

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Univ.-Professor Dr. med. Martin J. Lohse

**Untersuchung einer monomeren Mutante
der extrazellulär regulierten Kinase 2 (ERK2)
bei kardialer Hypertrophie**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Martin W. Hümmert
aus Hannover

Würzburg, Januar 2017

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Roland Jahns

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2017

Der Promovend ist Arzt.

Für Tatjana

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Herzinsuffizienz	1
1.1.1.	Allgemeines, Definition, klinische Klassifikation und Ätiologie	1
1.1.2.	Pathophysiologie	2
1.1.3.	Therapie	3
1.2.	Der ERK-Signalweg	4
1.2.1.	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.2.2.	Die MAP-Kinasen	5
1.2.3.	JNK und p38 – die Stress-aktivierten Proteinkinasen	5
1.2.4.	ERK1/2 – die Effektorinasen im Raf-MEK-ERK1/2-Signalweg	6
1.2.5.	ERK ^{Thr188} -Autophosphorylierung als Marker für kardiale Hypertrophie	9
1.2.6.	Zelllokalisierung und Oligomerisierungszustand beeinflussen ERK1/2-Signalverhalten	10
1.3.	Hypertrophie von Kardiomyozyten	12
1.4.	Apoptose von Kardiomyozyten	13
1.5.	Kardiale Fibrosierung	16
1.6.	Ziele dieser Arbeit	17
2.	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1.	Materialien	19
2.1.1.	Chemikalien	19
2.1.2.	Puffer und Medien	21
2.1.3.	DNA-Primer	24
2.1.4.	Antikörper	24
2.1.5.	Eukaryotische Zelllinien	24
2.2.	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.	DNA-Isolierung und Genotypisierung	24
2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.3.	Proteinanalytische Methoden	26

2.3.1.	Proteinlysate und BCA-Proteinbestimmung.....	26
2.3.2.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.3.3.	Westernblot und Immundetektion von Proteinen	28
2.4.	Zellkulturtechniken.....	30
2.4.1.	Konstruktion eines adenoviralen Vektors.....	30
2.4.2.	Präparation von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte	30
2.4.3.	[³ H]-Isoleucineinbau in neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	31
2.5.	Physiologische Methoden.....	32
2.5.1.	Generierung transgener Mauslinien	32
2.5.2.	Transversale Aortenligation	33
2.5.3.	Laufgradversuch.....	34
2.5.4.	Echokardiographie.....	35
2.5.5.	Linksherzkatheter mit Dobutamingabe	35
2.5.6.	Ermittlung des Herzgewichtes	36
2.5.7.	Ermittlung der Tibialänge.....	36
2.6.	Histologische Methoden	37
2.6.1.	Anfertigung von Paraffinschnitten des Herzens.....	37
2.6.2.	Sirius-Rot-Färbung	37
2.6.3.	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	38
2.6.4.	Quantifizierung von interstitieller Fibrose.....	38
2.6.5.	Morphometrische Ausmessung von Kardiomyozyten.....	39
2.6.6.	Apoptose-Erfassung mittels TUNEL-Färbung.....	39
2.7.	Statistik.....	41
2.8.	Methoden, die im Rahmen der Infrastruktur der Arbeitsgruppe übernommen wurden	41
3.	ERGEBNISSE.....	43
3.1.	Überexpression von ERK2^{Δ174-177} verringert die Proteinsynthese und pathologische kardiale Hypertrophie	43
3.1.1.	Reduzierte Proteinsynthese <i>in vitro</i>	43
3.1.2.	ERK2 ^{Δ174-177} bewirkt eine Verminderung kardialer Hypertrophie <i>in vivo</i> unter chronischer Druckbelastung.....	44

3.2.	Kardiale Überexpression von ERK2^{Δ174-177} hat keine negativen Auswirkungen auf das kardiale <i>Remodeling</i>	51
3.2.1.	Erhalt der anti-apoptotischen Effekte durch kardiale ERK2 ^{Δ174-177} -Expression.....	51
3.3.	Kardiale Überexpression von ERK2^{Δ174-177} bewirkt keine Verschlechterung der Herzfunktion.....	52
3.3.1.	Keine Unterschiede der kardialen Funktion zwischen den Versuchsgruppen in der Echokardiographie.....	52
3.3.2.	Unterschiede kardialer Funktionsparameter im Linksherzkatheter nur bei transgener Linie 3 unter TAC.....	53
3.4.	Kardiale Überexpression von ERK2^{Δ174-177} stört das physiologische Herzwachstum nicht.....	57
3.4.1.	ERK2 ^{Δ174-177} -Mäuse zeigen nach Laufradtraining das gleiche Ausmaß an kardialer Hypertrophie wie die Wildtyp-Kontrollgruppe...	58
3.4.2.	ERK2 ^{Δ174-177} -Mäuse zeigen nach Laufradtraining keine Unterschiede in der kardialen Funktion in der Echokardiographie im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe.....	62
4.	DISKUSSION.....	63
4.1.	Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in pathologischer kardialer Hypertrophie	63
4.2.	Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in kardialer Apoptose.....	65
4.3.	Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in kardialer Fibrosierung	67
4.4.	Einfluss von ERK2 ^{Δ174-177} auf kardiale Funktionsparameter	69
4.5.	Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in physiologischer kardialer Hypertrophie	71
4.6.	ERK1/2-Signalweg als therapeutischer Angriffspunkt	72
4.6.1.	ERK1/2 als Therapieziel für kardiale Erkrankungen	72
4.6.2.	ERK1/2 als Therapieziel auch in anderen Organsystemen – ein Ausblick	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
6.	LITERATURVERZEICHNIS	78

7.	ERGEBNISÜBERSICHT.....	A
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	B
	DANKSAGUNG.....	D
	LEBENS LAUF.....	E

1. EINLEITUNG

1.1. Herzinsuffizienz

1.1.1. Allgemeines, Definition, klinische Klassifikation und Ätiologie

Das Krankheitsbild Herzinsuffizienz ist eine der führenden chronischen Krankheiten in der westlichen Welt. Nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit, dem akuten Myokardinfarkt und der bösartigen Neubildung der Bronchien und der Lunge nimmt die Herzinsuffizienz in der Todesursachenstatistik 2014 für Deutschland den vierten Platz innerhalb der Gesamtpopulation und den zweiten Platz unter Frauen ein.¹ Die Erkrankung Herzinsuffizienz ist mittlerweile der häufigste Grund für eine Krankenhausaufnahme in Deutschland.^{2, 3} Diese Tatsache wird sich durch den demographischen Wandel hin zu einer alternden Gesellschaft weiter verschärfen. Entsprechend wichtig erscheint die Suche nach neuen Therapieansätzen, um der Krankheit angemessen zu begegnen.

Die etablierteste Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgt nach der *New York Heart Association* (NYHA) anhand der Leistungsfähigkeit und Symptomatik der Patienten in vier Schweregrade.⁴ Patienten mit einer Herzinsuffizienz der NYHA Klasse IV weisen nach Daten aus den Plazebogruppen großer älterer Studien („CONSENSUS“, „Minnesota Heart“ und „SOLVD-Treatment/-Prevention“) eine Überlebensrate von nur 10% nach einem Jahr auf.⁵ So verwundert es nicht, dass dieses Krankheitsbild mit einer wesentlich höheren Sterblichkeit als viele maligne Tumorerkrankungen einhergeht.⁶

Herzinsuffizienz ist ein syndromaler Begriff. Ätiologisch stehen dahinter viele verschiedene Krankheitsentitäten, die in Summe oder als Einzelerkrankung zu einem Missverhältnis zwischen der vom Herzen bereitgestellten und der vom Organismus benötigten Sauerstoffversorgung führt. Als häufigste Auslöser sind die koronare Herzkrankheit und der Zustand nach einem durchgemachten Myokardinfarkt sowie die Volkskrankheit Bluthochdruck zu nennen. Weitere Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind unter anderem Kardiomyopathien und Herzklappenerkrankungen.

1.1.2. Pathophysiologie

Zu Beginn einer Herzinsuffizienz steht ein myokardialer Schaden, der durch Druck- bzw. Volumenbelastung oder Gewebeverlust hervorgerufen wird.⁴ Daraus resultiert eine zunehmende kardiale Dysfunktion, die mit einer verringerten kardialen Auswurfleistung einhergeht. Um die Herzleistung vorübergehend aufrechtzuerhalten kommt es als Kompensationsversuch zur neurohumoralen Aktivierung, also der Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dies wiederum ist mit einer gesteigerten Salz-Wasser-Retention vergesellschaftet. Folglich führt dies längerfristig zu einer Volumenüberladung des Organismus, die zur Verschlimmerung des Krankheitsbildes beiträgt (**Abb. 1**).

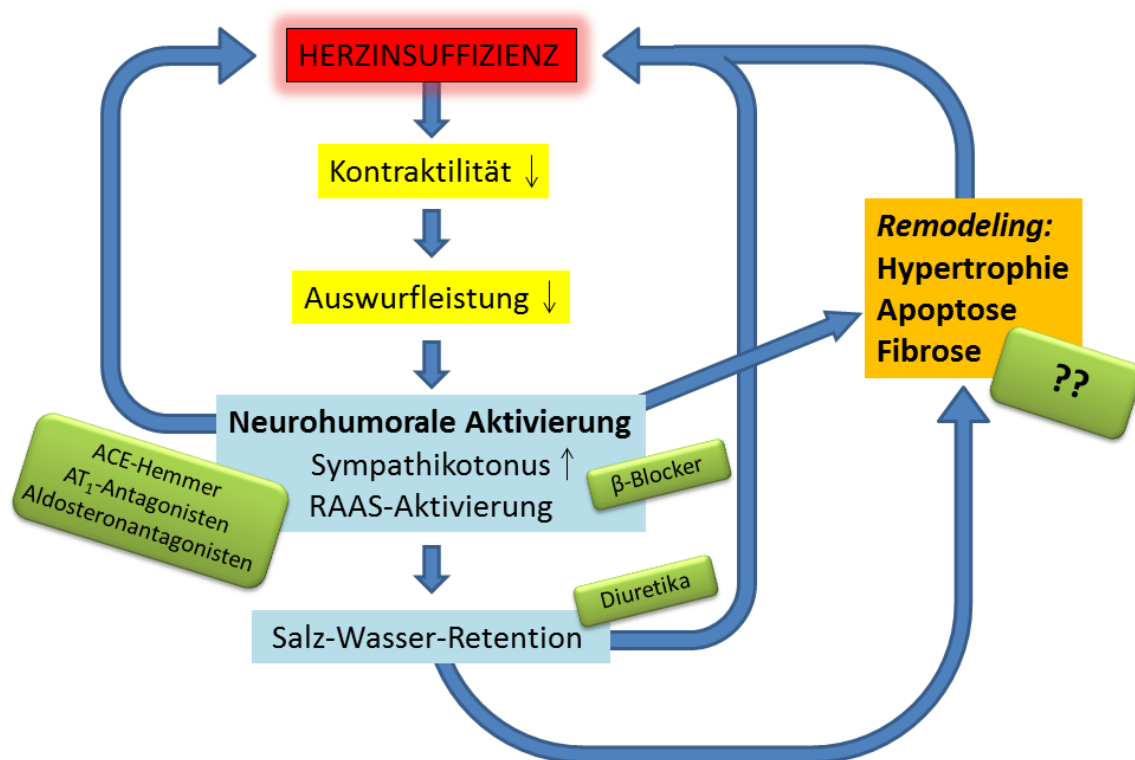


Abb. 1: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz

Die mit der Herzinsuffizienz einhergehende oder sie verursachende verminderte kardiale Kontraktilität und Auswurfleistung führt zur neurohumoralen Aktivierung mit Salz-Wasser-Retention. Dies verschlimmert ebenso wie die daraus resultierenden morphologischen kardialen Veränderungen (*Remodeling*) das Krankheitsbild. Eine therapeutische Blockade der neurohumoralen Aktivierung und Volumenüberlastung ist möglich (aktuell eingesetzte Medikamentenklassen siehe abgerundete Kästen).

Morphologisch spielen bei der Pathogenese der Insuffizienz des Herzmuskels vor allem drei Faktoren eine entscheidende Rolle: Hypertrophie, Apoptose und Fibrosierung von kardialem Gewebe.⁷⁻⁹ Diese Einflussgrößen des Myokardumbaus, die als universelle Anpassungsvorgänge bei Schädigung oder Überlastung des Herzens zu betrachten sind, werden synoptisch mit dem Begriff kardiales *Remodeling* beschrieben.¹⁰ Kardiale Hypertrophie, welche kurzfristig dazu dient die verlorene kontraktile Kapazität zu kompensieren, führt langfristig über Fibroseeinlagerung und Myozytenuntergang zu einer Verschlechterung der systolischen und diastolischen Funktion und damit zur Progression der Herzinsuffizienz. Ziel fast jeder pharmakologischen Therapie der Herzinsuffizienz ist letztlich die indirekte Verhinderung dieser pathologischen kardialen Umbauprozesse.¹¹

1.1.3. Therapie

Mittlerweile weisen eine Fülle an hochrangig publizierten randomisiert kontrollierten Studien und Metaanalysen die signifikante Reduktion von Morbidität und Mortalität durch ACE-Hemmer, einige Betablocker und Aldosteron-Antagonisten bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach.¹²⁻¹⁹ In den 70er Jahren wurde für den bis dahin bei Herzinsuffizienz als kontraindiziert angesehenen Einsatz von Betablockern eine Verbesserung der Herzfunktion festgestellt, die auf die Blockade der schädlichen β_1 -Effekte und die Resensibilisierung des kardialen β -Rezeptoren-Systems zurückgeführt wurde.²⁰ ²¹ Aktuell wird in der medikamentösen Therapie der chronischen systolischen Herzinsuffizienz ein an die NYHA-Stadien adaptiertes Stufenschema angewendet.^{4, 22} Je nach Schweregrad der Herzinsuffizienz und begleitender Symptome erfolgt eine Kombinationstherapie aus ACE-Hemmern (alternativ AT_1 -Rezeptor-Antagonisten), β -Blockern, Diuretika und Aldosteron-Antagonisten sowie bei spezifischen Indikationen Ivabradin, Herzglykosiden und Vasodilatoren.²³

Das derzeitige Therapiekonzept der Herzinsuffizienz zielt neben symptomatischer Besserung insbesondere auf die Minderung der neurohumoralen Aktivierung und deren unmittelbare Folgen ab und

verlangsamt dadurch auch das kardiale *Remodeling*.²⁴⁻²⁶ Ein direkter pharmakologischer Eingriff in die zellulären und molekularen Mechanismen des kardialen *Remodelings*, der den *Circulus vitiosus* der zunehmenden kardialen Destabilisierung durch Hypertrophie, Apoptose und interstitieller Fibrosierung im Herzen durchbricht, ist bisher jedoch nicht verfügbar (**Abb. 1**). Die vorliegende Arbeit möchte im Folgenden einen möglichen neuen Ansatzpunkt in diese Richtung aufzeigen.

1.2. Der ERK-Signalweg

1.2.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen mit über 800 Genorten die größte und im menschlichen Körper ubiquitär exprimierte Familie von Zelloberflächenproteinen dar.²⁷ Ihre Bedeutung wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass sie in ca. 50-60% aller Medikamente direkt oder indirekt an deren Wirkung beteiligt sind.²⁸ GPCR sind aus einem sieben transmembranären α -Helices umfassenden Rezeptorprotein aufgebaut, welches nach Agonistenbindung mit einem für die Signaltransduktion verantwortlichen Guaninnukleotid-bindenden-Protein (G-Protein) interagiert. Letzteres setzt sich aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammen. Nach Bindung eines extrazellulären Liganden wird am heterotrimeren G-Protein der Austausch von GDP mit GTP an der α -Untereinheit induziert. Dadurch wird das G-Protein aktiviert, dissoziiert in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit oder die Untereinheiten lagern sich um.²⁹⁻³¹ In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der α -Untereinheit werden unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt und G-Proteine unterschiedlich bezeichnet: G_q , G_s , G_i und $G_{12/13}$.^{32, 33} GPCR spielen im Herzen eine bedeutende Rolle in der Signalverarbeitung. So führt die adrenerge Stimulation G_s -gekoppelter Adrenorezeptoren zur Erhöhung der Herzfrequenz, wohingegen G_i -gekoppelte Acetylcholinrezeptoren nach Aktivierung mit einer negativ chronotropen Wirkung einhergehen.³⁴ Neben dieser funktionellen Signalvermittlung können im Herzen sowohl G_q - als auch G_s -gekoppelte Adrenorezeptoren kardiale Hypertrophie induzieren.³⁵⁻³⁷ Die Vermittlung von Herzwachstum über GPCR ist für verschiedene miteinander interagierende

Signalwege beschrieben. Zu nennen sind insbesondere die Signalwege über Calcineurin und Calmodulin sowie Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K).³⁸⁻⁴² Eine wesentliche Signalstrecke von GPCR für kardiale Hypertrophie stellt darüber hinaus die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase Kaskade dar.⁴³

1.2.2. Die MAP-Kinasen

MAP-Kinasen gehören zu einer hochkonservierten Familie von Serin-Threonin-Proteinkinasen.⁴⁴ Sie regulieren eine Vielzahl von physiologischen Zellfunktionen, darunter die Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose.⁴⁵ Die drei bisher am besten untersuchten MAP-Kinasen sind die extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK1-3) und p38 (α , β , γ und δ).⁴⁶ Die Sequenzhomologie dieser Kinasen beträgt etwa 40-45%.⁴⁷ Diese MAP-Kinasen werden durch duale Phosphorylierung an einem Threonin und Tyrosin enthaltendem Motiv, das die Aminosäure Glutaminsäure, Prolin oder Glycin umschließt, aktiviert (TXY-Motiv). Die mittlere Aminosäure bestimmt die Zugehörigkeit zur MAP-Kinasen-Subfamilie.⁴⁸ Mittlerweile sind weitere ERK-Subfamilien bekannt: ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7 und ERK8.^{49, 50} Allen MAP-Kinase-Kaskaden gemein ist, dass sie aus drei Proteinkinasen bestehen, die in Serie geschaltet ihr Substrat phosphorylieren und aktivieren. Neben ihrem ubiquitären Vorkommen in sämtlichen Körperzelltypen, spielen sie eine entscheidende Rolle in der Anpassungsfähigkeit von Kardiomyozyten auf externe Stimuli.

1.2.3. JNK und p38 – die Stress-aktivierten Proteinkinasen

Die MAP-Kinasen JNK und p38 werden vor allem durch zelluläre Stresssignale aktiviert. Dazu gehören hyperosmotischer Schock, Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorische Zytokine.^{46, 48} Das wahrscheinlich stärkste Stress- und Aktivierungssignal ist die Ischämie beziehungsweise die Reperfusion des Herzens nach Ischämie, die bei koronarer Herzkrankheit oder Myokardinfarkt auftritt.⁵¹ So wird den MAP-Kinasen JNK und p38 eine Beteiligung an dem sich daran anschließenden kardialen *Remodeling* zugeschrieben: JNK hat in Abhängigkeit der vorgeschalteten Signale eine positiv wie negativ modulierende Wirkung auf das

kardiale *Remodeling*, p38 führt über Zytokinfreisetzung aus dem Kardiomyozyten zu interstitieller Fibrosierung.^{45, 52, 53}

1.2.4. ERK1/2 – die Effektorinasen im Raf-MEK-ERK1/2-Signalweg

Die MAP-Kinasen ERK1/2 fungieren in der Raf-MEK-ERK1/2-Signaltransduktionskaskade als Übermittler extrazellulärer Stimuli auf zelluläre und nukleäre Zielproteine.⁵⁴ Dieser Signalweg gehört zu einem der am intensivsten untersuchten in der Zellbiologie. Die weitreichende Bedeutung dieser MAP-Kinasen zeigt z. B. die embryonale Letalität von ERK2-deletierten Mäusen.^{55, 56} Trotz der 90% Sequenzhomologie zwischen ERK1 und ERK2⁵⁷ und ihrer weitgehenden Übereinstimmung in vorgeschalteten Aktivierungswegen und nachgeschalteten Zielstrukturen bestehen vereinzelte Unterschiede in ihrer Funktion. Anhand der bereits erwähnten Gen-Knockout-Experimente, bei welchen gezeigt werden konnte, dass ERK1^{-/-}-Mäuse einen weitgehend normalen Phänotyp entwickeln, wohingegen ERK2^{-/-}-Mäuse im Embryonalstadium versterben^{55, 56, 58}, wird deutlich, dass ERK1 nicht sämtliche Funktionen von ERK2 kompensieren kann. Ebenso gilt dies für ERK2, das nicht fähig ist die mangelnde Thymusreifung bei ERK1-defizienten Mäusen auszugleichen.⁵⁹ Ursächlich für diese Unterschiede könnte eine zusätzliche N-terminale Domäne von ERK1 sein, die dessen nukleäre Translokation und dortige Aktivität im Vergleich zu ERK2 ausbremst.⁶⁰

Die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges ist über zahlreiche extra- und intrazelluläre Reize möglich. Wie in **Abb. 2** dargestellt, erfolgt in Kardiomyozyten insbesondere über die Aktivierung von GPCRs (mögliche Liganden: Angiotensin II, Endothelin-1, adrenerge Stimuli) sowie Rezeptortyrosinkinasen (mögliche Liganden: Insulin-like growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor)⁶¹ abhängig oder auch unabhängig von der GTPase Ras die Stimulation der Kinase Raf.⁶² Diese liegt in verschiedenen Isoformen vor: Raf-1, A-Raf oder B-Raf. Die verschiedenen Raf-Isoformen phosphorylieren und aktivieren dadurch die mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-1/2 (MEK1/2).⁶³ MEK1/2 wiederum phosphorylieren ERK1/2 an Tyrosin und Threonin. Bei ERK2 von Mäusen findet dies an Tyrosin 185 (Tyr185) und

Threonin 183 (Thr183) statt^{64, 65}, der sogenannten TEY-Motiv-Sequenz. Die Tyr185-Phosphorylierung ist auch durch Autophosphorylierung von ERK2 möglich.⁶⁶ Erst die duale Phosphorylierung erlaubt die maximale Aktivierung zellulärer (z.B. p90 ribosomal S6 kinase) und nukleärer (z.B. Transkriptionsfaktoren Elk-1 und c-Myc) Substrate.⁶²

Die wesentliche Funktion dieser Signalübertragung im adulten Kardiomyozyten besteht in der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellüberleben und kardialem *Remodeling*. Details hierzu werden in den nachfolgenden Abschnitten besprochen.

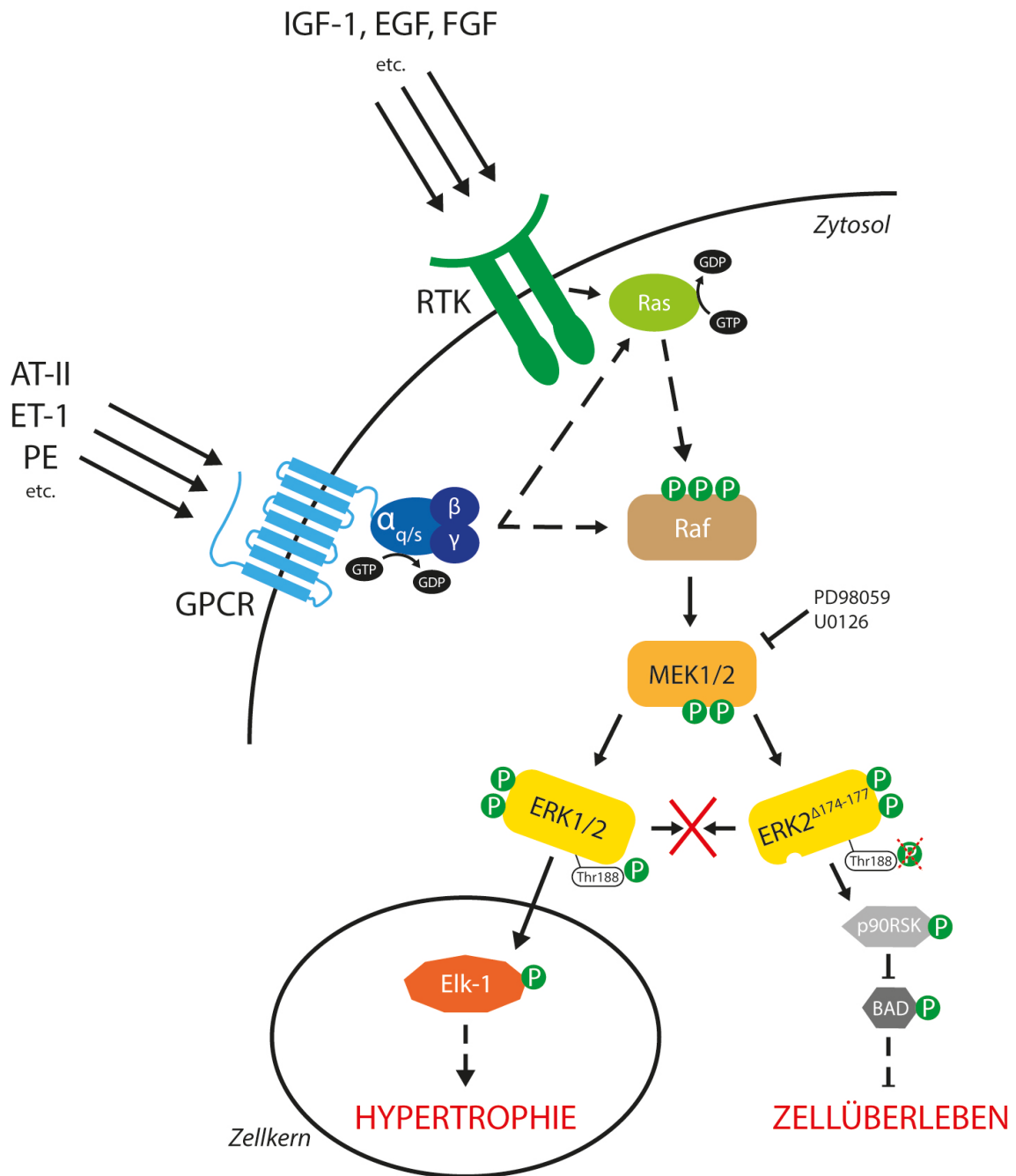


Abb. 2: Schematische Darstellung des ERK1/2-Signalweges in Kardiomyozyten

Durch extrazelluläre Stimuli erfolgt die Aktivierung von G_q- oder G_s-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Die nachfolgende aktivierende Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kaskade über Raf, MEK1/2 und ERK1/2 führt zur Aktivierung von ERK1/2. Im Gegensatz zu ERK1/2 besteht an dimerisierungsdefizientem ERK2 Δ 174-177 keine Möglichkeit der Threonin188-Phosphorylierung. ERK1/2 phosphorylieren im Zellkern Transkriptionsfaktoren, die in Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie stehen, exemplarisch für Elk-1 gezeigt, und im Zytosol Proteine, die zur Inaktivierung von proapoptischen Proteinen führen, hier am Beispiel der Inhibition des proapoptischen BAD-Proteins durch p90RSK gezeigt. Genaueres hierzu in den entsprechenden Textabschnitten. MEK1/2 kann durch die spezifischen Inhibitoren PD98059 und U0126 gehemmt werden.

(Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis)

1.2.5. ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung als Marker für kardiale Hypertrophie

Unsere Arbeitsgruppe deckte auf, dass die Aktivierung von ERK2 durch G_q- und G_s-Proteine neben der klassischen Phosphorylierung an Tyr185 und Thr183 zusätzlich eine Autophosphorylierung an Threonin 188 (Thr188) vermittelt (ERK1 an Thr208), die mit einer Translokation von ERK in den Zellkern assoziiert ist.^{67, 68} Die ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung erfordert dabei verschiedene molekulare Ereignisse. Neben der Aktivierung von ERK2 durch MEK mittels Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185 und Bindung der Gβγ-Untereinheit des aktivierenden G_q- oder G_s-Proteins ist die Dimerisierung von ERK1/2 notwendig.⁶⁷ Weiter konnten *Lorenz et al.* nachweisen, dass die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung kausal mit kardialer Hypertrophie in Verbindung steht: Durch Überexpressionsexperimente mit transgenen ERK2-Mutanten ließ sich durch chronische Druckbelastung des Herzens in Mäusen ein vermindertes Ausmaß kardialer Hypertrophie bei zwei Threonin188-Phosphorylierungsdefizienten Mutanten gegenüber Wildtyp-ERK2 oder Überexpression von Wildtyp-ERK2 (ERK2^{T188T}) nachweisen. Bei diesen phosphorylierungsdefizienten Mutanten wurde Threonin durch Alanin bzw. Serin ersetzt (ERK2^{T188A} bzw. ERK2^{T188S}), sodass eine Phosphorylierung an Aminosäure 188 nicht mehr erfolgte. Dahingegen führte die Phosphorylierungs-imitierende Mutante ERK2^{T188D} (Austausch von Threonin gegen Asparaginsäure) zu einem sehr deutlichen Anstieg der Hypertrophie unter chronischer Druckbelastung (**Abb. 3**).

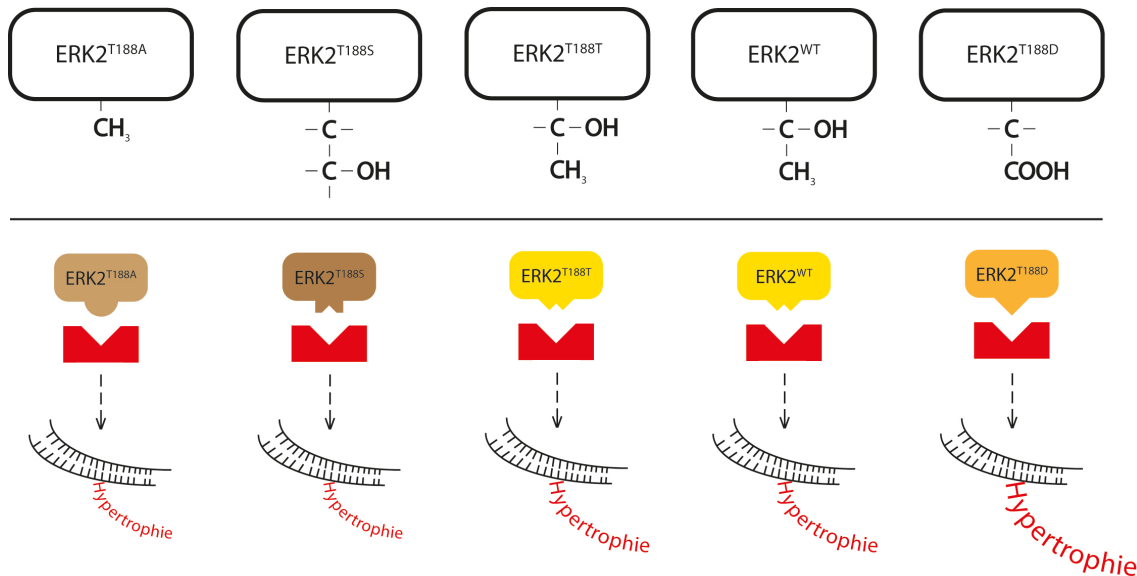


Abb. 3: Schematische Darstellung der Induktion kardialer Hypertrophie unter chronischer Druckbelastung in Abhängigkeit von Wildtyp-ERK2 und der Überexpression verschiedener ERK2-Mutanten

Der obere Abschnitt zeigt die Aminosäure-Modifikationen verschiedener ERK2-Mutanten an Stelle 188 bzw. Wildtyp-ERK2. Im unteren Abschnitt ist eine hypothetische Konformationsänderung dieser Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Mutante (T188T) bzw. Wildtyp-ERK2 und die damit unterschiedlichen Einflüsse auf das Expressionsverhalten für Hypertrophie vereinfacht dargestellt.

1.2.6. Zelllokalisierung und Oligomerisierungszustand beeinflussen

ERK1/2-Signalverhalten

ERK1/2 sind in zahlreichen Kompartimenten jeder Körperzelle verteilt. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass für die verschiedenen Stimuli, die ERK1/2 aktivieren, weitere Proteine sowie eine subzelluläre Kompartimentalisierung zur Koordination und Einleitung spezifischer Effekte notwendig sind. Dazu gehören als interagierende Proteine wirkende Strukturen wie KSR (*kinase suppressor of raf*), MP-1 (*MEK partner-1*), SEF (*similar expression to FGF*) und β -Arrestine⁶⁹, aber auch Protein-Phosphatasen, die als Regulatorproteine die Signalamplitude, Signaldauer und räumliche Lokalisation von ERK1/2 kontrollieren.⁴⁶ Folgende Interaktionspartner halten ERK1/2 im Zytoplasma: durch KSR werden ERK1/2 in der Nähe der Plasmamembran gehalten⁷⁰, durch MP-1 oder β -Arrestine in Endosomen^{71, 72} und durch SEF am Golgi-Apparat⁷³. Es könnte daher sein, dass die zelluläre Lokalisation von ERK1/2 eine wesentliche Rolle spielt, um spezifische Antwortmechanismen auf externe Stimuli in Gang zu setzen. So ist die Zellprotektion durch ERK1/2 vornehmlich an zytoplasmatisch-mitochondriale Signalprozesse geknüpft⁷⁴, wohingegen eine

nukleäre Translokation von ERK1/2 diesem Zugang zu Transkriptionsfaktoren verschafft, die beispielsweise in die Proteinsynthese und damit in Hypertrophieprozesse involviert sind⁷⁵ (**Abb. 2**). Mithilfe von dimerisierungsdefizienten Mutanten von ERK2 konnten *Khokhlatchev et al.* nachweisen, dass die Dimerisierung für die Translokation von ERK1/2 in den Kern wichtig ist.⁷⁶ Für die Versuche dieser Forschungsgruppe wurde eine ERK2 Mutante konstruiert, bei welcher an den Stellen 174 bis 177 die Aminosäuren Prolin, Asparaginsäure, Histidin und Asparaginsäure deletiert wurden. Diese sogenannte ERK2^{Δ174-177}-Mutante (auch genannt ERK2^{Δ4}) weist trotz Störung der ERK-Dimerisierung ähnliche Enzymaktivität auf und wird von MEK1/2 weiterhin wie Wildtyp-ERK2 als Substrat erkannt und phosphoryliert.^{47, 76} *In vitro* Ergebnisse ergaben deutliche Hinweise darauf, dass diese Mutante kein Gβγ binden und damit auch nicht an ERK^{Thr188} phosphoryliert werden kann (**Abb. 4**).⁶⁷

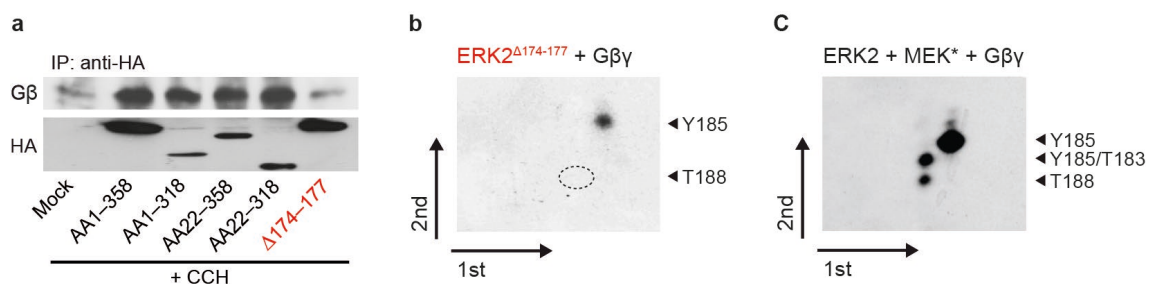


Abb. 4: Co-Immunopräzipitation und zweidimensionale Auftrennung der Phosphopeptide von ERK2

Die dimerisierungsdefiziente Mutante ERK2^{Δ174-177} bindet weder Gβγ (**a**, Co-Immunopräzipitation) noch ist sie in der Lage eine ERK^{Thr188}-Phosphorylierung (T188) zu induzieren (**b**, Phosphopeptid-Auftrennung). Im Vergleich dazu lässt sich an Wildtyp-ERK2 durch Zugabe von MEK* (aktiviertes aufgereinigtes MEK) und Gβγ-Untereinheiten neben der Phosphorylierung an der TEY-Sequenz (Y185/T183) und singularär an Tyr185 (Y185) eine Phosphorylierung an Thr188 (T188) nachweisen. Nicht gezeigt: Alleinige Gabe von Gβγ zu Wildtyp-ERK2 analog zu **b** führt zu Phosphorylierung an Y185 und T188.

(Graphiken modifiziert nach *Lorenz et al., 2009*)

Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Inhibition der ERK-Dimerisierung über eine Hemmung der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung ähnlich wie bei den oben beschriebenen ERK2^{T188A} und ERK2^{T188S}-Mutanten Hypertrophie vermindern kann.

1.3. Hypertrophie von Kardiomyozyten

Als einer der entscheidenden ätiologischen Faktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist die pathologische Hypertrophie des Herzmuskels zu nennen. Während der embryonalen und frühen neonatalen Entwicklung resultiert das Wachstum des Herzens aus der Zunahme von Zellen, der sogenannten Hyperplasie. Bereits früh nach Geburt verlieren Kardiomyozyten ihre Fähigkeit zur Zellteilung, womit weiteres Herzwachstum fortan durch myokardiale Hypertrophie gekennzeichnet ist.⁷⁷ Darunter versteht man die Volumenzunahme eines einzelnen Kardiomyozyten unter Vermehrung insbesondere der kontraktilen Proteine. Kardiale Hypertrophie ist als Anpassungsvorgang zum Ausgleich erhöhter hämodynamischer Belastung anzusehen. Hierbei muss man zwischen zwei Formen der Hypertrophie unterscheiden - der pathologischen und der physiologischen Hypertrophie. Körperliche Arbeit, Schwangerschaft und postnatale Anpassungsprozesse gehen mit physiologischem Wachstum der Kardiomyozyten einher, was zu einer verbesserten Dehnbarkeit des Herzmuskels führt.⁷⁸ Pathologische Hypertrophie hingegen ist ein Resultat unphysiologischer Überanstrengung des Herzens. Hierzu zählen vor allem Bluthochdruck, die neurohumorale Aktivierung und Defekte am Myokard.⁷⁹ Problematisch hierbei ist, dass eine zu Beginn als Kompensationsmechanismus wirkende Hypertrophie des Herzens bei fortschreitender Hypertrophie mit reduzierter Kontraktilität, zunehmender Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien und plötzlichem Herztod vergesellschaftet ist.⁸⁰⁻⁸² So führt die Überschreitung des kritischen Herzgewichts von circa 500 Gramm zu einer relativen Koronarinsuffizienz und einer zunehmenden klinischen Verschlechterung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass physiologische Hypertrophie mit einer verbesserten kardialen Funktion einhergeht, wohingegen bei pathologischer Hypertrophie nach anfänglicher Wiederherstellung des kardialen Funktionszustandes langfristig Umbauvorgänge im Herzen stattfinden, die zur kardialen Dekompensation führen.

Die Rolle von ERK1/2 in kardialer Hypertrophie

Zahlreiche *in vitro* Ergebnisse weisen darauf hin, dass ERK eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie spielt.^{75, 83, 84} *Bueno et al.* konnten mithilfe transgener Mäuse, die eine aktivierte Form der ERK-aktivierenden Proteinkinase MEK1 herzspezifisch überexprimierten, erstmals *in vivo* zeigen, dass die Aktivierung von ERK1/2 signifikant mit kardialer Hypertrophie assoziiert ist.⁸⁵ Nachweise für den Zusammenhang zwischen dem ERK-Signalweg und kardialer Hypertrophie finden sich mittlerweile auf verschiedenen Ebenen: So bewirkt die Stimulation kultivierter neonataler Kardiomyozyten mit Hypertrophie-induzierenden Agonisten wie Phenylephrin und Endothelin-1 die Aktivierung von ERK1/2.^{86, 87} An Meerschweinchen mit chronischer Druckbelastung durch Aortenligation bestätigte sich diese ERK1/2-Aktivierung unter hypertrophen Stimuli auch *in vivo*.⁸⁸ Durch Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 setzt das ERK-Protein die Translation von Proteinen und damit das Wachstum von Kardiomyozyten in Gang.⁷⁵ Dieses kann durch selektive Blockade des MEK1-ERK1/2-Signalweges durch dessen spezifischen Inhibitor U0126 verhindert werden (**Abb. 2**).⁸⁹ Ebenso wurde durch Herabregulation der ERK1/2-Expression deren Bedeutung für kardiale Hypertrophieprozesse untermauert.⁸⁴ Darüber hinaus geht die Expression des Herzinsuffizienzmarkers BNP (*brain natriuretic peptide*) mit der Aktivierung von ERK einher und wird durch den MEK-Inhibitor PD98059 gehemmt.⁹⁰ Anhand von Untersuchungen an menschlichen Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz wurde zudem eine verstärkte Aktivierung von ERK im Vergleich zu kompensiert hypertrophierten und normalen Herzen festgestellt.⁹¹ Diese Erkenntnis weist darauf hin, dass es sich bei der durch ERK1/2 induzierten Hypertrophie im Wesentlichen um pathologische Hypertrophie handelt.

1.4. Apoptose von Kardiomyozyten

Aktuell sind drei verschiedene Mechanismen des Zelltodes im Herzen bekannt: Apoptose, Nekrose und Autophagie.⁹²⁻⁹⁵ Handelt es sich bei Nekrose um einen Zellzerfallsprozess, welcher weitgehend unkontrolliert und potentiell schädlich für das Umgebungsgewebe verläuft, so unterscheidet sich die Apoptose davon

morphologisch, biochemisch sowie durch ihren regulierten Ablauf hin zum Zelltod. Deshalb wird Apoptose häufig als programmierter Zelltod bezeichnet, der für das umgebende Gewebe schonender abläuft. Apoptose ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, der von zwei Signalwegen eingeleitet werden kann: dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg.⁹⁶ Beide enden in der Aktivierung von Caspasen, Cystein-Proteasen, die den Apoptoseprozess durch Spaltung zellulärer Polypeptide wesentlich vorantreiben.⁹⁷ Der extrinsische Signalweg baut auf die externe Stimulation durch einen spezialisierten Liganden auf, entweder in Form eines Zellgekoppelten Liganden, wie Fas, oder in Form eines löslichen Proteins, wie TNF- α . Diese Stimulation bewirkt eine Aktivierung von Procaspase-8.⁹⁸ Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs kann über zahlreiche verschiedene Stimuli eingeleitet werden, wie Strahlung, oxidativer Stress oder DNA-Schäden. Über Proteine der Bcl-2-Familie führt dies zur mitochondrialen Membrandestabilisierung und damit unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom C, was die Aktivierung von Procaspase-9 bewirkt.⁹⁶ Ab hier verlaufen der extrinsische und intrinsische Signalweg nach gleichem Muster weiter: Die Aktivierung der Effektor-Caspasen 1, 6 und 7 führen zu zahlreichen, die Apoptose beschreibenden, molekularen und morphologischen Veränderungen, insbesondere zur Spaltung zellulärer Proteine, DNA und RNA, sowie zur Chromatinkondensation und Kernfragmentierung.^{96, 99}

Apoptose ist ein physiologischer Beitrag zu Proliferation, Differenzierung und Entwicklung eines Organismus. Ein Zuviel oder Zuwenig an Apoptose kann jedoch zu Pathologien führen. Der Verlust an Kardiomyozyten bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist einer der entscheidenden Schritte beim Übergang einer kompensierten in eine dekompensierte linksventrikuläre Hypertrophie.^{8, 100, 101} Bis in die 90er Jahre war der genaue Mechanismus des Kardiomyozytenverlustes noch recht unklar. Heute nimmt man anhand von einer Reihe experimenteller Daten an, dass der Kardiomyozytenuntergang vor allem auf eine signifikant erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz.¹⁰²⁻¹⁰⁴ In G_q-überexprimierenden transgenen Mäusen mit daraus resultierender peripartaler Kardiomyopathie

konnte durch Verminderung der Apoptose in Kardiomyozyten mittels Caspase-Inhibition eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und eine geringere Mortalität gezeigt werden.¹⁰⁵ Dies ist ein Hinweis dafür, dass Apoptose an kardialer Dysfunktion beteiligt ist und eine ursächliche Rolle in der Pathogenese von Herzinsuffizienz einnimmt.

Die Rolle von ERK1/2 in kardialer Apoptose

Eines der an der Regulation der Apoptose beteiligten Proteine ist das ERK1/2-Protein. Ihm wird eine wichtige kardioprotektive Rolle zugeschrieben.¹⁰⁶ Dabei zeigt ERK insbesondere anti-apoptotische Effekte in Zusammenhang mit oxidativem Stress, als auch nach Stimulation durch diverse Signalmoleküle wie IGF-1, Cardiotrophin 1 oder Phenylephrin.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Die genauen Vorgänge der Beteiligung von ERK1/2 am zellprotektiven Geschehen auf kardialer Ebene sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Man weiß jedoch inzwischen, dass ERK1/2 über zytoplasmatische Phosphorylierung der p90RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*) diese aktiviert, wodurch das pro-apoptotische BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) phosphoryliert, dadurch inhibiert und somit letztlich die Zellapoptose indirekt verhindert wird (**Abb. 2**).¹¹¹⁻¹¹³ Ähnlich wird BAD auch durch die Bildung eines Komplexes aus Proteinkinase C ϵ und ERK im Mitochondrium inaktivierend phosphoryliert.⁷⁴ Darüber hinaus wirkt ERK1/2 auch direkt anti-apoptotisch durch Inhibition von Caspase-9,^{114, 115} oder durch Verhinderung der Wechselwirkung zwischen den apoptosefördernden Proteinen BIM (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) und BAX (*Bcl-2 associated X protein*).

Umgekehrt ist jedoch aus Zellexperimenten bekannt, dass ERK1/2 unabhängig oder abhängig von p53, dem bekanntesten Protein im Zusammenhang mit Apoptose, nach DNA-Schäden die Apoptose einleiten kann.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Wann dieser oder der anti-apoptotische Mechanismus von ERK1/2 überwiegt ist bisher unklar, zumal die pro-apoptotische Wirkung von ERK1/2 bisher *in vivo* noch nicht bestätigt wurde.

1.5. Kardiale Fibrosierung

Ein entscheidender Parameter zur Unterscheidung der physiologischen von der pathologischen Hypertrophie ist das Ausmaß an Fibrose des Herzmuskels. Interstitielle und perivaskuläre Fibrosierung des Herzens geht in erster Linie auf die verstärkte Synthese von Kollagenfasern durch proliferierende kardiale Fibroblasten zurück.¹¹⁹ Als zentraler Botenstoff wirkt hierbei die Stimulation durch Aldosteron.^{119, 120} Zudem kann eine sympathische Überaktivierung kardiale Fibrose durch Induktion von Matrix-Metalloproteasen auslösen.¹²¹ Dient Fibrose anfangs zur Reparatur von geschädigtem Myokard, so begünstigt sie langfristig die Krankheitsprogression durch ventrikuläre Wandversteifung, die mit verminderter myokardialer Funktionalität einhergeht.^{122, 123} Darüber hinaus hat die Fibrose des Herzens eine entscheidende Bedeutung für das gehäufte Auftreten von Arrhythmien.¹²⁴ Die durch Fibrose verursachten morphologischen Veränderungen gehen mit elektrophysiologischen Veränderungen des Herzens einher. Kollagenfasern und Myofibroblasten bewirken eine elektrische Isolation und reduzieren elektrische Zell-Zell-Verbindungswege der Kardiomyozyten.^{9, 125} Dies bedingt veränderte Leitungseigenschaften des Herzens, die zu einer gesteigerten elektrophysiologischen Vulnerabilität des Myokards mit der Gefahr zu kreisenden Erregungen führen.¹²⁵

Rolle von ERK1/2 in kardialer Fibrosierung

Trotz des entscheidenden Beitrages der Fibrosierung zu kardialer Dysfunktion ist über die genauen Signalwege, die zu Fibrose führen, wenig bekannt. In der Literatur finden sich mittlerweile jedoch vereinzelt konkrete *in vitro*-Hinweise zur Beteiligung von ERK1/2 an kardialer Fibrosierung. So ist die Expression von Prokollagen Typ I im Rahmen von mechanischer Belastung in kardialen Fibroblasten auf die Aktivierung von ERK1/2 angewiesen.¹²⁶ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die durch Hyperglykämie hervorgerufene Synthese von Kollagen Typ I und III von der ERK1/2-Aktivität abhängt.^{127, 128} Zudem scheint der Calciumkanalblocker Nifedipin anti-fibrotische Effekte über die Verminderung der ERK1/2-Phosphorylierung zu vermitteln.¹²⁹ Ein Nachweis über den Einfluss von ERK1/2 auf kardiale Fibrose im lebenden Organismus steht bisher aus.

Ein indirekter Zusammenhang von ERK1/2 und kardialer Fibrose besteht ferner über deren Beteiligung am apoptotischen Geschehen. So korreliert das Ausmaß an Apoptose mit dem der Fibrose.^{130, 131} Apoptotische Kardiomyozyten werden möglicherweise durch Bindegewebe ersetzt um die strukturelle Integrität des Myokards zu erhalten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ERK1/2 bei kardialen Umbauvorgängen eine wichtige Rolle einnehmen. Eine Modifikation dieses Signalweges könnte einen Ansatz liefern, um pathologischen Anpassungsprozessen im Rahmen kardialer Erkrankungen entgegenzutreten.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Kardiale Hypertrophie geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Herzinsuffizienz, kardialen Arrhythmien und plötzlichem Herztod einher. Es mangelt jedoch nach wie vor an effizienten Strategien, die direkt mit der pathologischen Hypertrophieentwicklung interagieren. Daher ist es essentiell, neue Angriffspunkte zu erforschen, diese verstehen zu lernen, deren Nutzen zu evaluieren, um schließlich dieses Wissen in gegebenenfalls wirkungsvolle neue Therapien umzusetzen.

Die durch unsere Arbeitsgruppe im Vorfeld gemachte Beobachtung, dass für die G β -Untereinheit-Bindung und Thr188-Phosphorylierung von ERK1/2 und der durch sie induzierten kardialen Hypertrophie eine Dimerisierung von ERK1/2 notwendig ist, stellte die Hypothese auf, dass durch Unterbindung der ERK1/2-Dimerisierung eine Hypertrophie des Herzens vermindert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Inhibition der ERK1/2-Dimerisierung einen Einfluss auf die pathologische wie auch physiologische Hypertrophie des Herzens hat. Dies wurde mithilfe einer monomeren ERK2 Δ 174-177-Mutante im Vergleich zu Wildtyp untersucht. Weiterhin wurde geprüft, welche Auswirkungen der Einsatz dieser Mutante auf die anti-apoptotischen Effekte von ERK1/2 hat.

Für diese Untersuchungen wurde *in vitro* mit neonatalen Rattenkardiomyozyten und für die Untersuchungen im Organismus mit zwei unabhängigen transgenen Mauslinien gearbeitet, die ERK2^{Δ174-177} überexprimieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
100 bp DNA ladder	New England BioLabs
2,2,2-Tribromethanol (Avertin®)	Sigma-Aldrich
5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich
Albumin - Fraktion V	AppliChem
Alkohol (100% [v/v], 70% [v/v])	Sigma-Aldrich und Apotheke des Uniklinikums
Ammoniumperoxidsulfat	Merck
Direct Red 80	Sigma-Aldrich
Dobutamin	Sigma-Aldrich
Eosin	Merck
Ethidiumbromid (1% [m/v])	AppliChem
Fetales Rinderserum	Biochrom AG
Kollagenase Typ 2	Worthington
L-[4,5- ³ H]-Isoleucin	GE Healthcare
L-Glutamin	PAN
Lumasafe Plus (LSC-Cocktail)	PerkinElmer
Methanol	Sigma-Aldrich
Minimum Essential Medium (MEM) Eagle	Sigma-Aldrich
Mounting Medium (Eukitt®)	Fluka
Paraformaldehyd	AppliChem
PBS	PAN
Penicillin/Streptomycin	PAN
Pentobarbital-Natrium (Narcofen®)	Merial
peqGOLD Protein-Marker III	peQlab
peqGOLD Universal Agarose	peQlab
Roti-Histol	Carl Roth
Roti-Load (4x)	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth

TEMED	AppliChem
TRIS	AppliChem
Trypanblaulösung (0,4% [m/v])	Sigma-Aldrich
Vitamin B ₁₂	Sigma-Aldrich
Xylol	AppliChem

Alle weiteren Chemikalien wurden bei AppliChem, Carl Roth oder Sigma-Aldrich bestellt. Verbrauchsmaterialien und Arbeitsgeräte und deren Bezugsquelle werden am Ort der Nennung beschrieben.

2.1.2. Puffer und Medien

Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Agarosegel-Ladepuffer	100 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,1% (m/v) Bromphenolblau
50-fach TAE-Puffer- Stammlösung	2 M TRIS-HCl 6% (m/v) Essigsäure, konzentriert 50 mM EDTA

Puffer und Proteaseinhibitoren für proteinchemische Arbeiten

2-fach TSE-Puffer (pH 7,4)	100 mM TRIS-HCl 600 mM NaCl 10 mM EDTA 3 mM NaN ₃
Lysispuffer	1-fach TSE-Puffer (4°C) 1-fach IBX 1% (v/v) Triton X-100
10-fach IBX	500 mM NaF 83,9 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM Na ₃ VO ₄ 56,9 mM NaN ₃
100-fach Proteaseinhibitormix	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor 0,1% (w/v) 25 mM Benzamidin 50 mM TRIS (pH 7,4)
100-fach PMSF	100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in 99% (v/v) Ethanol

10-fach SDS-Puffer	250 mM TRIS-HCl 1,92 M Glycin 1% (m/v) SDS
BSA-Puffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 2 mM Nonidet P40 0,25% (m/v) BSA (Albumin) Fraktion V
4-fach Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) 0,4% (m/v) SDS
4-fach Trenngelpuffer	1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,4% (m/v) SDS
Transferpuffer	20 mM TRIS-HCl 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Blockpuffer	100 mM NaCl 5% (m/v) Magermilchpulver 10 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 0,1% (v/v) Tween 20

Puffer für histologische Arbeiten

10-fach PBS-Stammlösung	1,37 M NaCl 27 mM KCl 81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 15 mM KH ₂ PO ₄
-------------------------	--

Puffer zur Präparation von Primärzellen

5-fach ADS-Puffer	613 mM NaCl 100 mM HEPES 5 mM NaH ₂ PO ₄ 27,8 mM Glucose 26,8 mM KCl 4,2 mM MgSO ₄ auf pH 7,35 einstellen anschließend steril filtrieren und bei 4°C lagern
Kollagenase-Puffer	55 mL 1-fach ADS-Puffer 64% (m/v) Kollagenase Typ 2

Medien für eukaryotische Zellen

MEM-Nährmedium	1,05% (m/v) MEM 4 M NaHCO ₃ auf pH 7,3 einstellen 0,1% (v/v) Vitamin B ₁₂ -Lösung anschließend steril filtrieren und bei 4°C lagern
modifizierte MEM-Medien	zu 500 mL MEM je nach Bedarf geben: 5 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 000 U/10 mg/mL) 2 mM Glutamin-Lösung 5 mL (1% [v/v]), 25 mL (5% [v/v]) oder kein FCS ± 2,5 mL BrdU (0,6% [m/v])

2.1.3. DNA-Primer

Tabelle 1: Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Orientierung	Hersteller
α -MHC (fwd)	ACATAGACCTCTGACAGAGA	vorwärts	Biomers
ERK2 ^{A4} (bwd)	GCAACTCGAACTTTGTTGAG	rückwärts	Biomers
Kontrollprimer (fwd)	TTCCAGAAGCCTCGCAATGTCAA	vorwärts	Biomers
Kontrollprimer (bwd)	CCCCCTTACCGGTATCAGCAGAA	rückwärts	Biomers

2.1.4. Antikörper

- ERK1/2-Antikörper: p44/42 MAPK Antibody (*Fa. Cell Signaling*)
- Flag-Antikörper: Monoclonal ANTI-FLAG® M2 Antibody (*Fa. Sigma*)
- Maus-Antikörper: Peroxidasegekoppeltes anti-Maus IgG (*Fa. Dianova*)
- Rabbit-Antikörper: Peroxidasegekoppeltes anti-Kaninchen IgG (*Fa. Dianova*)

2.1.5. Eukaryotische Zelllinien

HEK-293 humane embryonale Nierenzellen

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. DNA-Isolierung und Genotypisierung

Um die DNA aus Mausschwanzbiopsien für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zugänglich zu machen, wurden 500 μ L 50 mM NaOH zur Biopsie zugegeben. Diese wurde anschließend 45 Minuten bei 95°C gekocht und der Überstand mit 60 μ L 1 M TRIS-Puffer (pH 8,0) mit 10 mM EDTA versetzt. 3 μ L dieser Suspension wurden für die Genotypisierung eingesetzt. Die Genotypisierungs-PCR wird mit einem Endvolumen von 26 μ L in einen auf 94°C vorgeheizten PCR-Cycler (*S1000 Thermal Cycler, Fa. Bio-Rad*) gestellt. Die PCR ermöglicht eine selektive Amplifizierung, eines Primer-spezifischen DNA-Abschnittes. Hierfür sind mehrere sogenannte Amplifizierungszyklen notwendig, die jeweils aus drei Phasen bestehen: „Denaturierung“ zur Trennung des DNA-Stranges, „Primerhybridisierung“ zur spezifischen Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA und „Elongation“ des Komplementärstranges.

