

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Würzburg

Kommiss. Vorstand: Prof. Dr. Antje Gohla

**Untersuchung des Einflusses der ERK1/2-Autophosphorylierung an
Threonin 188 auf Mausherzen
mittels transgener Mäuse mit ubiquitärer Überexpression
von ERK2^{T188D}**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nenad Eppli

aus Schefflenz

Würzburg, November 2018

Affidavit

I hereby confirm that my thesis with the title “Untersuchung des Einflusses der ERK1/2-Autophosphorylierung an Threonin 188 auf Mausherzen mittels transgener Mäuse mit ubiquitärer Überexpression von ERK2^{T188D}“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg, 22. November 2018

Nenad Eppli

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation “Untersuchung des Einflusses der ERK1/2-Autophosphorylierung an Threonin 188 auf Mausherzen mittels transgener Mäuse mit ubiquitärer Überexpression von ERK2^{T188D}“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, 22. November 2018

Nenad Eppli

Referentin:

Prof. Dr. Kristina Lorenz

Koreferent/Koreferentin:

Priv.-Doz. Dr. Peter Nordbeck

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2020

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 KARDIALE HYPERTROPHIE	1
1.1.1 <i>Molekulare Charakteristika in kardialer Hypertrophie</i>	5
1.1.2 <i>Abgrenzung der pathologischen vs. physiologischen kardialen Hypertrophie</i>	15
1.2 DIE EXTRAZELLULÄR SIGNAL-REGULIERTEN KINASEN 1 UND 2 (ERK1/2).....	17
1.2.1 <i>Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen</i>	17
1.2.2 <i>Die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade</i>	18
1.2.3 <i>Die kleine GTPase Ras</i>	20
1.2.4 <i>Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade</i>	21
1.2.5 <i>Die Kinasen der MAPK-Signalkaskade</i>	27
1.3 NICHT-KARDIOMYOZYTEN IM HERZEN	46
2. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	49
3. MATERIAL	50
3.1 CHEMIKALIEN	50
3.2 KITS.....	50
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	50
3.4 REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	51
3.5 ENZYME	51
3.6 ANTIKÖRPER	51
3.6.1 <i>Primäre Antikörper</i>	51
3.6.2 <i>Sekundäre Antikörper</i>	51
3.7 ISOTOPENMARKIERTE SUBSTANZEN	52
3.8 BIOLOGISCHES MATERIAL.....	52
3.8.1 <i>Eukaryotische Zellen</i>	52
3.8.2 <i>Adenoviren</i>	52
3.8.3 <i>Tiere</i>	52
3.9 PRIMER FÜR DIE GENOTYPISIERUNG.....	53
4. METHODEN	54
4.1 PHYSIOLOGISCHE MODELLE	54
4.1.1 <i>Tierhaltung</i>	54
4.1.2 <i>Transgene und Nicht-transgene-Mäuse</i>	54
4.1.3 <i>Aortenkonstriktion</i>	55
4.1.4 <i>Echokardiographie</i>	57

4.1.5	Isolation von DNA aus Ohrlochbiopsien	58
4.1.6	Organentnahme	58
4.1.7	Herstellung von Herzlysaten.....	59
4.1.8	Isolierung von RNA.....	59
4.2	HISTOLOGISCHE METHODEN	60
4.2.1	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	60
4.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	60
4.2.3	Pikro-Siriusrot-Färbung	62
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	64
4.3.1	Synthese von cDNA	64
4.3.2	Genotypisierung der transgenen und nicht-transgenen Mäuse	66
4.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	70
4.4.1	Beschichtung der Multiwell-Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin	70
4.4.2	Bestimmung der Zellzahl.....	70
4.4.3	Zelllinien	70
4.4.4	Transduktion eukaryotischer Zellen	73
4.4.5	[³ H]-Thymidin-Proliferationsassay	73
4.4.6	Herstellung von Zelllysaten	74
4.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	76
4.5.1	Quantifizierung der Gesamtproteinmenge mittels BCA.....	76
4.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	76
4.5.3	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen.....	78
4.5.4	Blocken unspezifischer Bindungsstellen	79
4.5.5	Immundetektion immobilisierter Proteine (Western Blot)	79
4.5.6	Entfernen gebundener Antikörper (Stripping)	81
4.6	STATISTISCHE ANALYSEN UND SOFTWARE	82
5.	ERGEBNISSE	83
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER ERK2 ^{T188D} -MAUSLINIEN	83
5.2	TRANSVERSE AORTIC CONSTRICTION (TAC) INDUZIERT KARDIALE HYPERTROPHIE	85
5.3	BEURTEILUNG DER KARDIALEN FUNKTION NACH TAC	91
5.4	BEURTEILUNG DES KARDIOVASKULÄREN REMODELINGS.....	94
5.5	ANALYSE DER KORONAREN BLUTGEFÄßE NACH TAC.....	97
5.6	ANALYSE DER GAIN-OF-FUNCTION-MUTATION ERK2 ^{T188D} IN KARDIALEN FIBROBLASTEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN	100
5.6.1	ERK2 ^{T188D} in kardialen Fibroblasten.....	100
5.6.2	ERK2 ^{T188D} in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC).....	102

5.6.3 Zusammenfassung der <i>in vitro</i> -Versuche	103
6. DISKUSSION.....	105
6.1 DIE ROLLE VON ERK1/2 IM HERZEN.....	105
6.2 DIE ERK2 ^{THR188} -PHOSPHORYLIERUNG ALS HYPERTROPHER SIGNALWEG	106
6.3 FUNKTIONEN VON ERK1/2 IN ZELLWACHSTUM UND -PROLIFERATION	108
6.4 INHIBITOREN DER MAPK-SIGNALKASKADE IN ANTITUMORALER UND ANTIHYPERTROPHER THERAPIE	109
6.5 DIE ERK2 ^{THR188} -PHOSPHORYLIERUNG ALS PHARMAKOLOGISCHES TARGET IN DER BEHANDLUNG DER KARDIALEN HYPERTROPHIE	110
6.5.1 <i>Inhibition der ERK1/2-Dimerisierung.....</i>	<i>111</i>
6.5.2 <i>Inhibition der ERK1/2-Interaktion mit G_{βγ}.....</i>	<i>112</i>
6.6 DAS ZUSAMMENSPIEL VON KARDIOMYOZYTEN UND KARDIALEN FIBROBLASTEN	113
6.7 AUSBLICK.....	115
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	116
8. ANHANG.....	117
8.1 GEWICHTE UND LÄNGEN DER ANALYSIERTEN TIERE	117
8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
8.3 PUFFER- UND STOCKLÖSUNGEN	119
8.3.1 <i>Histologische Färbelösungen.....</i>	<i>119</i>
8.3.2 <i>Molekularbiologische Puffer.....</i>	<i>119</i>
8.3.3 <i>Zellbiologische Medien und Puffer.....</i>	<i>121</i>
8.3.4 <i>Proteinbiochemische Puffer und Reagenzien</i>	<i>121</i>
9. VERZEICHNISSE	125
9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
9.2 LITERATURVERZEICHNIS	126

1. Einleitung

1.1 Kardiale Hypertrophie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind derzeit sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2016; World Health Organization, 2015). In Deutschland fiel während der letzten Jahre der größte Teil der gesamten Gesundheitsausgaben (14,5%) auf diese Krankheitsgruppe (Statistisches Bundesamt, 2010). Dabei besitzt die chronische Herzinsuffizienz die am schnellsten ansteigende Inzidenz in den westlichen Industrienationen (Heineke & Molkentin, 2006).

Einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, unter anderem der Herzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit oder Arrhythmien, stellt die linksventrikuläre Hypertrophie dar (Artham *et al.*, 2009). Die Hemmung oder Regression dieser pathologischen Hypertrophie senkt das individuelle kardiovaskuläre Risiko, was aufgrund der großen klinischen und sozioökonomischen Relevanz sowie der hohen Prävalenz weltweit ein wichtiges therapeutisches Ziel darstellt (Artham *et al.*, 2009; Bauml & Underwood, 2010; Katholi & Couri, 2011). Hierbei erbrachte die LIFE-Studie von 1995-2001 den stärksten Nachweis, dass sich die Behandlung der kardialen Hypertrophie günstig auf das kardiovaskuläre Risikoprofil auswirke (Dahlof *et al.*, 2002).

Der aus dem Griechischen stammende Begriff *Hypertrophie* (*hyper*: über + *trophé*: Ernährung, Wachstum) ist als Vergrößerung eines Organs bzw. Gewebes durch Vergrößerung der Einzelzellen bei gleichbleibender Zellzahl definiert (Pschyrembel & Arnold, 2014). Davon abzugrenzen ist die *Hyperplasie*, bei der sich das Organ durch eine vermehrte Zellzahl bei gleichbleibendem Zellvolumen vergrößert (Pschyrembel *et al.*, 2014). Wichtige Risikofaktoren der pathologischen kardialen Hypertrophie sind Adipositas und ein hohes Lebensalter sowie - unabhängig oder als Folge der beiden erstgenannten - die arterielle Hypertonie (Lavie *et al.*, 1996; Lavie *et al.*, 1992). Ferner unterscheidet man die pathologische kardiale Hypertrophie, die in dieser Arbeit betrachtet werden soll, von der physiologischen kardialen Hypertrophie („Sportlerherz“), die beispielsweise bei Ausdauersport auftritt (Ellison *et al.*, 2012; McCann *et al.*, 2000). Eine Abgrenzung dieser beiden Formen erfolgt in Kapitel 1.1.2.

Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich die Nennung „kardiale Hypertrophie“ in dieser Arbeit stets auf die pathologische Form.

Grundsätzlich stellt die Zunahme der Wanddicke einen wichtigen kardialen Adaptionsmechanismus dar, um eine gesteigerte Arbeitsbelastung zu kompensieren (Artham *et al.*, 2009; Gradman & Alfayoumi, 2006). Bei einer größeren hämodynamischen Beanspruchung des Herzens, beispielsweise aufgrund einer Aortenklappenstenose oder arterieller Hypertonie, reagiert das Herz mit dem Wachstum der Kardiomyozyten, um so die gleiche Auswurfsleistung bei erhöhtem Widerstand zu gewährleisten und die Wandspannung zu reduzieren (Diwan & Dorn, 2007; Rohini *et al.*, 2010; Sugden & Clerk, 1998).

Der Prozess der Entwicklung kardialer Hypertrophie kann in mehrere Stadien eingeteilt werden (Frey *et al.*, 2004): Zunächst muss das Herz auf die (temporäre oder dauerhafte) Mehrbelastung reagieren. Die Kardiomyozyten hypertrophieren, um die aufgrund erhöhten Arbeitsbelastung gesteigerten Wandspannung zu reduzieren (gemäß des *Laplace'schen Gesetzes*, Diwan *et al.*, 2007):

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

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

In einem hypertonen Kreislaufsystem, bei dem ein erhöhter Druck ($P \uparrow$) zu einer erhöhten Wandspannung ($K \uparrow$) und somit erhöhtem Stress führt, kann eine reaktive Zunahme der Wanddicke ($h \uparrow$) den Stress reduzieren und die kardiale Pumpfunktion aufrechterhalten (Grossman *et al.*, 1975). Im darauffolgenden zweiten Stadium (Kompensation) ist das Verhältnis Mehrbelastung zu Hypertrophie ausgeglichen; die kardiale Auswurfleistung kann auf diese Weise beibehalten werden (Frey *et al.*, 2004).

Die Manifestation der Hypertrophie ist bis zu diesem Zeitpunkt nahezu reversibel: Bei Reduktion der Mehrbelastung, beispielsweise durch eine antihypertensive Therapie, kann sich die Hypertrophie weitestgehend zurückbilden (Fagard, 1995; Hou & Kang,

2012; Pfeffer *et al.*, 1983). Hält die hypertrophe Stimulation dagegen über einen längeren Zeitraum an, dekomponiert das System, es resultiert eine Herzinsuffizienz (Frey *et al.*, 2004). Morphologisch zeigen sich in dieser letzten Phase der Herzhypertrophie das kardiale Remodeling mit Fibrosierung des Herzgewebes, im Endstadium zusätzlich die Verdünnung der Ventrikelwand ($h'' < h$) und eine ausgeprägte Dilatation der Herzkammer ($r' > r$) (Hill & Olson, 2008). Die Folgen dieser morphologischen Veränderungen sind in Abbildung 1 gezeigt: Wird die Ratio $r:h$ größer, steigt auch die Wandspannung weiter an. Obwohl dies weiteren hämodynamischen Stress im Herzen erzeugt und wiederum zur Aktivierung der bereits ausgelasteten hypertrophen Signalwege führt, ist das dilatierte, fibrosierte Herz nicht mehr zur adäquaten Aufrechterhaltung des Kreislaufs in der Lage (Diwan *et al.*, 2007).

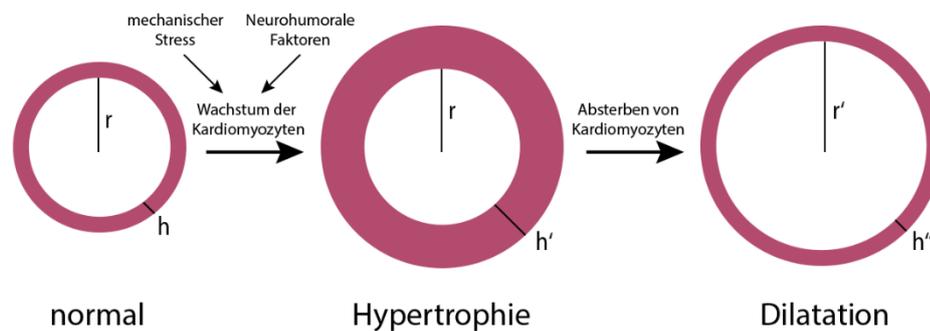


Abbildung 1: Stadien der Entwicklung kardialer Hypertrophie.

Die (kompensierte) kardiale Hypertrophie ist charakterisiert durch eine „Verdickung“ der Ventrikelwand ($h' > h$), die auf zellulärer Ebene durch die Größenzunahme der Kardiomyozyten infolge von hämodynamischen und/oder neurohumoralen Stress verursacht wird. Das Absterben der Kardiomyozyten führt zur Dilatation des Ventrikels ($r' > r$, Zunahme des intraventrikulären Radius) bei Verdünnung der Ventrikelwand ($h'' < h$).

Abbildung modifiziert nach Diwan & Dorn, 2007 mit Erlaubnis von The American Physiological Society.

Abhängig vom hypertrophen Phänotypen des Ventrikels und der zugrundeliegenden Ursache lassen sich zwei verschiedene Formen der kardialen Hypertrophie unterscheiden (Abbildung 2):

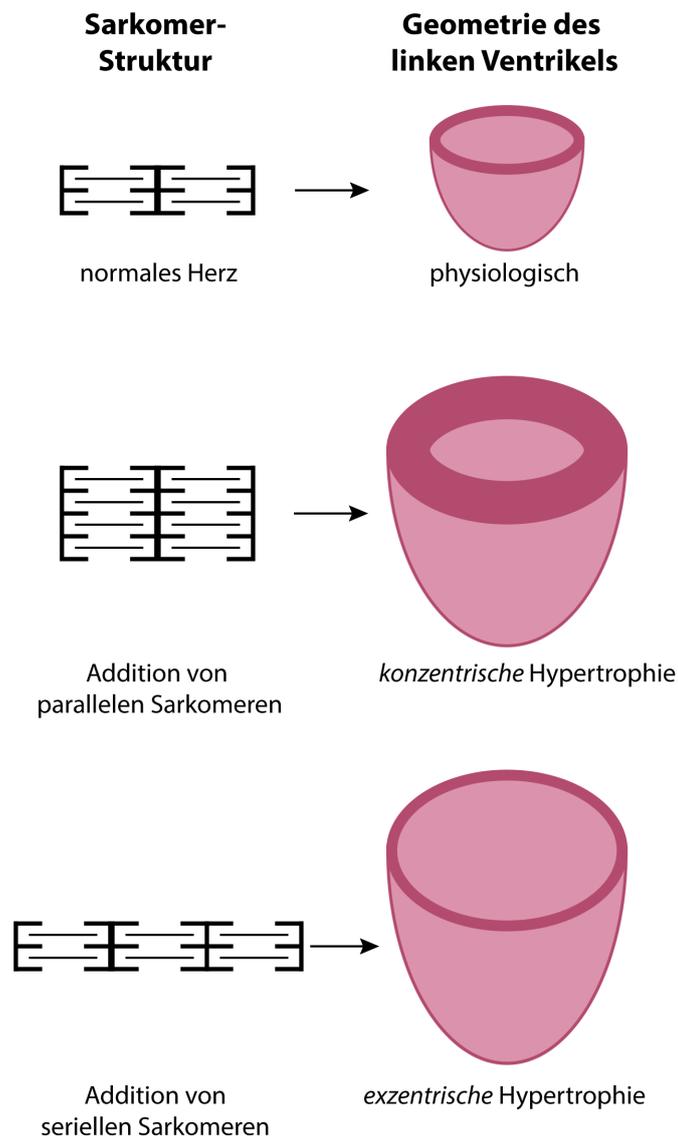


Abbildung 2: Morphologie der kardialen Hypertrophie.

Die *konzentrische* Hypertrophie ist morphologisch durch Addition parallelisierter Sarkomere und Verbreiterung der Kardiomyozyten gekennzeichnet, die zu einer Verdickung der Ventrikelwand führt. Die *exzentrische* Hypertrophie zeigt dagegen die Addition serieller Sarkomere bei Längenzunahme der Kardiomyozyten und resultiert in einer Dilatation des Ventrikels.

Abbildung modifiziert nach Gjesdal, Bluemke & Lima, 2011 mit Erlaubnis von Springer Nature.

Die *konzentrische* Hypertrophie entsteht reaktiv aufgrund einer chronischen Druckbelastung, die beispielsweise durch eine Aortenklappenstenose oder arterielle Hypertonie bedingt ist. Morphologisch ist diese Form der Hypertrophie durch Addition

parallelisierter Sarkomere und einer Vergrößerung der Kardiomyozyten-Durchmesser gekennzeichnet (Frey *et al.*, 2004; Gjesdal *et al.*, 2011). Dies bewirkt eine Zunahme der Wanddicke (die Ratio r:h bzw. Volumen : Masse wird kleiner), um die Wandspannung wieder zu normalisieren (Lorell & Carabello, 2000).

Die *exzentrische* Hypertrophie ist durch die Förderung großer Blutvolumina bedingt, wie es beispielsweise bei Klappeninsuffizienzen notwendig ist. Hierbei zeigen sich eine Vermehrung der Sarkomere in Serie sowie eine Längenzunahme der Kardiomyozyten (Dorn *et al.*, 2003; Mutlak & Kehat, 2015). Die Folge ist eine Dilatation des Ventrikels mit Vergrößerung der Ratio r:h (Lorell *et al.*, 2000).

1.1.1 Molekulare Charakteristika in kardialer Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie ist auf zellulärer Ebene durch die Größenzunahme der Kardiomyozyten sowie einer Reorganisation und Addition der Sarkomerstruktur gekennzeichnet (Rohini *et al.*, 2010). Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Muskelzellen, die postnatal ihre Teilungsfähigkeit verlieren (Woodcock & Matkovich, 2005). Daraus folgt, dass Herzwachstum und -hypertrophie hauptsächlich durch Größenzunahme bereits bestehender Kardiomyozyten ohne Zunahme der Zellzahlen erfolgt und dass der Verlust an Zellen, beispielsweise aufgrund eines Myokardinfarkts, durch eine gesteigerte Arbeitsleistung der vitalen Kardiomyozyten kompensiert werden muss (Rohini *et al.*, 2010; Woodcock *et al.*, 2005).

Prinzipiell können die Vorgänge auf zellulärer Ebene, die die Hypertrophie verursachen, in drei Stadien unterteilt werden: die extrazelluläre hypertrophe Stimulation der Kardiomyozyten, die diverse intrazelluläre Signaltransduktionen bewirkt, welche wiederum nukleäre Vorgänge aktivieren, die letztlich zur Entwicklung des hypertrophen Phänotypen führen (Glennon *et al.*, 1995).

