 108 Landschulz, W. H., Johnson, P. F. & McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)* **240**, 1759-1764 (1988).
- 109 Penn, L. J., Laufer, E. M. & Land, H. C-MYC: evidence for multiple regulatory functions. *Seminars in cancer biology* **1**, 69-80 (1990).
- 110 Luscher, B. & Eisenman, R. N. New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes & development* **4**, 2025-2035 (1990).
- 111 Amati, B. *et al.* Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* **72**, 233-245 (1993).
- 112 Wang, Z., Ge, L., Wang, M. & Carr, B. I. Phosphorylation regulates Myc expression via prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of cellular physiology* **208**, 133-140, doi:10.1002/jcp.20649 (2006).
- 113 Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science (New York, N.Y.)* **251**, 1211-1217 (1991).
- 114 Luscher, B. & Larsson, L. G. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* **18**, 2955-2966, doi:10.1038/sj.onc.1202750 (1999).
- 115 Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 43-55, doi:10.1016/j.bbamem.2013.04.028 (2014).
- 116 Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **8**, 848-866, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00572.x (2007).
- 117 Brooks, N. A., Pouniotis, D. S., Tang, C. K., Apostolopoulos, V. & Pietersz, G. A. Cell-penetrating peptides: application in vaccine delivery. *Biochimica et biophysica acta* **1805**, 25-34, doi:10.1016/j.bbcan.2009.09.004 (2010).
- 118 A., T. *Das Interface des ERK 1 / 2 Dimers ermöglicht die Strategie einer selektiven Inhibition nukleärer ERK-Funktionen*, (2017).

- 119 Diao, L. & Meibohm, B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clinical pharmacokinetics* **52**, 855-868, doi:10.1007/s40262-013-0079-0 (2013).
- 120 Abdel-Rahman, O., ElHalawani, H. & Ahmed, H. Risk of Selected Cardiovascular Toxicities in Patients With Cancer Treated With MEK Inhibitors: A Comparative Systematic Review and Meta-Analysis. *J Glob Oncol* **1**, 73-82, doi:10.1200/jgo.2015.000802 (2015).
- 121 van Empel, V. P. & De Windt, L. J. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovascular research* **63**, 487-499, doi:10.1016/j.cardiores.2004.02.013 (2004).
- 122 Kidger, A. M. *et al.* Dual-Mechanism ERK1/2 Inhibitors Exploit a Distinct Binding Mode to Block Phosphorylation and Nuclear Accumulation of ERK1/2. *Mol Cancer Ther* **19**, 525-539, doi:10.1158/1535-7163.Mct-19-0505 (2020).
- 123 DeFea, K. A. *et al.* beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* **148**, 1267-1281 (2000).
- 124 Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. 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**, 9429-9436, doi:10.1074/jbc.M106457200 (2002).
- 125 Plotnikov, A. *et al.* The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target. *Nature communications* **6**, 6685, doi:10.1038/ncomms7685 (2015).
- 126 Lorenzen, J. A. *et al.* Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development* **128**, 1403-1414 (2001).
- 127 Casar, B., Pinto, A. & Crespo, P. Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell* **31**, 708-721, doi:10.1016/j.molcel.2008.07.024 (2008).

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Lorenz, K., Schmitt, J.P., Schmitteckert, E.M., Lohse, M.J., 2009. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15(1), 75-83. Lizenz-Nummer: 4363141341575.
- Abb. 2 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. Lizenz-Nummer: 4363140477002.
- Abb. 8 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).
- Abb. 9 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).
- Abb. 10 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 11 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 12 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 13 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 15 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 18 Tomasovic, A. *et al.* Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat Commun* 11, 1733, doi:10.1038/s41467-020-15505-4 (2020). Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.).

Abb. 23 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. Lizenz-Nummer: 4363151495879.

Abb. 24 Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 15, 75-83, doi:10.1038/nm.1893 (2009). Lizenznummer: 4363141341575.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Kristina Lorenz, die mir die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mich dabei unterstützt, motiviert und herausgefordert hat.

Besonders möchte ich mich auch bei Angela Tomasovic für ihre Geduld, ihre ständige Ansprechbarkeit und Unterstützung bei allen Problemen und ihre Hilfe, sowohl bei theoretischen als auch bei praktischen Fragen.

Vielen Dank auch an Martina Fischer, Karina Lamprecht und Nadine Yurdagül-Hemrich für ihre Anleitung beim Lernen der verschiedenen Methoden. Die Arbeit in der Arbeitsgruppe hat wirklich Spaß gemacht

Zudem möchte ich mich auch meiner Familie für ihre Geduld und mentale Unterstützung in den letzten Jahren danken.

Sofia Kramer

Lebenslauf

Sofia Kramer

Geboren: 15. September 1992

Klinische Erfahrung

05/2019 – dato Assistenzärztin in Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg

11/2017 – 10/2018 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Würzburg

1. Tertial: Chirurgie
2. Tertial: Anästhesiologie
3. Tertial: Innere Medizin

Studium

04/2013 – 11/2018 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1. Staatsexamen 03/2014
2. Staatsexamen 10/2017
3. Staatsexamen 11/2018

10/2011 – 03/2013 Studium der Biomedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Promotion

09/2015 - dato Dissertation „Hemmung pathologischer kardialer Hypertrophie über das Dimer-Interface von ERK1/2“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Würzburg bei Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

Kongresse

10/2016 Posterpräsentation im Rahmen der Dissertation bei den DGK Herztagen 2016 (Berlin)

Stipendien

10/2016

Reisestipendium des „Basic-Science-Meetings“ im
Rahmen der DGK Herztage 2016

Schulbildung

09/2003 – 07/2011

Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt, Abitur 07/2011

Fremdsprachen

Englisch

Französisch

Würzburg, 27. Oktober 2020

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Tomasovic A., Brand T., Schanbacher C., Kramer S., Hümmert MW., Godoy P., Schmidt-Heck W., Nordbeck P., Ludwig J., Homann S., Wiegering A., Shaykhutdinov T., Kratz C., Knüchel R., Müller-Hermelink HK., Rosenwald A., Frey N., Eichler J., Dobrev D., El-Armouche A., Hengstler JG., Müller OJ., Hinrichs K., Cuello F., Zerneck A., Lorenz K.: *Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects*
Nat Commun. 2020 Apr 7;11(1):1733. doi: 10.1038/s41467-020-15505-4.

Posterpräsentationen

Tomasovic A., Kramer S., Hümmert M., Gruse T., Katus H, Müller O., Lorenz K.:
The dimer interface of ERK1/2 provides a potential strategy for selective inhibition of nuclear ERK functions.
DGK Herztage 2016, Berlin, 6. – 8. Oktober 2018.