Zur Vermehrung der gewünschten DNA-Fragmente wurden 40 Zyklen gewählt, wobei nachfolgendes Reaktionsschema Anwendung fand:

1.-40. Zyklus: 20 Sekunden 94°C
 25 Sekunden 58°C
 30 Sekunden 72°C
nach 40. Zyklus: 7 Minuten 72°C

PCR-Mix: 1 µM der beiden Kontrollprimer
 1 µM der beiden transgenspezifischen Primer
 2,5 µL 10-fach Taq-Polymerasepuffer
 20 µM MgCl₂
 2 µL dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 0,35 µL Taq-DNA-Polymerase (1 U)
 ad 23 µL H₂O (*aqua ad injectabilia*)

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Der PCR-Reaktionsmix wurde mit Ladepuffer versetzt und nach Beschichtung mit TAE-Puffer (1-fach) in einem 2%igen (m/v) Agarosegel bei einer konstanten Spannung von 100 V nach der Basengröße aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei fungierte das im Agarosegel gelöste Ethidiumbromid (pro 100 mL Agaroselösung 3,5 µL einer 1%igen [v/v] Lösung), welches mit Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Belichtung fluoresziert, als Detektionssubstanz. Als Referenzbande diente ein DNA-Referenzmarker. **Abb. 5** illustriert exemplarisch die Genotypisierung des ERK2^{Δ174-177}-Transgens, dessen Amplifikation mithilfe eines Primerpaares, bestehend aus α-MHC-Promoter und ERK-ansetzendem Primer (*siehe Abschnitt 2.1.3*) erfolgte. Die zweite Bande ist ein Myosin-Amplifikationsprodukt als Kontrolle.



Abb. 5: Beispiel einer Genotyp-Bestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Neben einer 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter als DNA-Referenzmarker wurden PCR-Reaktionen von einer Wildtyp-Maus (wt) und einer ERK2^{Δ174-177}-transgenen Maus (TG) auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Belichtung zeigt sich bei der transgenen Probe (TG) sowohl das 357 bp große Transgen-Amplifikationsprodukt, als auch das 211 bp große Kontroll-Amplifikationsprodukt (wt).

2.3. Proteinanalytische Methoden

2.3.1. Proteinlysate und BCA-Proteinbestimmung

Tiefgefrorene Herzspitzen (-80°C) wurden mit 700 µL Lysispuffer versetzt, dem zuvor Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:100 zugegeben wurde. Die Herzen wurden anschließend etwa 20 Sekunden auf Eis mit einem Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke & Kunkel) zerkleinert, wobei unmittelbar zuvor weitere 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) zum Gemisch hinzugefügt wurden, um den Abbau von aufgeschlossenen Proteinen durch Proteasen zu verhindern. Nach Aufbereitung des Gewebes mit dem Homogenisator wurde für die Proteinbestimmung das Lysat 1:10 mit Wasser verdünnt und die Proteinkonzentration unter Verwendung eines BCA Protein Assays (BCATM Protein Assay Kit, Fa. Thermo Scientific) bestimmt. Hierzu wurden 20 µL des verdünnten Lysates auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt und 20 µL einer Standardproteinreihe zugegeben. Anschließend wurden jeweils 200 µL BCA-Mix hinzupipettiert, welcher aus 49 Volumenanteilen von Reagenz A (Bicinchoninsäure) und einem Volumenanteil von Reagenz B (Kupfersulfat) hergestellt wurde. Durch Zugabe dieser Reagenzien kommt es zu einer Biuretreaktion, wobei bestimmte Proteinbestandteile gemeinsam mit der Bicinchoninsäure und den reduzierten Kupferionen im alkalischen Milieu einen

blauvioletten Chelatkomplex bilden.¹³² Da die Intensität der Farbe dieses Chelatkomplexes proportional zur Proteinmenge ist, kann man durch Einsatz eines Photometers die Proteinkonzentration bestimmen. Dies erfolgte nach Inkubation der Proben für 20 Minuten bei 37°C bei 562 nm mithilfe des SpektraMax 340 (Fa. Molecular Devices) unter Verwendung einer Standardproteinkurve. Die ermittelte Proteinkonzentration diente zur Einstellung der Proben auf die gleiche Konzentration von 2 µg/µL. Im Anschluss wurde den Proben 4-fach-Laemmli-Puffer (Roti-Load, Fa. Carl Roth) zugesetzt.

2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde mit SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli durchgeführt.¹³³ Hierfür wurden je nach Versuchsanordnung zwei verschiedene Elektrophorese-Systeme genutzt, sowohl Gel-Apparaturen von der Firma Hoefler (SE 600), als auch von der Firma Bio-Rad (Mini-PROTEAN®-System). Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei Phasen: einer Sammel- und einer Trennphase. Die Größenfraktionierung der Proteine erfolgte durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 70 mA pro Gel. Hierbei diente der zugegebene 1-fach SDS-Laufpuffer als Kathoden- und Anodenpuffer. Anhand des im Laemmli-Puffer enthaltenen Bromphenolblau war die vordere Lauffront als Markerfront für den Fortschritt der Gelelektrophorese behilflich. Gleichzeitig diente ein mitgelaufener Proteinstandard (peqGOLD Protein-Marker III, Fa. peqLab) der Zuordnung des erwarteten und zu detektierenden Proteins auf dem Gel.

Sammelgel:	7,5 mL H ₂ O
	3 mL 4-fach Sammelgelpuffer
	1,5 mL Rotiphorese Gel 30 (Lösung aus Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% [m/v])
	12 µL Tetramethylethyldiamin (TEMED)
	120 µL Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10% [m/v])
Trenngel:	10,5 mL H ₂ O
	7,5 mL 4-fach Trenngelpuffer
	12 mL Rotiphorese Gel 30

15 μ L TEMED

195 μ L APS (10% [m/v])

Die Angaben gelten jeweils für die Herstellung eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgels (18 x 16 cm).

2.3.3. Westernblot und Immundetektion von Proteinen

Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen und die darauf befindlichen Proteine mit einer Nassblottapparatur (*Fa. Bio-Rad*) im elektrischen Feld (100 V) auf eine PVDF-Membran (*Whatmann Westran CS, Fa. Schleicher & Schüll*) überführt. Hierzu wurde die PVDF-Membran zuvor in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Gel, die Faserplatten und das Filterpapier (*Whatmann 3MM, Fa. Schleicher & Schüll*) wurden in Transferpuffer getränkt. Die gesamte Apparatur wurde von Transferpuffer umgeben und während der Betriebszeit durch einen Eisakku gekühlt. Die Transferzeit betrug in der Regel 90 Minuten. Zwischen Kathode und Anode wurde dafür der in **Abb. 6** ersichtliche Aufbau verwendet:

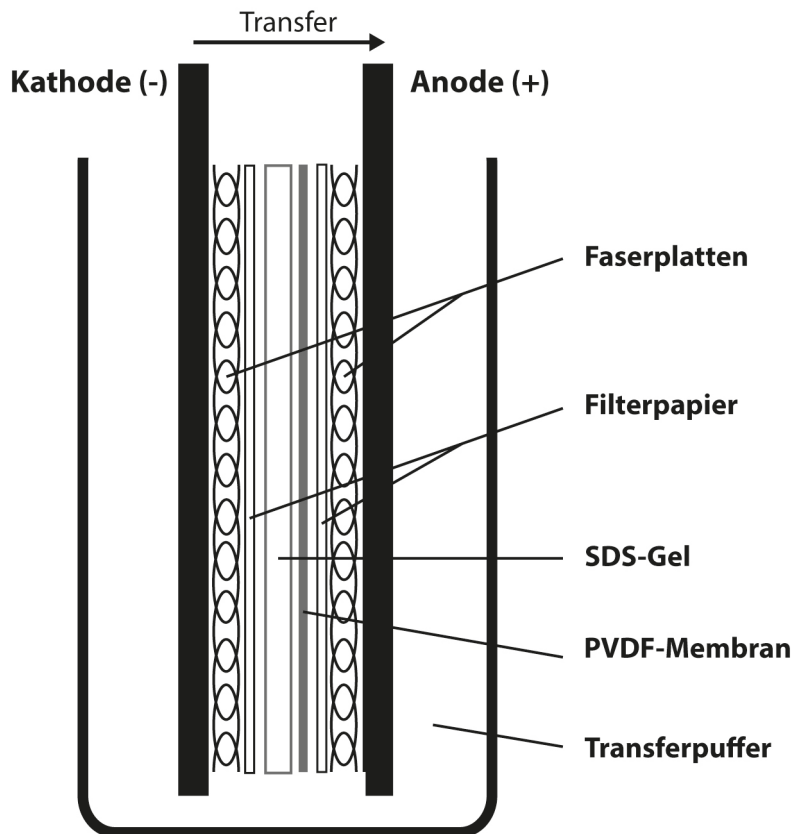


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer Nassblottapparatur für das Westernblot-Verfahren

Der gezeigte vertikale Aufbau einer Nassblottapparatur ist übertragbar auf horizontale semitrockene Apparaturen.

Nach Fertigstellung wurde die Membran entnommen und zwei Stunden in Blockpuffer gewaschen um unspezifische Proteinbindungsstellen zu maskieren. Anschließend wurde sie über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert, der in einer Verdünnung von 1:4000 je nach Antikörper in Block- bzw. BSA-Puffer verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran 5-mal jeweils 15 Minuten mit BSA gewaschen und daraufhin für mindestens 2 Stunden mit einem in BSA-Puffer gelösten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurden überschüssige Antikörper durch erneutes 5-maliges Waschen von jeweils 15 Minuten mit BSA entfernt. Durch Zugabe von Peroxidase-Substrat (*ECL Plus Western Blotting Detection System, Fa. GE Healthcare*) konnten die Proteine mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht und Röntgenfilme (*Super RX, Fa. Fujifilm*) in der Dunkelkammer belichtet werden.

2.4. Zellkulturtechniken

2.4.1. Konstruktion eines adenoviralen Vektors

Die Untersuchung der Dimerisierungsdefizienz des ERK2-Proteins *in vitro* wurde durch Überexpression eines adenoviralen Vektors in Primärzellen vorgenommen. Hierfür wurde das Vektorkonstrukt Flag-ERK2^{Δ174-177} nach dem Protokoll von invitrogen generiert. Nach Herstellung des adenoviralen Expressionsvektors (*ViraPowerTM Adenoviral Expression System, Fa. invitrogen*), bestehend aus der dimerisierungsdefizienten Variante des ERK2-Proteins (ERK2^{Δ174-177}) und einem Flag-Tag, wurde er aufgereinigt und nach Transfektion in HEK-Zellen in diesen vermehrt. Aus der dritten Amplifikation wurden die HEK-Zellen inklusive Medium geerntet und die Zellen durch drei Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation des Zelldebris wurde der virale Überstand abpipettiert. Dieser konnte fortan zur Transduktion von neonatalen Kardiomyozyten verwendet werden.

2.4.2. Präparation von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte

Organentnahme

Die für die nachfolgenden Versuche notwendigen Kardiomyozyten wurden aus Rattenbabys (Alter: 1-2 Tage) gewonnen. Unmittelbar nach Entnahme des Herzens wurde es in gekühlten 1-fach ADS-Puffer überführt, von umgebendem Gewebe freipräpariert und anschließend in eine ebenfalls mit 1-fach ADS-Puffer beschichtete Petrischale auf Eis gegeben. In dieser wurden die Vorhöfe abgeschnitten und die Ventrikel in einer kleinen Petrischale mit einer desinfizierten Schere in Stücke von wenigen Kubikmillimetern zerkleinert.

Gewinnung von neonatalen Kardiomyozyten

Mit Kollagenase-Puffer wurden die Herzen sogleich in eine Zellkulturflasche gebracht und 5 Minuten in einem Schwenk-Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach zehnmaliger Resuspension wurde der Überstand abgesaugt und verworfen, wiederum wurde Kollagenase-Puffer zu den Herzstücken gegeben und für 20 Minuten in das Schwenk-Wasserbad gestellt. Nach Resuspension, wurde der Überstand diesmal in ein mit FCS vorbereitetes Gefäß überführt. Während der

Inkubation der Herzstücke mit weiterem Kollagenase-Puffer im Wasserbad, wurde dieses Gefäß 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in FCS gelöst. In drei weiteren Schritten wurde ebenso verfahren. Nach dem letzten Schritt wurden alle in FCS gelösten Kardiomyozyten in ein Gefäß pipettiert und dieses noch einmal bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert um daraufhin den Überstand abzusaugen und modifiziertes MEM-Nährmedium (+Glu, +P/S, +5% [v/v] FCS) zuzugeben. Die resuspendierte Zellsuspension wurde nachfolgend über einen sterilen mit Nährmedium vorgespülten Sieb (*Falcon Zellsieb 40 µm Porengröße, Fa. BD Bioscience*) in ein zweites Gefäß gefiltert. Das Filtrat wurde auf Petrischalen ausplattiert und für 45 Minuten in den Brutschrank gestellt. Dieser Schritt diente dazu, möglichst viele Fibroblasten durch Anheften an die Plastikoberfläche der Petrischalen aus den Kardiomyozyten-Suspensionen abzusondern.

Auszählung und Aufteilung der Kardiomyozyten

Nach Zugabe von modifiziertem MEM-Nährmedium (+Glu, +P/S, +5% [v/v] FCS, +BrdU) wurde die Kardiomyozyten-Suspension in ein Becherglas überführt. Mithilfe der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (*Fa. Marienfeld*) wurde die Anzahl der im Medium enthaltenen Kardiomyozyten bestimmt. Hierfür wurde Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versehen und die lebenden Kardiomyozyten unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Da lebende Kardiomyozyten den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen, erschienen diese unter dem Lichtmikroskop weiß, abgestorbene Kardiomyozyten stellten sich hingegen dunkelblau dar.

2.4.3. [³H]-Isoleucineinbau in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Für den [³H]-Isoleucineinbau wurden 300 000 Zellen/24-well ausgesät und bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde nach 24 Stunden mit einem modifizierten MEM-Nährmedium ausgetauscht, welches anstelle von 5% (v/v) FCS nur 1% (v/v) FCS enthielt. Weitere 24 Stunden später wurden die Kardiomyozyten mit ERK2^{Δ174-177} oder Wildtyp Viren transduziert, wobei die Konzentrationen so angepasst wurden, sodass ein vergleichbares Überexpressionsniveau erreicht wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden nach

zweimaligem Waschen mit PBS die Zellen mit serumfreiem modifiziertem MEM-Nährmedium (0% [v/v] FCS, +Glu, +P/S, +BrdU) versetzt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium mit serumfreien modifizierten MEM-Nährmedium (0% [v/v] FCS, +Glu, +P/S, +BrdU) ausgetauscht, welches radioaktiv markiertes [³H]-Isoleucin (1 µCi/mL) und Ascorbinsäure (100µM) enthielt. Die Hälfte der Zellen wurde entweder mit oder ohne Phenylephrin (5 µM) oder Endothelin-1 (30 nM) stimuliert.

Nach 36-stündiger Stimulation der Kardiomyozyten wurden die Zellen zur Messung im β-Counter vorbereitet. Zunächst wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS nicht eingebautes [³H]-Isoleucin von den Kardiomyozyten entfernt und durch Zugabe von 5%iger (m/v) Trichloressigsäure (TCA) nach mindestens einstündiger Lagerung bei 4°C die Ausfällung von Proteinen bewirkt. Die TCA wurde abgesaugt, das Präzipitat in Natronlauge (0,5 M) gelöst und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung im Verhältnis 1:10 mit Szintillationsflüssigkeit (*Lumasafe Plus*) verdünnt. Die Menge des eingebauten [³H]-Isoleucins wurde im β-Counter (*LS 1801, Fa. Beckman Coulter*) analysiert. Dabei wurden die radioaktiven Zerfälle pro Minute jeder Probe und damit das Ausmaß des [³H]-Isoleucineinbaus in die Kardiomyozyten erfasst.

Die Expression von ERK2^{Δ174-177} und Wildtyp-ERK2 wurde mittels Westernblottanalyse bestimmt.

2.5. Physiologische Methoden

2.5.1. Generierung transgener Mauslinien

Mithilfe von transgenen Tieren erhält man die Möglichkeit die Konsequenzen einer Mutation eines einzelnen Gens auf komplexe physiologische Systeme wie das kardiovaskuläre *System in vivo* zu untersuchen.¹³⁴

Zur Gewinnung einer transgenen Mauslinie wurde cDNA in einen Vektor (**Abb. 7**) inseriert der den α-MHC-Promoter und eine SV40 Polyadenylierungssequenz besitzt. Die cDNA kodiert für die dimerisierungsdefiziente Mutante von ERK2, in welcher der Genabschnitt für die Aminosäuren 174 bis 177 fehlt.⁷⁶ Versehen ist

diese Mutante mit einem FLAG-Epitop, welches zur Identifizierung des transgenen Proteins genutzt werden kann. Der α -MHC-Promoter dient zur weitgehend herzspezifischen Expression der Mutante.^{135, 136}

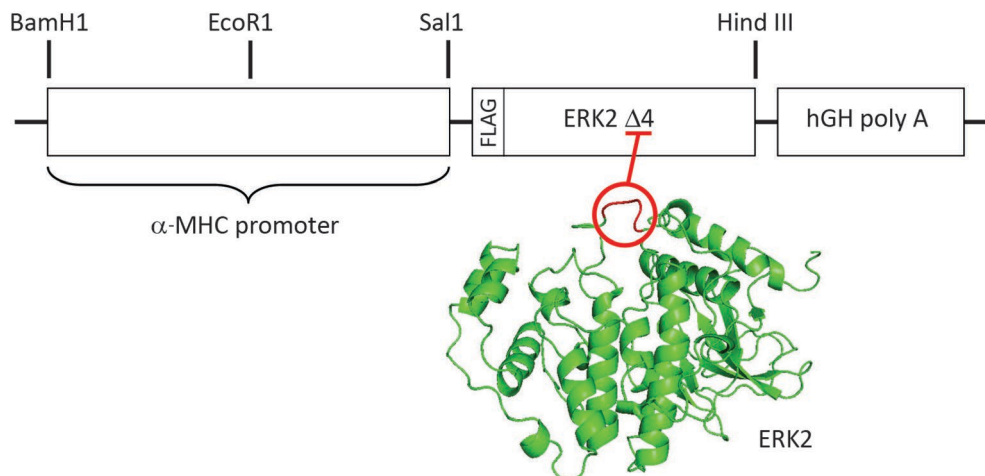


Abb. 7: Transgenkonstrukt mit 3D-Modell von ERK2

Das Transgenkonstrukt besteht aus einem α -MHC-Promoter, der ERK2 ^{$\Delta 174-177$} -Mutante, an welcher zur Detektion ein FLAG-Epitop angebracht ist, und einer Polyadenylierungssequenz. Zusätzlich eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Zur Verdeutlichung der ERK2 ^{$\Delta 174-177$} -Mutante dient ein 3D-Modell eines Wildtyp-ERK2-Proteins in welchem die fehlenden vier Aminosäuren der Mutante rot eingefärbt wurden (Kreis). (3D-Modell modifiziert nach *Canagarajah et al., 1997*)

Das Transgenkonstrukt wurde als linearisierte DNA in den Vorkern einer befruchteten Eizelle injiziert und diese anschließend durch Ovidukttransfer in ein pseudoträchtiges Ammentier implantiert.³⁷ Für die *in vivo* Versuchsreihe wurden zwei unabhängige ERK2 ^{$\Delta 174-177$} transgene Linien (TG #1 und TG #3) generiert. Die Mäuse wurden im FVB/N-Hintergrund generiert und gezüchtet, wobei diese bis zur Versuchsdurchführung unter SPF-Bedingungen gehalten wurden.

Nachfolgende Versuche und Messungen wurden an männlichen Mäusen mit FVB/N-Hintergrund vorgenommen. Die Tierversuche wurden durch die Ethikkommission der Regierung von Unterfranken überprüft und genehmigt.

2.5.2. Transversale Aortenligation

Die Methode der transversalen Aortenligation (TAC, *transverse aortic constriction*) wurde entwickelt, um am Tier eine pathologische Drucküberladung

des Herzens hervorzurufen um beispielsweise eine systemische Hypertonie oder eine stenotische Aortenklappenerkrankung des Menschen zu imitieren und deren Folgen auf den Organismus zu untersuchen.¹³⁷ Eine TAC erfolgte bei den Tieren 8 Wochen nach Geburt. Die Maus wurde hierfür anästhesiert, auf einer Wärmeplatte (40°C) fixiert und der Hals freipräpariert. Anschließend wurde die Maus unter Sicht der Luftröhre mit einem peripheren Venenverweilkatheter intubiert und an ein Beatmungsgerät (*MiniVent Type 845, Fa. Hugo Sachs Elektronik*) angeschlossen. Nach erfolgreicher Intubation wurde der Brustbereich bis unter den Thymus freigelegt und die Aorta darunter sichtbar gemacht. Zwischen dem Abgang des *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis communis sinistra* wurde um den Aortenbogen ein Faden gewunden, ein Doppelknoten vorgelegt und, nach Auflegen einer Nadel mit normierter Dicke (27 Gauge) auf die Aorta, die Schlaufe fest zugezogen.^{137, 138} Nachdem die Nadel vorsichtig entfernt, der Thorax zugenäht und die Maus extubiert wurde, wurde sie bis zum Erwachen aus der Narkose im Käfig unter Infrarotbestrahlung warm gehalten.

Durch die Aortenligation kommt es zu einer massiven Druckbelastung des linken Ventrikels, was eine Herzhypertrophie induziert.

2.5.3. Laufradversuch

Durch Verwendung eines Laufrad-Versuchsaufbaus kann das Ausmaß von trainingsinduzierter und damit physiologischer kardialer Hypertrophie bei Versuchstieren beurteilt werden.¹³⁹ Hierfür wurden die Mäuse in einem Alter von 8 Wochen für 21 Tage in einen Käfig mit Zugang zu einem Laufrad (Radius: 12,5 cm) gesetzt (*Fa. Tecniplast*). Vor und nach dem Aufenthalt der Mäuse im Laufradkäfig erfolgte eine Bildgebung des Herzens mittels Echokardiographie. Der über einen digitalen Magnetzähler erfasste Laufradzählerstand jedes einzelnen Tieres wurde aufgezeichnet und auf gleichmäßigen Trainingsverlauf gegenüber der gesamten Versuchsgruppe abgeglichen. Unter freiwilliger Nutzungsmöglichkeit des Laufrades ergab sich im Durchschnitt eine Laufdistanz von $14,3 \pm 0,9$ km pro Tag.

2.5.4. Echokardiographie

Mit der Sonographie des Herzens steht eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung von funktionellen Größen sowie Zustandsparametern des Herzens zur Verfügung, ohne den untersuchten Organismus hohen Strapazen aussetzen zu müssen. Die Maus wurde hierfür mit Pentobarbital (40 mg/kg KG) i.p. narkotisiert, auf einer Wärmeplatte (42°C) fixiert, um anschließend unter fortwährender EKG-Kontrolle mit dem Ultraschallgerät *Vevo 770* oder *Vevo 2100 Imaging System (Fa. VisualSonics)* mit einer 30 MHz-Sonde die Messungen vorzunehmen. Zur echokardiographischen Erfassung der linksventrikulären systolischen Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS) wurde der linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische innere Ventrikeldurchmesser (LVEDD und LVESD) in der kurzen Achse auf proximaler Höhe der Papillarmuskeln im 2D-Verfahren und im M-Mode bestimmt.

$$FS (\%) = \frac{LVEDD-LVESD}{LVEDD} \times 100$$

Ebenso erfolgte die Messung der enddiastolischen Ventrikelseptum- (IVS) und linksventrikulären Herzhinterwanddicke (LVHW). Bei TAC-Mäusen wurde die Spitzenflussgeschwindigkeit bzw. der Aortendruckgradienten (ΔP) über der Ligatur mittels *Pulsed-Wave-Doppler* ermittelt.

$$\Delta P (\text{mmHg}) = 4 \times \left(\frac{V_{\max}}{1000} \right)^2 \quad \text{vereinfachte Bernoulli-Gleichung}$$

2.5.5. Linksherzkatheter mit Dobutamingabe

Die Katheterisierung des linken Herzens dient zur funktionellen Erfassung herzphysiologischer Parameter. Durch die gleichzeitige Gabe des Katecholamins Dobutamin wird die Hämodynamik des Herzens unter Stressbedingungen simuliert. Mit der Hilfe von Dobutamin kann man die kontraktile Reserve des Herzens bestimmen. Das heißt Einschränkungen der Kontraktionsleistung, die unter Ruhebedingungen noch nicht auftreten, können unter Dobutamin-Stress deutlich werden.

Die Mäuse waren bei Basalkatheterisierung 8 Wochen, bei Katheterisierung nach TAC 14 Wochen alt. Die Maus wurde nach ausreichender Narkose auf einer Wärmeplatte (40°C) fixiert und die rechte *Arteria carotis* freipräpariert. Die Arterie wurde kranial abgebunden und kaudal mit einer Schlaufe auf Zug gesetzt. Mit einer Federschere wurde eine kleine Inzision in die Gefäßwand eingefügt und sogleich der Mikromanometer-Katheter (*1,4 F Practice Catheter, Fa. Millar INSTRUMENTS*) vorsichtig in den linken Ventrikel vorgeschoben. Nach Fixierung des Katheters mit mindestens einem Faden wurde die linke *Vena jugularis* freipräpariert um in diese einen Dobutamin-Katheter einzubringen. Bei gleichmäßiger Frequenz und konstantem Druck wurde mit dem Versuch begonnen indem die Dobutamindosis alle 60 Sekunden wie in **Tabelle 2** beschrieben gesteigert wurde:

Tabelle 2: Dosissteigerung von Dobutamin im zeitlichen Verlauf

Zeit [Minute]	1	2	3	4	5	6
Dosis [ng]	75	150	375	750	1500	3750

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Chart 5.4.2 (*Fa. AD Instruments*).