1.1.1.1 Extrazelluläre hypertrophe Stimuli

Die wichtigsten hypertrophen Stimuli sind chronische Druck- oder Volumenbelastung. Mechanischer Stress der Kardiomyozyten wird dabei in ein biochemisches Signal umgewandelt, das schließlich die nukleäre Gentranskription beeinflusst (Lorell *et al.*, 2000). Die Brücke zwischen mechanischem Stress und kardialer Hypertrophie stellen

Integrine und mechanosensitive Ionenkanäle (*stretch-activated ion channels*) dar, die den Durchtritt von Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und anderer Ionen auf mechanischen Reiz der Zelle zulassen (Hu & Sachs, 1997; Reed *et al.*, 2014; Ruknudin *et al.*, 1993).

Anhand folgender Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass die mechanische, hämodynamische Überlastung nur ein Baustein der komplexen Interaktion verschiedener Faktoren ist, die letztlich in kardialer Hypertrophie gipfeln: Bei hypertonen Patienten fördern manche Arzneimittel die Regression der linksventrikulären Hypertrophie stärker als andere, obwohl der Blutdruck gleichermaßen reduziert wurde (Dahlof *et al.*, 1992). Folglich sind an der Pathogenese weitere Stimuli, wie Hormone, Mediatoren und neuronale Faktoren, beteiligt, deren Zusammenspiel mit den mechanischen hämodynamischen Belastungen die ventrikuläre Hypertrophie verursachen (Glennon *et al.*, 1995; Mutlak *et al.*, 2015).

Der Einfluss dieser humoralen Faktoren wurde ausgiebig in kultivierten Kardiomyozyten erforscht. Die Aktivierung dieses Mechanismus erfolgt durch die Bindung des jeweiligen hypertrophen Mediators, unter anderem Angiotensin II (Hernandez *et al.*, 2014; Sadoshima & Izumo, 1993), Endothelin-1 (Amirak *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 1991), Katecholamine (Engelhardt, 2005; Engelhardt *et al.*, 2001; Hein & Schmitt, 2003; Lohse *et al.*, 2003; Lothar & Hein, 2016) oder andere Wachstumsfaktoren (Ito *et al.*, 1993), an seinen membrangebundenen Rezeptor. Dabei sind vor allem Rezeptortyrosinkinasen (RTK), aber auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) beteiligt, die in Kapitel 1.2.4 näher beleuchtet werden (Heineke *et al.*, 2006; Lohse *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2009b).

1.1.1.2 Intrazelluläre Signaltransduktion und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

Die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur hypertrophen Antwort der Kardiomyozyten führt, erfolgt im Wesentlichen über mehrere Signalwege, die nachfolgend kurz vorgestellt werden (Abbildung 3). Eine Schlüsselrolle nimmt dabei der sekundäre Botenstoff Calcium ein, der nicht nur die kontraktile Herzfunktion, sondern auch das Herzwachstum kontrolliert (Bernardo *et al.*, 2010; Engelhardt *et al.*, 2004; Foerster *et al.*, 2004). Calcium gelangt entweder über spannungsabhängige (L-Typ) Ca²⁺-Kanäle (LTCC) vom Extrazellularraum oder über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (sog. Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung) in die

Zelle (Endo, 1977; Fabiato, 1983). Die Bindung von Angiotensin II, Endothelin-1 oder Katecholaminen an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) führt über die Aktivierung der Proteinkinase C ebenfalls zur Mobilisierung intrazellulären Calciums (Kapitel 1.2.4.2.4 Einteilung der aktivierten G-Proteine).

1.1.1.2.1 Calcineurin-/NFAT-Signalweg

Der intrazelluläre Calcium-Einstrom bewirkt zunächst die Bildung eines Komplexes mit dem Adapterprotein Calmodulin (CaM) (Stevens, 1983). Dieser Ca^{2+} /CaM-Komplex aktiviert daraufhin die Calmodulin-abhängige Protein-Phosphatase Calcineurin (Rohini *et al.*, 2010). Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert die im Zytoplasma lokalisierten Transkriptionsfaktoren der *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Familie, um deren nukleäre Translokation zu ermöglichen (Lattion *et al.*, 1986; Obata *et al.*, 2005).

Im Zellkern aktivieren die NFATs verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter GATA-4 oder *myocyte enhancer factor 2* (MEF2), und initiieren so die prohypertrophe Genexpression (Bers, 2008; Morimoto *et al.*, 2000). Während der pharmakologisch genutzte Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A in einigen Modellen die Ausbildung kardialer Hypertrophie verhindern kann (Oie *et al.*, 2000; Sussman *et al.*, 1998), zeigten sich erhöhte Calcineurin-Aktivitäten in hypertrophierten murinen und humanen Herzen (Lim *et al.*, 2000; Ritter *et al.*, 2002; Shimoyama *et al.*, 1999).

1.1.1.2.2 CaMKII/HDAC-Signalweg

Ein weiteres durch den Ca^{2+} /CaM-Komplex reguliertes Enzym ist die Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII), die unter anderem an der Calcium-Aufnahme und -Homöostase in den Kardiomyozyten beteiligt ist (Anderson, 2005). An diesem Signalweg ist ebenfalls der Transkriptionsfaktor MEF2 beteiligt (Eom & Kook, 2015; Molkenin & Markham, 1993; Passier *et al.*, 2000).

In nicht-stimulierten Zellen wird die MEF2-Aktivität durch Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse IIa inhibiert, die sich an die DNA-Bindedomäne anlagern (Miska *et al.*, 1999; Sparrow *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung der Klasse II-HDACs durch die CaMKII bewirkt die Bindung von 14-3-3-Proteinen an diese Enzyme, die daraufhin vom Transkriptionsfaktor MEF2 dissoziieren (McKinsey *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000)

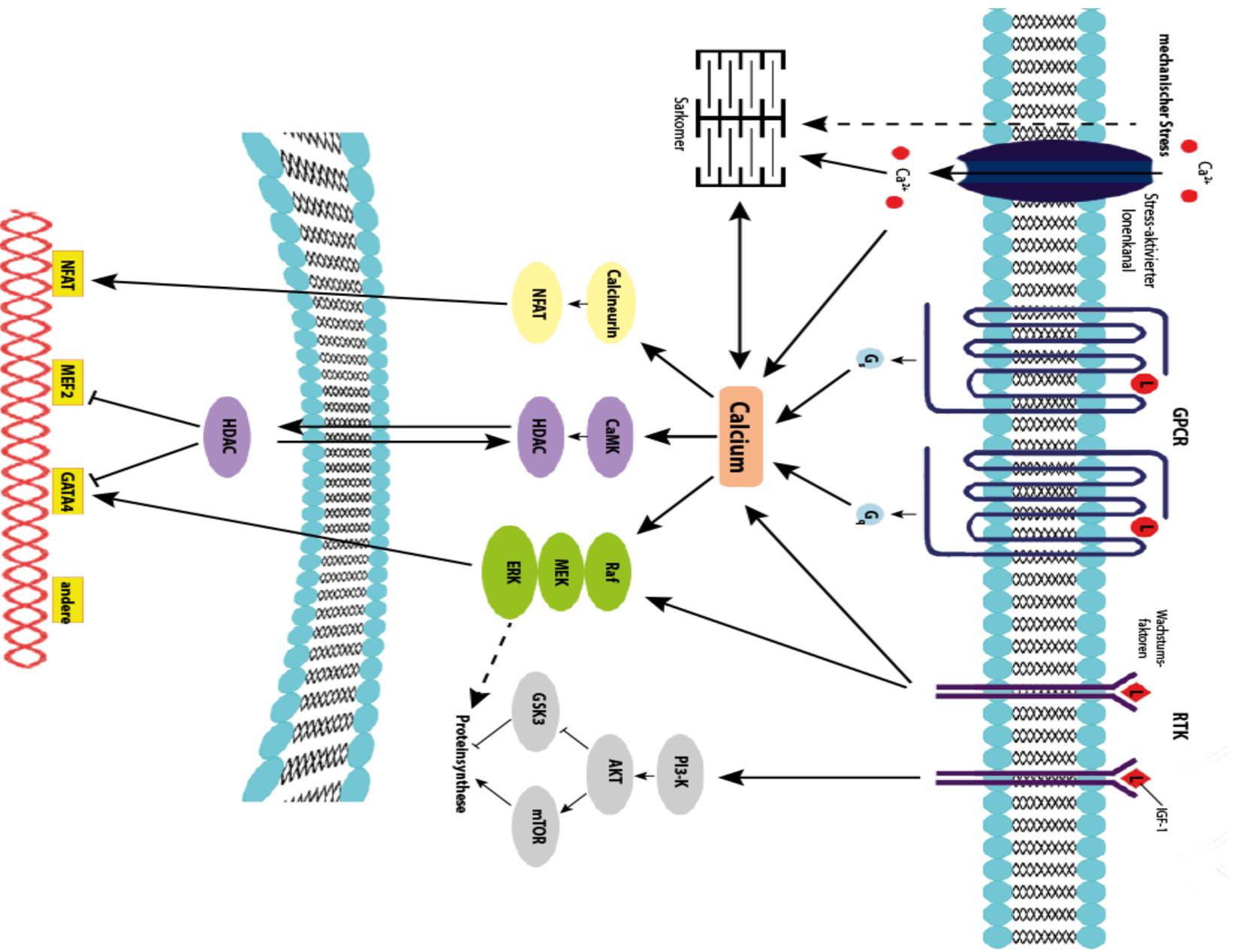


Abbildung 3: Schematische Darstellung von an der kardialen Hypertrophie beteiligten Signalwegen.

Die Stimulation der Kardiomyozyten durch mechanischen Stress und/oder neurohumorale Faktoren führt unter anderem zur Induktion hypertropher Gene. Der Prozess der Entstehung der kardialen Hypertrophie ist ein Zusammenspiel diverser Signalwege, von denen aufgrund deren Komplexität in dieser Abbildung lediglich einige exemplarische Interaktionen gezeigt wurden.

und aus dem Zellkern geschleust werden (Eom *et al.*, 2015; Kee & Kook, 2011). MEF2 wird durch Coaktivatoren, wie p300 oder *CREB-binding protein* (CBP), aktiviert (Impey *et al.*, 2002; Slepak *et al.*, 2001).

Die wichtige Rolle der HDAC der Klasse IIa als negative Regulatoren der kardialen Hypertrophie wurde an HDAC9-defizienten Mäusen gezeigt, die sogar unter basalen Bedingungen Zeichen der Herzhypertrophie zeigten und nach Erhöhung der Nachlast weitaus anfälliger waren als Wildtyp-Tiere (Zhang *et al.*, 2002).

1.1.1.2.3 MAPK-Signalwege

Die Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) nimmt ebenfalls einen hohen Stellenwert in der Entstehung kardialer Hypertrophie ein (Barry *et al.*, 2008). Durch Untersuchungen an transgenen oder *Knockout*-Mausmodellen, die eine veränderte Aktivität der MAPK hervorrufen, konnte die Bedeutung dieser Proteinkinasen in physiologischen und pathologischen Prozessen des Herzens ermittelt werden (Liu & Molkentin, 2016). Kapitel 1.2.1 behandelt die Familie der MAPK, zusätzlich wird die Rolle der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) und der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in den Kapiteln 1.2.5.3.8 und 1.2.5.3.9 ausführlich beleuchtet (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Daher wird im Folgenden lediglich die Bedeutung der beiden MAP-Kinasen p38 und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) in der kardialen Hypertrophie näher vorgestellt.

Sowohl p38 als auch JNK scheinen eine dilatative, zur Kardiomyopathie führende Wirkung auf das Herz zu besitzen (Liang & Molkentin, 2003b; Liu *et al.*, 2016). Obwohl JNK nach Stimulation (Behandlung mit einem Agonisten oder Stress) *in vitro* und *in vivo* schnell aktiviert werden (Choukroun *et al.*, 1999; Yano *et al.*, 1998), führte die Überexpression des vorgeschalteten Aktivators MKK7 in Mäusen – im Gegensatz zu ERK1/2 – zur Kardiomyopathie, an der die Tiere bereits in jungem Lebensalter verstarben (Petrich *et al.*, 2002; Petrich *et al.*, 2003). Die JNK-Inhibition bewirkte dagegen eine gesteigerte Anfälligkeit zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Liang *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2016).

Die herzspezifische Überexpression des p38-Aktivators MKK3 führte *in vivo* ebenfalls zur dilatativen Kardiomyopathie und einer frühen Letalität (Auger-Messier *et al.*, 2013; Liao

et al., 2001). Die Rolle der p38-Aktivierung in der Entwicklung kardialer Hypertrophie ist jedoch immer noch umstritten: Während die Hemmung oder der Verlust von endogenem p38 einen Stimulus für das Wachstum der Kardiomyozyten darstellt und die Tiere anfälliger für die Entstehung der Herzhypertrophie macht (Braz *et al.*, 2003; Nishida *et al.*, 2004), zeigten Streicher *et al.*, dass die akute Aktivierung von endogenem p38 ebenfalls zur kardialen Hypertrophie und Fibrose führt (Streicher *et al.*, 2010; Yokota & Wang, 2016). Obwohl die Aktivierung von p38 im Zusammenhang mit der kardialen Hypertrophie steht, ist seine Rolle bis heute unklar und muss daher bis zur Entdeckung weiterer Erkenntnisse weiterhin kontrovers diskutiert werden (Yokota *et al.*, 2016).

1.1.1.3 Zelluläre Antwort: Das fetale Gen-Programm

Nach der pathologischen hypertrophen Stimulation reagieren Kardiomyozyten mit einer charakteristischen Abfolge an Änderungen der Genexpression und der Reaktivierung des fetalen Gen-Programms (

Tabelle 1) (Barry *et al.*, 2008; Carreno *et al.*, 2006). Dabei werden Gene reexprimiert, die nur während der Embryogenese bedeutend und im Erwachsenenalter abgeschaltet sind (Barry *et al.*, 2008). So erlangt das gestresste Herz die Möglichkeit der koordinierten Proteinsynthese zur Vergrößerung der einzelnen Zellen (Barry *et al.*, 2008; Rajabi *et al.*, 2007). Außerdem verändert sich während der Progression der kardialen Hypertrophie der Energiemetabolismus von der β -Oxidation von Fettsäuren zu einem verstärkten Glucose-Metabolismus (Allard *et al.*, 1994; Bishop & Altschuld, 1970; Sack *et al.*, 1996).

Tabelle 1: Veränderungen in Kardiomyozyten nach hypertropher Stimulation.

Zeit nach hypertrophem Stimulus	Veränderungen im Kardiomyozyten	Beispiele
30 Minuten	Induktion der <i>immediate early genes</i>	c-Fos, c-Jun, c-Myc, hsp70
6-12 Stunden	Induktion des fetalen Gen-Programms	ANF, BNP, β -MHC
12-24 Stunden	Heraufregulation von kontraktile Genen	MLC-2, kardiales α -Aktin
> 24 Stunden	Anstieg an Protein- und RNA-Gehalt, Zunahme der Zellgröße, nicht der -zahl	

1.1.1.3.1 Induktion der *immediate early genes* (IEGs)

Die ersten induzierten Gene gehören der Gruppe der *immediate early genes* (IEG) an, die bereits innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation der Kardiomyozyten transkribiert werden (darunter die Protoonkogene c-Fos, c-Jun und c-Myc sowie das Hitzeschockprotein hsp70) (Iwaki *et al.*, 1990; Komuro *et al.*, 1990). Insbesondere die Expression von c-Fos zeigt sich dabei proportional zum mechanischen Stress, den die getesteten Herzen erfuhren (Schunkert *et al.*, 1991). Die IEGs kodieren für Proteine, die die weitere Transkription regulieren (Bishopric *et al.*, 1992): Beispielsweise bilden die Proteine Jun und Fos den *Activator Protein-1* (AP-1)-Komplex, der an die Promoter-Region vieler (fetaler) Gene bindet, unter anderem des Gens des atrialen natriuretischen Peptids (ANP, auch bekannt als atrialer natriuretischer Faktor, ANF) oder des Skelettmuskel- α -Aktins (Bishopric *et al.*, 1992; Seidman *et al.*, 1988).

1.1.1.3.2 Induktion des fetalen Gen-Programms

Nach Expression der IEGs beginnt mit einer Verzögerung von etwa sechs bis zwölf Stunden nach hypertropher Stimulation die Reaktivierung des fetalen Gen-Programms (Glennon *et al.*, 1995). Darunter fallen die natriuretischen Peptide sowie fetale Isoformen kontraktiver Proteine, wie beispielsweise die schwere Kette des β -Myosins (β -MHC) und das Skelettmuskel- α -Aktin (SKA), die zu den am häufigsten laborchemisch bestimmten Markern der Herzhypertrophie gehören (Barry *et al.*, 2008).

Die Familie der natriuretischen Peptide (atrialer natriuretischer Faktor (ANF) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP)) werden nach Dehnung der Vorhöfe durch große Blutvolumina sezerniert und bewirken unter anderem eine erhöhte renale Wasser- und Natriumausscheidung (Gardner *et al.*, 2007; Richards, 2007). Im Myokard wird die hypertrophe Antwort über die Aktivierung der Guanylylzyklase, die über den sekundären Botenstoff cGMP zur Muskelrelaxation führt (Hirose *et al.*, 2001), gehemmt (Barry *et al.*, 2008; Horio *et al.*, 2000). Die Herzen transgener ANF^{-/-}-Knockout-Mäuse hypertrophieren bereits unter Ruhebedingungen, während mechanischer Stress zu einer stärkeren hypertrophen Antwort führt (Mori *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Dagegen resultierte die herzspezifische ANF-Überexpression bei Mäusen zu einer verringerten hypertrophen Antwort (Klinger *et al.*, 1993).

Ein molekulares Charakteristikum der kardialen Hypertrophie ist der Wandel der Isoform-Expression von α -MHC zu β -MHC (Izumo *et al.*, 1987; Mahdavi *et al.*, 1984). Jede Isoform besitzt eine individuelle enzymatische Aktivität; somit wird die kardiale Funktion erheblich durch die relative Ratio der beiden MHC-Isoformen beeinflusst (Barry *et al.*, 2008). Durch die Verschiebung der Ratio zugunsten β -MHC wird die Geschwindigkeit der Myosin-ATPase verringert, wodurch die Kontraktionsrate des Kardiomyozyten reduziert wird (Lowes *et al.*, 1997). Kann die Hypertrophie erfolgreich revidiert werden, beispielsweise durch eine adäquate medikamentöse Therapie, verschiebt sich die Ratio wieder auf die physiologische Seite (Lowes *et al.*, 2002).

1.1.1.3.3 Regulation der Proteinbiosynthese: PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg

Die Reorganisation der Sarkomer-Struktur setzt eine gesteigerte Proteinsynthese voraus, die ein weiteres wichtiges Charakteristikum der kardialen Hypertrophie darstellt (Rohini *et al.*, 2010). Diese Prozesse stehen zumindest teilweise unter der Regulation des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs (Carreno *et al.*, 2006). Aktiviertes mTOR hat im Wesentlichen zwei Zielproteine: Einerseits phosphoryliert der mTOR-Komplex den Translationsinhibitor *eukaryotic initiation factor 4E (eIF4)-binding protein 1 (4E-BP1)*, der daraufhin von eIF4 dissoziiert und die Translation initiiert (Martelli *et al.*, 2011). Andererseits wird die p70^{S6} Kinase 1 (S6K1) durch mTOR an mindestens zwei Resten phosphoryliert (Ma & Blenis, 2009). Nach der Aktivierung stimuliert S6K1 die Proteinbiosynthese durch Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 und eIF4B (Peterson & Schreiber, 1998).

McCullen *et al.* zeigten, dass der mTOR-Inhibitor Rapamycin (auch Sirolimus genannt) die kardiale Hypertrophie verhindert und sogar revidiert (McCullen *et al.*, 2004; McCullen *et al.*, 2003). mTOR könnte also die gemeinsame Endstrecke vieler verschiedener Signale sein, die zur Proteinsynthese und dem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten führen (Carreno *et al.*, 2006).

1.1.1.4 Kardiovaskuläres Remodeling

Unter dem Begriff kardiovaskuläres *Remodeling* werden reaktive Umbauprozesse des Herzens sowie eine strukturelle Änderung des Herzgewebes bei pathologischen Zuständen verstanden, die unbehandelt in einer kardialen Dysfunktion und letztendlich in einer globalen Herzinsuffizienz münden können (Pfeffer & Braunwald, 1990). Diese Umbauprozesse können durch die folgenden Veränderungen charakterisiert werden: (1) Hypertrophie der Kardiomyozyten; (2) Verlust an Kardiomyozyten durch Apoptose und Nekrose; (3) interstitielle Fibrose mit Ablagerung von Kollagen; und (4) Dilatation des Ventrikels (Sutton & Sharpe, 2000). Zusätzlich tritt die Verdickung der intramyokardialen Arterien sowie eine reduzierte Sauer- und Nährstoffversorgung des Gewebes über Kapillaren auf (Tornig *et al.*, 1999).

Die Stimulatoren des kardialen *Remodeling* gleichen prinzipiell denen der kardialen Hypertrophie: eine gesteigerte Wandspannung des linken Ventrikels, die durch einen erhöhten intrakardialen Druck und/oder Volumen verursacht wird, und die Aktivierung neurohumoraler Faktoren, vor allem von Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholaminen, aber auch von Zytokinen (Seeland *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2005).

1.1.1.4.1 Apoptotischer und nekrotischer Verlust an Kardiomyozyten

Im Allgemeinen können Zellen auf zwei verschiedene Arten absterben: Die Apoptose (gr. *apóptosis*: abfallen) oder programmierter Zelltod stellt einen komplexen Mechanismus dar, der zu einem kontrollierten Abbau der Zellen führt (Hengartner, 2000). Dabei handelt es sich um einen aktiven, energieabhängigen Prozess einer Zelle, die schrittweise ohne Entstehung einer Entzündungsreaktion abgebaut werde (Kunapuli *et al.*, 2006). Demgegenüber führt die Nekrose (gr. *nékrosis*: das Töten), der unkontrollierte autolytische Zelltod, zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes und schließlich in der Bildung einer Narbe (Nadal-Ginard *et al.*, 2003; Proskuryakov *et al.*, 2003). Abhängig von Ätiologie und Pathogenese der Schädigung können Kardiomyozyten sowohl apoptotisch (z.B. in der kardialen Hypertrophie), als auch nekrotisch (z.B. nach einem Myokardinfarkt) untergehen (Chiong *et al.*, 2011). Vermehrtes Absterben der Kardiomyozyten bewirkt eine hypertrophe Stimulation der verbliebenen Zellen, um dieselbe Auswurfleistung erbringen zu können, und dem Ersatz

der Zellen durch Fibroblasten und Kollagen, der als Bestandteil des kardialen Remodeling als Fibrose bezeichnet wird (Chiong *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012; Hang *et al.*, 2006).

1.1.1.4.2 Interstitielle Fibrose

Ein wichtiger Bestandteil des kardialen Remodeling ist die exzessive Ablagerung von extrazellulärer Matrix (ECM) als Narbe und/oder Fibrose, die in besonderem Maße zu Herzrhythmusstörungen und kontraktile Dysfunktion beiträgt (Burchfield *et al.*, 2013; Spinale, 2007). Die ECM wird durch kardiale Fibroblasten sezerniert (Eghbali & Weber, 1990) und hat im Wesentlichen zwei Funktionen: Sie bildet ein strukturelles Netzwerk, das die kardialen Zellen umgibt und stabilisiert (beispielsweise bei Füllung der Ventrikel), und ermöglicht eine regelrechte Herzaktion, indem die Kontraktionen der vielen Kardiomyozyten als eine einzelne systolische Reaktion organisiert wird (Creemers & Pinto, 2011; Krenning *et al.*, 2010). Als Reaktion auf gewisse Stimuli, beispielsweise Tumornekrosefaktor α (TNF α), *transforming growth factor* β (TGF- β) oder mechanische Stimulation, synthetisieren die Fibroblasten Kollagenfasern (insbesondere Typ I und III), aber auch andere Proteine der ECM (Bosman & Stamenkovic, 2003; Brooks & Conrad, 2000; Seeland *et al.*, 2007).

Üblicherweise ist die Sekretionsmenge der Kollagenfasern beim Gesunden begrenzt (Krenning *et al.*, 2010). Eine Schädigung am Herzen jedweder Art kann jedoch die exzessive Ablagerung von ECM bewirken (Eghbali *et al.*, 1990), die die Myokardwand versteift und zu einer diastolischen Dysfunktion führt (Chaturvedi *et al.*, 2010). Zusätzlich kann die vermehrte ECM die elektromechanische Kopplung von Kardiomyozyten stören, wodurch die kardiale Kontraktion verringert und das Risiko für Herzrhythmusstörungen erheblich gesteigert wird (Spach & Boineau, 1997).

Histopathologisch werden zwei Formen der kardialen Fibrose unterschieden: Die *reaktive* (interstitielle) Fibrose ist eine adaptive Antwort des Herzens auf eine gesteigerte Arbeitsbelastung oder Inflammation und dient in erster Linie dazu, den für den Auswurf notwendigen gesteigerten Druck aufrechtzuerhalten (Anderson *et al.*, 1979). Charakteristischerweise beginnen die fibrotischen Veränderungen in der Nähe der Mikrovaskularisation und breiten sich erst später in die restlichen interstitiellen

Areale aus (Anderson *et al.*, 1979; Silver *et al.*, 1990; Weber, 1989). Die *reparative* Fibrose dient dem Ersatz von untergegangenen Herzwesen: Sie kann infolge einer strukturellen Schädigung des Herzens, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt (Anderson *et al.*, 1979; Krenning *et al.*, 2010), oder aber der reaktiven Form nachfolgend auftreten. Dabei wird der Verlust der Masse von Kardiomyozyten durch eine fibrotische Narbe ersetzt (Burchfield *et al.*, 2013).

1.1.2 Abgrenzung der pathologischen vs. physiologischen kardialen Hypertrophie

Wie die pathologische Hypertrophie ist auch die physiologische Form ein adaptiver Prozess, um die Leistung und Funktion des Herzens bei gesteigerten Anforderungen zu verbessern (Rohini *et al.*, 2010). Klassischerweise tritt diese Form der Hypertrophie bei Menschen auf, die Ausdauersport betreiben (Bernardo *et al.*, 2010); weiterhin zählen auch das postnatale Wachstum und die Herzhypertrophie bei Schwangeren in diesen Kreis (Ellison *et al.*, 2012; Maillet *et al.*, 2013). Das Herz kann bei diesen Stimuli sowohl konzentrisch als auch ekzentrisch hypertrophieren (Bernardo *et al.*, 2010; Ellison *et al.*, 2012).

Obwohl sich das Herz bei beiden Formen vergleichbar vergrößert, zeigt die physiologische Hypertrophie deutliche Unterschiede in funktionalen, strukturellen und metabolischen Merkmalen (Bernardo *et al.*, 2010): Sie ist reversibel und durch eine normale Morphologie und Struktur des Myokards sowie einer normalen oder gesteigerten Auswurfleistung gekennzeichnet (Ellison *et al.*, 2012; Weeks & McMullen, 2011). Typischerweise treten weder fibrosierte Areale noch erhöhte Raten an Zellsterben der Kardiomyozyten auf (Bernardo *et al.*, 2010). Die Zunahme der Myokardmasse erfolgt in einem gesunden, ausgeglichenen Verhältnis von Kardiomyozyten-Hypertrophie und gesteigerter Kapillardichte (Ellison *et al.*, 2012).

In der pathologischen Hypertrophie dominiert dagegen das kardiale Remodeling mit Fibrose, der Verlust an Kardiomyozyten sowie die daraus resultierende kardiale Dysfunktion (Burchfield *et al.*, 2013; Ellison *et al.*, 2012).

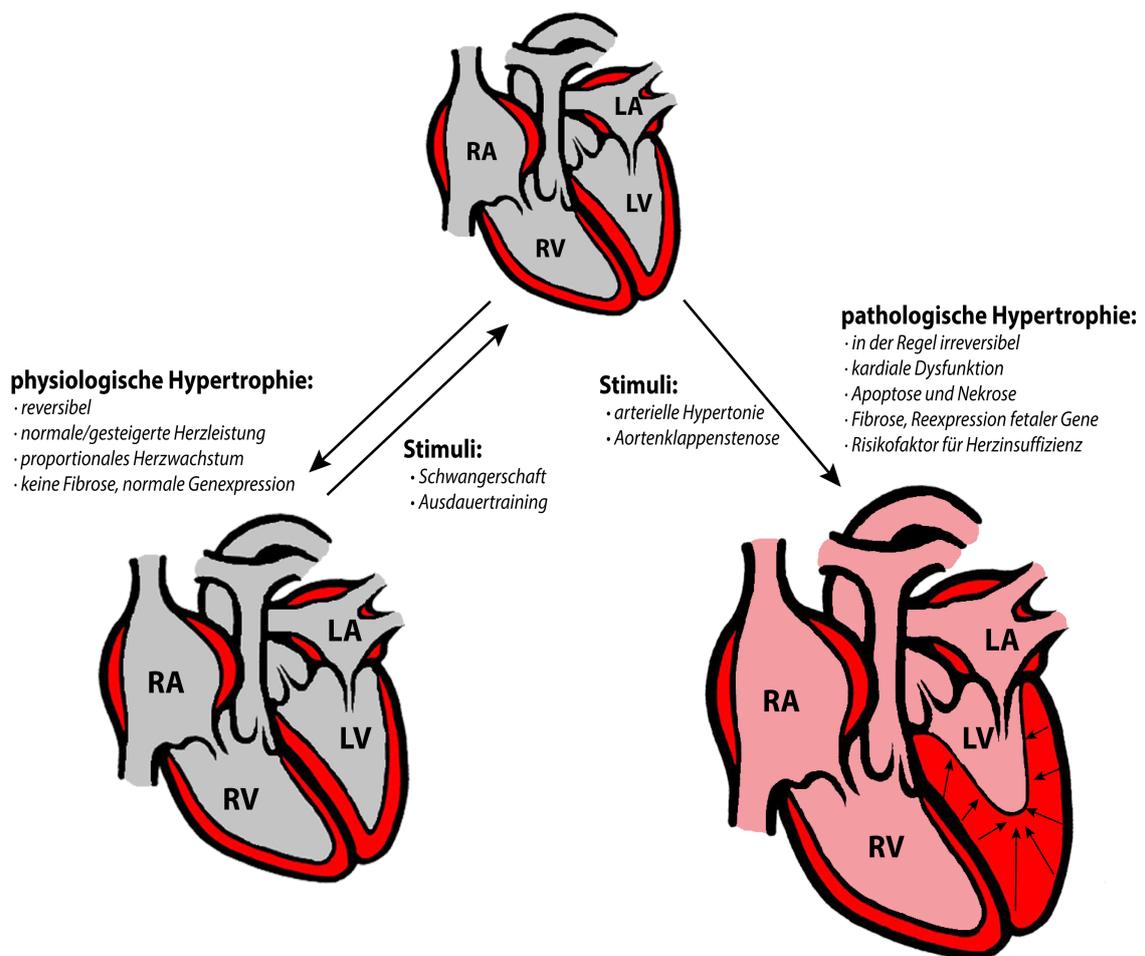


Abbildung 4: Vergleich der physiologischen vs. pathologischen kardialen Hypertrophie.

Die physiologische kardiale Hypertrophie tritt bei Ausdauersport oder während der Schwangerschaft auf und ist durch eine normale oder gesteigerte Herzleistung bei einer normalen Morphologie des Myokards gekennzeichnet. Die pathologische kardiale Hypertrophie, die durch eine Aortenklappenstenose oder bei arterieller Hypertonie auftreten kann, ist dagegen durch eine kardiale Dysfunktion bei einer asymmetrischen Vergrößerung mit Fibrose und Zelluntergang gekennzeichnet.

Legende: RA: rechtes Atrium; RV: rechter Ventrikel; LA: linkes Atrium; LV: linker Ventrikel.
Abbildung modifiziert nach Bernardo, 2010 mit Erlaubnis von Elsevier.

1.2 Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2)

1.2.1 Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen, MAPK) sind Enzyme, die eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion eukaryotischer Organismen übernehmen (Cargnello & Roux, 2011; Chen *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2009b; Robinson & Cobb, 1997). Sie werden durch extrazelluläre Signale, wie beispielsweise Mitogene, Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren, stimuliert und rufen eine Antwort auf zellulärer Ebene hervor. Dabei spielen sie eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Funktionen, unter anderem der Proliferation, der Embryogenese, dem Zellzyklus und der Apoptose (Pearson *et al.*, 2001).

Die Familie der MAP-Kinasen kann, wie bereits in Kapitel 1.1.1.2.3 beschrieben, in drei unterschiedliche Signalwege eingeteilt werden: Die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die vor allem am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung beteiligt sind, die p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen, die unter anderem in Entzündung und Apoptose eine Rolle spielen (English *et al.*, 1999), und schließlich die c-Jun-terminalen Kinasen (JNK), die zu Entzündung und Apoptose führen (Chen *et al.*, 2001). Ihnen ist eine Aktivierung über Phosphorylierungskaskaden aus mindestens drei Bestandteilen gemeinsam: Ein Mitogen aktiviert über seine Rezeptortyrosinkinase zunächst die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), die daraufhin ihr Target, die MAP-Kinase-Kinase (MAP2K), phosphoryliert. Dieses Enzym aktiviert schließlich die MAP-Kinase (MAPK) durch duale Phosphorylierung am für diesen Signalweg charakteristischen Threonin-X-Tyrosin-Motiv, wobei sich X für die einzelnen MAPKs unterscheidet (im Falle von ERK1/2 ist X die Aminosäure Glutaminsäure, also das sogenannte TEY-Motiv; Alberts, 2015). Sobald die MAP-Kinasen aktiv sind, können sie ihre nukleären und zytosolischen Zielproteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und andere funktionelle Proteine, aktivieren (Cargnello *et al.*, 2011; Roskoski, 2012b). Proteinphosphatasen (beispielsweise Tyrosinphosphatasen oder Serin-/Threoninphosphatasen) inaktivieren die MAP-Kinasen, indem sie einer der beiden Aktivierungsstellen (pThr oder pTyr) dephosphorylieren (Theodosiou & Ashworth, 2002).

1.2.2 Die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade

Die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade besteht aus den Kinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2 und wird häufig auch als MAPK-Kaskade bezeichnet (Roskoski, 2012a). Diese Kaskade ist – wie die Kaskaden der anderen MAP-Kinasen auch – der Überträger eines extrazellulären Signals zur DNA in den Zellkern und nimmt einen zentralen Stellenwert vieler zellulärer Funktionen ein (Pearson *et al.*, 2001; Torii *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurden die Effektoren dieses Signalwegs als „extrazellulär regulierte Kinasen“ (ERK) benannt (Boulton & Cobb, 1991a).

Mehrere Stimuli, unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine oder zellulärer Stress, führen über ihre unterschiedlichen Rezeptoren und unterschiedliche Signalwege letztlich zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras (Raman *et al.*, 2007). Dieses bindet und aktiviert die MAP3K c-Raf, welche die MAPK/ERK-Kinase (MEK1/2) an zwei Serin-Resten phosphoryliert (Crews & Erikson, 1992; Kyriakis *et al.*, 1992). MEK1/2 aktiviert schließlich die MAPK ERK1/2 durch duale Phosphorylierung innerhalb des TEY-Motivs (Abbildung 5) (Payne *et al.*, 1991). Die MAP2K MEK1/2 stellen die wichtigsten Substrate von Raf dar, wobei insbesondere in der Tumorgenese andere Targets der MAP3K Raf beschrieben wurde (Niault & Baccarini, 2010), ERK1/2 die wichtigsten Substrate von MEK1/2. Die Effektoren ERK1/2 haben hingegen mehrere hundert zytosolische und nukleäre Targets (Brietz *et al.*, 2016; von Kriegsheim *et al.*, 2009).

ERK1/2 werden hauptsächlich durch Dephosphorylierung von einem oder beiden Threonin- bzw. Tyrosin-Reste im TEY-Motiv inaktiviert (Lorenz *et al.*, 2009a). Dies geschieht durch Protein-Ser/Thr-Phosphatasen (Alessi *et al.*, 1995), Protein-Tyr-Phosphatasen (Pulido *et al.*, 1998) oder dual-spezifischen MAP-Kinase-Phosphatasen (Sun *et al.*, 1993). Weiterhin werden ERK1/2 durch negative Feedback-Mechanismen gehemmt, in denen vorgeschaltete Proteine inaktiviert werden (Dougherty *et al.*, 2005; Slack-Davis *et al.*, 2003).

Lorenz *et al.* identifizierten die $G_{\beta\gamma}$ -vermittelte Autophosphorylierung des Threonin-Restes an Position T188 (in murinem ERK2), die nach hypertropher Stimulation auftritt und die kardiale Hypertrophie begünstigt (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013;

Vidal *et al.*, 2012). Die detaillierte Beschreibung dieser ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung folgt in Kapitel 1.2.5.3.9.

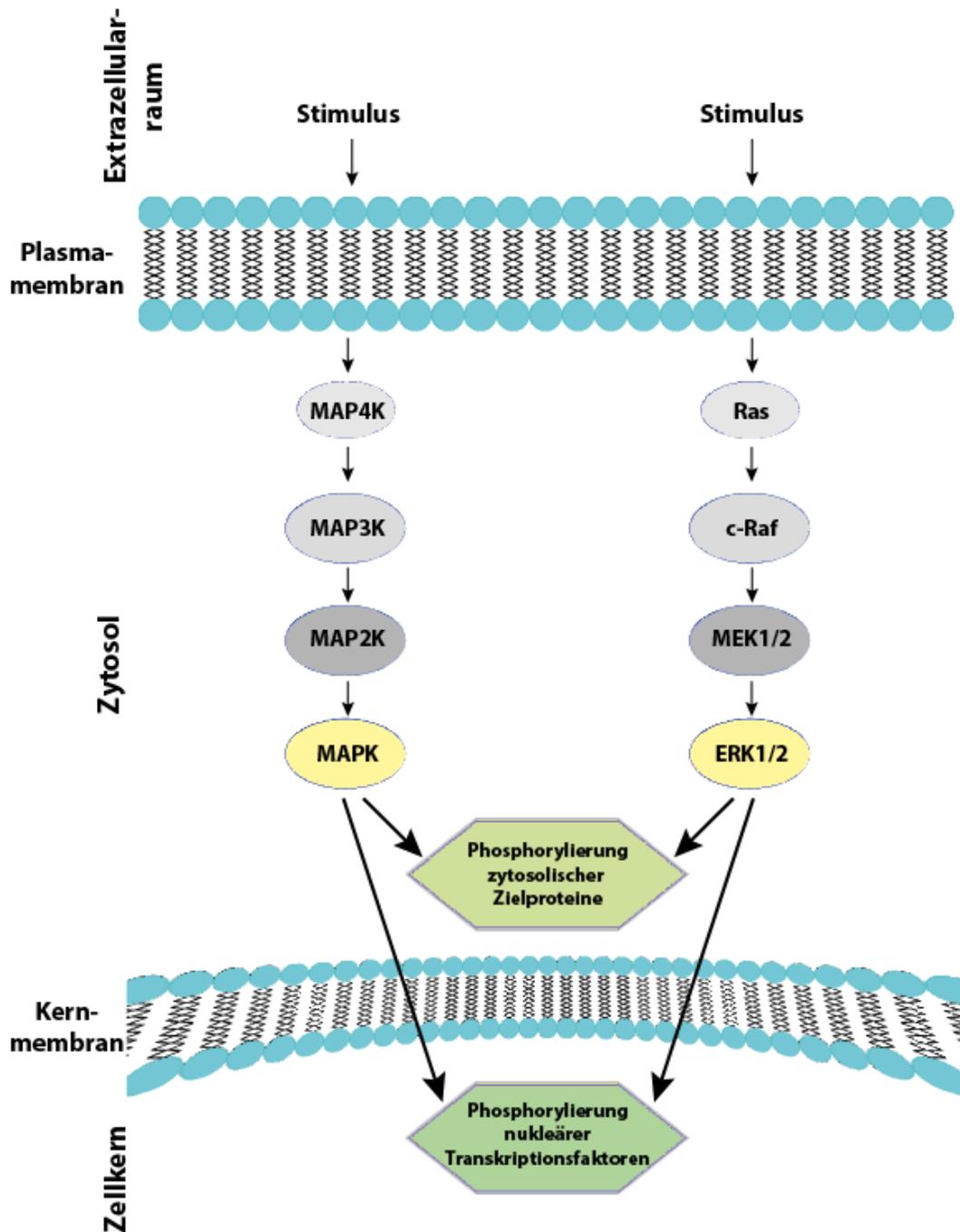


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der MAP-Kinase-Signalkaskade.