2.5.6. Ermittlung des Herzgewichtes

Nach Abschluss des Herzkatheters bzw. des Laufradversuches wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet um anschließend das Herz dem eröffneten Brustkorb zu entnehmen. Danach entfernte man umliegende Gefäßreste und ließ das Herz auf einem Papiertuch unter leichtem Druck ausbluten.

2.5.7. Ermittlung der Tibialänge

Als gut vergleichbarer Parameter mit geringer Schwankungsbreite für das Alter eines Organismus dient die Länge der Tibia. Diese wurde am rechten Hinterbein der Maus mit einem Nonius-Messschieber bestimmt.

2.6. Histologische Methoden

2.6.1. Anfertigung von Paraffinschnitten des Herzens

Unmittelbar nach Organentnahme wurde das Herz zur Fixierung in 4%ige (m/v) Paraformaldehydlösung gegeben und bis zur weiteren Aufbereitung bei 4°C gelagert. Die Lösung wurde hergestellt indem 8 g Paraformaldehyd in 100 mL Wasser gelöst, anschließend unter Rühren auf 50°C erwärmt, mit wenigen Tropfen 1 M Natronlauge versetzt und mit 2-facher PBS-Lösung auf 200 mL aufgefüllt wurden. Mittels automatisierter Gewebeaufbereitung (*Tissue-Tek VIP, Fa. Sakura*) erfolgte die Entwässerung des Gewebes über mehrere Stunden in einigen aufeinanderfolgenden Schritten mit Formalin, Alkohol (80% [v/v] und 100% [v/v]) und Xylol. Anschließend wurde das Herz in Paraffin eingebettet (*EG 1150H, Fa. Leica*) um nach Trocknung und Kühlung mit einem Rotationsmikrotom (*RM 2165, Fa. Leica*) 2 µm dicke Herzquerschnitte anzufertigen. Diese wurden im Anschluss auf SuperFrost- und SuperFrost Plus-Objektträger (*Fa. Menzel-Gläser* und *Fa. R. Langenbrinck*) überführt und mindestens 12 Stunden in einem Inkubator bei 45°C getrocknet um eine adäquate Fixierung an den adhäsiv beschichteten Objektträgern zu erreichen. Generell wurden pro Objektträger zwei Schnitte des gleichen Herzens aufgebracht, wobei ihr Abstand im Gewebe ca. 100 µm betrug und damit eine zweite Untersuchungsebene verfügbar war. Die Auswertung erfolgte verblindet gegenüber den verschiedenen Untersuchungsgruppen.

2.6.2. Sirius-Rot-Färbung

Um das Gewebe für die Färbemittel zugänglich zu machen, mussten die Schnitte zunächst in einer Abfolge von mehreren Schritten mit Roti-Histol (dreimal je 4 Minuten) und Ethanol (dreimal je 2 Minuten 100% [v/v], anschließend einmal 2 Minuten 70% [v/v]) entparaffiniert und mit doppelt destilliertem Wasser viermal je 30 Sekunden gespült werden.

Im Anschluss an die Entparaffinierung erfolgte eine 45-minütige Färbung mit Sirius-Rot um den fibrotischen Anteil des Herzmuskels kenntlich zu machen. Hierbei interagiert der stark anionische Farbstoff Sirius-Rot mit den in Kollagenfasern reichlich vorhandenen basischen Aminosäuren.¹⁴⁰ Nach kurzem Auswaschen mit doppelt destilliertem Wasser, Entwässerung über eine

Ethanolreihe (einmal Ethanol 70% [v/v], viermal Ethanol 100% [v/v]) und abschließender zweimaliger Behandlung mit Roti-Histol wurden die Schnitte mit dem Schnelleinschlussmittel Eukitt® (Fa. Fluka) eingedeckt.

Sirius-Rot- 25 mL 1% (v/v) Direct Red 80-Lösung
Lösung: 225 mL gesättigte Pikrinsäure

2.6.3. Häkalaun-Eosin-Färbung

Zur Entparaffinierung der Schnitte wurde wie oben beschrieben verfahren. Danach erfolgte eine zehnminütige Färbung mit Häkalaun an welche sich eine ebenso lange Spülung unter fließendem Leitungswasser anschloss. Zur Komplettierung der Färbung wurden die Schnitte anschließend für etwa 50 Sekunden in eine Eosin-Lösung gegeben um daraufhin zweimal mit doppelt destilliertem Wasser je 30 Sekunden ausgewaschen zu werden. Für die Entwässerung entsprach das Vorgehen dem der Sirius-Rot-Färbung. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte zur Aufbewahrung ebenfalls eingedeckt.

Häkalaun-Lösung (nach Mayer): 1 g Hämatoxylin
 50 g Kaliumaluminiumsulfat
 200 mg Natriumiodat
 50 g Chloralhydrat
 1 g Zitronensäure
 ad 1000 mL H₂O

Eosin-Lösung: 10 g Eosin
 ad 1000 mL H₂O

2.6.4. Quantifizierung von interstitieller Fibrose

Pro Tier wurden unter dem Mikroskop (*Axiovert 135*, Fa. Zeiss) bei 50-facher Vergrößerung und jeweils gleicher Auflösung vier repräsentative Fotos (*AxioCam HRc*, Fa. Zeiss) endokardnah aus jedem Quadranten des Herzens erstellt. Dies wurde zur Erhöhung der Messgenauigkeit bei dem zweiten Schnitt des gleichen Herzens wiederholt. Als histologische Präparate dienten die

Herzschnitte mit Sirius-Rot-Färbung, deren Eigenschaft die Rotfärbung von Kollagenfasern und Gelbfärbung des übrigen Parenchyms ist. Mithilfe der Software Adobe Photoshop CS4 wurde anschließend nach Abdeckung von Gefäßen, die sonst die Messung aufgrund der perivaskulären Fibrose artifiziell erhöhen, die Pixelzahl des rot gefärbten fibrotischen Gewebes durch eine definierte Farbbereichsauswahl erfasst und in Relation zur Pixelzahl des Myokards gesetzt. Von den dabei errechneten Prozentwerten der beiden kardialen Schnitte wurde das arithmetische Mittel gebildet.

2.6.5. Morphometrische Ausmessung von Kardiomyozyten

Zur Erfassung der Kardiomyozytengröße wurden pro Tier von den mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitten bei 400-facher Vergrößerung jeweils acht Fotos gleicher Auflösung mit jeweils etwa fünf gut abgrenzbaren Kardiomyozyten angefertigt. Mit Photoshop CS4 wurde die Fläche der Kardiomyozyten als Pixelanzahl erfasst und in Quadratmikrometer umgerechnet. Im Durchschnitt wurden pro Tier 38 Kardiomyozyten ausgemessen, wobei für die weitere Auswertung das arithmetische Mittel errechnet wurde.

2.6.6. Apoptose-Erfassung mittels TUNEL-Färbung

Zur Erfassung von apoptotischen Zellen wurde die TUNEL-Färbung angewandt (*In Situ Cell Death Detection Kit TMR red, Fa. Roche*). TUNEL steht für Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediated-dUTP-Nick-End-Labeling, womit die durch die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) vermittelte Kopplung von mit Tetramethylrhodamin (TMR) markiertem Desoxyuridintriphosphat (dUTP) an freie 3'-OH-Enden von DNA-Bruchstücken gemeint ist (**Abb. 8**). Durch die direkte Verbindung des rotfluoreszierenden Farbstoffs TMR (Exzitationsmaximum: 552 nm, Emissionsmaximum: 578 nm) mit dUTP kann man somit nach Färbung DNA-Strangbrüche im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

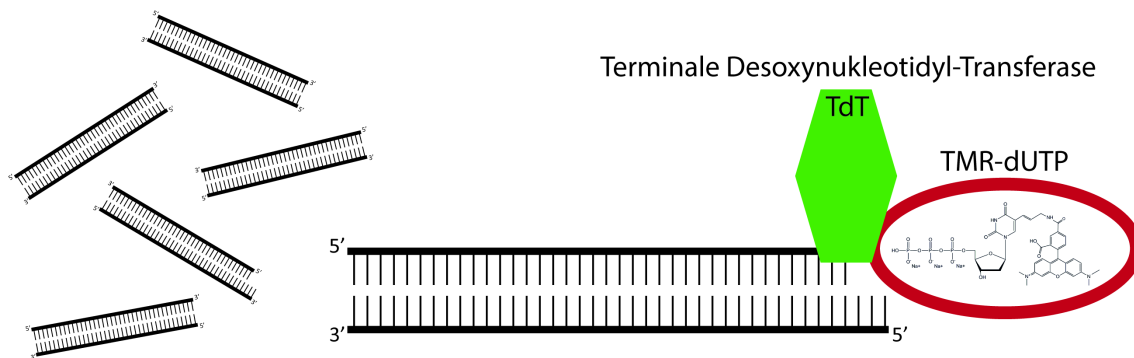


Abb. 8: Schematische Darstellung der TUNEL-Reaktion

Die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) überträgt an freien 3'-OH-Gruppen von DNA-Fragmenten, die während der Apoptose entstanden sind, den an dUPT gekoppelten roten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrodamin (TMR).

Die 2 µm dicken, formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte wurden hierfür in einer Reihe von aufeinanderfolgenden entparaffinierenden und rehydrierenden Schritten mit Xylol und Ethanol behandelt. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten zu auf 37°C erwärmtem TRIS (10 mM, pH 7,5) in den Brutschrank gegeben, wobei für die Permeabilisierung der Zellmembranen des Gewebes kurz vor Zugabe der Schnitte die Lösung um Proteinase K (37 µM) ergänzt wurde. Anschließend erfolgte ein Verdau mit in PBS gelöster RNase (365 nM) über 20 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Im nächsten Schritt wurden die apoptotischen Zellen markiert indem sie bei 37°C für eine Stunde ebenfalls in einer feuchten Kammer mit dem TUNEL-Reagenz interagierten. Zur Gegenfärbung der Kerne wurden die Schnitte 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit *Hoechst 33345* (0,6 µg/ml Endkonzentration, Exzitationsmaximum: 352 nm, Emissionsmaximum: 455 nm) inkubiert. Zwischen allen beschriebenen Schritten wurde drei- bis viermal mit PBS gewaschen. Als Positivkontrolle diente ein bei Raumtemperatur 10 Minuten mit DNase I (3,23 µM) behandelter Gewebeschnitt, welcher anschließend die TUNEL-Reaktion wie die restlichen Proben unterlief. Für die Negativkontrolle wurde ein Schnitt mit dem rotfluoreszierenden Farbstoff TMR ohne Zugabe der TdT behandelt.

Nach Entwässerung mit Xylol wurden die Schnitte mit Fluoromount-G (*Fa. SouthernBiotech*) eingedeckt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (*Axiovert 135 mit HBO 100-Brenner und Filter Set 40,*

Fa. Zeiss) untersucht. TUNEL-positive-Zellen wurden durch Absuchen des Gewebeschnittes nach rotfluoreszierenden Kernen bei 400-facher Vergrößerung ermittelt, wobei anhand der Zellmorphologie nur Kardiomyozyten in die Wertung aufgenommen wurden. Die blaufluoreszierende Gegenfärbung wurde genutzt, um durch Überlappungskontrolle den rotfluoreszierenden Kern als solchen definitiv zu bestimmen. **Abb. 9** zeigt einen Ausschnitt eines TUNEL-positiven Kardiomyozyten.

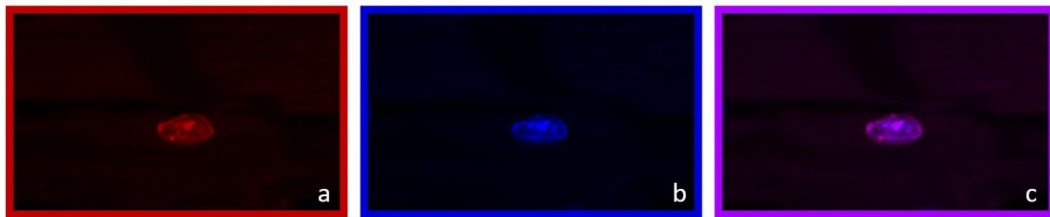


Abb. 9: Exemplarische Darstellung einer TUNEL-positiven Zelle.

Der Zellkern ist in der TUNEL-Färbung mit TMR rot angefärbt (a), (b) zeigt die Hoechst-Gegenfärbung und (c) die Überlagerung aus beiden Aufnahmen.

2.7. Statistik

Die statistische und graphische Auswertung erfolgte mit den Programmen Excel (Fa. Microsoft), Prism (Fa. GraphPad) und Photoshop (Fa. Adobe). Die dargestellten Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm Standardfehler (SEM). Zum Vergleich der Mittelwerte wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur angewendet. Werte wurden ab $P < 0,05$ als signifikant angesehen.

2.8. Methoden, die im Rahmen der Infrastruktur der Arbeitsgruppe übernommen wurden

Während meiner Arbeit konnte ich auf die Infrastruktur der Arbeitsgruppe und des Instituts zurückgreifen. Anbei die Auflistung der Arbeiten, die für mich teilweise oder vollständig übernommen wurden, wofür an dieser Stelle nachfolgenden Personen herzlich gedankt sei:

Tabelle 3: Auflistung übernommener Arbeiten

Methode	
Generierung transgener Mauslinien	Kristina Lorenz, Marianne Babl
Genotypisierung	Martina Fischer
Adenovirengenerierung	Nadine Yurdagül-Hemrich (teilweise)
[³ H]-Isoleucineinbau in neonatalen Kardiomyozyten	Martina Fischer, Kristina Lorenz (teilweise)
Präparation neonataler Kardiomyozyten	Julia Becker (teilweise)
Transversale Aortenligation	Kristina Lorenz, Joachim Schmitt
Echokardiographie	Kristina Lorenz, Nadine Yurdagül-Hemrich
Linksherzkatheter	Kristina Lorenz, Marianne Babl
HE- und Sirius-Rot-Färbung	Marianne Babl (gemeinsam)

3. ERGEBNISSE

3.1. Überexpression von ERK2^{Δ174-177} verringert die Proteinsynthese und pathologische kardiale Hypertrophie

3.1.1. Reduzierte Proteinsynthese *in vitro*

Die Auswirkungen der Dimerisierung des ERK2-Proteins auf Kardiomyozyten wurden bisher nie systematisch untersucht. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war zu klären, ob die Inhibition der Dimerisierung bzw. monomeres ERK2 einen Einfluss auf kardiale Hypertrophie zeigt.

Zunächst erfolgten daher Untersuchungen *in vitro* an adenoviral transduzierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte. In mit dimerisierungsdefizientem ERK2^{Δ174-177} transduzierten Zellen wurde in Abwesenheit und Anwesenheit des Stimulus Phenylephrin, einem α_1 -Agonisten, oder Endothelin-1, einem hypertrophen Stimulus, der ET_A-Rezeptoren aktiviert, die Proteinsynthese gemessen. Diese wurde mithilfe des Einbaus einer radioaktiv markierten Aminosäure ([³H]-Isoleucin) durch Messung im β -Counter quantifiziert. Gleiches wurde mit Wildtyp-ERK2 transduzierten Zellen als Kontrollgruppe durchgeführt, die unter Stimulation einen signifikanten Anstieg des [³H]-Isoleucineinbaus aufwiesen (**Abb. 10**). Kardiale Hypertrophie geht mit einer gesteigerten Proteinsyntheserate einher.¹⁴¹ Das mit dieser Untersuchung erfasste Ausmaß des Aminosäureeinbaus in die Kardiomyozyten durch hypertrophe Stimuli lässt genau quantifizierbare Rückschlüsse auf das Ausmaß der Proteinsynthese und somit der Hypertrophie dieser Kardiomyozyten zu.

Wie **Abb. 10** zeigt, ist die Basalrate des [³H]-Isoleucineinbaus ohne Stimulation in Wildtyp-ERK2-transduzierten Zellen auf gleichem Niveau wie in ERK2^{Δ174-177}-transduzierten Zellen. Dahingegen offenbart sich ein signifikanter Unterschied im [³H]-Isoleucineinbau zwischen Wildtyp-ERK2- und ERK2^{Δ174-177}-transduzierten Zellen nach Stimulation sowohl mit Phenylephrin, als auch mit Endothelin-1. Unter Stimulation mit Phenylephrin fand sich sogar zwischen Kontrolle und Stimulationsgruppe der ERK2^{Δ174-177}-transduzierten Zellen kein signifikanter Unterschied im [³H]-Isoleucineinbau.

Um die Aussagekraft dieses ersten Hinweises eines potentiell verringerten Hypertrophieausmaßes durch ERK2^{Δ174-177} zu erhöhen, wurde nachfolgend eine genaue Analyse dieser Fragestellung im Rahmen einer *in vivo*-Versuchsreihe vorgenommen.

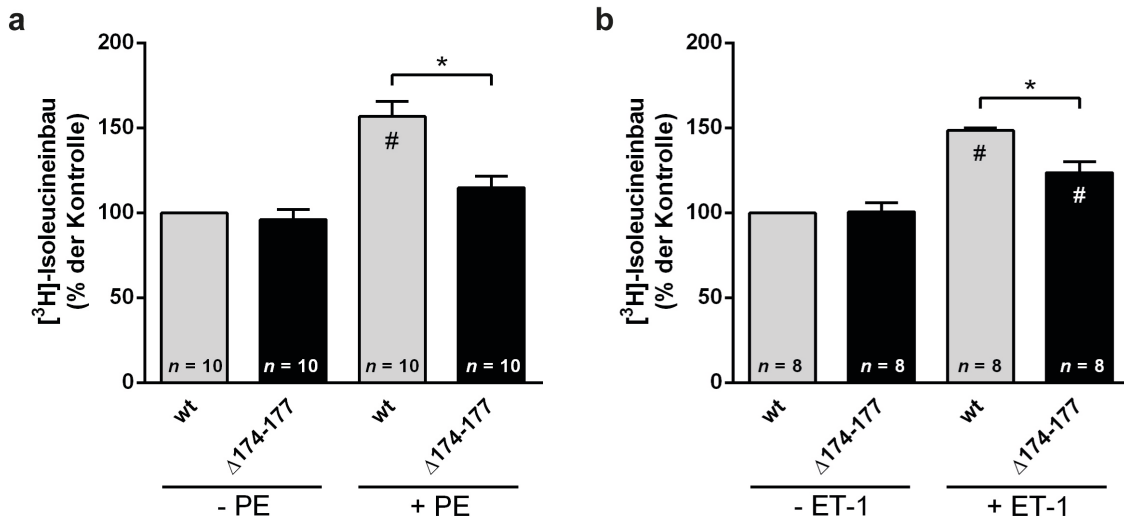


Abb. 10: [3H]-Isoleucineinbau in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte

Ausmaß des [3H]-Isoleucineinbaus in mit Wildtyp-ERK2 oder ERK2^{Δ174-177} transduzierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte unter Stimulation mit Phenylephrin (PE, **a**) oder Endothelin-1 (ET-1, **b**). * $P < 0,001$; # $P < 0,001$ gegenüber unstimulierter Kontrolle. Die *n*-Zahl wurde durch zusätzliche Versuche der Arbeitsgruppe erreicht.

3.1.2. ERK2^{Δ174-177} bewirkt eine Verminderung kardialer Hypertrophie *in vivo* unter chronischer Druckbelastung

ERK2^{Δ174-177}-Proteinexpression in transgenen Mäusen

Für die *in vivo* Versuche wurden männliche Mäuse mit FVB/N-Hintergrund mit transgener kardialer Überexpression von ERK2^{Δ174-177} und als Kontrolle Wildtyp FVB/N-Mäuse genutzt. In vorangehenden Untersuchungen wurden als Kontrolle neben Wildtyp-Mäusen auch ERK2^{T188T}-Mäuse verwendet, bei welchen eine transgene Überexpression von Wildtyp-ERK2 bestand. Es konnte anhand von histologisch morphometrischen Auswertungen, Herzgewichtsmessungen, Linksherzkatheter-Untersuchungen und in der Echokardiographie gezeigt werden, dass sich beide Kontrollen in den Ergebnissen für kardiale Hypertrophie, kardiale Fibrose und kardialer Funktion nicht unterscheiden.⁶⁷

Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit der Vergleich der transgenen Mauslinien nur mit Wildtyp FVB/N-Mäusen.

In der Arbeitsgruppe wurden zwei unabhängige transgene Mauslinien generiert und gezüchtet, die das ERK2^{Δ174-177}-Konstrukt überexprimierten. Mithilfe einer Westernblot-Analyse wurde das Transgen in den beiden Linien detektiert und durch densitometrische Auswertung mittels Photoshop CS4 quantifiziert. Die Ergebnisse sind **Abb. 11** zu entnehmen:

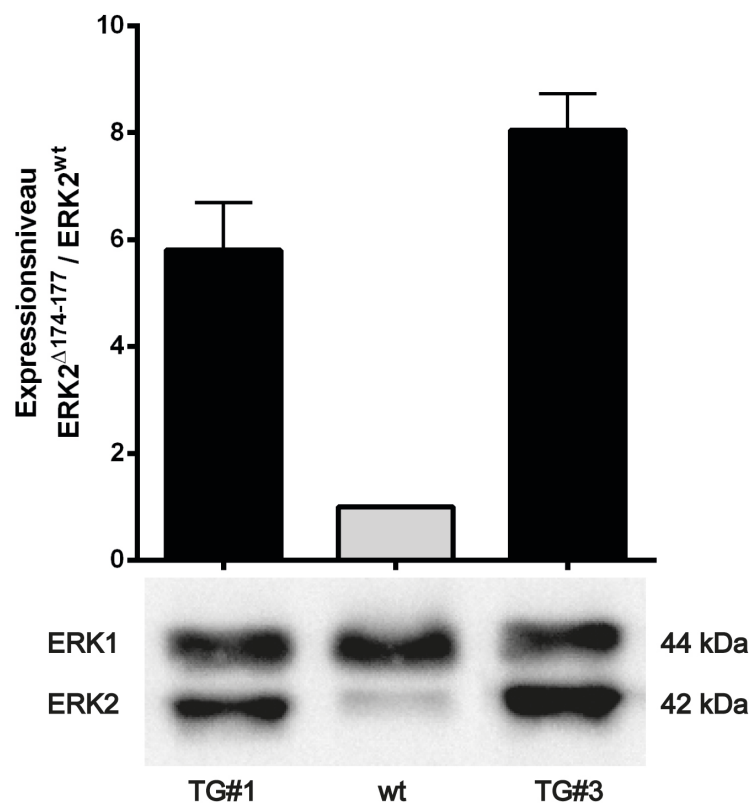


Abb. 11: Westernblot-Analyse des ERK2^{Δ174-177}-Expressionsausmaßes der transgenen Mauslinien 1 und 3 im Vergleich zur Expression von Wildtyp-ERK2 in Wildtyp-Mäusen

Der Westernblot zeigt das mit ERK1/2-Antikörpern detektierte Wildtyp-ERK1 und Wildtyp-ERK2, sowie das mit einem Flag-Antikörper sichtbar gemachte ERK2^{Δ174-177}-Konstrukt der transgenen Mauslinien. $n = 4$ Mäuse pro Gruppe.

Das Expressionsausmaß von ERK2^{Δ174-177} in Linie 1 liegt bei dem knapp sechsfachen, das der Linie 3 bei dem etwa achtfachen des Wildtyp-ERK2-Expressionsniveaus.

ERK2^{Δ174-177}-Mäuse zeigen in histologischen Herzquerschnitten eine geringere Kardiomyozytengröße nach TAC im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Zur Evaluation der Auswirkung von monomerem ERK2 auf kardiale Hypertrophie im lebenden Organismus wurde ein Mausmodell gewählt. Die Mäuse unterliefen 8 Wochen nach Geburt einem chirurgischen Eingriff mit Ligation der Aorta thoracalis (TAC). Die durch die Verengung der Aorta bewirkte chronische Druckbelastung des linken Ventrikels führt im Verlauf zur Entwicklung von pathologischer kardialer Hypertrophie und imitiert Erkrankungen wie beispielsweise eine stenotische Herzklappenerkrankung oder eine arterielle Hypertonie. Das Ausmaß an kardialer Hypertrophie wurde ohne TAC und 6 Wochen nach TAC in zwei unabhängigen Mauslinien (TG#1 und TG#3) gegenüber Wildtyp-Mäusen analysiert. Durch Überexpression der dimerisierungsdefizienten ERK2^{Δ174-177}-Mutante ließ sich *in vivo* – ähnlich wie im [³H]-Isoleucineinbau-Versuch *in vitro* – ein verringertes Ausmaß an kardialer Hypertrophie in Antwort auf chronische Drucküberladung durch Aortenligation (TAC) im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Dies wurde mit mithilfe verschiedener Methoden untersucht:

Auf zellulärer Ebene spiegelt sich die kardiale Hypertrophie in der Zunahme der Zellgröße der Kardiomyozyten wider, da Kardiomyozyten nicht proliferieren können. Hierfür wurde die Fläche von durchschnittlich 38 Kardiomyozyten pro Tier in HE-gefärbten histologischen Herzquerschnitten ausgemessen. Unter basalen Bedingungen, das heißt bei Tieren ohne Aortenligation, ließ sich kein signifikanter Unterschied im Kardiomyozytenquerschnitt zwischen den transgenen Tieren und den Wildtyp-Mäusen nachweisen. Bei Wildtyp-Mäusen und Mäusen der Linie 3 kam es unter Aortenligation zu einer signifikanten Zunahme der Kardiomyozytengröße im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ohne TAC. Gleichzeitig fanden sich signifikant geringere Werte der Kardiomyozytengröße in beiden transgenen Linien unter dem hypertrophen Stimulus TAC gegenüber Wildtyp-Tieren unter TAC (**Abb. 12**).

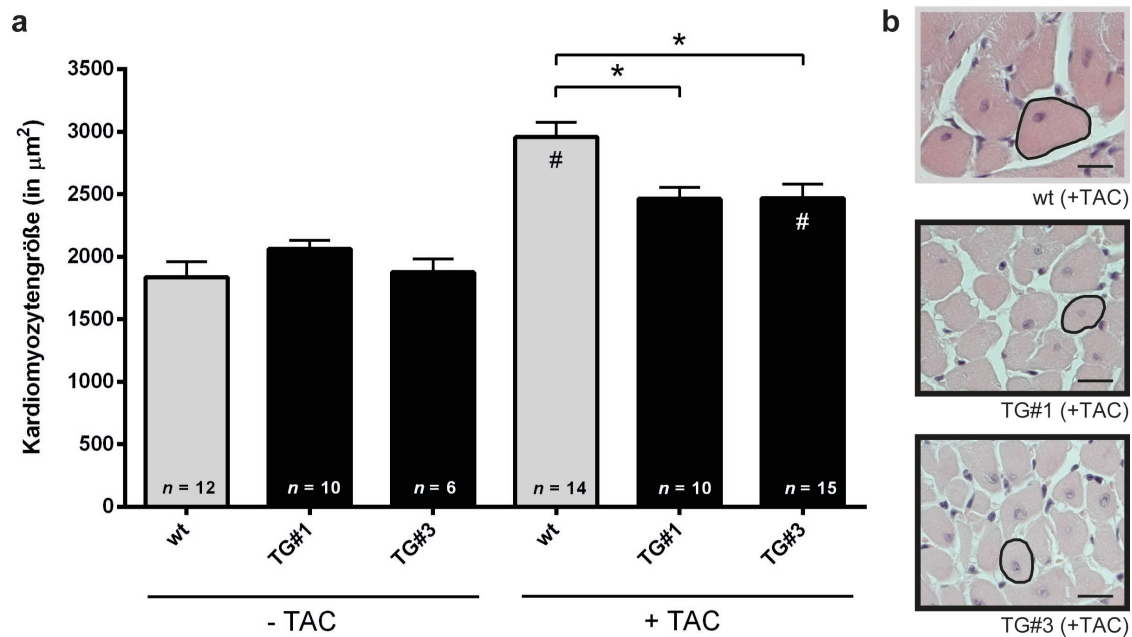


Abb. 12: Quantifizierung der Kardiomyozytengröße an histologischen Schnitten ohne und mit TAC
 (a) Morphometrisch erfasste Kardiomyozytengröße von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2 Δ 174-177 ohne und sechs Wochen nach TAC. * $P < 0,05$; # $P < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe ohne TAC (b) Repräsentative histologische Beispielschnitte linksventrikulären Myokards nach sechs Wochen TAC. HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 50 μm .