Auf der linken Seite der Abbildung ist die MAP-Kinase-Signalkaskade im Allgemeinen dargestellt, auf der rechten Seite der Aufbau der Raf-MEK-ERK-Kaskade. Ein extrazellulärer Stimulus führt zur Aktivierung des G-Proteins Ras, das die MAP3K c-Raf aktiviert. Diese phosphoryliert daraufhin die MAP2K MEK1/2. Die MAPK ERK1/2 wird schließlich durch MEK1/2-abhängige duale Phosphorylierung am TEY-Motiv des Aktivierungssegments aktiviert. Die Effektorinasen ERK1/2 kann sowohl zytosolische, als auch nukleäre Targets durch Phosphorylierung aktivieren.

1.2.3 Die kleine GTPase Ras

Ras ist eine ubiquitär exprimierte Proteinfamilie, die an der Signaltransduktion verschiedener Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt ist. Aufgrund der Erstbeschreibung als Onkogen in Ratten wurden die Proteine *Rat sarcoma* (Ras) genannt (Malumbres & Barbacid, 2003). Im Menschen sind drei Ras-Gene (HRas, NRas und KRas) bekannt, deren Proteine verschiedene Signalwege, unter anderem die MAPK-Signalkaskade, regulieren (Lodish, 1999; McCormick, 1995).

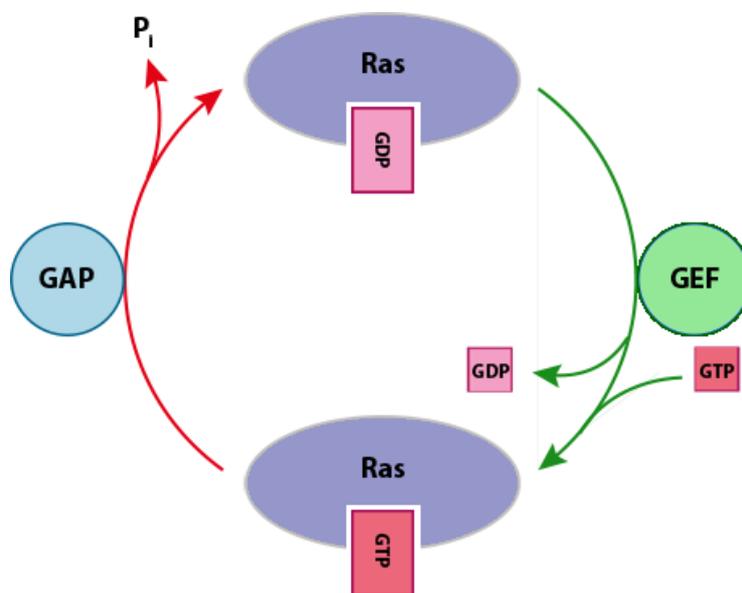


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Ras-Zyklus.

Die GTPase Ras wird durch den Austausch von GDP in GTP, katalysiert durch *den Guanine nucleotide exchange factor* (GEF), aktiviert. Nach diesem Austausch ist sie in der Lage, Effektorproteine, unter anderem c-Raf, zu aktivieren. Die Terminierung dieses Signals erfolgt durch die Abspaltung eines Phosphat-Restes von GTP, katalysiert durch das *GTPase-activating protein* (GAP), wodurch Ras in inaktivem Zustand vorliegt.

Ras ist eine sogenannte monomere kleine GTPase (auch kleines G-Protein genannt), die Guanosin-Nukleotide bindet. Es besteht aus zwei Domänen: einer Nukleotid-bindenden G-Domäne und dem C-Terminus, an dem es in der Plasmamembran verankert ist (Vetter & Wittinghofer, 2001). Analog zu den heterotrimeren G-Proteinen ist Ras inaktiv, wenn es an Guanosindiphosphat (GDP) gebunden ist, und wird durch den Austausch zu

Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert (Alberts, 2015). Dieser Austausch wird durch *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF) und *GTPase-activating protein* (GAP) reguliert (Abbildung 6) (Cherfils & Zeghouf, 2013). Der Wechsel in GTP-Ras bewirkt eine Konformationsänderung, durch die es eine höhere Affinität zu seinen Effektoren erhält und diese binden kann. Einer dieser Effektoren ist c-Raf, die erste Kinase der MAPK-Kaskade.

1.2.4 Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade

Klassischerweise wird die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade durch Wachstumsfaktoren aktiviert, die ihre Funktionen über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vermitteln (Hubbard & Till, 2000). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung dieser Signalkaskade ist durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt (Belcheva & Coscia, 2002; Werry *et al.*, 2005). Im Folgenden werden beide Mechanismen zur ERK1/2-Aktivierung sowie eine Transaktivierung der RTK durch GPCR näher erläutert (Abbildung 7).

1.2.4.1 RTK-vermittelte ERK1/2-Aktivierung

Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehört zur großen Klasse der Membranrezeptoren, die sich durch eine intrazelluläre Kinaseaktivität auszeichnet (Williams & Larsen, 2002). Im menschlichen Genom sind 58 unterschiedliche RTK-Proteine bekannt, deren Signaltransduktion nach gleichem Muster abläuft (Robinson *et al.*, 2000). Jede RTK besteht aus einer hydrophoben Transmembrandomäne, einem extrazellulären N-Terminus mit Ligandenbindungsstelle sowie einem intrazellulären C-Terminus mit katalytischer Tyrosinkinase-Aktivität (Hubbard, 1999). Eine Ligandenbindung, beispielsweise des *epidermal growth factors* (EGF) oder des *platelet-derived growth factors* (PDGF), an seinen Rezeptor führt zunächst zur Dimerisierung der RTKs (Schlessinger, 2000), welche daraufhin einen intrazellulären Tyrosin-Rest des jeweiligen Partnerrezeptors *trans*-phosphorylieren (Lemmon & Schlessinger, 2010). Durch eine Konformationsänderung werden Bindungsstellen für Adaptermoleküle erschaffen, in die (im Falle der MAPK-Kaskade) das *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) bindet (Lowenstein *et al.*, 1992).

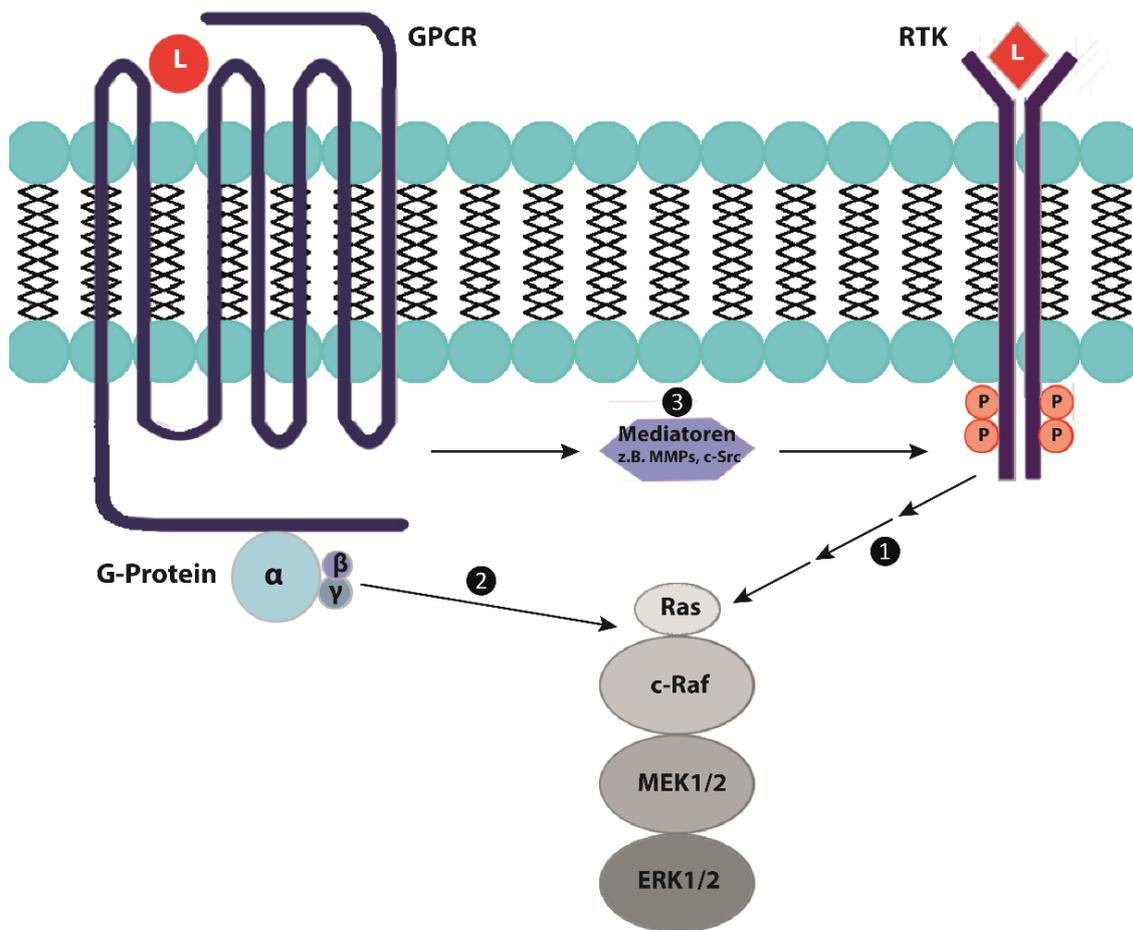


Abbildung 7: Überblick über die Aktivierungsmechanismen der MAPK-Signalkaskade.

Diese Abbildung zeigt schematisch die verschiedenen Aktivierungsmechanismen der MAPK. **1** stellt den klassischen Aktivierungsweg über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar, wobei nicht sämtliche beteiligten Proteine abgebildet sind. **2** zeigt die Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), **3** die GPCR-vermittelte Transaktivierung von RTKs.

CAVE: Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist Ras in dieser Abbildung nicht membrangebunden dargestellt.

Dies resultiert in einer Rekrutierung von *son of sevenless 1* (SOS1), einem *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) (Chardin *et al.*, 1993). Wenn ein Komplex dieser Proteine (GRB2 und SOS1) an die phosphorylierte RTK bindet, wird die Rezeptortyrosinkinase aktiv (Zarich *et al.*, 2006). Diese ist in der Lage, an die Membran gebundene kleine GTPase-Moleküle wie Ras zu aktivieren, indem sie den Austausch von

GDP in GTP katalysiert (Cherfils *et al.*, 2013). Aktiviertes Ras-GTP bindet schließlich die MAP3K c-Raf und intiiert so die Aktivierung der MAPK.

1.2.4.2 GPCR-vermittelte ERK1/2-Aktivierung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen eine große Proteinfamilie dar, die ein extrazelluläres Signal über Signalkaskaden in eine zelluläre Antwort umwandeln (Alberts, 2015). Etwa 800 verschiedene menschliche Gene kodieren für GPCR (Bjarnadottir *et al.*, 2006), damit bilden sie die größte Familie der Membranrezeptoren (Fredriksson *et al.*, 2003). Sie übernehmen in nahezu allen Bereichen bei Säugetieren wichtige Funktionen und sind der wichtigste molekulare Angriffspunkt in der pharmakologischen Therapie (Overington *et al.*, 2006). Ihren Namen verdanken die GPCR der Kopplung des Rezeptors an ein heterotrimeres G-Protein, das die zytosolische Signalkaskade einleitet (Alberts, 2015).

1.2.4.2.1 Struktur der GPCR

GPCR werden auch als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren bezeichnet, weil sie aus sieben die Zellmembran durchspannenden hydrophoben Helices bestehen, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Rasmussen *et al.*, 2007; Venkatakrishnan *et al.*, 2013). Die Bindungsstelle für einen Liganden befindet sich häufig in einer Tasche, die aus den extrazellulären Schleifen und dem N-Terminus gebildet wird (Ji *et al.*, 1998). Das G-Protein sowie weitere Adapter- und Signalmoleküle binden an der intrazellulären Domäne (Tuteja, 2009).

1.2.4.2.2 Heterotrimere G-Proteine

Guanosin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) sind Schlüsselproteine in der Signaltransduktion, weil sie ein extrazelluläres Signal, das durch einen Rezeptor detektiert wird, in eine intrazelluläre Signalkaskade umwandeln (Alberts, 2015). Sie werden in heterotrimere G-Proteine, die durch GPCR aktiviert werden, und in kleine monomere G-Proteine, beispielsweise Ras, eingeteilt.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei homologen Untereinheiten (α , β und γ), wobei die β - und γ -Untereinheit stabile Komplexe bilden und daher gewöhnlich als $G_{\beta\gamma}$ zusammengefasst werden (Hurowitz *et al.*, 2000). Die G_{α} -Untereinheit bindet das

namensgebende Guanosin-Nukleotid: In inaktivem Zustand ist ein GDP-Molekül gebunden, das bei einer Aktivierung in GTP ausgetauscht wird.

1.2.4.2.3 Aktivierung von GPCR

Die Aktivierung eines GPCR durch Bindung eines extrazellulären Liganden bewirkt eine Interaktion mit einem intrazellulären G-Protein (Moreira, 2014). Durch eine Konformationsänderung des GPCR (Trzaskowski *et al.*, 2012) fungiert dieser als Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor und bewirkt eine Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von GDP in GTP an der G_{α} -Untereinheit (Johnston & Siderovski, 2007; Lohse *et al.*, 2014b). Das G-Protein ändert seine Konformation ebenfalls, in der Folge dissoziiert die G_{α} -Untereinheit (Hamm, 1998). Die weitere Signaltransduktion erfolgt durch beide aktivierten Untereinheiten des G-Proteins (Lohse *et al.*, 2014b; van Biesen *et al.*, 1996). Eine Terminierung der aktivierten G-Proteine erfolgt durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit. Diese katalysiert die Hydrolyse des gebundenen GTP in GDP, wodurch das G-Protein inaktiviert und eine Reassoziierung beider Untereinheiten ermöglicht wird (Kleuss *et al.*, 1994). *Regulators of G protein signaling* (RGS) beschleunigen den hydrolytischen Vorgang und erlauben so ein schnelles Abschalten der Signalwege (De Vries *et al.*, 2000).

1.2.4.2.4 Einteilung der aktivierten G-Proteine

Für die weitere Signaltransduktion der GPCR sind im Wesentlichen G_{α} von Bedeutung. Anhand der Eigenschaften dieser Untereinheit lassen sich 23 bekannte G_{α} -Proteine (McCudden *et al.*, 2005) in vier verschiedene Klassen einteilen (α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$ und $\alpha_{12/13}$), nach denen das G-Protein entsprechend benannt wird (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$) (Tabelle 2) (Strathmann & Simon, 1991). G_s aktiviert das Enzym Adenylylzyklase, das die Umwandlung von ATP in den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert (Hein, 2011; Pierce *et al.*, 2002; Ross & Gilman, 1977). G_i dagegen hemmt dieses Enzym (Hildebrandt *et al.*, 1983) und bewirkt die Aktivierung von *G-Protein-coupled inwardly rectifying potassium* (K_{ir})-Kanälen (Pierce *et al.*, 2002). Die $G_{q/11}$ -Isoform aktiviert das Enzym Phospholipase C β (PLC β), das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP $_3$) und

Diacylglycerol (DAG) umwandelt (Hein *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 2002; Rhee, 2001). G_{12/13} regulieren das kleine G-Protein RhoGEF (Fukuhara *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2002). Auch die G_{βγ}-Untereinheit besitzt einige Effektoren, unter anderem der K_{ir}-Kanal (Logothetis *et al.*, 1987), Ca²⁺-Kanäle (Garcia *et al.*, 1998) und das Enzym Phosphoinositide-3' kinase-γ (PI3K) (Stephens *et al.*, 1994).

Tabelle 2: Einteilung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Rezeptorklasse	Nachgeschaltete Signalkaskade	Beispiel
G _s	Aktivierung der Adenylylzyklase (cAMP ↑)	β ₁ -Adrenorezeptor
G _{i/o}	Hemmung der Adenylylzyklase (cAMP ↓)	α ₂ -Adrenorezeptor
G _{q/11}	Aktivierung der Phospholipase Cβ (IP ₃ und Ca ²⁺ ↑)	α ₁ -Adrenorezeptor
G _{12/13}	Aktivierung von RhoGEF	Regulation des Zytoskeletts

1.2.4.2.5 ERK1/2 und GPCR

Auch die MAPK ERK1/2 sind Zielproteine der Aktivierung von GPCR (Gutkind, 2000; Werry *et al.*, 2005). Im Gegensatz zur Aktivierung der MAPK-Signalkaskade über RTK und Ras folgt die Aktivierung über GPCR keinem strikten Mechanismus. Sie ist dagegen vielmehr von den beteiligten Substraten, also den unterschiedlichen G_α-Untereinheiten und der G_{βγ}-Untereinheit, abhängig (Eishingdrelo & Kongsamut, 2013; Werry *et al.*, 2005). Zusätzlich unterscheidet sich die GPCR-vermittelte MAPK-Aktivierung abhängig vom Zelltyp und Rezeptortyp (Luttrell, 2005).

Eine alleinige G_α-Expression (unabhängig vom Subtyp) ist dabei nicht für eine MAPK-Aktivierung ausreichend, während G_{βγ}-Untereinheiten in der Lage sind, diese Kaskade zu aktivieren (Crespo *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995). Die ERK1/2-Aktivierung durch G_i scheint überwiegend durch die G_{βγ}-Untereinheit vermittelt zu werden, deren Beteiligung durch Verwendung des C-Terminus der β-adrenergen Rezeptorkinase (βARK-ct) nachgewiesen wurde (Koch *et al.*, 1994).

Die Signalkaskade von G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren stellt die sekundären Botenstoffe IP₃ und DAG bereit (Pierce *et al.*, 2002). Diacylglycerol aktiviert das Enzym Proteinkinase C (PKC) (Newton, 1995), die aktive PKC kann die MAP3K c-Raf phosphorylieren und damit die MAPK-Signalkaskade initiieren (Kolch, 2000; Sozeri *et al.*, 1992), wobei der genaue Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist. Ein zweiter PKC-vermittelter

Mechanismus ist die Phosphorylierung von *Raf kinase inhibitor protein* (RKIP) (Goel & Baldassare, 2004). Unter basalen Bedingungen kann dieses Protein c-Raf binden und die Aktivität der MAP3K behindern (Yeung *et al.*, 2000). Nach Phosphorylierung von RKIP dissoziiert dieses von c-Raf und bindet an die *G-protein-coupled receptor kinase 2* (GRK2), einem Regulator der GPCR-Aktivität (Lorenz *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2015; Vidal *et al.*, 2012). Phosphoryliertes RKIP verhindert damit die GRK2-abhängige GPCR-Rezeptorinternalisierung durch β -Arrestin (s. Kapitel 1.2.4.2.6 ERK1/2-Aktivierung durch β -Arrestine, woraus eine zunehmende ERK1/2-Aktivierung resultiert (Corbit *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2014; Werry *et al.*, 2005).

Über G_s wird die Bereitstellung des sekundären Botenstoffes cAMP vermittelt (Pierce *et al.*, 2002), der die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Cheng *et al.*, 2008). cAMP und die Proteinkinase A wirken, abhängig von den beteiligten Zelltypen, auf die MAPK-Kaskade entweder aktivierend (Ciullo *et al.*, 2001; Frodin *et al.*, 1994; Stork & Schmitt, 2002; Tsygankova *et al.*, 2000) oder inhibierend (Cook & McCormick, 1993; Cospedal *et al.*, 1999; Stork *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1993). Stork & Schmitt kommen in einem Review daher zu dem Schluss, dass es zahlreiche unterschiedliche Mechanismen gebe, die eine Regulierung der ERK-Signalwege durch cAMP zulasse (Stork *et al.*, 2002).

1.2.4.2.6 ERK1/2-Aktivierung durch β -Arrestine

β -Arrestine sind Proteine, die an der Regulierung der GPCR beteiligt sind (Lohse *et al.*, 1990; Lohse & Hoffmann, 2014a). Nach der Aktivierung eines GPCR wird dieser durch GRK2 phosphoryliert, damit weitere Signale unterbunden werden (Lohse *et al.*, 2014a; Pippig *et al.*, 1993). Der phosphorylierte GPCR wird dann von β -Arrestin gebunden, welches die Bindungsstelle für das G-Protein des Rezeptors blockiert, wodurch weitere von diesem Rezeptor ausgehende Signale unterbunden werden und dieser für die Internalisierung in Endosomen, also dem Rückzug von der Zelloberfläche ins Zellinnere, vorbereitet wird (Gurevich & Gurevich, 2006; Lefkowitz & Shenoy, 2005; Lohse *et al.*, 1990; Lohse *et al.*, 2014a).

β -Arrestin übernimmt allerdings auch eine Funktion als Adapterprotein in Signalwegen (Eishingdrelo *et al.*, 2013; Shenoy & Lefkowitz, 2003): Die Stimulierung des *Protease activated receptor 2* (PAR2) oder des Angiotensin II-Rezeptors (AT_{1A}R) führt zu einem

Komplex aus PAR2 bzw. AT_{1A}R, β -Arrestin, c-Raf und phosphoryliertem ERK1/2, der im Zytosol verbleibt (DeFea *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009; Min & DeFea, 2010; Tohgo *et al.*, 2002). Die β -Arrestin-abhängige ERK1/2-Aktivierung wurde indes auch für andere GPCR nachgewiesen (Eishingdrelo *et al.*, 2015).

1.2.4.3 Transaktivierung von RTK durch GPCR

Die Signalwege der RTK und der GPCR, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen, sollten nicht solitär betrachtet werden, weil sich beide Rezeptorklassen gegenseitig beeinflussen können. Daub *et al.* berichteten von einer Stimulierung des *epidermal growth factor receptors* (EGFR) durch den GPCR-Agonisten Endothelin-1 (ET-1) und nannten dieses Phänomen „Transaktivierung“ (Daub *et al.*, 1996). Viele weitere GPCR aktivieren die MAPK-Kaskade durch Transaktivierung des EGFR (Daub *et al.*, 1997; Engelhardt, 2007; Gutkind, 1998; van Biesen *et al.*, 1996) und anderer RTKs (Cattaneo *et al.*, 2013; Herrlich *et al.*, 1998; Kruk *et al.*, 2013). Dabei scheint es intrazelluläre wie extrazelluläre Mechanismen zu geben, die zu einer RTK-Transaktivierung führen (Cattaneo *et al.*, 2014): Im Zusammenhang der Aktivierung der MAPK-Kaskade sind Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und die intrazelluläre Tyrosinkinase *cellular Sarcoma* (c-Src) relevant, die nach ihrer GPCR-abhängigen Aktivierung die RTK-Transaktivierung vermitteln (Cattaneo *et al.*, 2014; Luttrell & Luttrell, 2004; Rodriguez-Fernandez & Rozengurt, 1996). Die Inhibition beider Enzyme bewirkt die Reduktion der ERK1/2-Aktivierung (Maudsley *et al.*, 2000; Shah & Catt, 2004).

1.2.5 Die Kinasen der MAPK-Signalkaskade

1.2.5.1 MAP3K: Raf

Das erste Enzym der MAPK-Signalkaskade ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase der Raf-Familie (*rapid accelerated fibrosarcoma*) (Roskoski, 2012a). Die Familie besteht aus den drei Kinasen A-Raf, B-Raf und c-Raf (letztere wird auch als Raf-1 bezeichnet). Alle drei Isoformen können MEK1/2 aktivieren (Marais *et al.*, 1997), wobei B-Raf die größte Affinität zu seinem Substrat zeigt (Matallanas *et al.*, 2011; Wellbrock *et al.*, 2004). c-Raf ist ubiquitär exprimiert, während die anderen beiden Isoformen nur in spezifischen Geweben vorkommen (Storm *et al.*, 1990).

Die Isoformen bestehen aus drei konservierten Regionen (*conserved regions*, CR): Am N-Terminus ist die Ras-Bindungsdomäne (CR₁) und eine cysteinreiche Domäne, an der die Raf-Autoinhibition erfolgt (Tran *et al.*, 2005). An der CR₂-Region sind wichtige inhibitorische Phosphorylierungsstellen, durch die Raf nach seiner Aktivierung durch Ras-Bindung reguliert wird (Dhillon *et al.*, 2002). Am C-Terminus befindet sich schließlich die katalytische Kinase-Domäne (CR₃), die N-Region, deren negative Ladung eine Bedingung für die Aktivierung ist (Mason *et al.*, 1999), und das Aktivierungssegment, dessen Phosphorylierung Voraussetzung für die Kinase-Aktivität ist (Chong *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005).

Im inaktiven Stadium liegt Raf vorwiegend als Monomer im Zytoplasma vor (Goetz *et al.*, 2003), die N-terminale Region verdeckt das katalytische Zentrum (Tran & Frost, 2003). Diese geschlossene Konformation wird durch regulatorische 14-3-3-Proteindimere stabilisiert (Fischer *et al.*, 2009). Spezifische Protein-Phosphatasen dephosphorylieren einen Serin-Rest an Raf und lösen die 14-3-3-Proteine von der N-terminalen Bindungsstelle (Jaumot & Hancock, 2001; Ory *et al.*, 2003), wodurch die Ras-Bindungs-Domäne freigegeben wird. Aktiviertes Ras-GTP, das hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist (Vetter *et al.*, 2001), rekrutiert Raf an die Membran und bindet an der Ras-Bindungs-Domäne (Wellbrock *et al.*, 2004; Wittinghofer & Nassar, 1996). Gleichzeitig interagiert Ras-GTP mit der cysteinreichen Domäne an CR₁ von Raf, um die Autoinhibition aufzuheben (Okada *et al.*, 1999). Dieser initiale Aktivierungsschritt reicht jedoch nicht für eine Aktivierung der Kinase aus (Roskoski, 2010). Nach Bindung von Ras-GTP folgen Phosphorylierungen im Aktivierungssegment und in der N-Region von CR₃ entweder durch Raf selbst (im Sinne einer Autophosphorylierung) (Zang *et al.*, 2008) oder durch andere Kinasen (PAK1 und c-Src) (King *et al.*, 1998; Matallanas *et al.*, 2011; Ziogas *et al.*, 2005); Im Falle des Aktivierungssegments ist das aktivierende Enzym noch unbekannt (Matallanas *et al.*, 2011; Wellbrock *et al.*, 2004).

Der aktivierte Ras-Raf-Komplex kann im Rahmen der Aktivierung homo- und heterodimerisieren (Luo *et al.*, 1996; Matallanas *et al.*, 2011). Ein B-Raf/c-Raf-Heterodimer scheint eine gesteigerte Kinaseaktivität, verglichen mit Homodimeren, zu besitzen (Freeman *et al.*, 2013; Matallanas *et al.*, 2011; Rushworth *et al.*, 2006). Dimerisierte

phosphorylierte Ras-Raf-Komplexe sind vollständig aktiviert (Freeman *et al.*, 2013; Goetz *et al.*, 2003; Matallanas *et al.*, 2011) und können MEK1/2 durch Phosphorylierung zweier Serin-Reste in der Aktivierungseinheit des Effektors (in der Position S218 und S222 im Falle von MEK1) aktivieren (Wellbrock *et al.*, 2004). Die Kinaseaktivität von Raf kann jedoch erheblich variieren. So sind nicht alle oben beschriebenen Phosphorylierungen oder eine Dimerisierung für eine Aktivierung von Raf zwingend notwendig, erhöhen aber die Kinaseaktivität (Matallanas *et al.*, 2011). Nach Aktivierung von MEK1/2 werden die Raf-Dimere durch Bindung der Protein-Phosphatase 5 und durch den Effektor ERK1/2 inaktiviert, indem das Aktivierungssegment dephosphoryliert und die Bindungsstelle für 14-3-3-Proteine in der cysteinreichen Domäne rephosphoryliert wird (von Kriegsheim *et al.*, 2006).

MEK1/2 stellen die wichtigsten Substrate von Raf dar (Matallanas *et al.*, 2011; Wellbrock *et al.*, 2004), wobei auch andere Targets, insbesondere im Rahmen der Tumorgenese, beschrieben wurden (Ding *et al.*, 2004; Niaux *et al.*, 2010; Pfeleiderer *et al.*, 2009)

1.2.5.2 MAP2K: MEK1/2

Die Rolle der MAP2K in der Ras-MEK-ERK-Signalkaskade nimmt die Familie der MAPK/ERK-Kinase (MEK1/2) ein. Es handelt sich um ubiquitär exprimierte, hydrophile Protein-Kinasen, die durch die MAP3K Raf aktiviert werden (Roskoski, 2012b) und ihrerseits ihre Effektorsubstrate ERK1/2 durch duale Phosphorylierung aktivieren (Pearson *et al.*, 2001). Die MEK-Familie umfasst sieben Isoformen (MEK1/2 und MKK3-7), von denen nur MEK1/2 in der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade relevant sind (Roskoski, 2012b). Die Kinasen MKK3-7 sind an der Aktivierung anderer MAP-Kinasen (p38, JNK und ERK5) beteiligt (Derijard *et al.*, 1995).

MEK1/2 besitzen eine Sequenzhomologie von 79% und sind beide gleichermaßen kompetent, ihre Substrate ERK1/2 zu phosphorylieren (Ohren *et al.*, 2004; Zheng & Guan, 1993). Sie liegen *in vivo* und *in vitro* als Homo- und Heterodimere vor (Ohren *et al.*, 2004). Interessanterweise haben beide Kinasen dennoch unterschiedliche biologische Eigenschaften: Während der *Knockout* von MEK1^{-/-} embryonal letal ist, sind MEK2^{-/-}*Knockout*-Mäuse lebensfähig und fruchtbar und zeigen keine offensichtlichen Abnormitäten (Belanger *et al.*, 2003; Giroux *et al.*, 1999). Also scheinen nur MEK1-

Homodimere den Verlust von MEK2-Homodimeren und Heterodimeren kompensieren zu können, während MEK2-Homodimere dazu nicht in der Lage waren (Cseh *et al.*, 2014).

Die Kinasen bestehen aus einem kurzen N-Terminus, an dem eine inhibitorische Domäne, eine nukleäre Exportsequenz (NES), die für die zytoplasmatische Lokalisation (und nukleäre Exklusion) von MEK1/2 verantwortlich ist (Fukuda *et al.*, 1996; Zehorai *et al.*, 2010), sowie die ERK-Bindungs-Domäne lokalisiert ist, der Proteinkinase-Domäne sowie dem langen C-Terminus, dessen genaue Funktion bislang unklar ist (Fischmann *et al.*, 2009; Roskoski, 2012b). Die Aktivierung von MEK1/2 erfolgt mittels dualer Phosphorylierung zweier Serin-Reste (S218 und S222 für MEK1; S222 und S226 für MEK2) durch aktivierte Raf-Dimere (Zheng & Guan, 1994). Auch die dephosphorylierte Form scheint eine geringe Kinaseaktivität zu besitzen, die gegenüber der phosphorylierten Form jedoch um das 5.000-fache reduziert ist (Alessi *et al.*, 1994). Daraus folgt, dass diese Proteinkinase in mindestens zwei Aktivitätszuständen existiert (Fischmann *et al.*, 2009). Sobald MEK1/2 aktiv sind, phosphorylieren sie einen Tyrosin- und einen Threonin-Rest innerhalb des sogenannten TEY-Motivs der Effektoren ERK1/2 (Payne *et al.*, 1991). Die Terminierung des Signals erfolgt schließlich durch rapide Dephosphorylierung der Serin-Reste im Aktivierungssegment (Ordan *et al.*, 2018; Owens & Keyse, 2007).

Durch zusätzliche Phosphorylierungen, beispielsweise an S386 (für MEK1) durch den Effektor ERK1/2, kann die MEK1/2-Aktivität reguliert werden (Matsuda *et al.*, 1993): Im Sinne eines negativen Feedbacks führt diese Phosphorylierung durch den unmittelbaren Effektor zu einer MEK1/2-Inhibition (Brunet *et al.*, 1994).

Außerdem übernehmen *scaffolds*, wie das Protein *kinase suppressor of Ras* (KSR), eine wichtige Rolle in der Regulation der Kinase-Aktivität (Roskoski, 2012b). In ruhenden Zellen liegt MEK1/2 als Komplex mit KSR und anderen Proteinen vor (Stewart *et al.*, 1999). Nach Aktivierung von Raf transportiert das Gerüstprotein die MAP2K zur Plasmamembran und koordiniert die Erstellung eines Multiproteinkomplexes mit Raf, MEK1/2 und ERK1/2 (McKay *et al.*, 2011; Ritt *et al.*, 2006). Zusätzlich scheinen MEK1/2 auch als zytosolisches Ankerprotein für ERK1/2 zu fungieren (Fukuda *et al.*, 1997;

Rubinfeld *et al.*, 1999).

Lange Zeit wurde angenommen, dass ERK1/2 die einzigen Substrate der MAP2K seien (Roskoski, 2012b; von Kriegsheim *et al.*, 2009). Allerdings wurden inzwischen Interaktionen und Phosphorylierungen von anderen Zielproteinen (STAT5 und RhoD) durch nukleär lokalisiertes MEK1 *in vitro* nachgewiesen (Jo *et al.*, 2011; Maki & Ikuta, 2008). Die meisten MEK-Moleküle scheinen nach Stimulation der Zelle schnell zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und hertransportiert zu werden und verbleiben wegen der NES nur für eine kurze Zeit im Zellkern (Guo *et al.*, 2013; Zehorai *et al.*, 2010). Dennoch scheint die kurze nukleäre Translokation zur Phosphorylierung anderer Substrate als ERK1/2 auszureichen, wobei deren Rolle *in vivo* genauer erforscht werden muss (Guo *et al.*, 2013; Zehorai *et al.*, 2010).

1.2.5.3 MAPK: ERK1/2

Die letzten Kinasen der MAPK-Signalkaskade stellen die MAPK extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) dar (English *et al.*, 1999). Sie wurden erstmals von Boulton *et al.* Anfang der 1990er Jahre kloniert, näher charakterisiert und entsprechend ihrer Eigenschaft, durch extrazelluläre Signale reguliert zu werden, benannt (Boulton *et al.*, 1991a; Cobb *et al.*, 1991). Zuvor war dessen enzymatische Kinase-Aktivität, das *microtubule associated protein 2* (MAP-2) und das *Myelin basic protein* (MBP) nach Stimulation durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren zu phosphorylieren, anderen Forschern aufgefallen (Ahn & Krebs, 1990; Cicirelli *et al.*, 1988; Ray & Sturgill, 1987). Die Proteinkinasen wurden schnell als wichtiger Bestandteil zellulärer Signaltransduktion angesehen und sind bis heute intensiv erforscht.

1.2.5.3.1 Die Isoformen ERK1 und ERK2

Die Isoformen ERK1 (auch als p44 bezeichnet) und ERK2 (p42) besitzen eine Aminosäuren-Sequenzhomologie von 84% (Boulton *et al.*, 1991b). Beide sind ubiquitär exprimierte Kinasen, deren Verteilung in verschiedenen Geweben variiert (Boulton *et al.*, 1991b). Allerdings führen alle bisher bekannten Stimuli zu einer parallelen Aktivierung beider Isoformen (Lefloch *et al.*, 2008; Roskoski, 2012a). Kein Agonist ist in der Lage, spezifisch eine einzige Isoform zu aktivieren (Lefloch *et al.*, 2008). ERK1 und

ERK2 zeigen zudem die gleiche Substratspezifität und übernehmen im Säugetier (Lefloch *et al.*, 2009) und *in vitro* ähnliche spezifische Eigenschaften (Lefloch *et al.*, 2008). Aus diesen Gründen werden die Kinasen meist auch als ERK1/2 subsummiert.

Allerdings scheint es Unterschiede zwischen den beiden Isoformen während der embryonalen Entwicklung zu geben: Die Ablation des ERK2-Gens in Mäusen führte in relativ kurzer Zeit zur embryonalen Letalität (Hatano *et al.*, 2003), während ERK1-defiziente Mäuse lebensfähig, normal groß und fruchtbar waren (Nekrasova *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2003). Der Verlust des ERK1-Gens scheint also durch ERK2 kompensiert zu werden (Nekrasova *et al.*, 2005; Pages *et al.*, 1999). Umgekehrt führten Versuche an embryonalen Stammzellen mit ERK2-Defizienz trotz eingeschränkter ERK-Aktivität zur Zellproliferation (Yao *et al.*, 2003). In diesem *in vitro*-System kann ERK1 den Verlust von ERK2 kompensieren. ERK2-defiziente Mäuse starben dagegen innerhalb der ersten Woche aufgrund gestörter Vaskularisierung und damit verbundener fehlerhafter Plazenta-Entwicklung (Hatano *et al.*, 2003). *In vivo* kann ERK1 eine ERK2-Defizienz also nicht kompensieren. Dies führte schließlich zur Annahme, dass die beiden Isoformen eventuell unterschiedliche, sogar gegensätzliche Funktionen ausüben könnten (Lloyd, 2006; Vantaggiato *et al.*, 2006). Lefloch *et al.* zeigten, dass die spezifische Aktivität der beiden Isoformen nicht unterscheidbar ist und dass das Überleben der Mäuse von der Menge an exprimiertem, aktivierbarem ERK (unabhängig von der Isoform) abhängt (Lefloch *et al.*, 2008). Sie folgern, dass die biologischen Unterschiede nach Ablation eines der beiden ERK-Gene aus einer unterschiedlichen Genexpression von ERK1 und ERK2 und einer veränderten Relation resultieren (Lefloch *et al.*, 2008). Um mögliche Unterschiede der beiden Kinasen endgültig verifizieren oder falsifizieren zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

1.2.5.3.2 Struktur von ERK2

Proteinkinasen spielen in nahezu jedem Aspekt zellulärer Funktionen eine wichtige Rolle (Hunter, 2000). Das menschliche Genom enthält 518 für Proteinkinasen kodierende Gene, was diese Familie zu einer der größten Proteinfamilien macht (Manning *et al.*, 2002). Diese Enzyme katalysieren die Übertragung einer γ -Phosphatgruppe von einem

Donor, meistens ATP, auf eine freie Hydroxylgruppe einer Aminosäure des Proteinsubstrats (Kornev *et al.*, 2006).