Diese Daten lieferten erste *in vivo* Hinweise auf ein verringertes Ausmaß an kardialer Hypertrophie durch die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 als Antwort auf chronische Druckbelastung. Die Ergebnisse zeigen, dass monomeres ERK2 nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* einen hemmenden Effekt auf Kardiomyozytenhypertrophie hat.

ERK2 Δ 174-177-Mäuse zeigen im Herz-Echo ein geringeres Hypertrophieausmaß nach TAC im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Diese Beobachtung konnte durch echokardiographische Auswertung der interventrikulären Septumdicke und der linksventrikulären Hinterwanddicke, beides Messgrößen, die das Hypertrophieausmaß beziffern, bestätigt werden (**Abb. 13**). Bei allen Mäusen die eine Aortenligation erhielten, ließen sich signifikant vergrößerte Wanddicken im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe ohne TAC nachweisen. Für ERK2 Δ 174-177-überexprimierende Mäuse und Wildtyp-Mäuse fand sich ohne TAC kein statistisch signifikanter Unterschied in der linksventrikulären Septum- und Hinterwanddicke. Dahingegen zeigten Mäuse mit Überexpression von monomerem ERK2 nach

TAC eine verringerte linksventrikuläre Septum- und Hinterwanddicke. Messungen beider Wanddicken erreichten statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe (FVB/N Wildtyp-Mäuse) unter TAC.

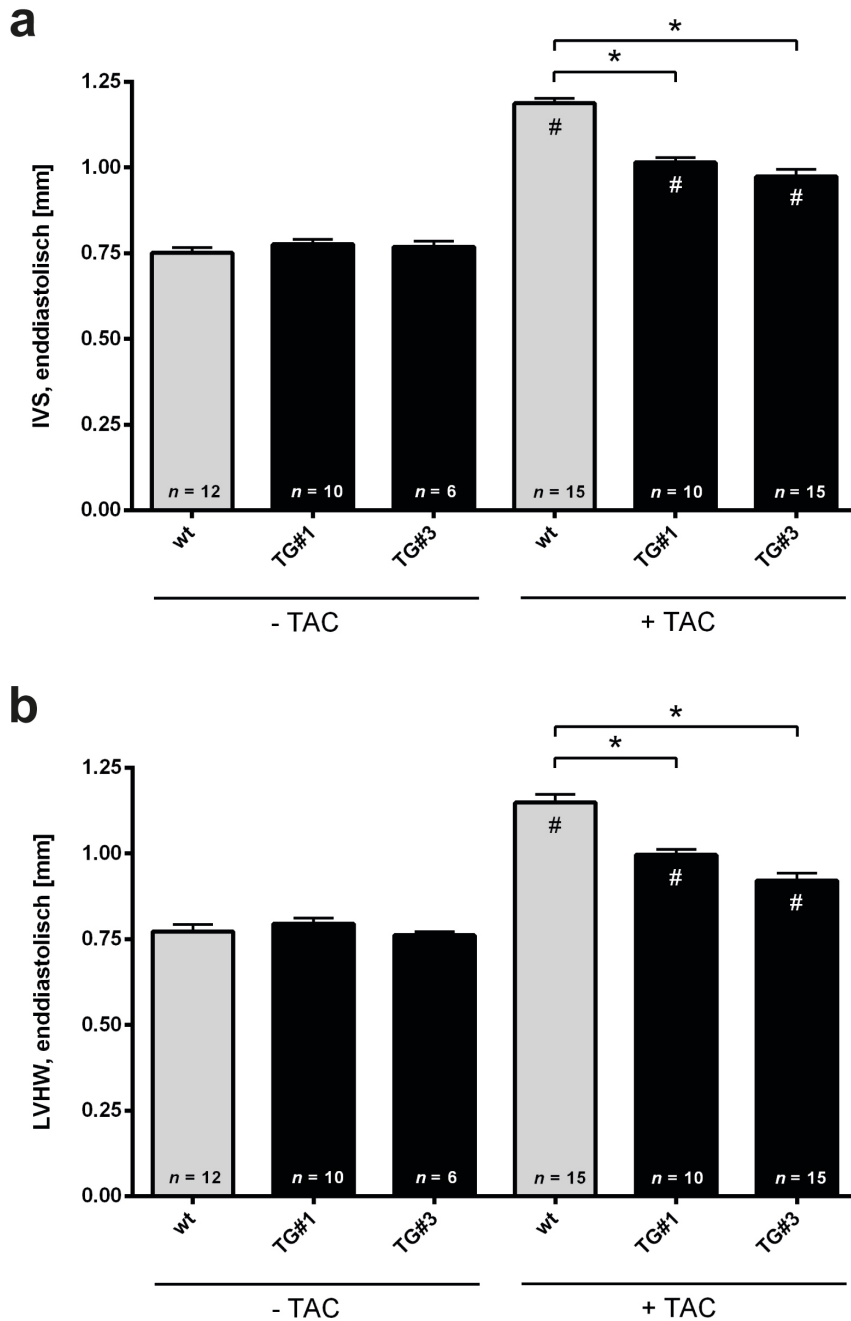


Abb. 13: Interventrikuläres Septum und linksventrikuläre Hinterwand ohne und mit TAC

Erfassung der enddiastolischen interventrikulären Septumdicke (IVS, **a**) und der enddiastolischen Dicke der linksventrikulären Hinterwand (LVHW, **b**) von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} anhand von M-Mode-Bildern ohne und sechs Wochen nach TAC. * $P < 0,001$; # $P < 0,001$ gegenüber Kontrollgruppe ohne TAC.

Dies ist ein weiterer Nachweis im lebenden Organismus dafür, dass unter Überexpression der dimerisierungsdefizienten ERK2-Mutante kardiale Hypertrophie vermindert wird. Gleichzeitig zeigt das unter basalen Bedingungen gleiche Niveau der Wanddicken der verschiedenen Gruppen, dass monomeres ERK2 bei fehlenden pathophysiologischen Stimuli wie chronische Drucküberlastung keine von Wildtyp abweichenden Veränderungen der Myokardgröße bewirkt. Die signifikant geringeren Wanddicken der ERK2^{Δ174-177}-Mäuse nach TAC lassen auf eine verringerte kardiale Masse schließen.

ERK2^{Δ174-177}-Mäuse zeigen ein geringeres Herzgewicht nach TAC im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Ein wertvoller Parameter zur interindividuellen Einschätzung des Herzgewichtes und damit zur Evaluation und zum Vergleich kardialer Hypertrophie ergibt sich aus der Normierung des Herzgewichtes auf die Tibialänge oder das Körpergewicht. Insbesondere die Relation zur Tibialänge gilt nach Abschluss der körperlichen Reifezeit als eine stabile und vergleichbare Kenngröße für kardiale Hypertrophie.¹⁴² Die operative Verengung des kardialen Ausflusstraktes (TAC) erbrachte eine signifikante Zunahme des normierten Herzgewichtes in allen untersuchten Teilgruppen. **Abb. 14** veranschaulicht das Herzgewicht normiert auf Tibialänge (**Abb. 14a**) oder Körpergewicht (**Abb. 14b**). In beiden Messungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Linien unter TAC. Unter basalen Bedingungen fand sich einmal mehr kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Somit unterstützen auch diese Daten die Annahme, dass durch Störung der ERK2-Dimerisierung kardiale Hypertrophie reduziert wird. Die Ergebnisse bestärken die bereits anhand der Echokardiographiedaten gemutmaßte im Vergleich zur Kontrollgruppe global verringerte Herzmasse bei ERK2^{Δ174-177}-überexprimierenden Mäusen nach TAC.

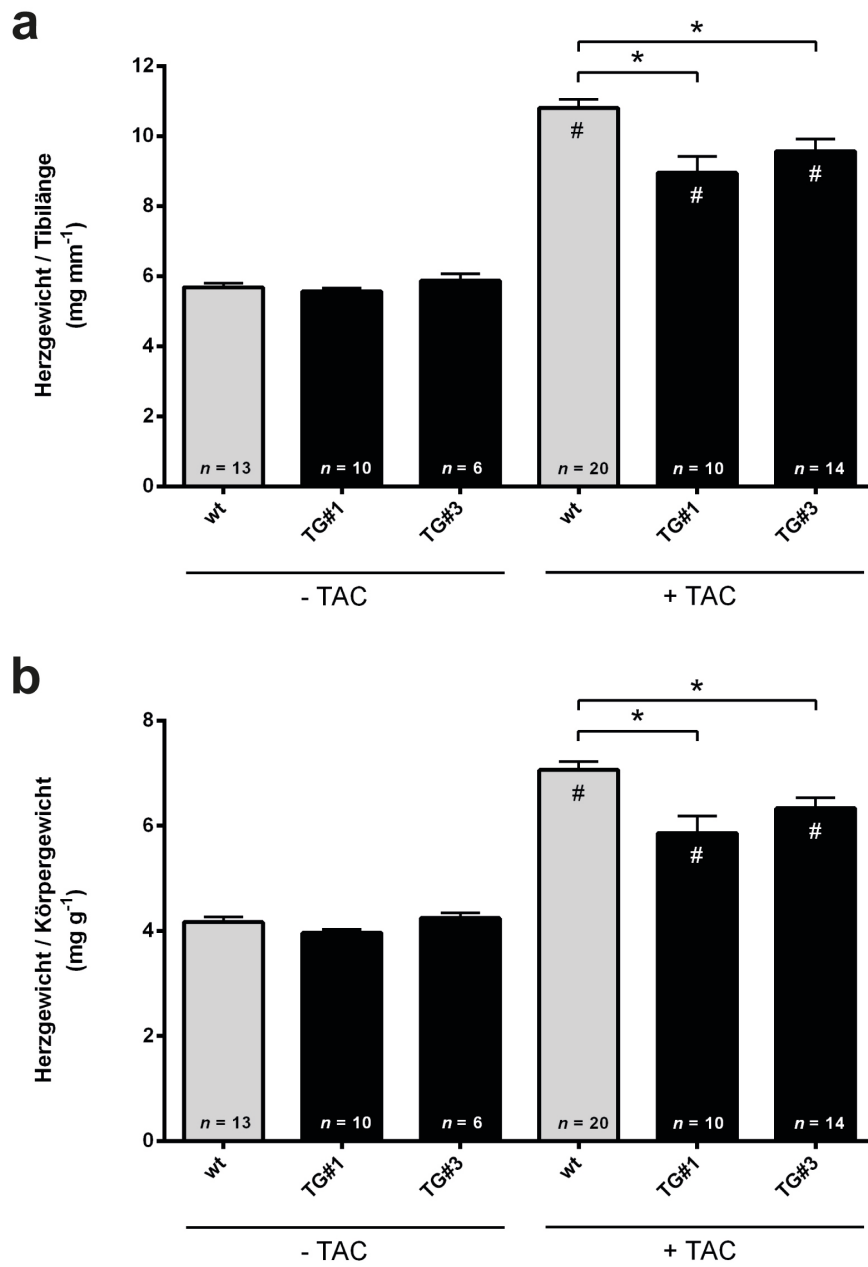


Abb. 14: Herzgewicht bezogen auf Tibialänge und Körpergewicht ohne und mit TAC
 Untersuchung der Herzgewicht/Tibialänge- und Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne und sechs Wochen nach TAC. * $P < 0,05$; # $P < 0,001$ gegenüber Kontrollgruppe ohne TAC.

3.2. Kardiale Überexpression von ERK2^{Δ174-177} hat keine negativen Auswirkungen auf das kardiale *Remodeling*

3.2.1. Erhalt der anti-apoptotischen Effekte durch kardiale ERK2^{Δ174-177}-Expression

Neben der Beteiligung von ERK2 an kardialen Hypertrophieprozessen hat diese MAP-Kinase auch regulatorischen Einfluss auf die Apoptose (s. **Kapitel 1.4**). Ziel des nachfolgenden Experiments war zu untersuchen, ob die Dimerisierungsdefizienz des ERK2-Proteins dessen anti-apoptotische Effekte aufhebt und damit zur Progression einer schweren Herzinsuffizienz beiträgt. Hierzu wurde in histologischen Herzschnitten von Wildtyp-Mäusen und von den beiden transgenen Linien die Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten mittels TUNEL-Technik unter dem Fluoreszenzmikroskop erfasst und miteinander verglichen. Als Resultat zeigte sich unter basalen Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Linien und der Wildtyp-Kontrollgruppe. Unter Aortenligation stieg der Anteil apoptotischer Kardiomyozyten bei den Wildtyp-Mäusen sowie bei den Mäusen der Linie 1 signifikant an, wohingegen die Tiere der Linie 3 im Vergleich zu den transgenen Mäusen ohne TAC keinen signifikanten Apoptoseanstieg verzeichneten. Beim Vergleich der Tiere mit Aortenligation fand sich bei den beiden transgenen Linien im gleichen Ausmaß eine tendenziell niedrigere Anzahl an TUNEL-positiven Kernen im Vergleich zu Wildtyp (**Abb. 15**). Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

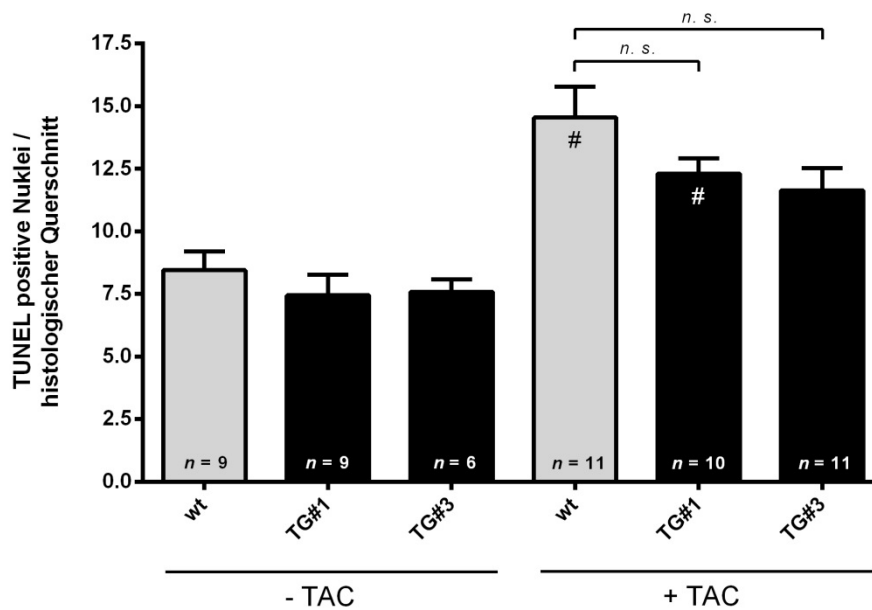


Abb. 15: Quantifizierung der Apoptose an histologischen Schnitten ohne und mit TAC
 Analyse TUNEL-positiver Nuklei im histologischen Myokardquerschnitt von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2 Δ 174-177 ohne und sechs Wochen nach TAC. # $P < 0,01$ gegenüber Kontrollgruppe ohne TAC.

3.3. Kardiale Überexpression von ERK2 Δ 174-177 bewirkt keine Verschlechterung der Herzfunktion

3.3.1. Keine Unterschiede der kardialen Funktion zwischen den Versuchsgruppen in der Echokardiographie

Die Evaluation der Herzfunktion wurde durch Bestimmung der linksventrikulären systolischen Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS) erfasst. Bei Mäusen ohne Aortenligation zeigten sich hier vergleichbare Werte zwischen transgener und Wildtyp-Gruppe. Ebenso fand sich in transgenen ERK2 Δ 174-177-Mäusen 6 Wochen nach TAC eine normale Verkürzungsfraction ähnlich der Kontrollgruppe. Die Werte wiesen auch zwischen den Gruppen mit und ohne TAC keine signifikanten Unterschiede auf (**Abb. 16**).

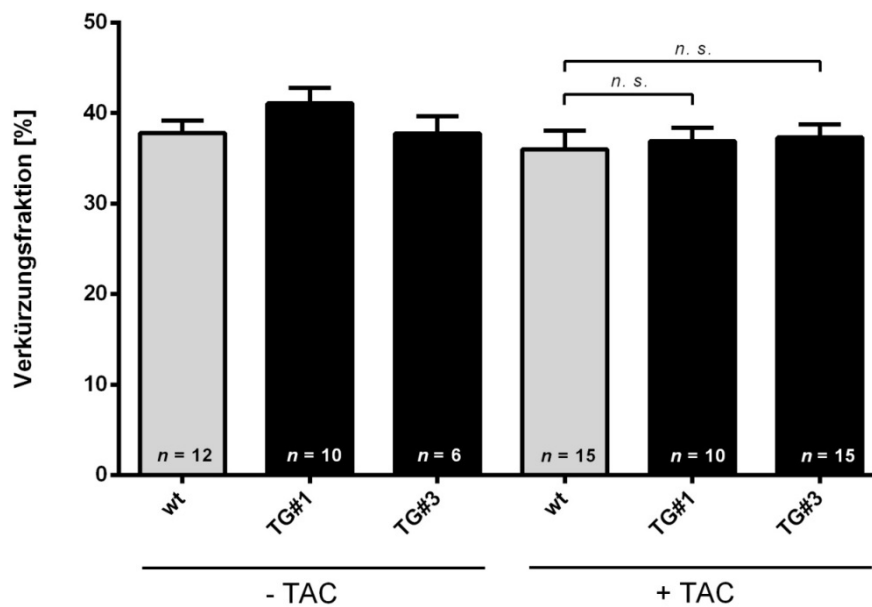


Abb. 16: Linksentrikuläre systolische Verkürzungsfraction (Fractional shortening, FS) ohne und mit TAC

Ventrikuläre Kontraktilität von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne und sechs Wochen nach TAC.

Da die Verkürzungsfraction als Kennzahl für die Kontraktilität des linken Ventrikels dient, lässt sich daraus ableiten, dass durch die ERK2^{Δ174-177}-Mutante die kardiale Funktion unter Ruhebedingungen gegenüber Wildtyp nicht eingeschränkt, aber auch nicht verbessert wird.

3.3.2. Unterschiede kardialer Funktionsparameter im Linksherzkatheter nur bei transgener Linie 3 unter TAC

Kontraktilitätsstörungen können unter Ruhebedingungen maskiert und damit fälschlicherweise nicht detektiert werden. Zur Aufdeckung etwaiger Kontraktilitätsstörungen, die unter Ruhebedingungen noch nicht auftraten, und zur Erfassung der ventrikulären Relaxation wurden die Mäuse neben oben beschriebener echokardiographischer Bestimmung der Verkürzungsfraction einem Linksherzkatheter mit pharmakologischem Stressstimulus unterzogen.

Nach der Registrierung der basalen linksventrikulären Druckänderungen unter Ruhebedingungen erfolgte durch Infusion des Sympathomimetikums Dobutamin die Untersuchung der kardialen Hämodynamik unter Stressbedingungen. Für die transgene Linie 1 zeigte sich ohne TAC ein

gleichartiger Kurvenverlauf mit sukzessivem Anstieg der Kontraktilität und Relaxation unter Dobutamingabe wie bei Wildtyp-Mäusen (**Abb. 17**).

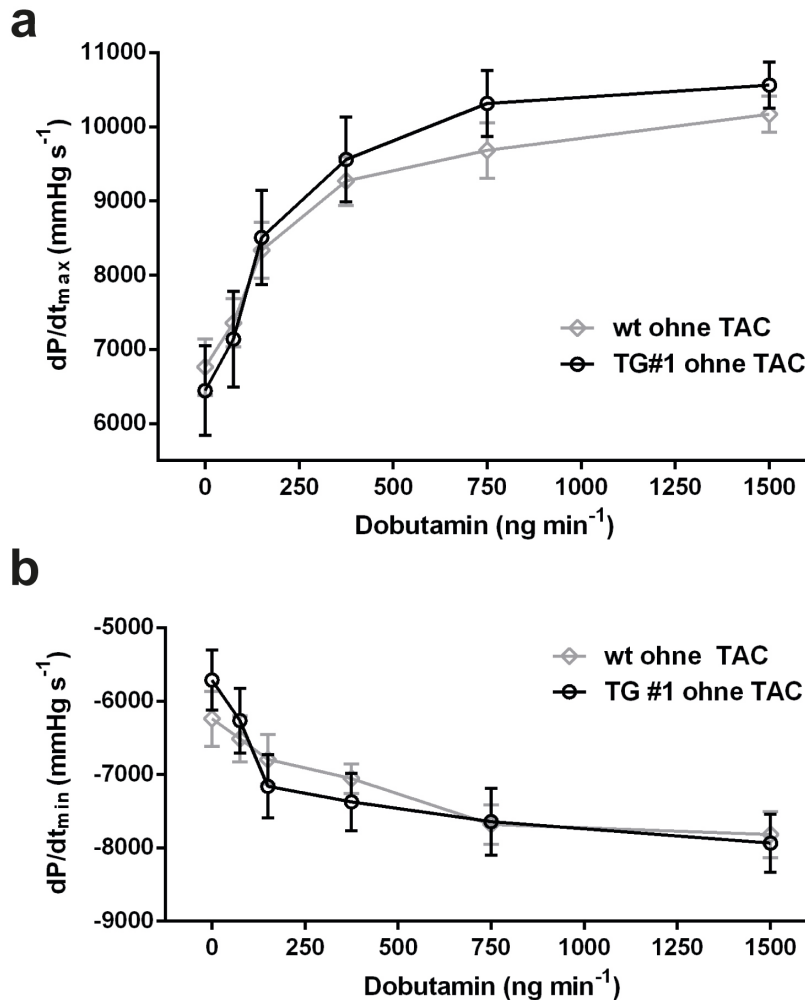


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven für dP/dt_{max} und dP/dt_{min} nach Dobutamin-Infusion bei Mäusen der Linie 1 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ohne TAC

Durch Druckmessung im linken Ventrikel bestimmte Geschwindigkeit des Druckanstiegs und Druckabfalls pro Zeiteinheit als Maß für die Kontraktilität (dP/dt_{max} , **a**) und Relaxation (dP/dt_{min} , **b**) des linken Ventrikels von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen der Linie 1 mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne TAC. $n = 10$ Mäuse pro Gruppe.

Beginnend auf höherem Niveau verlief die Kurve von Mäusen mit TAC der Linie 1 und der Wildtyp-Kontrolle ebenfalls ähnlich (**Abb. 18**). Erst bei hohen Dobutaminkonzentrationen zeigten sich nicht signifikante leichte Unterschiede der Kontraktilität und der Relaxation zwischen den beiden Gruppen, wobei dies bei Berücksichtigung des hohen Standardfehlers der Linie 1 wahrscheinlich auf zu geringe Fallzahlen zurückzuführen ist.

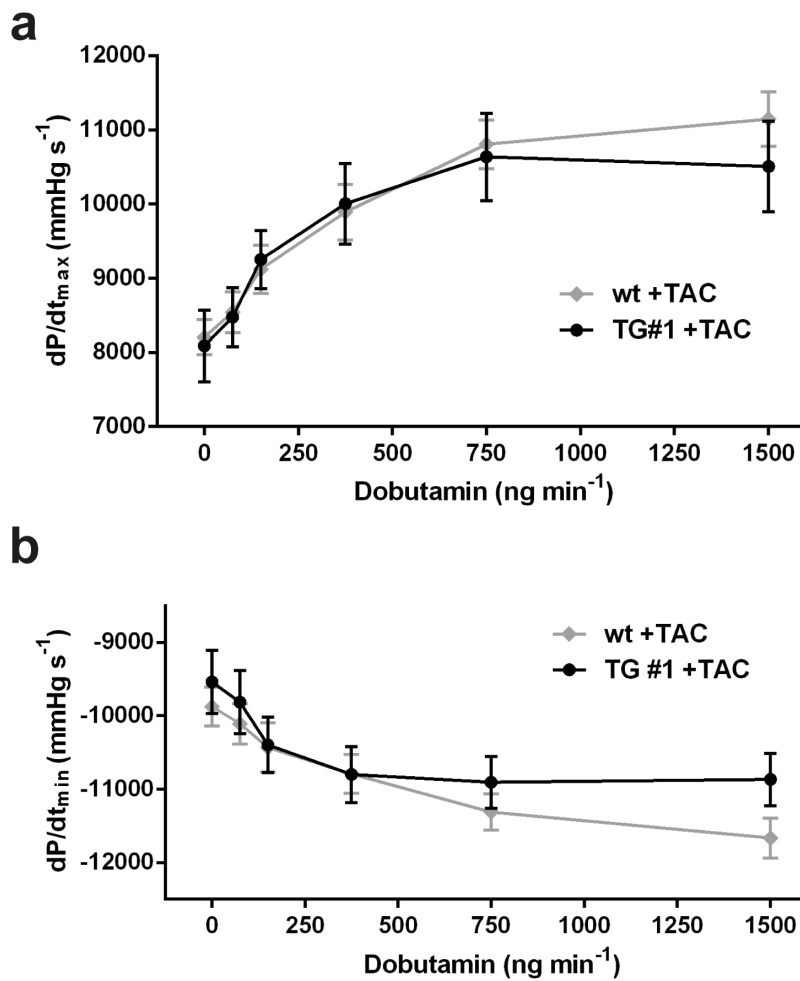


Abb. 18: Dosis-Wirkungskurven für dP/dt_{max} und dP/dt_{min} nach Dobutamin-Infusion bei Mäusen nach TAC der Linie 1 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit TAC.

Durch Druckmessung im linken Ventrikel bestimmte Geschwindigkeit des Druckanstiegs und Druckabfalls pro Zeiteinheit als Maß für die Kontraktilität (dP/dt_{max} , **a**) und Relaxation (dP/dt_{min} , **b**) des linken Ventrikels von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen der Linie 1 mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} sechs Wochen nach TAC. $n = 8-13$ Mäuse pro Gruppe.

ERK2^{Δ174-177}-transgene Mäuse der Linie 1 ohne TAC, aber auch nach TAC-Operation, zeigten eine vergleichbare Geschwindigkeit des Druckanstiegs und Druckabfalls wie Wildtyp-Mäuse. Diese Resultate veranschaulichen, wie bereits in den Echokardiographie-Daten ohne Dobutaminstress, dass ERK2^{Δ174-177} auch unter Stress keinen negativen Einfluss auf die Herzfunktion hat.

Die für Linie 1 erzielten Ergebnisse ließen sich für Linie 3 nur unter basalen Bedingungen reproduzieren. Ohne TAC wiesen die transgenen Mäuse der Linie 3 analog zur Linie 1 sowohl in der Geschwindigkeit des Druckanstiegs, als auch

des Druckabfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle auf (**Abb. 19**).