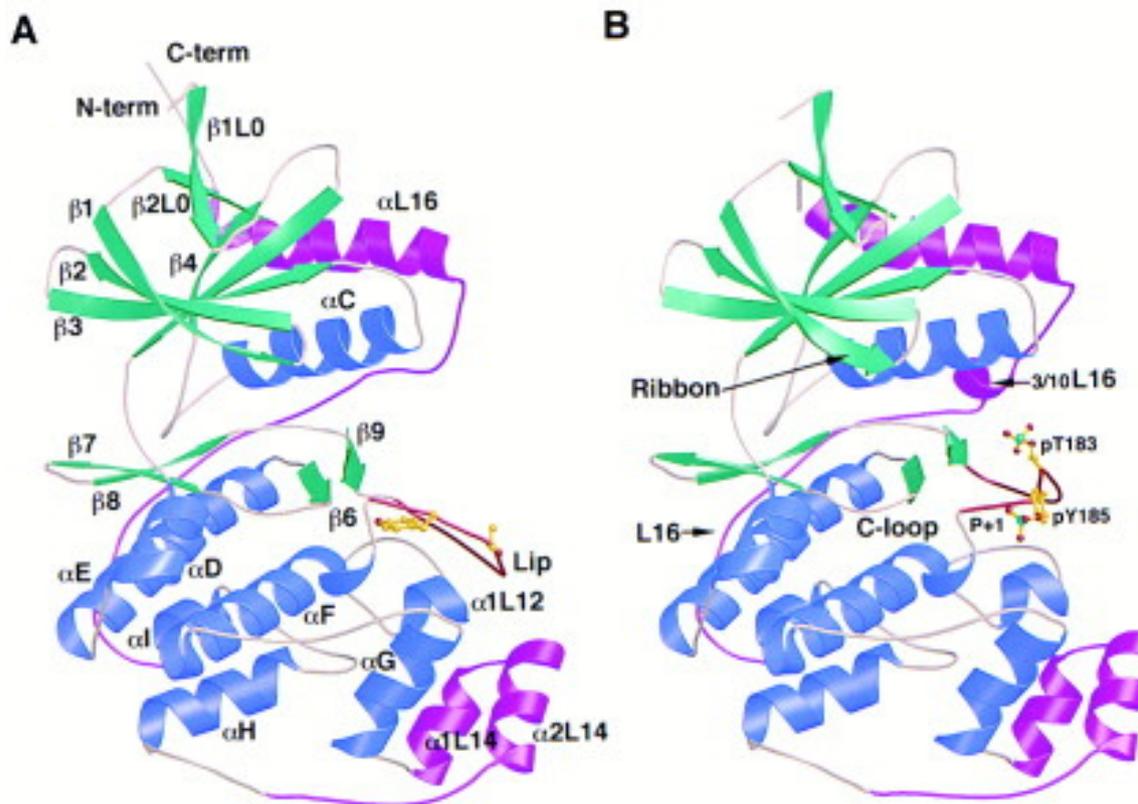


Abbildung 8: Aufbau und Konformationsänderung von nicht-phosphoryliertem und dual-phosphoryliertem ERK2.

Diese Abbildung zeigt ERK2 in unphosphoryliertem [A] und dual-phosphoryliertem [B] Zustand. Die kleine N-terminale Domäne besteht vorwiegend aus β -Strängen (*türkis*) sowie den beiden Helices α C (*blau*). Der C-terminale Lappen besteht primär aus α -Helices (*blau*) und beinhaltet die Substratbindungsstelle (α D- α I) und die Aktivierungslippe (*rot*). Der Vergleich beider Abbildungen zeigt die Konformationsänderungen des Proteins nach dualer Phosphorylierung des TEY-Motivs in der Aktivierungslippe.

Abbildung übernommen aus Canagarajah *et al.*, 1997 mit Erlaubnis von Elsevier.

Die Tertiärstruktur der aus 360 Aminosäuren bestehenden humanen ERK2 (42 kDa) in nicht-phosphorylierter und dual-phosphorylierter Form ist in Abbildung 8 dargestellt (Canagarajah *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Im Allgemeinen zeichnen sich Proteinkinasen durch zwölf konservierte Motive aus (Hanks *et al.*, 1988), die sich in einen kleinen N-terminalen und einen großen C-terminalen Lappen aufteilen und über

die sogenannte *hinge*-Region verbunden sind (Patel & Doerksen, 2010). Dabei ist der N-Terminus vor allem für die korrekte Positionierung des für die Katalyse erforderlichen ATP zuständig (Patel *et al.*, 2010; Roskoski, 2012b). Im C-terminalen Lappen befindet sich die Substratbindungsstelle, die Domänen für die katalytische Aktivität, das Aktivierungssegment (TEY-Motiv) sowie eine Erkennungsschleife für mögliche Substrate (P+1-Tasche) (Canagarajah *et al.*, 1997; Roskoski, 2012a, 2012b; Taylor & Kornev, 2011).

1.2.5.3.3 Aktivierung von ERK1/2

Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt durch duale Phosphorylierung im TEY-Motiv der Aktivierungslippe durch die MAP2K MEK1/2 (Canagarajah *et al.*, 1997). Dabei wird zuerst der Tyrosin-Rest phosphoryliert (Haystead *et al.*, 1992), bevor nach einer Dissoziation von MEK1/2 und einer erneuten Reassoziierung der Threonin-Rest phosphoryliert wird (Roskoski, 2012a). Die Interaktion von ERK1/2 mit seinem Aktivator erfolgt hauptsächlich am C-Terminus in der *common docking domain* (CD), in der ERK1/2 auch mit anderen Proteinen interagieren kann (Rubinfeld *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2000).

In nicht-phosphoryliertem ERK1/2 ist die Substratbindungsstelle teilweise durch die Aktivierungslippe blockiert (Cobb & Goldsmith, 2000). Die Bindung von MEK1/2 an die CD von ERK1/2 induziert eine Konformationsänderung, durch die das TEY-Motiv freigelegt wird (Zhou *et al.*, 2006). Nach der dualen Phosphorylierung erfolgen Konformationsänderungen in der Aktivierungslippe und den benachbarten Strukturen (Canagarajah *et al.*, 1997). Diese Veränderungen bewirken dessen volle katalytische Aktivität (Cobb & Goldsmith, 1995).

Die Phosphorylierungen des TEY-Motivs bewirken außerdem eine erhöhte Neigung zur ERK-Dimerisierung: Durch die Konformationsänderungen der Aktivierungslippe schließen sich drei oberflächliche Leucin-Reste (L333, L336 und L344) mit den Leucin-Resten eines anderen ERK1/2-Moleküls als hydrophober „Reißverschluss“ zusammen, sie bilden einen Leucin-Zipper (Cobb *et al.*, 2000). Die aktiven katalytischen Zentren beider Monomere sind dabei auf derselben Seite des Dimers lokalisiert (Canagarajah *et al.*, 1997). Außerdem geht die Aminosäure Histidin H176 der Aktivierungslippe eines Interaktionspartners Ionenbindungen mit dem Glutaminsäure-Rest E343 und

Phenylalanin-Rest F329 der carboxyterminalen Verlängerung des anderen ERK2-Moleküls ein (Cobb *et al.*, 2000). So wird das Dimer durch den hydrophoben Zipper und zwei Ionenpaaren, je eins am Ende des Leucin-Zippers, stabilisiert (Cobb *et al.*, 2000). Die Dimerisierung – neben der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung – bewirkt eine vermehrte Translokation in den Nukleus (Casar *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013), wobei es sich hauptsächlich um ERK1- oder ERK2-Homodimere handelt, weil Heterodimere instabil sind und schnell dissoziieren (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

1.2.5.3.4 ERK1/2-Kinaseaktivität

Die beiden Kinasen ERK1 und ERK2 sind Prolin-gerichtete Serin-/Threonin-Kinasen. Das bedeutet, dass sie die Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten katalysieren, deren benachbarte Aminosäure (in der P+1-Position) Prolin ist (Gonzalez *et al.*, 1991). Hierbei spielt die P+1-Tasche am Ende des Aktivierungssegmentes eine entscheidende Rolle, weil diese Prolin bindet (Canagarajah *et al.*, 1997; Roskoski, 2012a). Die optimale Sequenz von ERK1/2-Substraten besitzt außerdem ein zusätzliches Prolin in der P-2-Position (also Pro-X-Ser/Thr-Pro), was durch Analyse mithilfe synthetischer Peptide ermittelt wurde (Davis, 1993). Eine korrekte Substraterkennung und –bindung wird durch zusätzliche Docking-Domänen von ERK1/2 gewährleistet (Roskoski, 2012a).

Das bei der Phosphorylierung umgesetzte ATP wird in der Glycin-reichen *P-loop* gebunden (Roskoski, 2012a), die mit ihrem hydrophoben Valin-Rest (V39 in ERK2) die Adenin-Base koordiniert und mit einem konservierten Lysin-Rest (K54 in ERK2) die nicht-transferierten α - und β -Phosphate verankert (Burkhard *et al.*, 2009; Liao, 2007). In Nachbarschaft der ATP-Bindungsdomäne befindet sich außerdem ein konserviertes DFG-Motiv, das die Bindung des für die Proteinkinase essentiellen Magnesiums koordiniert (Burkhard *et al.*, 2009; Liao, 2007).

Im Allgemeinen wird nach der Aktivierung der Kinase zuerst ATP gebunden und positioniert, bevor das Substrat rekrutiert wird. Nach Übertragung der Phosphat-Gruppe auf einen Serin-/Threonin-Rest wird das phosphorylierte Substrat von der Kinase freigesetzt, bevor ADP aus dem katalytischen Zentrum gelöst wird (Ubersax & Ferrell, 2007).

1.2.5.3.5 Substrate von ERK1/2

Die MAPK-Signalkaskade ist in fast allen Zelltypen an der Regulation von Wachstum, Zelldifferenzierung, Genexpression und Apoptose beteiligt (Pearson *et al.*, 2001). ERK1/2 können nach ihrer Aktivierung über 160 bekannte nukleäre und zytosolische Substrate phosphorylieren und somit die verschiedensten Funktionen regulieren (Brietz *et al.*, 2016). Ungefähr die Hälfte der ERK1/2-Targets sind im Nukleus lokalisiert, während die restlichen Substrate in Zytoplasma, an der Plasmamembran oder in Zellorganellen aktiviert werden (Brietz *et al.*, 2016). Dabei zeigte sich, dass für die Aktivierung zytoplasmatischer Zielproteine ERK1/2-Dimere notwendig sind (Casar *et al.*, 2008). Die Regulation der Signalweiterleitung wird in Kapitel 1.2.5.3.7 beschrieben.

ERK1/2 katalysieren die Phosphorylierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren und einigen ihrer Regulatoren (Roskoski, 2012a). Eines der am intensivsten erforschten Targets der MAPK-Kaskade ist die Familie der *ternary complex factors* (TCF), die den Transkriptionsfaktoren der *E-twenty-six*- (ETS)-Domäne angehören (Marais *et al.*, 1993). *ETS-like 1 transcription factor* (Elk1) stellt ein wichtiges Substrat von ERK1/2 dar, das vor allem die Expression von IEGs induziert (Buchwalter *et al.*, 2004).

Ein zweiter durch ERK1/2 aktivierter Transkriptionsfaktor ist das Proto-Onkogen c-MYC, das ebenfalls Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert (Cole, 1986; Sears, 2004). c-MYC wird nur in stimulierten und sich teilenden Zellen in hohen Levels exprimiert (Sears, 2004). Aus diesem Grund kann eine Dysregulation von c-MYC zu einem unkontrollierten Wachstum des betroffenen Gewebes sowie schließlich zu Karzinomen führen (Adams *et al.*, 1985). Der Transkriptionsfaktor wird durch ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung aktiviert (Sears *et al.*, 2000). c-MYC wird mit der Regulation der Expression von 15% aller Gene in Verbindung gebracht (Gearhart *et al.*, 2007), beispielsweise Initiatoren der Transkription (*eukaryotic initiation factors* (eIFs)) (Rosenwald *et al.*, 1993) und Cycline, die den Zellzyklus regulieren (Daksis *et al.*, 1994). Außerdem wird die Expression von c-MYC reaktiv nach hypertropher Stimulation heraufreguliert (Pollack *et al.*, 1994), um die Proteinsynthese und Zellmasse gleichermaßen zu steigern (Brietz *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2001).

Mehr als 50 zytoplasmatische ERK1/2-Substrate, darunter Proteinphosphatasen, die

Familie der RSK-Proteinkinasen, Proteine des Zytoskeletts und regulatorische Proteine, wurden bislang identifiziert. Ein wichtiges Beispiel stellt die Familie der *90 kDa ribosomal S6 kinase* (RSK, p90^{RSK}) dar, die an der zytoplasmatischen wie der nukleären ERK1/2-Signalweiterleitung beteiligt ist (Sturgill *et al.*, 1988). Zielproteine der RSK sind einige Transkriptionsfaktoren und pro-apoptotische Proteine, wie *Bcl-2-associated death promotor* (Bad) oder *death-associated protein kinase* (DAPK), die RSK-abhängig inaktiviert werden (Roskoski, 2012a).

1.2.5.3.6 Subzelluläre Lokalisation von ERK1/2

In nicht-stimulierten ruhenden Zellen sind ERK1/2 vorwiegend zytosolisch lokalisiert (Chen *et al.*, 1992). Nach Stimulation der Zelle erfolgt dagegen die Translokation in verschiedene Zellkompartimente, wobei der Großteil (60-70%) in den Nukleus transportiert wird (Fukuda *et al.*, 1997; Lenormand *et al.*, 1993; Zehorai *et al.*, 2010). Verschiedene Ankerproteine und *scaffolds* binden ERK1/2 in ruhenden Zellen und halten die MAPK so im Zytoplasma (Kolch, 2005; Roskoski, 2012a). Daran sind vor allem KSR (Kapitel 1.2.5.2) und andere Proteine beteiligt (Kolch, 2005; Torii *et al.*, 2004; Zehorai *et al.*, 2010). Außerdem sind die Kinasen am Zytoskelett verankert (Leinweber *et al.*, 1999). Die über die CD-Domäne vermittelten Verankerungen werden durch Konformationsänderungen innerhalb des Proteins gelöst; erst danach können ERK1/2 in den Nukleus translozieren (Tanoue *et al.*, 2000). Dabei sind sowohl eine transiente nukleäre Lokalisation mit einer Verweildauer von nur wenigen Minuten, als auch eine anhaltende Translokation für mehrere Stunden möglich (Zehorai *et al.*, 2010).

Zu den wichtigsten Regulatoren der ERK1/2-Lokalisation zählen deren Aktivatoren MEK1/2, die als zytosolischer Anker unphosphorylierte ERK1/2 binden (Eblen *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 1997). Wie in Kapitel 1.2.5.2 beschrieben besitzen MEK1/2 eine nukleäre Export-Sequenz (NES), durch die ihre vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation (unabhängig vom Aktivierungszustand) resultiert und ERK1/2 so im Zytoplasma hält (Fukuda *et al.*, 1996; Lenormand *et al.*, 1993).

Die Translokation von ERK1/2 in den Zellkern erfordert den aktiven Transport über Kernporen (Hoelz *et al.*, 2011; Xu & Massague, 2004). Klassischerweise besitzen für den Zellkern bestimmte Proteine eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS), die von

speziellen Proteinen, Importin α und β , erkannt und gebunden wird (Xu *et al.*, 2010). Da ERK1/2 keine typische NLS besitzen und Importin α nicht binden kann, ist dieser klassische Weg für die nukleäre Translokation nach Stimulation der Zelle nicht verantwortlich (Zehorai *et al.*, 2010). Allerdings sind ERK1/2 in der Lage, nicht- α/β -Importine (Importin 7) zu binden, über die die nukleäre Translokation ebenfalls erfolgen kann (Chuderland *et al.*, 2008; Lorenzen *et al.*, 2001).

1.2.5.3.7 Regulation von ERK1/2

Im Allgemeinen ist das physiologische Ergebnis einer Signalkaskade von vielen Faktoren abhängig, darunter von der Dauer, dem Ausmaß der Kinase-Aktivität und von der subzellulären Lokalisation der beteiligten Kinasen sowie dem Zugang zu Targets (Marshall, 1995; Owens *et al.*, 2007). Viele unterschiedliche und komplexe Faktoren beeinflussen die Effekte der MAPK-Signalkaskade: Zunächst die Dichte und Internalisierungsraten der Rezeptoren, weiterhin mögliche Interaktionen der beteiligten Komponenten mit *scaffolds* und Ankerproteinen und schließlich die Balance zwischen Aktivierung der Kaskade und deren Terminierung durch negative Regulation, die durch Dephosphorylierung und inhibitorische Feedbacksignale vermittelt wird (Owens *et al.*, 2007).

Für eine volle katalytische ERK1/2-Aktivität ist die Phosphorylierung beider Aminosäuren im TEY-Motiv der Aktivierungslippe notwendig (Canagarajah *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1993). Bereits die Dephosphorylierung einer dieser Positionen (pThr183 oder pTyr185) bewirkt die Inaktivierung der Kinase (Anderson *et al.*, 1990). Dabei handelt es sich um einen reversiblen Prozess, der von MAP-Kinase Phosphatasen (MKP) katalysiert wird (Owens *et al.*, 2007; Roskoski, 2012a).

Die MAPK sind außerdem in einem streng regulierten Feedback-System integriert, in dem ERK1/2 vorangeschaltete Proteine und Kinasen hemmen (Shin *et al.*, 2009). Aktivierte ERK1/2 bzw. ihr Substrat RSK greifen in den Aktivierungsmechanismus von Raf ein, indem SOS1 phosphoryliert wird, sodass der GRB2/SOS1-Komplex dissoziiert (s. Kapitel 1.2.3) (Dong *et al.*, 1996; Douville & Downward, 1997). Auch die MAP3K Raf wird durch ERK1/2-Phosphorylierung herunterreguliert, wobei fünf der sechs Phosphorylierungsstellen Ziele von ERK1/2 sind (Dougherty *et al.*, 2005). Dies scheint

auch der Hauptmechanismus der Terminierung des ERK1/2-Signals zu sein (Cirit *et al.*, 2010).

Die Interaktion von Raf mit RKIP wurde bereits in Kapitel 1.2.5.1 beschrieben. RKIP scheint durch ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert zu werden, sodass sich die ERK1/2-Aktivität im Sinne eines positiven Feedbacks selbst reguliert (Shin *et al.*, 2009).

1.2.5.3.8 ERK1/2 in kardialer Hypertrophie

Die MAPK-Signalkaskade ist an der Entstehung kardialer Hypertrophie maßgeblich beteiligt (Barry *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2009b; Yue *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2003). Nahezu jeder hypertrophe Agonist ist in der Lage, die Raf-MEK-ERK-Kaskade zu aktivieren (Bueno & Molkentin, 2002). Die Bedeutung der MAPK-Signalkaskade in der Entstehung kardialer Hypertrophie wurde unter anderem durch zahlreiche *loss-* bzw. *gain-of-function*-Tiermodellen *in vivo* untersucht. Zusätzlich wurde die Antwort von Kardiomyozyten auf eine hypertrophe Stimulation *in vitro* erforscht.

Besonders Agonisten von G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren (beispielsweise Angiotensin II, Endothelin-1, Phenylephrin) sind potente Ras-Aktivatoren, dessen Aktivierung Voraussetzung für die Phenylephrin-induzierte Hypertrophie von Kardiomyozyten ist (Kang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003). Akhter *et al.* zeigten, dass die Inhibition der G_{q/11}-vermittelten Signalwege *in vivo* zu einer deutlichen Reduktion der kardialen Hypertrophie nach Nachlasterhöhung führt (Akhter *et al.*, 1998). Dagegen führt die herzspezifische Überexpression einer permanent aktiven Ras-Mutante (V12Ras) *in vitro* (Thorburn *et al.*, 1993) und *in vivo* (Hunter *et al.*, 1995) zu hypertrophen Veränderungen der Kardiomyozyten (Mitchell *et al.*, 2006; Proud, 2004).

Tiere mit einer konstitutiv aktivierten MEK1-Mutation zeigten eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie und eine verbesserte systolische, jedoch schwächere diastolische Herzfunktion (Bueno *et al.*, 2000; Kehat *et al.*, 2011). Die alleinige Überexpression von ERK2 reicht dagegen nicht aus, Hypertrophie zu induzieren (Bueno *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2009a).

Komplementär zu den *gain-of-function*-Tiermodellen verwendeten Harris *et al.* eine dominant-negative c-Raf-Mutante, um die MAPK-Kaskade zu inhibieren (Harris *et al.*,

2004). Nach chronischer Erhöhung der Nachlast zeigten diese Tiere eine beschränkte ERK1/2-Aktivität mit daraus resultierender reduzierter Induktion hypertropher Gene und eine deutliche Widerstandsfähigkeit gegenüber der Entwicklung von ventrikulärer Hypertrophie (Harris *et al.*, 2004).