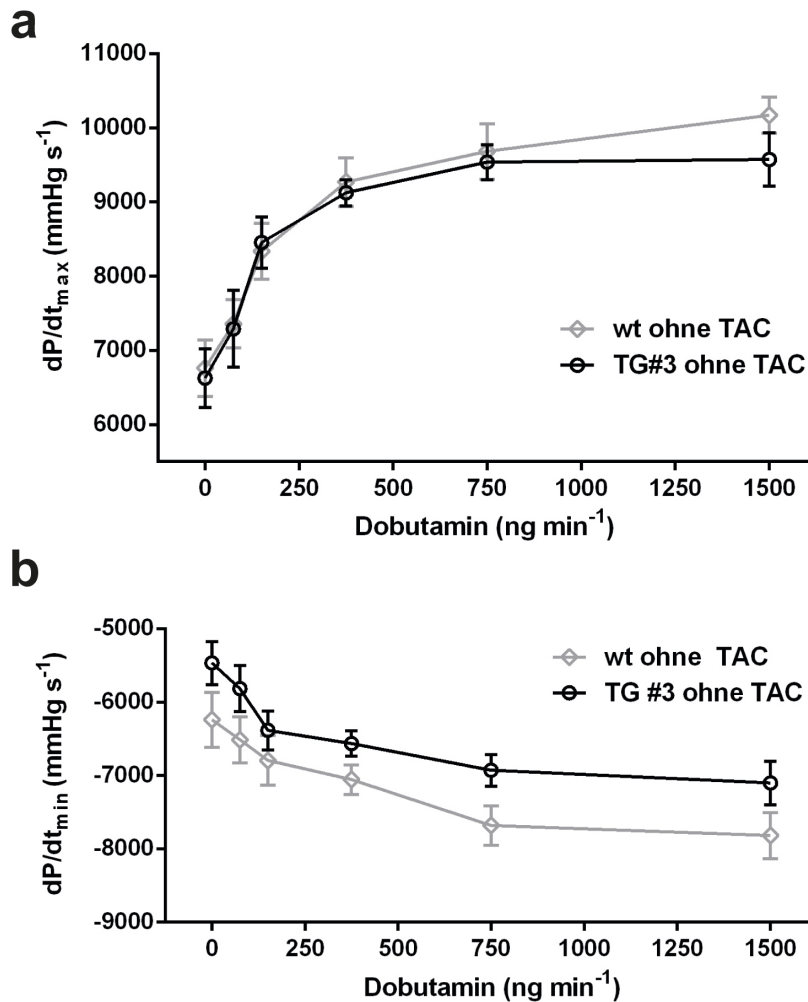


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurven für dp/dt_{max} und dp/dt_{min} nach Dobutamin-Infusion bei Mäusen der Linie 3 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ohne TAC

Durch Druckmessung im linken Ventrikel bestimmte Geschwindigkeit des Druckanstiegs und Druckabfalls pro Zeiteinheit als Maß für die Kontraktilität (dp/dt_{max} , **a**) und Relaxation (dp/dt_{min} , **b**) des linken Ventrikels von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen der Linie 3 mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne TAC. $n = 6-10$ Mäuse pro Gruppe.

Bei den Mäusen der Linie 3 mit TAC bestand unter steigender Dobutamingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein durchgehend signifikant reduzierter Anstieg des Kontraktionsverhaltens und ein teilweise signifikant reduziertes Relaxationsverhalten der Mäuse mit TAC (**Abb. 20**).

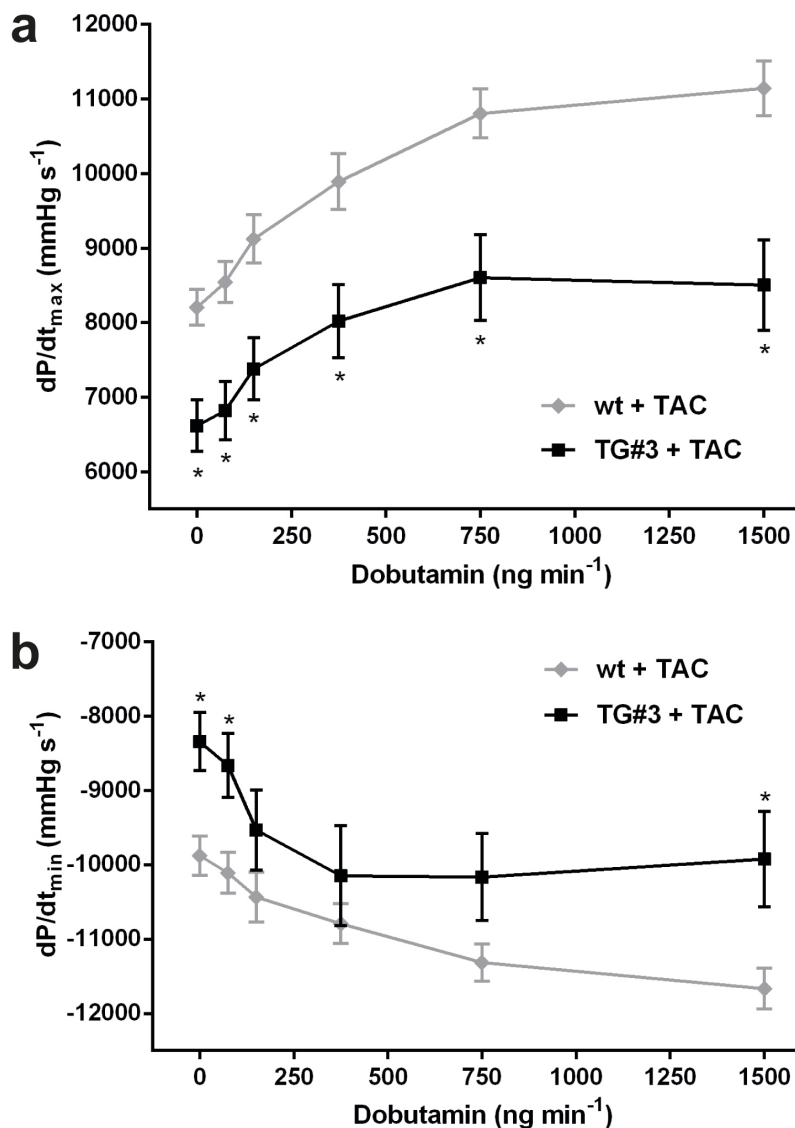


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven für dP/dt_{max} und dP/dt_{min} nach Dobutamin-Infusion bei Mäusen nach TAC der Linie 3 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit TAC

Durch Druckmessung im linken Ventrikel bestimmte Geschwindigkeit des Druckanstiegs und Druckabfalls pro Zeiteinheit als Maß für die Kontraktilität (dP/dt_{max} , **a**) und Relaxation (dP/dt_{min} , **b**) des linken Ventrikels von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen der Linie 3 mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} sechs Wochen nach TAC. $n = 10-13$ Mäuse pro Gruppe. * $P < 0,05$ gegenüber wt + TAC.

3.4. Kardiale Überexpression von ERK2^{Δ174-177} stört das physiologische Herzwachstum nicht

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich durch die Inhibition der Dimerisierung von ERK2 kardiale Hypertrophie aufgrund chronischer Drucküberladung reduzieren lässt, sollte nachfolgend herausgefunden werden, wie sich das Herz bezüglich Hypertrophie und Funktion unter

Dimerisierungsdefizienz von ERK2 im Rahmen physiologischer Stimulation verändert. Hierzu wurde ein Laufradversuchsaufbau gewählt, in welchem Wildtyp- und ERK2^{Δ174-177}-Mäuse in einem Käfig mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten wurden.

3.4.1. ERK2^{Δ174-177}-Mäuse zeigen nach Laufradtraining das gleiche Ausmaß an kardialer Hypertrophie wie die Wildtyp-Kontrollgruppe

Ähnliche Kardiomyozytengröße im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Zur Evaluation des Einflusses von monomerem ERK2 auf physiologische Hypertrophieprozesse wurde analog zur TAC-Versuchsreihe die Kardiomyozytengröße von Mäusen mit und ohne Zugang zu einem Laufrad erfasst. Hierfür wurde die Fläche von durchschnittlich 37 Kardiomyozyten pro Tier in HE-gefärbten histologischen Herzquerschnitten ausgemessen. Bei statistischem Vergleich aller Gruppen, zeigte sich bei den Mäusen ohne Zugang zu einem Laufrad gegenüber den Mäusen mit Zugang zu einem Laufrad eine signifikant höhere Kardiomyozytengröße. Im Gegensatz zu den Mäusen mit TAC (**Abb. 12**) fand sich bei der Kardiomyozytenvermessung der transgenen Mäuse mit Zugang zu einem Laufrad keine verringerte, sondern eine Kardiomyozytengröße von gleicher Dimension wie die der Kontrollgruppe (**Abb. 21**). Auch ohne Zugang zu einem Laufrad konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der transgenen Linie 1 erkannt werden.

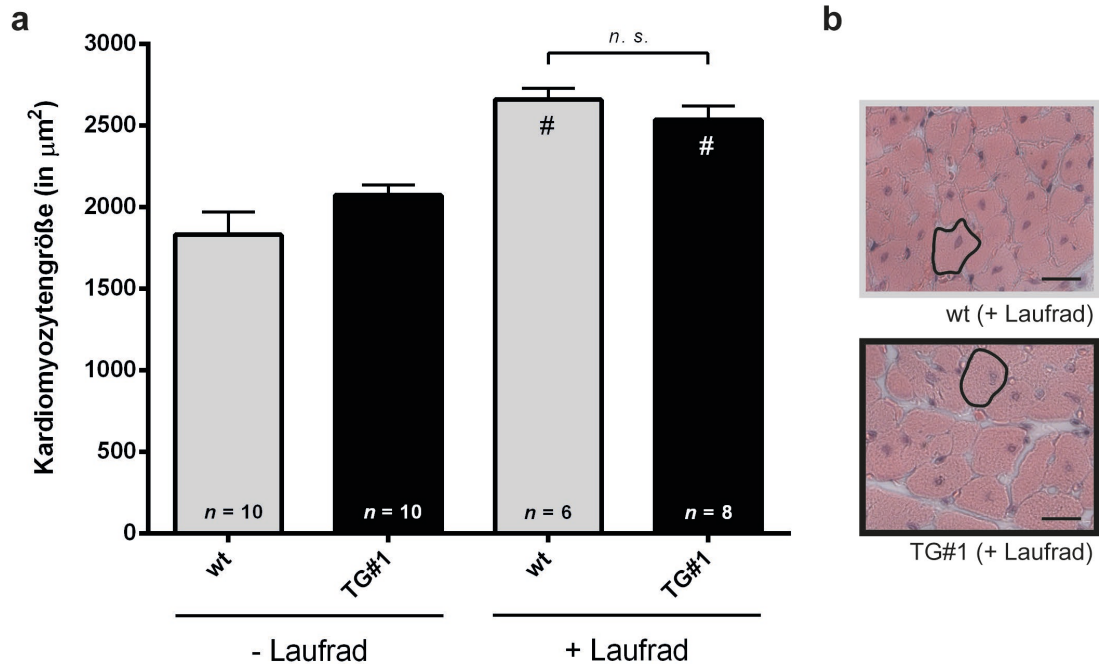


Abb. 21: Quantifizierung der Kardiomyozytengröße an histologischen Schnitten ohne und 3 Wochen mit Laufradversuch

Morphometrisch erfasste Kardiomyozytengröße von Wildtyp-Mäusen und einer Linie transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2 $\Delta^{174-177}$ ohne und drei Wochen nach freiwilliger körperlicher Betätigung im Laufrad. # $P < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe ohne Laufradzugang (b) Repräsentative histologische Beispielschnitte linksventrikulären Myokards nach drei Wochen Laufradversuch. HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 50 μm .

Ähnliches Hypertrophieausmaß im Herz-Echo im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Auch die Analyse der interventrikulären Septumdicke und der Dicke der linksventrikulären Hinterwand mittels Echokardiographie zeigte keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Hypertrophieentwicklung nach Laufradtraining durch Expression von monomerem ERK2 (**Abb. 22**). So wiesen sowohl die Wildtyp-Mäuse, als auch die Mäuse mit ERK2 $\Delta^{174-177}$ -Überexpression eine signifikante Wanddickenzunahme von ähnlichem Ausmaß auf. Ein weiterer Hinweis dafür, dass durch ERK2 $\Delta^{174-177}$ keine Beeinträchtigung der physiologischen kardialen Hypertrophie erfolgt. In den beiden Gruppen ohne Laufradzugang fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

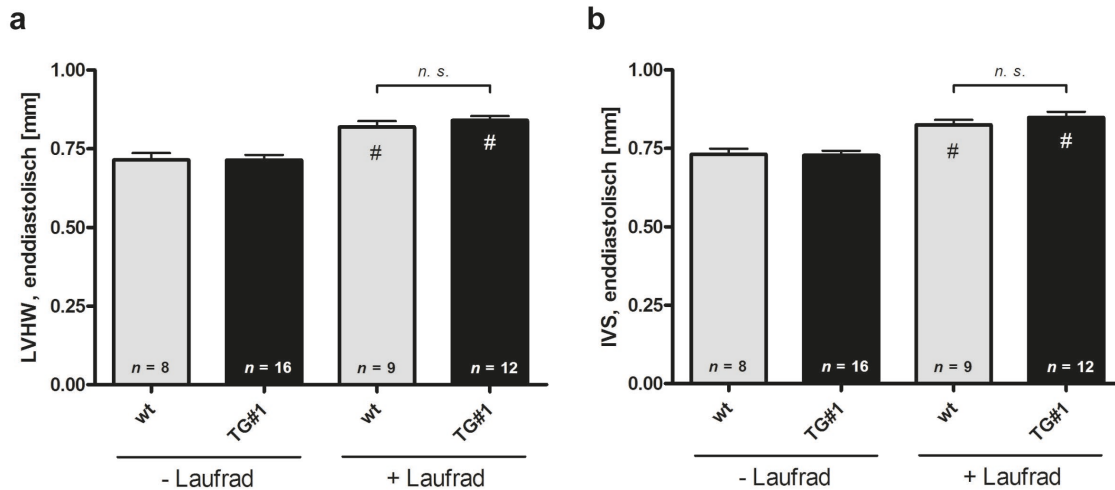


Abb. 22: Interventrikuläres Septum und linksventrikuläre Hinterwand ohne und nach 3-wöchigem LaufRADtraining

Erfassung der enddiastolischen interventrikulären Septumdicke (IVS, **a**) und der enddiastolischen Dicke der linksventrikulären Hinterwand (LVHW, **b**) anhand von M-Mode-Bildern ohne und drei Wochen nach freiwilliger körperlicher Betätigung im LaufRAD. # $P < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe ohne LaufRADzugang.

Ähnliches Herzgewicht im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

Durch Vergleich des Herzgewichts der Mäuse normiert auf Tibiallänge (**Abb. 23a**) und Körpergröße (**Abb. 23b**) konnte bestätigt werden, dass zwischen den transgenen und Wildtyp-Mäusen mit LaufRADzugang keine signifikanten Unterschiede vorliegen. Zwischen den Gruppen ohne LaufRADzugang ließ sich wiederholt kein signifikanter Unterschied feststellen. Methodisch interessant ist, dass das Herzgewicht bezogen auf die Tibiallänge einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne LaufRAD im wechselseitigen Vergleich zeigt, wohingegen der Bezug zum Körpergewicht bei Wildtyp-Mäusen ohne LaufRADzugang im Vergleich zur Gruppe mit LaufRADzugang keine statistische Signifikanz erreichte. Dies zeigt, wie anfällig das Verhältnis Herzgewicht-zu-Körpergewicht auf äußere Einflüsse ist, die das Körpergewicht verändern, wie beispielsweise körperliches Training. Dahingegen ist der Bezug zur Tibiallänge aufgrund der Unveränderlichkeit der Tibiallänge durch äußere Umstände ein weniger stör anfälliger Parameter.¹⁴²

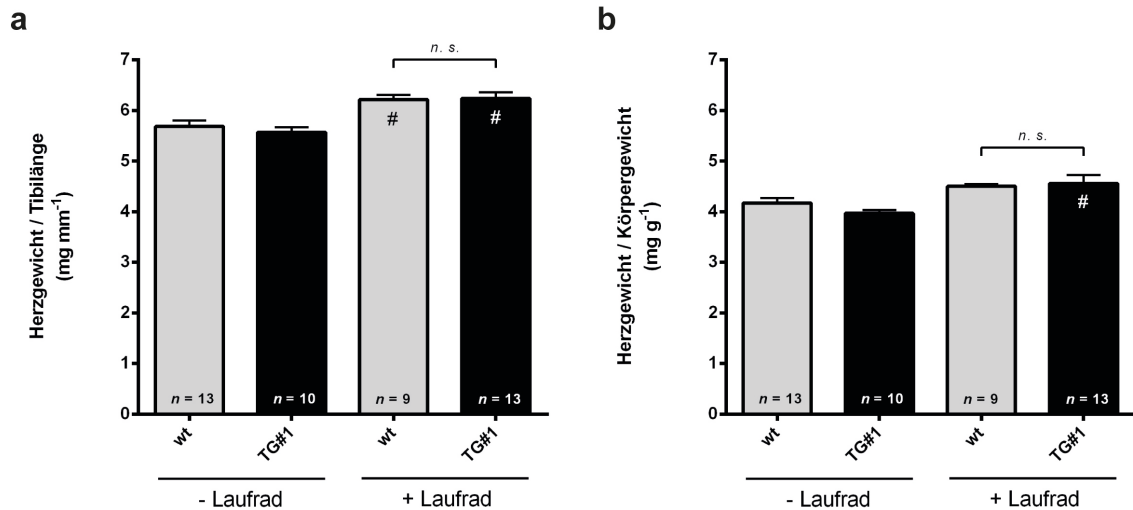


Abb. 23: Herzgewicht bezogen auf Tibialänge und Körpergewicht ohne und nach 3-wöchigem Lauftraining

Untersuchung der Herzgewicht/Tibialänge- und Herzgewicht/Körpergewicht-Quotienten von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne und drei Wochen nach freiwilliger körperlicher Betätigung im Lauftraining. # $P < 0,05$ gegenüber Kontrollgruppe ohne Lauftraining.

Betrachtet man das Herzgewicht normiert auf die Tibialänge von **Abb. 23a** (Lauftraining) im Vergleich zu **Abb. 14a** (TAC) zeigen sich deutliche Unterschiede: Die chronische Drucküberladung führte zu einer weitaus stärkeren Herzgewichtszunahme als körperliches Training. Zu berücksichtigen ist, dass die Tiere unter TAC nach Abschluss des Versuchs 14 Wochen, die Lauftraining-Tiere 11 Wochen alt waren, der von extern eingeführte Stimulus also bei den TAC-Tieren 3 Wochen länger wirkte.

Die Resultate zu kardialer Hypertrophie in Histologie, Echokardiographie und Herzgewicht-Indizes begründen die Annahme, dass durch die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 pathologischer Hypertrophie entgegengewirkt werden kann, physiologische Hypertrophieprozesse jedoch von dieser unbeeinflusst bleiben.

Im arithmetischen Mittel \pm Standardfehler legten Wildtyp-Mäuse eine Distanz von $15,7 \pm 1,0$ km pro Tag und die transgenen Mäuse eine Distanz von $13,3 \pm 1,2$ km pro Tag zurück. Trotz leicht jedoch statistisch nicht signifikant geringerer Laufanstrengung der Mäuse der transgenen Linie 1 wurde das gleiche trainingsinduzierte Hypertrophieausmaß wie das der Wildtyp-Kontrolle erreicht.

3.4.2. ERK2^{Δ174-177}-Mäuse zeigen nach Laufradtraining keine Unterschiede in der kardialen Funktion in der Echokardiographie im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

In der Beurteilung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie zeigte auch im Laufradversuch keine Reduktion der linksventrikulären systolischen Verkürzungsfraction von transgenen ERK2^{Δ174-177}-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch zwischen transgener Gruppe und Wildtyp-Kontrollgruppe jeweils ohne Laufradzugang fand sich kein signifikanter Unterschied (**Abb. 24**).

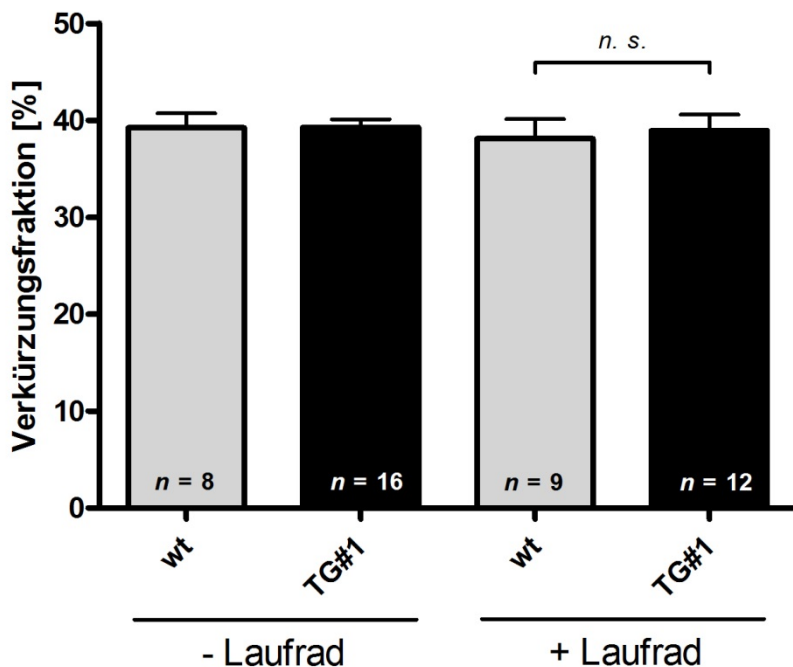


Abb. 24: Linksventrikuläre systolische Verkürzungsfraction (Fractional shortening, FS) vor und nach Laufradversuch
Kontraktilität von Wildtyp und transgenen Mäusen der Linie 1 mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} vor und drei Wochen nach freiwilliger körperlicher Betätigung im Laufrad.

Unter Ruhebedingungen fand sich somit weder in der Kontrollgruppe noch in der Gruppe der transgenen Mäuse ein Zuwachs an Kontraktilität durch physiologische Hypertrophie im Rahmen der Laufradnutzung.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Dimerisierungsdefizienz des ERK2-Proteins auf kardiale Hypertrophie und Zellüberleben untersucht. Im Folgenden sollen die in Kapitel 3 beschriebenen gewonnenen Erkenntnisse genauer beleuchtet, kritisch hinterfragt und in einen übergeordneten Zusammenhang gesetzt werden.

4.1. Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in pathologischer kardialer Hypertrophie

Pathologische kardiale Hypertrophie gilt nach Ergebnissen aus der Framingham-Studie als wichtiger unabhängiger Risikofaktor für vorzeitigen Tod.^{143, 144} *Vakili et al.* haben in einer systematischen Übersichtsarbeit, in welcher 20 Studien im Zeitraum zwischen 1960 und 2000 analysiert wurden, die negativen prognostischen Auswirkungen von linksventrikulärer Hypertrophie hinsichtlich Morbidität und Mortalität aufgezeigt.¹⁴⁵ Mehrere Studien weisen gleichzeitig darauf hin, dass für den Erhalt der kardialen Funktion als Reaktion auf chronische Drucküberladung keine Hypertrophie notwendig ist.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Deshalb gilt es mögliche therapeutische Zielstrukturen zu finden, die unmittelbar mit pathologischer Hypertrophie interagieren.

Ein Zusammenhang zwischen kardialer Hypertrophie und ERK1/2 wurde 2000 erstmals *in vivo* von *Bueno et al.* nachgewiesen.⁸⁵ Jüngste Ergebnisse unterstreichen ebenso wie die in Kapitel 1.3 aufgeführten Untersuchungen die bedeutende Rolle von ERK1/2 in kardialen Hypertrophieprozessen. So ließ sich die durch Nährmedium mit erhöhter Phosphatkonzentration hervorgerufene Zellgrößenzunahme in Kardiomyoblasten der Zelllinie H9c2 mittels des selektiven ERK1/2-Inhibitors U0126 signifikant reduzieren.¹⁴⁹ Ebenso konnte *in vitro* durch Unterdrückung der Expression des Transkriptionsregulationsproteins ANKRD1 die Phenylephrin-induzierte Hypertrophie über den ERK1/2-Signalweg signifikant vermindert werden. Dies ließ sich *in vivo* durch Knockout-Experimente bestätigen.¹⁵⁰

Als zentralen Regulationsmechanismus für ERK1/2-vermittelte kardiale Hypertrophie konnten *Lorenz et al.* die ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung identifizieren.⁶⁷ Wie in Kapitel 1.2.6 dargelegt, scheint die ERK1/2-Dimerisierung eine entscheidende Vorbedingung für diese ERK^{Thr188}-Autophosphorylierung zu sein. Die Untersuchung der Unterbindung dieser Dimerisierung stellt somit einen interessanten Ansatz zur Verminderung von pathologischer kardialer Hypertrophie dar.

Zunächst erfolgte hierfür die Untersuchung *in vitro* anhand von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte. Die Daten zeigen eine signifikant verminderte Proteinsynthese in ERK2^{Δ174-177}-transduzierten Zellen gegenüber ERK2^{wt}-transduzierten Zellen nach Stimulation mit Phenylephrin oder Endothelin-1 (**Abb. 10**), gängigen Hypertrophie induzierenden Rezeptoragonisten, die über den ERK1/2-Signalweg die Proteinsynthese in Gang setzen können.^{89, 151, 152}

Die in Primärzellen gezeigte Hemmung von Hypertrophieentwicklung sollte im Anschluss daran im lebenden Organismus verifiziert werden. Zur Erzeugung pathologischer Hypertrophie diente ein Mausmodell mit chronischer Drucküberladung durch TAC. Nach der Laplace-Beziehung wird die erhöhte ventrikuläre Wandspannung durch die operativ erzeugte Aortenverengung mit einer Zunahme der Ventrikelwandstärke im Sinne einer zunächst kompensatorisch wirkenden Hypertrophie ausgeglichen.¹⁵³ Die Erfassung der linksventrikulären Hypertrophie mittels Echokardiographie bekräftigte die *in vitro* Versuche, indem sich auch hier eine verringerte kardiale Hypertrophie infolge linksventrikulärer Druckbelastung in Mäusen mit kardialer Überexpression von dimerisierungsdefizientem ERK2^{Δ174-177} im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle zeigte (**Abb. 13**). Die Ausmessung der Kardiomyozytengröße (**Abb. 12**) bestätigte ebenso wie die auf Tibialänge und Körpergröße normierten Herzgewichte (**Abb. 14**) die signifikante Verminderung von kardialer Hypertrophie durch Unterbindung der ERK2-Dimerisierung. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine monomere Mutante von ERK2 ein vermindertes Ausmaß an kardialer Hypertrophie als Antwort auf chronische Druckbelastung und damit pathologische kardiale Hypertrophie hervorruft. Wie hat man sich jedoch die Veränderung des Signalprozesses hin zu weniger

pathologischer kardialer Hypertrophie unter Beteiligung von dimerisierungsdefizientem ERK2 vorzustellen? Welche Vorgänge werden durch die ERK2-Dimerisierungsdefizienz umorganisiert? Wie in der Einleitung zu dieser Arbeit dargestellt, ist die Induktion von Herzwachstum durch ERK1/2 auf die Transkription nukleärer DNA mithilfe von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 angewiesen.⁷⁵ Prozesse wie diese scheinen durch die Dimerisierungsinhibition von ERK2 eingedämmt zu werden. Wahrscheinlich aufgrund der bereits von *Khokhlatchev et al.* beschriebenen Tatsache, dass die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 mit einer reduzierten nukleären Lokalisation von ERK1/2 einhergeht.⁷⁶ Beispielsweise an den Ergebnissen des [³H]-Isoleucineinbau-Versuchs konnte man dies bereits indirekt ablesen: Da die Phenylephrin- oder Endothelin-1-induzierte Proteinsynthese abhängig von der Genexpression ist, diese jedoch eine im Zellkern stattfindende Transkription erfordert, war sie möglicherweise durch ERK2^{Δ174-177}-Überexpression vermindert, da hierdurch eine nukleäre Translokation minimiert wurde. Im Anschluss an diese Arbeit erhobene Daten aus unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass durch Unterbindung der Dimerisierung von ERK2 keine Nukleustranslokation der Mutante möglich ist. So konnte anhand von YFP-markiertem ERK2^{Δ174-177} gezeigt werden, dass dieses im Gegensatz zu Wildtyp-ERK2 keine Akkumulation im Nukleus nach Carbachol-Stimulation aufwies (*Antje Kremer, nicht publizierte Daten*). Die Aufklärung des Ablaufs der Translokation von ERK1/2 in den Zellkern sollte somit von in weiteren Studien zu prüfendem hohen Interesse sein. Wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist bereits, dass die ERK2-Dimerisierungsdefizienz einen nennenswerten Einfluss auf pathologische Hypertrophieprozesse hat. Zudem ist zu vermuten, dass von der ERK2-Dimerbildung eine zentrale Bedeutung für die subzelluläre Kompartimentierung von ERK1/2 ausgeht.