Zudem erfolgten auch Untersuchungen mit ERK-Knockout-Tieren: ERK2^{-/-}-Mäuse verstarben bereits intrauterin (Hatano *et al.*, 2003), wohingegen ERK1^{-/-}- und heterozygote ERK2^{+/-}-Knockout-Mäuse keine signifikanten Unterschiede in der Entstehung physiologischer oder pathologischer Hypertrophie nach Nachlasterhöhung oder Ausdauertraining zeigten; die Versuchstiere waren jedoch anfälliger für Dekompensationen bei länger bestehender Nachlasterhöhung mit erhöhter Rate an kardialer Apoptose (Purcell *et al.*, 2007).

Viele Ergebnisse sprechen für eine ausgeprägte Beteiligung der Kinasen ERK1/2 in der Entstehung kardialer Hypertrophie (Lorenz *et al.*, 2009b; Wang & Proud, 2002; Yue *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2003). Allerdings verdeutlichen sie ebenfalls die Komplexität und Vielschichtigkeit im Prozess der Entstehung. ERK1/2 nehmen eine führende regulatorische Funktion im Herzen ein, die insbesondere von kardioprotektiver Natur ist (Purcell *et al.*, 2007; Ruppert *et al.*, 2013). Die Kinasen sind außerdem unter gewissen Bedingungen in der Lage, kardiale Hypertrophie zu induzieren. Es ist allerdings anzunehmen, dass mehrere parallele Signalwege unter Beteiligung der MAPK-Signalkaskade in der pathologisch induzierten Hypertrophie zusammenwirken. Einer der maßgebenden Regulatoren in der Signalweiterleitung ERK1/2-vermittelter kardialer Hypertrophie ist die von Lorenz *et al.* identifizierte ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung, die im anschließenden Kapitel erläutert wird (Lorenz *et al.*, 2009a).

1.2.5.3.9 Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung stellt einen zuerst 2009 von Lorenz *et al.* identifizierten regulatorischen Mechanismus dar, der die nukleäre Akkumulation von ERK1/2 fördert sowie kardiale Hypertrophie begünstigt (Lorenz *et al.*, 2009a). Es handelt sich hierbei um eine G_{βγ}-vermittelte Autophosphorylierung eines Threonin-Restes an der Position T188 (in murinem ERK2) bzw. T208 (in murinem ERK1) aufgrund einer hypertrophen Stimulation.

Die ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung wird durch die Interaktion von ERK1/2 mit G_{βγ}-Untereinheiten in der Folge einer hypertrophen Stimulation induziert (Lorenz *et al.*, 2009a). Nach Aktivierung eines G_s- oder G_q-vermittelten GPCR wird eine G_{βγ}-Untereinheit freigesetzt, die als Adapterprotein für ERK1/2 fungiert (Vidal *et al.*, 2012). Zudem wird die MAPK-Signalkaskade aktiviert, deren Folge die ERK1/2-Phosphorylierung im TEY-Motiv und dessen Dimerisierung ist. Die Verknüpfung dieser Ereignisse resultiert schließlich in der ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung (Abbildung 9) (Lorenz *et al.*, 2009b; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012).

Lediglich die Aktivierung eines G_s oder G_q, jedoch nicht G_i, führt zur G_{βγ}-abhängigen ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung (Lorenz *et al.*, 2009a; Vidal *et al.*, 2012). Die für die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung charakteristische Bildung eines Proteinkomplexes aus G_{βγ}, c-Raf und ERK1/2 wurde nur über Stimulation des G_q-vermittelten Angiotensin II-Rezeptors (AT₁) erreicht, während Carbachol, ein Agonist des G_i-vermittelten muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors (M₂), dazu nicht in der Lage war (Lorenz *et al.*, 2009a).

Die Interaktion von G_{βγ} mit c-Raf und ERK1/2 erfordert die Stimulierung eines GPCR mit einem hypertrophen Agonisten, der die gesamte Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade aktiviert. Hemmung von MEK1/2 bzw. ERK1/2 durch Inhibitoren (beispielsweise PD98059) oder durch Überexpression einer dominant-negativen MEK1- bzw. ERK2-Mutante sowie Hemmung der endogenen c-Raf-Expression durch RNA-Interferenz verhinderten allesamt die Bildung des G_{βγ}/MAPK-Komplexes (Lorenz *et al.*, 2009a). Deswegen scheint G_{βγ} die Rolle eines *scaffolds* einzunehmen. Weiterhin ist die ERK2-Kinasedomäne essentiell für die Interaktion von ERK2 mit G_{βγ}: Diese ist maßgeblich an der Homodimerisierung der Kinase beteiligt. Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung konnte hingegen in einer Dimerisierungs-defizienten Mutante nicht induziert werden (Lorenz *et al.*, 2009a).

Um den kausalen Zusammenhang zwischen der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung und kardialer Hypertrophie zu beweisen, generierten Lorenz *et al.* ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsdefiziente (ERK2^{T188A}, ERK2^{T188S}) und ERK2^{Thr188}-phosphorylierungs-

mimetische (ERK2^{T188D}) Mauslinien, bei denen durch den Austausch der Aminosäure Threonin an Position 188 *loss-* oder *gain-of-function* Modelle entstanden.

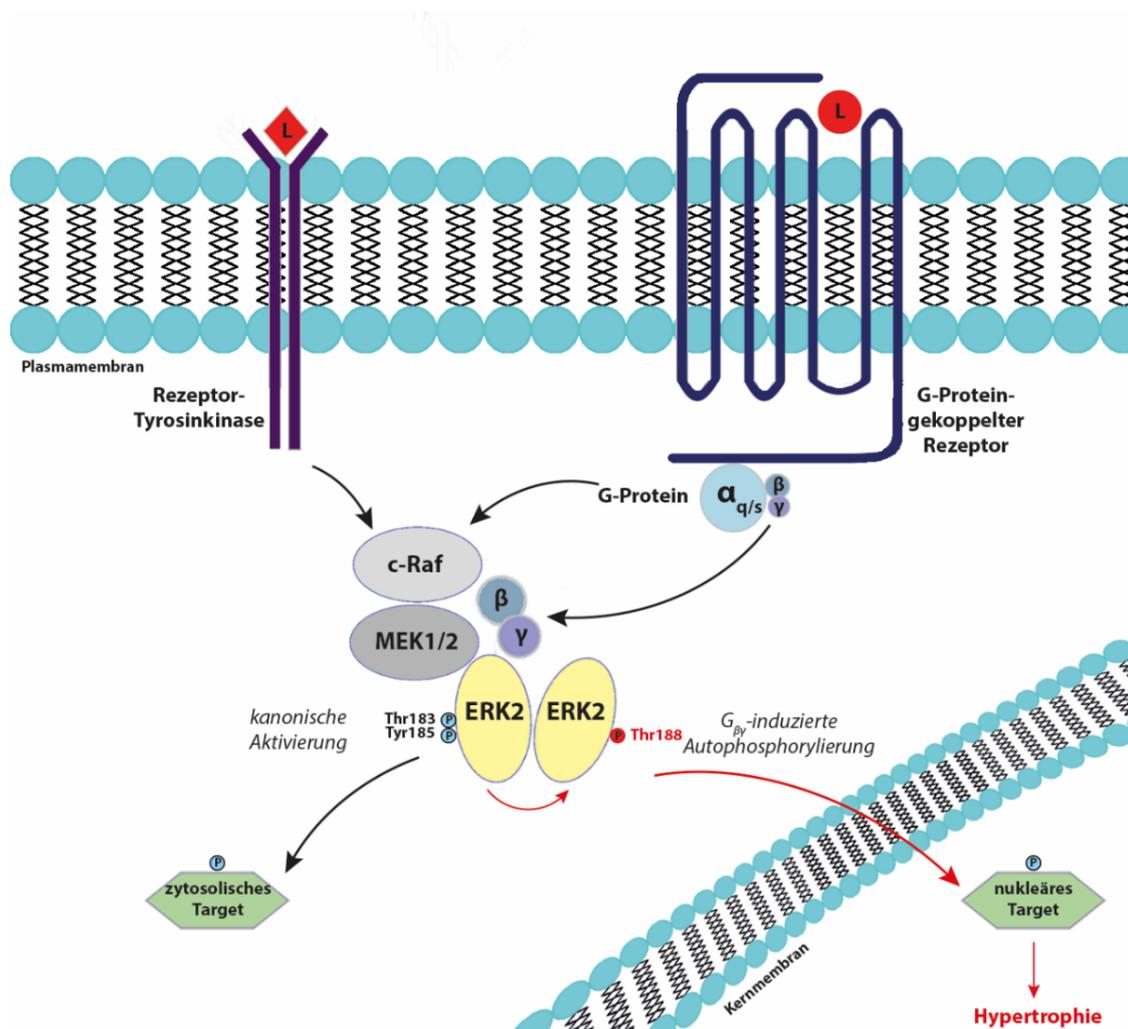


Abbildung 9: Modell der Gβγ-induzierten ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung.

Die kanonische Aktivierung der MAPK-Signalkaskade kann über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) erfolgen und resultiert in der Aktivierung von ERK1/2 über MEK1/2-vermittelte duale Phosphorylierung des TEY-Motivs, also an den Aminosäuren Threonin 183 und Tyrosin 185 (in ERK2). Sobald ERK1/2 vollständig aktiviert wurde, kann es dimerisieren und nachfolgende Zielproteine phosphorylieren. Bei einer hypertrophen Stimulation kann aktiviertes ERK1/2 außerdem mit G_{βγ}-Untereinheiten, die von G_q- oder G_s-gekoppelten Rezeptoren freigesetzt wurden, interagieren. Diese Interaktion bewirkt eine zusätzliche Autophosphorylierung eines Threonin-Restes an der Position T188 (bei ERK2) bzw. T208 (bei ERK1), die dessen nukleäre Akkumulation fördert sowie die ERK1/2-vermittelte kardiale Hypertrophie begünstigt.

Die Mäuse wurden einer sechswöchigen *transverse aortic constriction* (TAC) unterzogen, um die kardiale Nachlast zu erhöhen und eine Hypertrophie zu induzieren (deAlmeida *et al.*, 2010). Dabei zeigten transgene Tiere mit ERK2^{T188A}-Mutation eine signifikant reduzierte TAC-induzierte Hypertrophie und Fibrosierung (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Die physiologische Hypertrophie als Folge des Alters oder freiwilligen Trainings wurde jedoch nicht gehemmt (Ruppert *et al.*, 2013). Mäuse mit Überexpression der phosphorylierungsmimetischen Mutante zeigten dagegen eine stärker ausgeprägte kardiale Hypertrophie und Fibrosierung (Lorenz *et al.*, 2009a). Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung hat zudem einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung der MAP-Kinase: Besonders in Mäusen mit ERK2^{T188D}-Mutation wurde eine ausgeprägte nukleäre Lokalisation sowie eine vermehrte Aktivierung nukleärer Zielproteine festgestellt (Lorenz *et al.*, 2009a).

Auch *in vitro* verhindert die ERK2^{T188A}-Mutation hypertrophe Antworten auf Stimulation mit Phenylephrin, Isoproterenol oder Angiotensin II, ohne dabei anti-apoptotische ERK2-Funktionen oder die physiologische Herzfunktion zu beeinflussen (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013).

1.2.5.3.10 Die *gain-of-function*-Mutation ERK2^{T188D} in murinen Herzen

Da in dieser Arbeit die phosphorylierungsmimetische Mutante untersucht wird, werden die bisherigen Erkenntnisse von Lorenz *et al.* in diesem Kapitel kurz beschrieben. Sie nutzten neben einer ERK2^{T188D}-Mauslinie auch neonatale Kardiomyozyten aus Rattenherzen (*neonatal rat cardiomyocytes*, NRCM) (Kapitel 4.4.3.2), die die *gain-of-function*-Mutation (ERK2^{T188D}) überexprimieren und mit Wildtyp-ERK2 (ERK2^{T188T}) verglichen wurden.

Die permanente Aktivierung von ERK2^{Thr188} führt *in vitro* und *in vivo* zu einem *gain-of-function*-Phänotypen: In NRCM vermittelte die parasymphatische – und damit nicht-hypertrophe – Stimulation des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors (M₂) mit Carbachol einen Anstieg der Proteinsynthese (Abbildung 10).

In vivo zeigten Mäuse mit Überexpression von α MHC-ERK2^{T188D} nach TAC eine signifikante Vergrößerung der Kardiomyoyten-Querschnittsfläche und interstitiellen Fibrosierung (im Vergleich zu Wildtyp- oder transgenen ERK2^{T188T}-Mäusen) (Lorenz *et*

al., 2009a). Echokardiographisch wurde in diesen Tieren eine Verdickung der Herzwand sowie eine reduzierte kardiale Funktion (Verkürzungsfraktion, *fractional shortening*) nachgewiesen. Weiterhin waren die kardiale Kontraktilität und Relaxation in diesen Tieren reduziert, sodass Mäuse mit Überexpression von ERK2^{T188D} nach TAC eine globale kardiale Dysfunktion entwickelten.

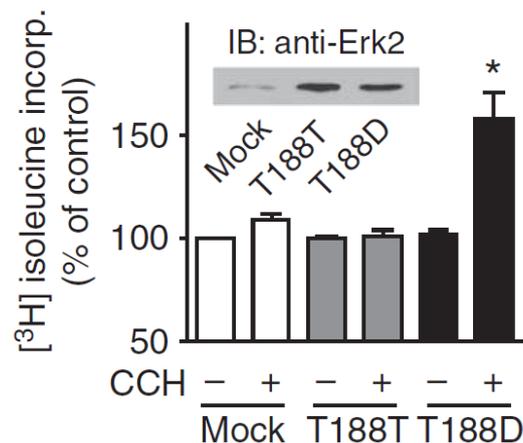


Abbildung 10: Proliferationsanalyse in Kardiomyozyten mit Überexpression von ERK2^{T188D}.

[³H]-Isoleucin-Inkorporation in neonatalen Kardiomyozyten (NRCM) mit Überexpression des Kontrollplasmids (Mock), ERK2-Wildtyp (T188T) oder ERK2^{T188D} (T188D) vor oder nach Stimulation mit Carbachol (CCH).

Abbildung übernommen aus Lorenz et al., 2009 mit Erlaubnis von Springer Nature.

Mithilfe der *Realtime*-quantitativen PCR (RT-qPCR) konnte außerdem eine signifikant gesteigerte Reexpression fetaler Gene nachgewiesen werden (Lorenz et al., 2009a). Schließlich wandelte die ERK2^{T188D}-Mutation, wie auch in NRCM, die Stimulation des M₂-Rezeptors durch Carbachol in einen hypertrophen Stimulus um, der Herzgewicht und Wanddicke dieser Tiere erhöht (Lorenz et al., 2009a).

Also führt die permanente Phosphorylierung von ERK2^{Thr188} zu einem *gain-of-function*-Phänotypen mit stärkerer Ausbildung der kardialen Hypertrophie und des kardialen *Remodeling* sowie zu einer verringerten Herzfunktion (Lorenz et al., 2009a).

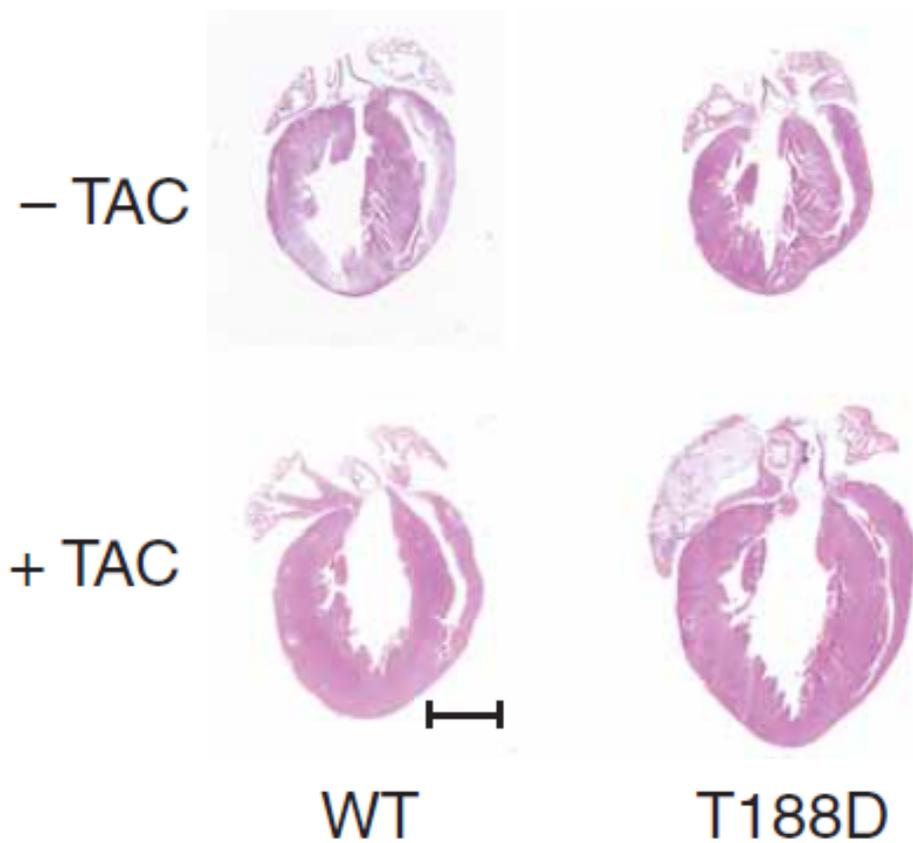


Abbildung 11: Transversalschnitte von Wildtyp- und transgenen ERK2^{T188D}-Mäusen nach TAC.

Diese Abbildung zeigt repräsentative longitudinale Schnitte von Wildtyp- (WT) und transgenen Mäusen mit Überexpression von ERK2^{T188D} (T188D) nach sechswöchiger operativer Konstriktion der Aorta (+ TAC) versus Kontrolltiere (- TAC). Maßstab: 2 mm.

Abbildung übernommen aus Lorenz et al., 2009 mit Erlaubnis von Springer Nature.

1.3 Nicht-Kardiomyozyten im Herzen

1.3.1 Kardiale Fibroblasten

Obwohl Kardiomyozyten circa 75% des normalen Herzvolumens ausmachen, sind sie bei Menschen nur für 30-40% aller im Herzen vorhandenen Zellen verantwortlich (Vliegen *et al.*, 1991). Den größten Anteil kardialer Zellen bilden Fibroblasten¹ (Adler *et al.*, 1981; Banerjee *et al.*, 2007; Camelliti *et al.*, 2005).

Fibroblasten werden klassischerweise als Zellen mesenchymalen Ursprungs, die interstitiales Kollagen synthetisieren, definiert (Camelliti *et al.*, 2005). Prinzipiell handelt es sich um bewegliche Zellen, die die beiden kontraktilen Proteine Aktin und Myosin enthalten und daher zu Kontraktionen fähig sind (Camelliti *et al.*, 2005). Kardiale Fibroblasten wurden als *Sentinel*-Zellen bezeichnet, weil sie Veränderungen von chemischen, mechanischen und elektrischen Signalen aufspüren und die adäquate Antwort des Herzen initiieren können (Souders *et al.*, 2009). Im Rahmen einer zellulären Schädigung differenzieren diese zu Myofibroblasten. Dabei handelt es sich um kontraktile und bewegliche Fibroblasten, die sensibler für die Stimulation durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren werden und ihrerseits vermehrt Mediatoren und ECM sezernieren (Kawaguchi *et al.*, 2011; Lajiness & Conway, 2014). Diese Zellen sind daher für die initiale Antwort auf eine myokardiale Schädigung notwendig, eine anhaltende Anwesenheit führt allerdings zu pathologischem *Remodeling* des Herzens (Turner, 2014).