4.2. Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in kardialer Apoptose

Die Untersuchung der Beteiligung von ERK1/2 am apoptotischen Geschehen ist vor allem deshalb interessant, da intensiv an möglichen Zielstrukturen zur Beeinflussung der Apoptoseeinleitung im Herzmuskel geforscht wird, um zu

klären, ob sich durch therapeutische Blockade der Apoptose beispielsweise der Fortschritt zur dekompensierten Herzinsuffizienz verhindern lässt.¹⁵⁴ Anhand der Aufhebung anti-apoptotischer Effekte durch kardial begrenzten Knockout des Zytokinrezeptors gp130 (Glykoprotein 130) in Mäusen konnten *Hirota et al.* unter chronischer Druckbelastung die Entwicklung von massivem apoptotischen Zelluntergang in der Ventrikelwand hin zur dilatativen Kardiomyopathie zeigen.¹⁵⁵ Eine der Effektorinasen von gp130 ist ERK.¹⁵⁶ Dies verdeutlicht, welche Rolle anti-apoptotische Signale für die Funktion des Herzmuskels spielen und welche Möglichkeiten eine Beeinflussung des Apoptose-Signalweges, beispielsweise über ERK1/2, zur Behandlung und Verhinderung von Herzerkrankungen bieten könnte, aber auch, welche potentiellen Gefahren vom Eingriff in die ERK1/2-Funktion ausgehen.

Verschiedene Methoden wurden bereits zur Identifizierung von apoptotischen Zellen beschrieben, wie die Erfassung der Caspase-Aktivierung oder die Messung von pro- und anti-apoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie. Daneben wird die DNA-Fragmentierung als das biochemische finale Schlüsselereignis betrachtet, welches in der Spaltung von Kern-DNA in DNA-Bruchstücke um 180 Basenpaare resultiert.¹⁵⁷ Eine häufig angewendete Methode zur Erfassung dieser DNA-Bruchstücke ist der DNA-Leiter-Nachweis nach Agarosegel-Elektrophorese. Diese Methode eignet sich aber nicht für die individuelle Betrachtung einer Zelle bzw. den Nachweis von Apoptose in histologischen Schnitten. Durch die TUNEL-Methodik ist dies jedoch kardiomyozytenspezifisch möglich.¹⁵⁸ Bei der Bewertung der Resultate ist allerdings zu beachten, dass der TUNEL-Assay durch die mögliche Erfassung von nekrotischen Zellen zu falsch-positiven Resultaten führen kann.¹⁵⁹ Seine weite wissenschaftliche Verbreitung und die damit einhergehende Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowie seine hohe Sensitivität machen ihn bei standardisierter Anwendung dennoch zu einer etablierten Apoptose-Detektions-Methode.

Die Ergebnisse zeigen, dass die dimerisierungsdefiziente ERK2-Mutante die kardiale Apoptose nicht beeinflusst und somit kein negativer Einfluss auf das Zellüberleben von ERK2^{Δ174-177} ausgeht. Vielmehr noch illustriert der Graph

(Abb. 15), dass die Expression von ERK2 Δ 174-177 eine deutliche, allerdings nicht signifikante Tendenz zu einem geringeren Apoptoseanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe unter TAC zur Folge hat. Berechnet man die Effektstärken (Cohens d) als ein Maß für die Bedeutsamkeit des Unterschiedes, so ergibt sich für den Vergleich zwischen wt (+TAC) und TG#1 (+ TAC) die Effektstärke $d = 0,69$, für wt (+ TAC) gegen TG#3 (+TAC) $d = 0,81$. Diese relativ hohen Effektstärken weisen auf deutliche Unterschiede hin, sodass durch eine Erhöhung des Stichprobenumfanges eventuell ein signifikantes Ergebnis zugunsten einer geringeren Apoptoserate durch ERK2 Δ 174-177 unter TAC erzielt werden könnte. Dies könnte bedeuten, dass von der Dimerisierungsdefizienz von ERK1/2 sogar eine zusätzliche Zellprotektion ausginge. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass eine möglicherweise reduzierte Apoptoserate nicht nur durch die Dimerisierungsinhibition, sondern auch durch die Überexpression von ERK2 Δ 174-177 erklärbar wäre. Somit müsste zur genaueren Evaluation dieses Sachverhaltes der Versuch um eine Kontrollgruppe mit transgener ERK2^{wt}-Überexpression ergänzt werden. Die Ergebnisse legen jedoch bereits jetzt nahe, dass trotz Dimerisierungsdefizienz die zytoplasmatisch lokalisierte anti-apoptotische Funktion von ERK1/2 erhalten bleibt. Mit anderen Worten weist das Ergebnis darauf hin, dass für zytoplasmatische Funktionen wie die Apoptoseprotektion eine Dimerisierung von ERK1/2 scheinbar nicht notwendig ist, jene vielleicht sogar generell als Monomer stattfinden.

4.3. Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in kardialer Fibrosierung

Ein wichtiger morphologischer Parameter zur Erfassung der kardialen Funktionalität ist das Ausmaß an interstitieller kardialer Fibrose. Im Rahmen kardialer Erkrankungen nimmt die Fibrosierung des Herzens zu, was mit einer eingeschränkten Herzleistung einhergeht. Um zu klären, ob die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 eine Bedeutung für interstitielle Fibrosierungsprozesse hat, erfolgte ein Vergleich des Fibrosegrades an Sirius-Rot gefärbten histologischen Schnitten wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben. Mithilfe dieser Färbemethode lässt sich der Bindegewebeanteil eines histologischen Präparates durch Rotfärbung detektieren.

Unter basalen Bedingungen fand sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied an interstitieller Fibrosierung. Interessanterweise zeigte sich auch nach Aortenligation in den histologischen Schnitten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und transgenen Mäusen. So wiesen alle drei Gruppen unter TAC im arithmetischen Mittel eine Intensität an interstitieller Fibrosierung um 17% auf (wt [+ TAC]: $16,59 \pm 1,94\%$, TG#1 [+ TAC]: $16,96 \pm 1,83\%$, TG#3 [+ TAC]: $17,28 \pm 1,88\%$), ohne TAC um 4,5% (wt [- TAC]: $4,26 \pm 0,91\%$, TG#1 [- TAC]: $4,93 \pm 0,64\%$, TG#3 [- TAC]: $4,24 \pm 0,61\%$), womit es zu einem gruppenunabhängigen hochsignifikanten Anstieg der kardialen Fibrose unter Aortenligation kam (**Abb. 25**).

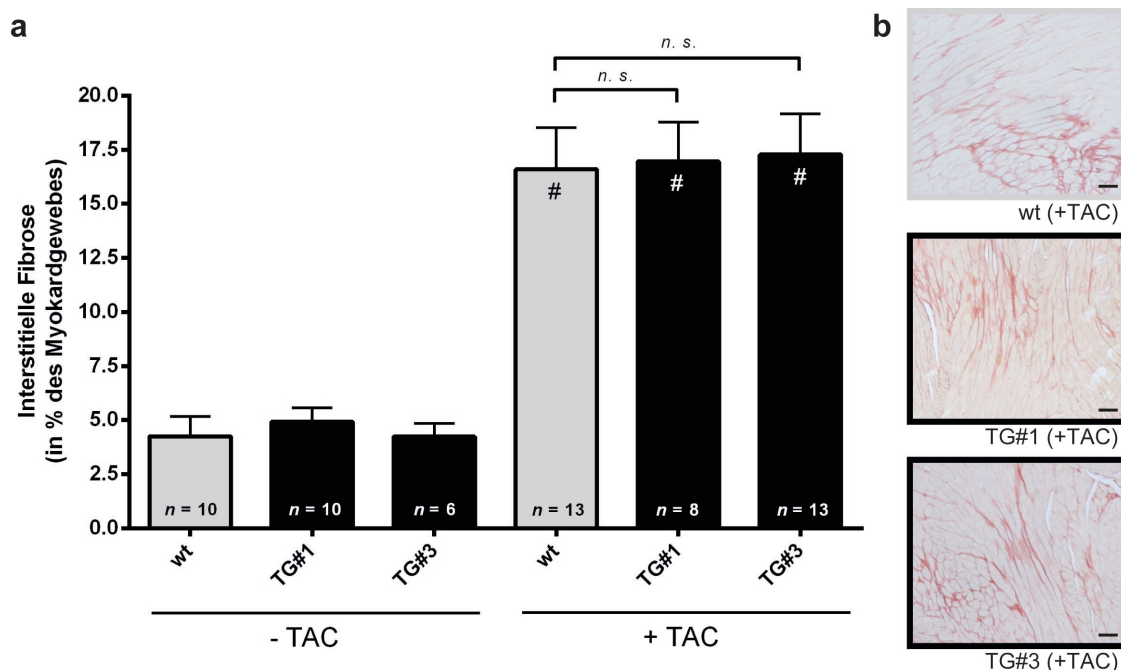


Abb. 25: Quantifizierung von interstitieller Fibrose an histologischen Schnitten ohne und mit TAC
(a) Analyse interstitieller Fibrose im Myokard von Wildtyp-Mäusen und zwei unabhängigen Linien transgener Mäuse mit Überexpression von ERK2^{Δ174-177} ohne und sechs Wochen nach TAC. Pro Tier erfolgte die Auswertung an zwei Schnitten mit je vier Bildern. # $P < 0,001$ gegenüber Kontrollgruppe ohne TAC. **(b)** Repräsentative histologische Beispielschnitte linksventrikulären Myokards nach sechs Wochen TAC. Sirius-Rot-Färbung, 50-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 150 μm .

Obwohl also in transgenen Mäusen durch die ERK2^{Δ174-177}-Mutante das Ausmaß an Hypertrophie deutlich vermindert war und sich kein negativer Einfluss auf die zell-protectiven Effekte von ERK1/2 zeigte, entsprach die interstitielle Fibroserate dieser dimerisierungsdefizienten ERK2-Mutante der der Wildtyp-Mäuse. Drei unabhängige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe im

Anschluss an diese Arbeit konnten dies nicht bestätigen, sondern zeigten vielmehr eine Reduktion von interstitieller kardialer Fibrose und von Fibrosemarkern unter Expression von ERK2^{Δ174-177} im Vergleich zu Wildtyp-ERK2. So konnte ein signifikant geringeres Expressionsausmaß von Kollagen-3 – als Markerprotein für Fibrosierung – in ERK2^{Δ174-177} im Vergleich zu Wildtyp in Mäuseherzen nach TAC gezeigt werden (*Susanne Homann, nicht publizierte Daten*). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der im Nachgang an diese Arbeit erzielten Ergebnisse zu den in dieser Arbeit erfassten Daten stellt die unterschiedliche Färbung der histologischen Schnitte dar. Da apoptotische Zellen über parakrine Signale und durch Zytokin-Ausschüttung der sie phagozytierenden Makrophagen die Proliferation von Fibroblasten bewirken¹³⁰, ist zu berücksichtigen, dass die Resultate von Fibrose und Apoptose miteinander korrelieren müssten.

Generell sollte an Signalwegen geforscht werden, die zu interstitieller Fibrosierung im Herzen führen, um eine Einordnung der genannten Ergebnisse und die Detektion möglicher weiterer Beeinflussungen des ERK1/2-Signalweges durch andere Transduktionskaskaden zu ermöglichen. Dies nicht zuletzt auch deswegen, da eine direkte Interaktion mit kardialem *Remodeling* und dessen wesentlichem Bestandteil Fibrose eine aussichtsreiche Therapiestrategie für Herzerkrankungen darstellt.

4.4. Einfluss von ERK2^{Δ174-177} auf kardiale Funktionsparameter

Neben der Auswirkung der Dimerisierungsdefizienz von ERK2 auf die Morphologie des Herzens war es von weiterem Interesse deren Effekt auf die kardiale Funktion zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst echokardiographisch die linksventrikuläre systolische Verkürzungsfraction untersucht. Diese ist ein Maß, um die Kontraktilität des Herzens beurteilen zu können. Die Echokardiographie-Ergebnisse zeigten ein Gruppen- und Stimulus-übergreifendes gleiches Kontraktionsverhalten (**Abb. 16**). Unter Ruhebedingungen, wie dies bei der Echokardiographie der Fall war, ist jedoch eine Maskierung von Kontraktilitätsstörungen möglich. Zudem ist die Verkürzungsfraction insbesondere von der linksventrikulären Vor- und Nachlast

aber auch von der Herzfrequenz abhängig.¹⁶⁰ Daher wurden die Ergebnisse der Echokardiographie durch eine Linksherzkatheter-Untersuchung validiert. Die Analyse der Linksherzkatheter-Untersuchung ergab in Analogie zu den Echokardiographiedaten bei der transgenen Linie 1 keine kardialen Funktionseinschränkungen durch monomeres ERK2 gegenüber Wildtyp. So findet sich weder in Ruhe, noch unter Dobutamin-Stressbedingungen eine Verminderung der Funktionsparameter zwischen den Untersuchungsgruppen. Das spiegelt sich sowohl in einer vergleichbaren Druckanstiegsgeschwindigkeit, als auch Druckabfallgeschwindigkeit von ERK2^{Δ174-177} und Wildtyp als Maß für kardiale Kontraktion und Relaxation (**Abb. 17** und **Abb. 18**) wieder.

Berücksichtigt man die bisherigen Ergebnisse, dass durch monomeres ERK2 pathologische kardiale Hypertrophie vermindert wird, die anti-apoptische Wirkung und kardiale Funktion gleichzeitig erhalten bleiben, eröffnet sich mit der Hemmung der Dimerisierung von ERK2 ein potentiell erfolgsversprechender therapeutischer Angriffspunkt für ERK1/2 vermittelte kardiale Hypertrophie.

Einschränkend muss selbstverständlich erwähnt werden, dass dies für die transgene Linie 3 in den Katheter-Ergebnissen nicht zutreffend ist. Hier fand sich unter zunehmender Stresstimulation durch Dobutamin im Vergleich zur Kontrollgruppe ein reduzierter Anstieg der Kontraktion und Relaxation (**Abb. 20**), wohingegen in der unter Ruhebedingungen durchgeführten echokardiographischen Untersuchung das Kontraktionsausmaß dem von Wildtyp und Linie 1 entspricht (**Abb. 16**). Die isoliert in dieser transgenen Linie unter Stressbedingungen auftretende kombiniert systolische und diastolische Dysfunktion zwingt die Frage auf, wieso dies in Linie 3 so ist, obwohl beide Linien auf dem gleichen transgenen Vektorkonstrukt basieren. Zu berücksichtigen ist, dass das Expressionsniveau von ERK2^{Δ174-177} der Linie 3 um 25% höher liegt, als das der Linie 1 (**Abb. 11**). Vielleicht führt eine zu ausgeprägte Expression des transgenen Konstrukts zur negativen Beeinflussung physiologischer Signalwege und zu einer entsprechenden Reduktion kardialer Funktionalität bei ansonsten gleichem Phänotyp wie Linie 1. Ein wahrscheinlicherer Erklärungsversuch könnte lauten, dass durch Insertion

des transgenen Vektorkonstruktes bei der Generierung der transgenen Linie die Funktion für ein für kardiale Belastung essentielles Gen verloren ging. Entsprechend interessant wäre zu ermitteln, wo das transgene Konstrukt eingebaut wurde. Durch die Transgenlokalisierung in Zusammenhang mit Genorten ist nicht auszuschließen, dass man auf ein bekanntes, oder vielleicht sogar neues für die Kontraktion des Herzens unter Stressbedingungen relevantes Gen stößt. Außerdem wäre interessant im weiteren Verlauf das Überleben der Mäuse der Linie 3 im Vergleich zu Wildtyp und Linie 1 zu beobachten um die Tragweite eventueller Veränderungen durch die Insertion des transgenen Vektors abschätzen zu können. Nicht ausgeschlossen ist jedoch die Option, dass die Funktionsparameter von Linie 3 die Realität widerspiegeln und nicht die der Linie 1. Um dies zu überprüfen, müsste eine neue Linie generiert werden, die unter gleichen Bedingungen entsprechende Versuche durchläuft.

4.5. Die Rolle der ERK2-Dimerisierung in physiologischer kardialer Hypertrophie

Bereits vor über 40 Jahren konnte gezeigt werden, dass Ausdauertraining durch Schwimmen bei Nagern mit einer verbesserten kardialen Leistung einhergeht.¹⁶¹ Erst vor wenigen Jahren wurden erstmals in zwei randomisiert kontrollierten Studien die positiven Auswirkungen von körperlichem Training bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion auf die Lebensqualität, die kardiale Funktionalität und kardiales *Remodeling* gezeigt.^{162, 163} Entsprechend wichtig war es zu untersuchen, ob durch die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 neben pathologischer Hypertrophie auch potentiell kompensatorische physiologische Hypertrophie im Rahmen von Ausdauertraining inhibiert wird. Anhand des Laufradversuchs ist ersichtlich, dass ERK2^{Δ174-177} einen gleichen Zuwachs an physiologischer Hypertrophie unter körperlichem Training hervorruft wie Wildtyp (**Abb. 21 – Abb. 23**). Somit ist im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie von einer Unabhängigkeit der physiologischen Hypertrophie von der ERK2-Dimerisierung auszugehen. Bestärkt werden diese Erkenntnisse durch die jüngste Veröffentlichung aus unserer Arbeitsgruppe, wonach pathologische Hypertrophie in Assoziation mit

der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung steht, physiologische Hypertrophie jedoch nicht.¹⁶⁴

Neben der Vermittlung von pathologischer Hypertrophie scheinen ERK1/2 auch einen Einfluss auf physiologische Hypertrophie zu haben.^{85, 165} Ein Regulationsmechanismus, ob der durch ERK1/2 vermittelte Beitrag zur Hypertrophieentwicklung pathologisch oder physiologisch ist, scheint nach den aufgeführten Ergebnissen mutmaßlich die ERK-Dimerisierung zu sein. Wie vermittelt ERK dann physiologische Hypertrophie? Unter der oben aufgeführten Annahme, dass ERK2 als Monomer zytoplasmatisch lokalisiert bleibt, könnte durch verschiedene prä- oder posttranskriptionelle Modifikationen des Signalprozesses physiologische Hypertrophie induziert werden. So wäre beispielsweise denkbar, dass durch eine fehlende nukleäre Anreicherung von ERK1/2 andere im Kern lokalisierte Signalkaskaden hin zur physiologischen Hypertrophie unbehindert ablaufen können. Möglicherweise kommt es aber auch durch die zytoplasmatische Anreicherung von ERK1/2 zu einer von diesem initiierten posttranskriptionalen Modifikation von mRNA, die für Proteine der kardialen Fitness kodieren. Für all diese Vermutungen ist im Umkehrschluss von Bedeutung, die Mechanismen der physiologischen kardialen Hypertrophieentwicklung im Allgemeinen aufzuklären, um beurteilen zu können, welchen Anteil ERK1/2 am gesamten Ausmaß von physiologischer Hypertrophie trägt.

4.6. ERK1/2-Signalweg als therapeutischer Angriffspunkt

4.6.1. ERK1/2 als Therapieziel für kardiale Erkrankungen

Dass durch die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 das pathologische Herzwachstum verringert wird, gleichzeitig aber weder anti-apoptotische Effekte von ERK2 noch die kardiale Funktion supprimiert werden und währenddessen eine mögliche kompensatorische physiologische Hypertrophie weiterhin möglich ist, zeigt eine aussichtsreiche Option zur Verhinderung pathologischer kardialer Hypertrophie im Rahmen von kardialen Erkrankungen auf, die die Interaktion mit dem ERK1/2-Protein in den therapeutischen Fokus rückt.

Wie bereits mehrfach dargelegt, tragen dekompenzierte kardiale Hypertrophie und der programmierte Zelltod wesentlich zum Fortschreiten einer Herzinsuffizienz bei.^{8, 154} Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass durch ERK2^{Δ174-177} pathologische Hypertrophie unter Erhalt der kardioprotektiven ERK-Effekte selektiv blockiert wird. Darin könnte ein vielversprechender Ansatz zur Progressionsverzögerung bzw. –verhinderung der Herzinsuffizienz liegen. Visionär betrachtet, müsste man mithilfe eines *smart molecule* oder eines *Biologicals* selektiv die Dimerisierung des ERK1/2-Proteins pharmakologisch inhibieren, wodurch pathologische Hypertrophie abgeschwächt und anti-apoptotischen Funktionen weiterhin unbeeinträchtigt bleiben. Ein ganz konkretes Einsatzgebiet dieser hypothetischen Pharmaka könnte in der Progressionsverzögerung der bisher nur symptomatisch behandelbaren autosomal-dominant vererbten hypertrophen Kardiomyopathie liegen. Bei derartigen therapeutischen Überlegungen muss man jedoch berücksichtigen, dass durch den Eingriff in den komplexen Signaltransduktionsprozess der MAP-Kinase ERK1/2 unerwünschte Wirkungen provoziert werden könnten. Aufgrund der Verknüpfung des ERK1/2-Proteins in mannigfaltige Signalwege, sowie durch potentielle Beeinflussung der anderen ERK-Isoformen, wird sich zeigen müssen, welche Nebenwirkungen unter Umständen mit diesem Ansatz auch in anderen Geweben provoziert werden.

4.6.2. ERK1/2 als Therapieziel auch in anderen Organsystemen – ein Ausblick

Modifikationen im ERK1/2-Signalweg eröffnen nicht nur in Kardiomyozyten relevante Therapieoptionen. Da dieses Protein in jeder Zelle vorkommt, bieten sich selbstverständlich auch in anderen Organsystemen entsprechende Möglichkeiten, wobei im Folgenden hierfür zwei konkrete Anwendungsfelder aufgeführt werden sollen:

Ein weiteres potentiell therapeutisches Einsatzgebiet von nicht-katalytischer ERK1/2-Hemmung erschließt sich bei Betrachtung der Wirkung von ERK in der Tumorgenese. Exemplarisch sei hier die Verwendung von Cetuximab genannt, ein gegen den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) gerichteter

monoklonaler Antikörper, der zur therapeutischen Eskalationstherapie bei kolorektalem Karzinom genutzt wird.¹⁶⁶ Dessen Wirkung ist auf die Hemmung des (K-)Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges zurückzuführen.^{167, 168} Studien zeigten jedoch, dass dieser Antikörper bei Patienten mit mutiertem K-Ras-Status keinen signifikanten Überlebensvorteil erzielt.^{169, 170} Hier führt die K-Ras-Punktmutation zu einer Akkumulation von EGFR-unabhängig aktiviertem K-Ras und folglich zur Stimulation von Zellproliferation und somit Tumorwachstum.¹⁷¹ Unterbindet man jedoch eine der von K-Ras aktivierten Kinasen im weiteren Kinase-Kaskaden-Verlauf, so ist von einer der Cetuximab-Wirkung ebenbürtigen Tumorprogressionshemmung auszugehen – trotz K-Ras-Mutation. Bereits für MEK1/2-Inhibitoren konnten erste Erfolge gezeigt werden.¹⁶⁸ Es wäre lohnend zu untersuchen, ob dies auch durch die selektive Blockade der Dimerisierung von ERK1/2 nebenwirkungsarm zu erreichen ist, um die Chance auf neue Therapieoptionen für viele der durch das Ras-Protoonkogen bedingten Tumorarten zu erhöhen. Als jüngstes und sehr erfolgreiches Beispiel des therapeutischen Eingriffes in den MAP-Kinase-Signalweg ist zudem die simultane Blockade von B-Raf und MEK beim metastasierten Melanom zu nennen. Nach mehreren Jahrzehnten unzureichender Behandlungsmöglichkeiten des metastasierten Melanoms ließ sich in 2 randomisiert-kontrollierten Phase 3 Studien zeigen, dass eine Kombination von B-Raf-Inhibitoren mit MEK-Inhibitoren eine signifikante Erhöhung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zur alleinigen B-Raf-Inhibition bewirkt.^{172, 173} Auch hier erschließen sich möglicherweise neue Therapieoptionen durch Beeinflussung des Oligomerisierungszustandes von ERK.

Auch im zentralen Nervensystem sind die MAP-Kinasen ERK1/2 von zentraler Bedeutung. Mehrere Arbeiten zeigen *in vitro*, *in vivo* und an Hirngewebebeobachten von Patienten, dass epileptiforme Anfälle mit einer gesteigerten ERK1/2-Phosphorylierung der betroffenen Hirnareale unmittelbar nach Anfallseinleitung einhergehen.¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ Die Anfalls-Aktivität kann durch Gabe des selektiven MEK1-Inhibitors PD98059 und des selektiven MEK1/2-Inhibitors U0126 deutlich reduziert werden.¹⁷⁵ Bisher gibt es bei der Epilepsie-Therapie – mit Ausnahme

spezieller Fälle der neurochirurgischen Entfernung von epilepsiegenerierendem Gewebe – nur symptomatische und keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Dies zeigt das Potential weiterer eingehender Untersuchungen der Dimerisierungsdefizienz des ERK2-Proteins bzw. der Inhibition der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung auch in diesem Organsystem.

Dass ERK1/2 zusätzlich eine bedeutende Rolle für das Überleben von Neuronen einnimmt,¹⁷⁸ spiegelt die komplexe und vielgestaltige Wirkung dieser Kinase wider. Einmal mehr offenbart dies die Notwendigkeit von weiterer Forschungsarbeit, um sich ein möglichst detailliertes Bild davon machen zu können, welche Auswirkungen ein gezielter Eingriff in diese Signaltransduktionskaskade verursacht und was davon – nicht nur im Kardiomyozyten - therapeutisch verwertbar ist.

Dieser Einblick über die Wirkung von ERK1/2 in anderen Organsystemen zeigt, wie wichtig bei all den therapeutischen Überlegungen die Berücksichtigung des gesamten Organismus ist. So kann beispielsweise ein Zuviel an Anti-Apoptose durch ERK2^{Δ174-177} zur Karzinogenese beitragen, ein Zuwenig zu neuronalem Untergang. Deshalb müssen künftige Therapeutika bei dem Eingriff in ubiquitär vorkommende Signalkaskaden auch dahingehend weiterentwickelt werden, dass sie streng organspezifisch wirken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Raf-MEK-ERK1/2-Kaskade spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von kardialer Hypertrophie und Zellüberleben. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die Dimerisierung von ERK2 eine Voraussetzung für dessen Autophosphorylierung an Thr188 darstellt, welche wiederum für die Übermittlung der hypertrophen Effekten von ERK1/2 erforderlich ist.⁶⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurde daraus abgeleitet die Fragestellung untersucht, ob mit Verhinderung der ERK2-Dimerisierung eine nützliche Strategie zur Inhibition von Hypertrophie vorliegt und welchen Einfluss diese auf das Zellüberleben hat.

Die Auswirkungen der Dimerisierungsdefizienz von ERK2 wurden in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte und in transgenen Mäusen mithilfe einer ERK2-Mutante untersucht, der einige Aminosäuren in der ERK-ERK-Interaktionsfläche fehlen und daher keine Dimere bilden kann (ERK2^{Δ174-177}). Eine Überexpression von ERK2^{Δ174-177} in neonatalen Kardiomyozyten verringerte signifikant die Antwort auf hypertrophe Stimuli (Phenylephrin, Endothelin 1). Im Anschluss daran wurden die Effekte der Dimerisierungsdefizienz von ERK2 *in vivo* an transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von ERK2^{Δ174-177} erforscht. Diese Mäuse zeigten unter basalen Bedingungen keine Unterschiede gegenüber Wildtyp-Mäusen hinsichtlich Kardiomyozytengröße, Ventrikelwanddicke und kardialer Funktion. Unter chronischer Druckbelastung mittels TAC ließ sich hingegen ein signifikant vermindertes Ausmaß an Hypertrophie im Vergleich zu Wildtyp quantifizieren. Da der ERK1/2-Signalweg auch am Überleben von Kardiomyozyten beteiligt ist, wurde die Apoptose an histologischen Schnitten von Mausherzen analysiert. Interessanterweise fand sich bei Herzen, die das dimerisierungsdefiziente ERK2-Protein überexprimierten, eine mit Wildtyp vergleichbare Anzahl TUNEL-positiver Zellen. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Messung des Fibrosegrades an Sirius-Rot gefärbten histologischen Schnitten beobachtet werden. Zuletzt wurden die Folgen der ERK2-Dimerisierungsdefizienz auf physiologische Hypertrophie mit einem Laufrad-Versuchsaufbau evaluiert. Transgene

ERK2^{Δ174-177}- und Wildtyp-Mäuse zeigten unter diesem physiologischen Stimulus keine Unterschiede im Hinblick auf die Zunahme an kardialer Hypertrophie.

Da die Dimerisierungsdefizienz von ERK2 zu einer reduzierten pathologischen Hypertrophie, ohne negative Auswirkungen auf ERK1/2-vermittelte anti-apoptotische Effekte noch auf kardiale Funktion oder physiologische Hypertrophieprozesse führt, stellt die Hemmung der ERK-Dimerisierung ein attraktives Ziel zur Therapie pathologischer Hypertrophie sowie potentiell auch anderer auf den ERK1/2-Signalweg basierenden Krankheiten dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014. Verfügbar unter: www.destatis.de (Dokumentationsstand: 30.12.2016).
2. Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R. Heart failure: The commonest reason for hospital admission in germany: Medical and economic perspectives. *Deutsches Arzteblatt international*. 2009;106:269-275
3. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016. Krankenhauspatienten. Vollstationär behandelte Patientinnen und Patienten (einschließlich Sterbe- und Stundenfälle) in Krankenhäusern nach der ICD-10 im Jahr 2015. Verfügbar unter: www.destatis.de/de/zahlenfakten/gesellschaftstaat/gesundheit/krankenhaeuser/tabellen/20diagnoseninsgesamt.html (Dokumentationsstand: 30.12.2016).
4. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung. Version 7 08/2013 [zitiert: 14.09.2013; derzeit in Überarbeitung, Dokumentationsstand 30.12.2016]. Verfügbar unter: www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz.
5. Greten H, Rinninger F, Greten T. Innere medizin. *Thieme, Stuttgart*. 2010;13. Aufl.:111
6. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *European journal of heart failure*. 2001;3:315-322

7. Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Zhou G, Matsubara L, Guarda E. Pathologic hypertrophy with fibrosis: The structural basis for myocardial failure. *Blood Press*. 1992;1:75-85
8. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997;336:1131-1141
9. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128:388-400
10. Cohn JN, 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. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-582
11. Xie M, Burchfield JS, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: Therapies: Part 2 of 2. *Circulation*. 2013;128:1021-1030
12. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the cooperative north scandinavian enalapril survival study (consensus). The consensus trial study group. *N Engl J Med*. 1987;316:1429-1435
13. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The solvd investigators. *N Engl J Med*. 1991;325:293-302
14. The cardiac insufficiency bisoprolol study ii (cibis-ii): A randomised trial. *Lancet*. 1999;353:9-13
15. Effect of metoprolol cr/xl in chronic heart failure: Metoprolol cr/xl randomised intervention trial in congestive heart failure (merit-hf). *Lancet*. 1999;353:2001-2007

16. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709-717
17. Shekelle PG, Rich MW, Morton SC, Atkinson CS, Tu W, Maglione M, Rhodes S, Barrett M, Fonarow GC, Greenberg B, Heidenreich PA, Knabel T, Konstam MA, Steimle A, Warner Stevenson L. Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in the management of left ventricular systolic dysfunction according to race, gender, and diabetic status: A meta-analysis of major clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1529-1538
18. Al-Gobari M, El Khatib C, Pillon F, Gueyffier F. Beta-blockers for the prevention of sudden cardiac death in heart failure patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:52
19. Driscoll A, Currey J, Tonkin A, Krum H. Nurse-led titration of angiotensin converting enzyme inhibitors, beta-adrenergic blocking agents, and angiotensin receptor blockers for people with heart failure with reduced ejection fraction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015:CD009889
20. Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *British heart journal*. 1975;37:1022-1036
21. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*. 2003;93:896-906
22. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie--Herz- und Kreislaufforschung e V. [guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol*. 2005;94:488-509

23. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Task Force for the D, Treatment of A, Chronic Heart Failure of the European Society of C, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Lung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P, Guidelines ESCCfP. Esc guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the european society of cardiology. Developed in collaboration with the heart failure association (hfa) of the esc. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:803-869
24. Greenberg B, Quinones MA, Koilpillai C, Limacher M, Shindler D, Benedict C, Shelton B. Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the solvd echocardiography substudy. *Circulation.* 1995;91:2573-2581
25. Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, MacMahon S, Sharpe N. Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Australia-new zealand heart failure research collaborative group. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:1060-1066
26. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: Insights

- from the randomized aldactone evaluation study (rales). Rales investigators. *Circulation*. 2000;102:2700-2706
27. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2002;3:639-650
 28. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:79-94
 29. Lin HH. G-protein-coupled receptors and their (bio) chemical significance win 2012 nobel prize in chemistry. *Biomed J*. 2013;36:118-124
 30. Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. G protein activation without subunit dissociation depends on a g{alpha}(i)-specific region. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:24584-24590
 31. Vilardaga JP, Bunemann M, Feinstein TN, Lambert N, Nikolaev VO, Engelhardt S, Lohse MJ, Hoffmann C. GPCR and G proteins: Drug efficacy and activation in live cells. *Molecular endocrinology*. 2009;23:590-599
 32. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995;80:249-257
 33. Raymond JR. Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *The American journal of physiology*. 1995;269:F141-158
 34. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews*. 1999;51:651-690
 35. Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR. The alpha 1a-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268:15374-15380

36. Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ. Myocardial expression of a constitutively active alpha 1b-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:10109-10113
37. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:7059-7064
38. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-228
39. Wilkins BJ, Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322:1178-1191
40. Mishra S, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM, Brown JH. Cardiac hypertrophy and heart failure development through gq and cam kinase ii signaling. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2010;56:598-603
41. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and pten in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:449-471
42. Tilley DG. G protein-dependent and g protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ Res*. 2011;109:217-230
43. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Rockman HA. Cardiac hypertrophy: Role of g protein-coupled receptors. *Journal of cardiac failure*. 2002;8:S409-414

44. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation*. 2007;116:1413-1423
45. Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: Angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiological reviews*. 2010;90:1507-1546
46. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of mapks. *Oncogene*. 2007;26:3100-3112
47. Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, Stein B, Goldsmith E, Cobb MH. Contributions of the mitogen-activated protein (map) kinase backbone and phosphorylation loop to mek specificity. *J Biol Chem*. 1996;271:29734-29739
48. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-jun n-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*. 1998;83:345-352
49. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR. Erk8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 2002;277:16733-16743
50. Bogoyevitch MA, Court NW. Counting on mitogen-activated protein kinases--erks 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal*. 2004;16:1345-1354
51. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. P38/rk mitogen-activated protein kinases and c-jun n-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 1996;79:162-173
52. Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-jun nh2-terminal kinase in ventricular muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:5423-5426

53. Li M, Georgakopoulos D, Lu G, Hester L, Kass DA, Hasday J, Wang Y. P38 map kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart. *Circulation*. 2005;111:2494-2502
54. Luttrell LM. 'Location, location, location': Activation and targeting of map kinases by g protein-coupled receptors. *Journal of molecular endocrinology*. 2003;30:117-126
55. Saba-EI-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S. An essential function of the mitogen-activated protein kinase erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO reports*. 2003;4:964-968
56. Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12759-12764
57. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. Erks: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and ngf. *Cell*. 1991;65:663-675
58. Gerits N, Kostenko S, Moens U. In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: Conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic research*. 2007;16:281-314
59. Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouyssegur J. Defective thymocyte maturation in p44 map kinase (erk 1) knockout mice. *Science*. 1999;286:1374-1377
60. Marchi M, D'Antoni A, Formentini I, Parra R, Brambilla R, Ratto GM, Costa M. The n-terminal domain of erk1 accounts for the functional differences with erk2. *PLoS One*. 2008;3:e3873

61. Bueno OF, Molkenkin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002;91:776-781
62. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*. 1998;31:152-161
63. Muslin AJ. Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends in cardiovascular medicine*. 2005;15:225-229
64. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (map kinase). *The EMBO journal*. 1991;10:885-892
65. Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW. Ordered phosphorylation of p42mapk by map kinase kinase. *FEBS letters*. 1992;306:17-22
66. Rossomando AJ, Wu J, Michel H, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of tyr-185 as the site of tyrosine autophosphorylation of recombinant mitogen-activated protein kinase p42mapk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:5779-5783
67. Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ. A new type of erk1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2009;15:75-83
68. Vidal M, Wieland T, Lohse MJ, Lorenz K. Beta-adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a gbetagamma/erk-dependent pathway. *Cardiovascular research*. 2012;96:255-264
69. Strungs EG, Luttrell LM. Arrestin-dependent activation of erk and src family kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;219:225-257

70. Morrison DK, Davis RJ. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:91-118
71. Teis D, Wunderlich W, Huber LA. Localization of the mp1-mapk scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell.* 2002;3:803-814
72. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. 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.* 2001;98:2449-2454
73. Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for ras/map kinase signaling. *Dev Cell.* 2004;7:33-44
74. Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R, Ping P. Mitochondrial pkcepsilon and mapk form signaling modules in the murine heart: Enhanced mitochondrial pkcepsilon-mapk interactions and differential mapk activation in pkcepsilon-induced cardioprotection. *Circulation research.* 2002;90:390-397
75. Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M. Phosphorylation of elk-1 by mek/erk pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1447-1457
76. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the map kinase erk2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell.* 1998;93:605-615
77. Rakusan K, Hrdina PW, Turek Z, Lakatta EG, Spurgeon HA, Wolford GD. Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: Quantitative study. *Basic Res Cardiol.* 1984;79:389-395

78. Woodiwiss AJ, Norton GR. Exercise-induced cardiac hypertrophy is associated with an increased myocardial compliance. *J Appl Physiol.* 1995;78:1303-1311
79. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 2008;358:1370-1380
80. McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1987;317:787-792
81. Clement DL, De Buyzere M, Duprez D. Left ventricular function and regression of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1993;6:14S-19S
82. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: The framingham heart study. *The American journal of cardiology.* 1987;60:560-565
83. Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Yamashita T, Ishido S, Hotta H, Yokoyama M. Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:947-960
84. Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 1996;78:954-961
85. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The mek1-erk1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J.* 2000;19:6341-6350

86. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:1110-1119
87. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH. Differential activation of protein kinase c isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:32848-32857
88. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Lawrence EG, Hoit BD, Berk BC, Walsh RA. Src and multiple map kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: Comparison with acute mechanical stretch. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33:1637-1648
89. Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 2000;275:37895-37901
90. Liang F, Lu S, Gardner DG. Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension*. 2000;35:188-192
91. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkenstein JD. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with

- hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*. 2001;103:670-677
92. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257
 93. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290:1717-1721
 94. Judah JD, Ahmed K, McLean AE. Pathogenesis of cell necrosis. *Federation proceedings*. 1965;24:1217-1221
 95. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013
 96. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation research*. 2004;95:957-970
 97. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:383-424
 98. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-776
 99. Martelli AM, Zwyer M, Ochs RL, Tazzari PL, Tabellini G, Narducci P, Bortol R. Nuclear apoptotic changes: An overview. *J Cell Biochem*. 2001;82:634-646
 100. Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 1998;13:317-325

101. Merkle S, Frantz S, Schon MP, Bauersachs J, Buitrago M, Frost RJ, Schmitteckert EM, Lohse MJ, Engelhardt S. A role for caspase-1 in heart failure. *Circulation research*. 2007;100:645-653
102. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*. 1996;148:141-149
103. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:380-386
104. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 2003;111:1497-1504
105. Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Shirani J, Brown JH, Dorn GW, 2nd, Armstrong RC, Kitsis RN. Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of galpha(q) transgenic mice. *Circulation*. 2003;108:3036-3041
106. Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouyssegur J, Pages G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD. Mek1-erk2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 2004;109:1938-1941
107. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest*. 1997;100:1813-1821

108. Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 1997;272:154-161
109. Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hoshijima M, Brown JH, Chien KR. Cardiotrophin 1 (ct-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream ct-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1997;272:5783-5791
110. De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, Molkenin JD. Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res.* 2000;86:255-263
111. Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC, Jr., Boyd D, Mills GB. Regulation of bad phosphorylation at serine 112 by the ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene.* 1999;18:6635-6640
112. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the ras-mapk signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 1999;286:1358-1362
113. Valks DM, Cook SA, Pham FH, Morrison PR, Clerk A, Sugden PH. Phenylephrine promotes phosphorylation of bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase a. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2002;34:749-763
114. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at thr 125 by erk mapk. *Nat Cell Biol.* 2003;5:647-654
115. Martin MC, Allan LA, Mancini EJ, Clarke PR. The docking interaction of caspase-9 with erk2 provides a mechanism for the selective inhibitory

- phosphorylation of caspase-9 at threonine 125. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:3854-3865
116. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ. Erk activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*. 2002;277:12710-12717
117. Liu J, Mao W, Ding B, Liang CS. Erks/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in h9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1956-1965
118. Zhang DX, Ma DY, Yao ZQ, Fu CY, Shi YX, Wang QL, Tang QQ. Erk1/2/p53 and nf-kappab dependent-puma activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:2435-2442
119. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-1865
120. Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C. Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Current hypertension reports*. 2013;15:395-400
121. Seeland U, Selejan S, Engelhardt S, Muller P, Lohse MJ, Bohm M. Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic research in cardiology*. 2007;102:183-193
122. Villari B, Vassalli G, Monrad ES, Chiariello M, Turina M, Hess OM. Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement. *Circulation*. 1995;91:2353-2358
123. Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: Mechanisms and therapeutic strategies. *Internal medicine*. 2003;42:465-469

124. Vasquez C, Benamer N, Morley GE. The cardiac fibroblast: Functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57:380-388
125. Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: The road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol*. 2013
126. Papakrivopoulou J, Lindahl GE, Bishop JE, Laurent GJ. Differential roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38mapk in mechanical load-induced procollagen alpha1(i) gene expression in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2004;61:736-744
127. Tang M, Zhang W, Lin H, Jiang H, Dai H, Zhang Y. High glucose promotes the production of collagen types i and iii by cardiac fibroblasts through a pathway dependent on extracellular-signal-regulated kinase 1/2. *Mol Cell Biochem*. 2007;301:109-114
128. Dai B, Cui M, Zhu M, Su WL, Qiu MC, Zhang H. Stat1/3 and erk1/2 synergistically regulate cardiac fibrosis induced by high glucose. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;32:960-971
129. Jia Y, Xu J, Yu Y, Guo J, Liu P, Chen S, Jiang J. Nifedipine inhibits angiotensin ii-induced cardiac fibrosis via downregulating nox4-derived ros generation and suppressing erk1/2, jnk signaling pathways. *Pharmazie*. 2013;68:435-441
130. Johnson A, DiPietro LA. Apoptosis and angiogenesis: An evolving mechanism for fibrosis. *FASEB J*. 2013;27:3893-3901
131. Gurtl B, Kratky D, Guelly C, Zhang L, Gorkiewicz G, Das SK, Tamilarasan KP, Hoefler G. Apoptosis and fibrosis are early features of heart failure in an animal model of metabolic cardiomyopathy. *International journal of experimental pathology*. 2009;90:338-346

132. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85
133. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970;227:680-685
134. Franz WM, Mueller OJ, Hartong R, Frey N, Katus HA. Transgenic animal models: New avenues in cardiovascular physiology. *J Mol Med.* 1997;75:115-129
135. Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991;266:24613-24620
136. Gupta M, Zak R, Libermann TA, Gupta MP. Tissue-restricted expression of the cardiac alpha-myosin heavy chain gene is controlled by a downstream repressor element containing a palindrome of two ets-binding sites. *Mol Cell Biol.* 1998;18:7243-7258
137. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8277-8281
138. Buitrago M, Lorenz K, Maass AH, Oberdorf-Maass S, Keller U, Schmitteckert EM, Ivashchenko Y, Lohse MJ, Engelhardt S. The transcriptional repressor nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2005;11:837-844
139. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of applied physiology.* 2001;90:1900-1908

140. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11:447-455
141. Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y. Cardiac hypertrophy: A matter of translation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:517-527
142. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: Application in the aging rat. *The American journal of physiology.* 1982;243:H941-947
143. Kannel WB, Gordon T, Offutt D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the framingham study. *Annals of internal medicine.* 1969;71:89-105
144. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *The New England journal of medicine.* 1990;322:1561-1566
145. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *American heart journal.* 2001;141:334-341
146. Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation.* 2000;101:2863-2869
147. Esposito G, Rapacciuolo A, Prasad SVN, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation.* 2002;105:85-92
148. Hill JA, Rothermel B, Yoo KD, Cabuay B, Demetroulis E, Weiss RM, Kutschke W, Bassel-Duby R, Williams RS. Targeted inhibition of

- calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:10251-10255
149. Liu YL, Huang CC, Chang CC, Chou CY, Lin SY, Wang IK, Hsieh DJ, Jong GP, Huang CY, Wang CM. Hyperphosphate-induced myocardial hypertrophy through the gata-4/nfat-3 signaling pathway is attenuated by erk inhibitor treatment. *Cardiorenal medicine*. 2015;5:79-88
150. Zhong L, Chiusa M, Cadar AG, Lin A, Samaras S, Davidson JM, Lim CC. Targeted inhibition of ankrd1 disrupts sarcomeric erk-gata4 signal transduction and abrogates phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2015;106:261-271
151. Wang L, Proud CG. Ras/erk signaling is essential for activation of protein synthesis by gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circulation research*. 2002;91:821-829
152. Rolfe M, McLeod LE, Pratt PF, Proud CG. Activation of protein synthesis in cardiomyocytes by the hypertrophic agent phenylephrine requires the activation of erk and involves phosphorylation of tuberous sclerosis complex 2 (tsc2). *The Biochemical journal*. 2005;388:973-984
153. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation*. 1975;56:56-64
154. Diwan A, Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: Cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:56-64
155. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, Jr., Muller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*. 1999;97:189-198

156. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S414-427
157. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555-556
158. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501
159. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*. 1995;21:1465-1468
160. Lipshultz SE, Orav EJ, Sanders SP, McIntosh K, Colan SD. Limitations of fractional shortening as an index of contractility in pediatric patients infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr*. 1994;125:563-570
161. Penpargkul S, Scheuer J. The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J Clin Invest*. 1970;49:1859-1868
162. Kitzman DW, Brubaker PH, Morgan TM, Stewart KP, Little WC. Exercise training in older patients with heart failure and preserved ejection fraction: A randomized, controlled, single-blind trial. *Circulation. Heart failure*. 2010;3:659-667
163. Edelmann F, Gelbrich G, Dungen HD, Frohling S, Wachter R, Stahrenberg R, Binder L, Topper A, Lashki DJ, Schwarz S, Herrmann-Lingen C, Loffler M, Hasenfuss G, Halle M, Pieske B. Exercise training improves exercise capacity and diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Results of the ex-dhf (exercise

- training in diastolic heart failure) pilot study. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1780-1791
164. Ruppert C, Deiss K, Herrmann S, Vidal M, Oezkur M, Gorski A, Weidemann F, Lohse MJ, Lorenz K. 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*. 2013;110:7440-7445
 165. Yeh CC, Malhotra D, Yang YL, Xu Y, Fan Y, Li H, Mann MJ. Mek1-induced physiological hypertrophy inhibits chronic post-myocardial infarction remodeling in mice. *J Cell Biochem*. 2013;114:47-55
 166. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3 - Leitlinie kolorektales Karzinom, Langversion 1.1 08/2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007ol [zitiert: 24.07.2015]. Verfügbar unter: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/ll_krk_langfassung_1.1.pdf (Dokumentationsstand: 30.12.2016).
 167. de Bono JS, Rowinsky EK. Therapeutics targeting signal transduction for patients with colorectal carcinoma. *Br Med Bull*. 2002;64:227-254
 168. Yoon J, Koo KH, Choi KY. Mek1/2 inhibitors as703026 and azd6244 may be potential therapies for kras mutated colorectal cancer that is resistant to egfr monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*. 2011;71:445-453
 169. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359:1757-1765
 170. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR,

- Krishnamurthi SS, Burris HA, 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and k-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25:3230-3237
171. Downward J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:11-22
172. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A. Combined vemurafenib and cobimetinib in braf-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371:1867-1876
173. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion Sileni V, Lebbe C, Mandala M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K, Flaherty K. Combined braf and mek inhibition versus braf inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371:1877-1888
174. Gass P, Kiessling M, Bading H. Regionally selective stimulation of mitogen activated protein (map) kinase tyrosine phosphorylation after generalized seizures in the rat brain. *Neuroscience letters*. 1993;162:39-42
175. Merlo D, Cifelli P, Cicconi S, Tancredi V, Avoli M. 4-aminopyridine-induced epileptogenesis depends on activation of mitogen-activated protein kinase erk. *Journal of neurochemistry*. 2004;89:654-659

176. Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, Makwana M, Brandner S, Adams RH, Jefferys JG, Kann O, Behrens A. Erk activation causes epilepsy by stimulating nmda receptor activity. *The EMBO journal*. 2007;26:4891-4901
177. Xi ZQ, Wang XF, He RQ, Li MW, Liu XZ, Wang LY, Zhu X, Xiao F, Sun JJ, Li JM, Gong Y, Guan LF. Extracellular signal-regulated protein kinase in human intractable epilepsy. *Eur J Neurol*. 2007;14:865-872
178. Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2004;271:2050-2055

7. ERGEBNISÜBERSICHT

Tabelle 4 fasst die in Kapitel 3 beschriebenen zentralen Resultate im Überblick zusammen.

Tabelle 4: Ergebniszusammenfassung

Das genannte Ergebnis bezieht sich auf die Auswirkung der kardialen Expression der dimerisierungsdefizienten ERK2^{Δ174-177}-Mutante im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle unter basalen Bedingungen und unter verschiedenen Hypertrophiestimuli.

Untersuchungsaspekt	Methodik	Ergebnis		
		unter basalen Bedingungen	unter hypertrophem Stimulus	
Pathologische Hypertrophie	<i>in vitro</i>	[³ H]-Isoleucineinbau	kein Unterschied	<i>PE / ET-1</i> :signifikant reduzierte Proteinsynthese
	<i>in vivo</i>	Kardiomyozytengröße Echokardiographie (IVS, LVHW) Normiertes Herzgewicht	} kein Unterschied	} <i>TAC</i> : signifikant vermindertes Ausmaß an Hypertrophie
Apoptose	<i>in vivo</i>	TUNEL-Methode	kein Unterschied	<i>TAC</i> : ähnliche Apoptoserate
Funktionale Parameter	<i>in vivo</i>	Ruhebedingungen: Echokardiographie (<i>FS</i>)	} kein Unterschied	<i>TAC</i> : gleiche Funktionsparameter
		Stressbedingungen: Linksherzkatheter mit Dobutamingabe		<i>TAC</i> : TG#1 zeigt keine signifikanten Abweichungen TG#3 zeigt signifikante Abweichungen
Physiologische Hypertrophie	<i>in vivo</i>	Kardiomyozytengröße Echokardiographie (IVS, LVHW) Normiertes Herzgewicht	} kein Unterschied	} <i>Laufradtraining</i> : gleiches Ausmaß an Hypertrophie
Funktionale Parameter II	<i>in vivo</i>	Ruhebedingungen: Echokardiographie (<i>FS</i>)	kein Unterschied	<i>Laufradtraining</i> : gleiche Funktionsparameter

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANKRD1	A nkyrin repeat domain 1
APS	A mmoniumperoxodisulfat
AT-II	A ngiotensin II
BCA	b icinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
Bcl-2	B -cell lymphoma 2
bp	B asenpaar
BrdU	B romodesoxyuridin
cDNA	c omplementary D esoxyribonucleic acid
cpm	c ounts p er m inute
dNTP	D esoxynukleosidtriphosphat
dUTP	D esoxyuridintriphosphat
EDTA	E thylendiamintetraacetat
EGF	e pidermal g rowth f actor
Elk-1	E T(S E twenty-six)-like-1 transcription factor
ERK	e xtracellular signal r egulated protein k inase
ET-1	E ndothelin 1
FCS	f etal c alf s erum
FGF	f ibroblast g rowth f actor
FVB/N	F riend V irus B -type susceptibility (Inzucht Mausstamm mit besonderer Eignung für transgene Analysen, erstmals herausgezüchtet vom N ational Institute of Health)
GDP / GTP	G uanosindiphosphat / G uanosintriphosphat
Glu	L- G lutamin
GPCR	G -protein-coupled receptor
HE	H ämalaun- E osin-Färbung
IGF-1	I nsulin-like g rowth f actor 1
IVS	I nterventrikuläres S eptum
KG	K örpergewicht
LVEDD	L inksventrikulärer e nddiastolischer D urchmesser

LVESD	Linksventrikulärer e ndsystolischer D urchmesser
LVHW	Linksventrikläre H inter w and
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase / mitogen-activated ERK -activating k inase
MEM	M inimum e ssential m edium
<i>n. s.</i>	nicht s ignifikant
P/S	P enicillin/ S treptomycin
p90RSK	p90 ribosomal S6 k inase
PBS	P hosphate b uffered s aline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	P olymerase C hain R eaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	P henylephrin
PMSF	P henyl m ethyl s ulfonyl f luorid
PVDF	P oly v inylid e n f luorid
Raf	r at f ibrosarcoma / r apid- a ctivation of f ibrosarcoma kinase
Ras	r at s arcoma
rpm	revolutions p er m inute (Umdrehungen pro Minute)
RTK	R ezeptor t yrosin k inase
SDS-PAGE	S odium d odecyl s ulfat- P oly a crylamid g elelektrophorese
SPF	s pezifisch p athogen f rei
ssDNA	s ingle s trand DNA (Einzelstrang-DNA)
TAC	T ransverse a ortic c onstriction (Aortenligation)
Taq- Polymerase	aus dem thermophilen Bakterium T hermus a quaticus isolierte DNA-Polymerase
TEY	Aminosäuresequenzabschnitt 183 bis 185 von ERK2 im Einbuchstabencode, Threonin 183 (T), Glutaminsäure 184 (E) und Tyrosin 185 (Y)
TG	t rans g en
TNF- α	T umornekrosefaktor- α
TRIS	T ris(hydroxymethyl)aminomethan
wt	W ildtyp
YFP	y ellow f luorescent p rotein
α -MHC	α - m ysin h eavy c hain

DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin und Doktormutter Frau Prof. Dr. Kristina Lorenz für den fortwährenden intensiven fachlichen Austausch und die permanente Unterstützung – auch weit über normale Büroöffnungszeiten hinaus.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Institut in einem exzellenten Umfeld Forschung zu betreiben.

Für die hervorragende technische Hilfestellung und die tolle Arbeitsatmosphäre sei Frau Marianne Babl, Julia Becker, Martina Fischer und Nadine Yurdagül-Hemrich herzlich gedankt.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums.

Zu guter Letzt möchte ich zum einen meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit, zum anderen meiner Frau Tatjana Hümmert für den steten, bedingungslosen und liebevollen Rückhalt von ganzem Herzen danken.

LEBENS LAUF