(Myo-)Fibroblasten übernehmen diverse Funktionen im Herzen: Sie interagieren mit den Kardiomyozyten über Connexine, um das elektrische Signal via *gap junctions* auch über große Distanzen zu leiten und so eine synchrone Kontraktion zu ermöglichen (Gaudesius *et al.*, 2003). Ihre Hauptaufgabe ist allerdings die Synthese und der Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) (Camelliti *et al.*, 2005). Außerdem sind sie an der Aufrechterhaltung der myokardialen Gewebsstruktur sowie der Synthese und dem Abbau des kardialen Bindegewebes beteiligt (Camelliti *et al.*, 2005; MacKenna *et al.*, 2000). Wenn die regulatorischen Signalwege unterbrochen werden und ein

¹ **Anmerkung:** Neuere Daten zeigen, dass sich die Zusammensetzung humaner Herzen von murinen deutlich unterscheidet: Letztere bestehen aus 56% Kardiomyozyten, 27% Fibroblasten, 10% VSMC und 7% andere Zellen (Banerjee *et al.*, 2007).

Ungleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau der ECM entsteht, fibrosiert und verhärtet das Myokard (Souders *et al.*, 2009; Zannad *et al.*, 2001).

Zusätzlich sezernieren die Fibroblasten nach Stimulation durch Angiotensin II oder Endothelin-1 Wachstumsfaktoren und Zytokine, die einen Einfluss auf alle kardialen Zelltypen haben können (Kim *et al.*, 1995; Souders *et al.*, 2009): Beispielsweise wird das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) nach einer Schädigung des Herzgewebes durch die Fibroblasten sezerniert (Long, 2001). Dieses Zytokin bewirkt die Migration von Abwehrzellen zum Ort des Geschehens, stimuliert das Wachstum der Kardiomyozyten und verhindert die Proliferation von Fibroblasten (Mitchell *et al.*, 2007), um so auf die Herzschädigung zu reagieren (Kapitel 6.6).

1.3.2 Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC)

Eine weitere große Population kardialer Zellen stellen vaskuläre glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) dar, die in Mäusen etwa 10% aller Zellen des Herzens ausmachen (Banerjee *et al.*, 2007). Diese Zellen bilden (physiologisch als einziger Zelltyp) die Media und damit das kontraktile Gewebe von Blutgefäßen (Lacolley *et al.*, 2012; Schwartz, 1995). Durch Kontraktionen und Relaxationen verändern sie den Durchmesser der Gefäße, damit diese den erforderlichen Blutdruck aufrechterhalten können (Lacolley *et al.*, 2012; Rensen *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang proliferieren die VSMC nur sehr wenig und exprimieren eine Vielzahl an kontraktile Proteinen, Ionenkanälen und für die Kontraktion benötigten Signalmolekülen (Owens *et al.*, 2004).

Allerdings können die VSMC ihren Phänotypen und ihre Funktion deutlich und reversibel ändern, wenn Veränderung ihrer Umgebung, physiologisch beispielsweise im Rahmen der Schwangerschaft, pathologisch aber auch nach einer vaskulären Schädigung, auftreten: In diesen Fällen synthetisieren sie Komponenten der ECM und steigern ihre Proliferation und Migration (Owens *et al.*, 2004; Rensen *et al.*, 2007). Somit regulieren sie den Gefäßdurchmesser nicht nur kurzfristig, sondern adaptieren auch langfristig die Gefäßmorphologie durch Veränderungen der Zellzahl und Zusammensetzung des Bindegewebes (Owens *et al.*, 2004; Rensen *et al.*, 2007). Diese Plastizität ist beispielsweise während der Angiogenese erforderlich: Dann formen die VSMCs das

Blutgefäß morphologisch und zeigen hohe Raten an Proliferation, Migration und der Synthese von Bestandteilen der ECM, während sie gleichzeitig kontraktile Fähigkeiten erwerben (Owens *et al.*, 2004). Dieser Switch kann über eine Vielzahl humoraler Faktoren initiiert werden, darunter PDGF, IGF, Angiotensin II oder Endothelin-1 (Beamish *et al.*, 2010; Hughes, 1998; Owens *et al.*, 2004). Signale geschädigter Endothelzellen bewirken ebenfalls den Wechsel der VSMC in den aktiven synthetischen Status, der durch die ECM-Ablagerung in der Pathogenese der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielt (Bennett *et al.*, 2016).

Die arterielle Hypertonie, die die Hypertrophie von Kardiomyozyten induzieren kann, führt zudem zu einer Hypertrophie der VSMC, um die Masse der glatten Muskelzellen in großen Arterien zu erhöhen (Drazner, 2011; Hixon *et al.*, 2000; Olivetti *et al.*, 1980). Dies führt zu einer Verdickung der Media zugunsten des Lumens, weshalb die Media-zu-Lumen-Ratio ansteigt (Lacolley *et al.*, 2012; Schiffrin, 2010). Die Hypertrophie der glatten Muskelzellen ist häufig von einer Polyploidie, also der Vermehrung des DNA-Gehalts ohne Teilung der Zelle, begleitet (Geisterfer *et al.*, 1988; Hixon & Gualberto, 2003; Owens, 1989). Auf diese Weise erreichen sie eine bis zu fünffach größere Masse als diploide Zellen, die unter physiologischen Bedingungen vorliegen (Dominiczak *et al.*, 1996; Hixon *et al.*, 2003).

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) sind wichtige Mediatoren der kardialen Hypertrophie (Barry *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2009b; Yue *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2003), die ihre Wirkung hauptsächlich über die Phosphorylierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren vermitteln (Bueno *et al.*, 2002). Ein zusätzlicher Mechanismus ist die von Lorenz *et al.* identifizierte Autophosphorylierung an der Position Theronin-188 (ERK2^{Thr188}), die nach hypertropher Stimulation auftritt und die kardiale Hypertrophie begünstigt (Lorenz *et al.*, 2009a). Um die Rolle dieser Autophosphorylierung zu untersuchen, wurden durch einen Aminosäureaustausch ERK2-überexprimierende phosphorylierungsdefiziente (T188A) und -mimetische (T188D) Mauslinien generiert. Die Überexpression der phosphorylierungsdefizienten Mutante T188A bewirkte eine verringerte hypertrophe Antwort von murinen Herzen, die durch die Erhöhung der Nachlast (TAC) zur Induktion der Hypertrophie stimuliert wurden (Ruppert *et al.*, 2013). Die Überexpression der *gain-of-function*-Mutante T188D bewirkte hingegen eine stärker ausgeprägte kardiale Hypertrophie und Fibrosierung (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013).

Da im Herzen mit Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen auch andere Zelltypen vorhanden sind, die in der hypertrophen Antwort mit den Kardiomyozyten interagieren (Banerjee *et al.*, 2007; Camelliti *et al.*, 2005), wurde eine Mauslinie erzeugt, die die *gain-of-function*-Mutation ubiquitär (und damit prinzipiell auch in diesen Zellen) überexprimiert. Als Kontrolle wurden Mäuse mit einer Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts in Kardiomyozyten verwendet. Beide transgenen Mauslinien werden in dieser Arbeit miteinander verglichen, um so die Rolle der nicht-Myozyten im Zusammenhang der ERK2^{Thr188}-abhängigen kardialen Hypertrophie untersuchen zu können. Ergänzend soll ein weiterer Teil dieser Arbeit die Frage nach der Rolle dieser *gain-of-function*-Mutation in nicht-Myozyten behandeln.

3. Material

3.1 Chemikalien

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

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Peqlab
Luminol	Alexis
pegGold Proteinmarker III® (Proteingrößenstandard)	Peqlab
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30% (v/v)	AppliChem

3.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Invitrogen Gateway® Cloning	Thermo Scientific
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

3.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoradiographiefilme	Fuji Film
Deckgläser	Hartenstein
Entwicklungs- und Fixierlösungen für Aldioradiographiefilme	Sigma-Aldrich
Kryoröhrchen	Nunc
Objektträger	Hartenstein
Zellkulturschalen	Nunc
Zellsieb (40 µm), Nylon	BD Biosciences

3.4 Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)-Puffer	PAN
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	PAN
Minimum Essential Medium Eagle (MEM Eagle) ohne NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10mg/ml)	PAN
Poly-D-Lysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0.4% m/v)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAN
Vitamin B ₁₂	AppliChem

3.5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Collagenase Typ 2 (323 U/mg)	Worthington, Lakewood
Desoxyribonuklease (DNAse) I, RNAse-frei	Sigma-Aldrich
Trypsin (Difco™ Trypsin 250)	BD Biosciences

3.6 Antikörper

3.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognummer
G _β (Thr20)	Kaninchen	1:5.000	Santa Cruz	sc-378
ERK1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	9102
phospho-ERK1/2 (TEY)	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	9101

3.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Kaninchen, Meerrettichperoxidase-konjugiertes IgG	Ziege	1:7.500	Dianova	111-035-144

3.7 Isotopenmarkierte Substanzen

Bezeichnung	spez. Aktivität	Firma	Katalognummer
Thymidin, [Methyl- ³ H]	6,7 Ci/mMol	PerkinElmer	NET027005MC

3.8 Biologisches Material

3.8.1 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
-	Fibroblasten aus neonatalen Rattenherzen	Präparation s. Kapitel 4.4.3.2
NRCM	Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen	Präparation s. Kapitel 4.4.3.2
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen	Lonza

3.8.2 Adenoviren

Bezeichnung	Spezies	Referenz
AdV-Flag-ERK2 (T188T)	Maus	K. Lorenz, Pharmakologie Würzburg
AdV-Flag-ERK2 (T188D)	Maus	K. Lorenz, Pharmakologie Würzburg
AdV-LacZ	Maus	Pharmakologie Würzburg

3.8.3 Tiere

Bezeichnung	Herkunft
Sprague-Dawley Ratten	Janvier
nicht-transgene Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J)	Harlan, Niederlande
ERK2 ^{T188D} -transgene Mäuse (C57BL/6J)	K. Lorenz, Pharmakologie Würzburg

3.9 Primer für die Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz
CAG2f	5'-ACG TGC TGG TTA TTG TGC T-3'
CAG2b	5'-TTG CTG AGG TGC TGT GTC T-3'
RF	5'- ACA TAG ACC TCT GAC AGA GA-3'
EB	5'- GCA ACT CGA ACT TTG TTG AG-3'
VF	5'-TTC CAG AAG CCT CGC AAT GTC AA-3'
VB	5'-CCC CCT TAC CGG TAT CAG CAG AA-3'

4. Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer- und Stocklösungen sowie alle Reagenzien und Medien werden bei ihrer erstmaligen Erwähnung beschrieben. Zusätzlich befindet sich im Anhang eine Auflistung aller Lösungen (Kapitel Puffer- und Stocklösungen).

Wenn nicht anders erwähnt, wurde Wasser der Qualität Milli-Q verwendet.

4.1 Physiologische Modelle

4.1.1 Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und Versuchsbedingungen wurden von der Tierschutzkommission der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die Zucht und Haltung der Tiere unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingungen erfolgte in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz. Sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Trinkwasser und artgerechtem Futter.

4.1.2 Transgene und Nicht-transgene-Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere der Mauslinien ERK2^{T188D} (T188D) wurden von Kristina Lorenz generiert. Die Mauslinien mit dem genetischen Hintergrund *C57BL/6J* zeichnen sich durch eine Überexpression einer Mutante aus, die eine dauerhafte Phosphorylierung von ERK2 an der Position T188 simuliert. In der Mauslinie α MHC-ERK2^{T188D} ist diese Überexpression nur in den Kardiomyozyten vorhanden, das Genkonstrukt steht unter der Kontrolle des kardiomyozyten-spezifischen *α -Myosin Heavy Chain-(α MHC-)*Promotors (Molkentin *et al.*, 1996). In einer weiteren Mauslinie, CAG-ERK2^{T188D}, ist dieses Konstrukt ubiquitär in allen murinen Zellen vorhanden, es steht unter Kontrolle des *CMV Early Enhancer/Chicken β -Actin-(CAG-)*Promotors (Abbildung 12) (Miyazaki *et al.*, 1989).

Die Generierung der Mäuse erfolgte durch Vorkerninjektion des Konstrukts in befruchtete Oozyten der *C57BL/6J*-Mäuse. Das transgene Genkonstrukt enthielt die kodierende DNA-Sequenz für murines ERK2, bei dem die Aminosäure Threonin an Position 188 zu Asparaginsäure mutiert wurde. Als Folge dieser Mutation ist das ERK2 an der Position 188 dauerhaft stimuliert (Lorenz *et al.*, 2009a).

Um die Translation der mRNA dieses Konstrukts zu fördern, wurde außerdem eine

Polyadenylierungssequenz des viralen SV40-Genoms, kurz Poly-A-Sequenz, angebracht (Engelhardt *et al.*, 1999).

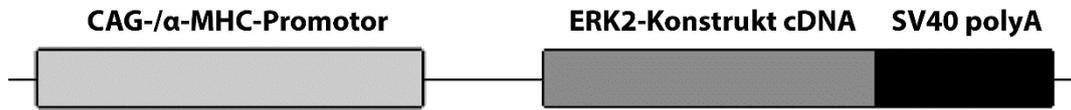


Abbildung 12: Schema des Genkonstrukts für die Generierung transgener Mäuse.

Aufbau des Inserts für die Expression des ERK2-Konstrukts ERK2^{T188D} unter der Kontrolle des CAG-Promotors (für ubiquitäre Expression) bzw. des α-MHC-Promotors (für Kardiomyozyten-spezifische Expression).

Kontrolltiere waren isogene nicht-transgene Wildtyp-Geschwistermäuse mit *C57BL/6J*-Hintergrund, welche vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg zu Verfügung gestellt wurden. Alle verwendeten Mäuse wurden vorab genotypisiert (Kapitel 4.3.2). Es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet.

4.1.3 Aortenkonstiktion

Um die pathologische Hypertrophie zu induzieren, wurde das Modell der Aortenkonstriktion (*transverse aortic constriction*, TAC) gewählt (Rockman *et al.*, 1991). Im Alter von 8 Wochen wurden transgene Mäuse der Linie αMHC-ERK2^{T188D} und CAG-ERK2^{T188D} sowie nicht-transgene Wildtyp-Mäuse einer Konstiktion der *Aorta transversa* für einen Zeitraum von 10 Tagen unterzogen (Lorenz *et al.*, 2009a).

Die operativen Eingriffe wurden von Kristina Lorenz unter einem Binokular (*Medax*) durchgeführt. Nach Injektion der Narkose wurden die Tiere zur kontinuierlichen Beatmung intubiert (Minivent Typ 854, *HSE*) und auf einer Wärmeplatte fixiert. Vor Beginn des operativen Eingriffs wurde eine ausreichende Narkosetiefe durch den Wegfall der Zwischenzehenreflexe überprüft.

Nach Eröffnung des Thoraxes wurde der Aortenbogen freipräpariert. Die Aorta tranversa wurde durch einen Faden, der zwischen den Truncus brachiocephalicus und die Arteria carotis sinistra gelegt und mit einer 27-Gauge-Kanüle zweifach verknötet wurde, verengt (Abbildung 13). Durch dieses Verfahren weist die artifizielle Stenose der

Aorta in allen Tieren denselben Durchmesser von 0,4 mm auf (deAlmeida *et al.*, 2010). Dann wurde die Kanüle entfernt und der Brustkorb durch 6.0-Prolenfäden (*Resorba*) verschlossen. Postoperativ wurde die Narkose durch subkutane Injektion der spezifischen Antagonisten beendet. Die Mäuse wurden außerdem nach dem entsprechenden genehmigten Tierversuchsprotokoll analgisiert. Die erfolgreiche Konstriktion wurde anhand echokardiographischer Erhebungen überprüft.

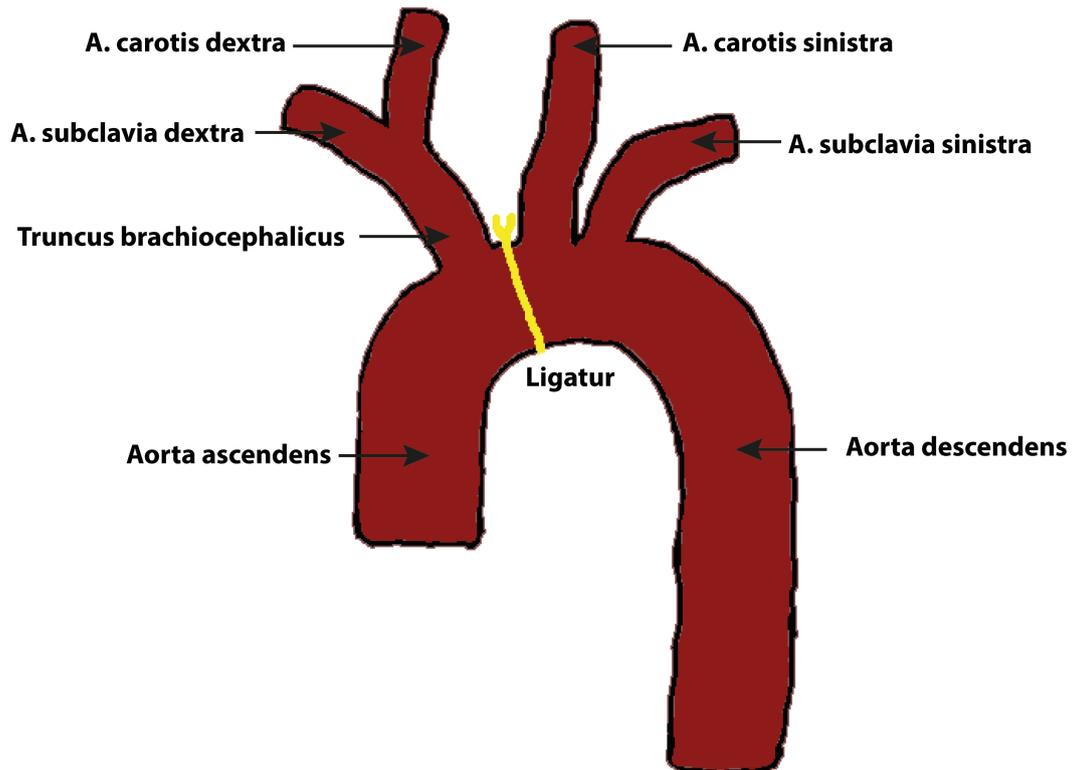


Abbildung 13: Schematische Darstellung der *transverse aortic constriction* (TAC).

Diese Abbildung zeigt schematisch den Verlauf der Aorta nach Verlassen des Herzens sowie deren wichtigste abgehende Arterien. Die Ligatur zur Konstriktion des Gefäßes wird zwischen dem Truncus brachiocephalicus und dem Abgang der linken Arteria carotis (A. carotis sinistra) gelegt.

Narkose:

Medetomidin (Domitor®)	1 mg/ml
Midazolam (Dormicum®)	5 mg/ml
Fentanyl	0,05 mg/ml
NaCl (0.9%)	40 ml

Antagonisierung:

Atipamezol (Antisedan®)	5 mg/ml
Flumazenil (Anexate®)	0,1 mg/ml
Naloxon (Narcanti®)	0,4 mg/ml
NaCl (0,9%)	40 ml

4.1.4 Echokardiographie

Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden mit dem Vevo2100, einem hochauflösenden Bildgebungssystem (*VisualSoncis*), das mit einem 30-MHz Ultraschallkopf ausgestattet ist, von Nadine Yurdagül-Hemrich und Kristina Lorenz unter Verblindung durchgeführt. Die Messung der aortenstenosierten Mäuse erfolgte am 10.±1. postoperativen Tag, nicht-operierte Kontrolltiere waren zum Zeitpunkt der Echokardiographie im äquivalenten Alter. Die Daten wurden analog der Beschreibung bei Lorenz *et al.* erhoben (Lorenz *et al.*, 2009a).

Folgende Parameter wurden erhoben: Die enddiastolische interventrikuläre Septumdicke (IVS_D), die enddiastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke ($LVPW_D$) sowie der endsystolische und enddiastolische linksventrikuläre Innendurchmesser ($LVID_S$ und $LVID_D$) sind mittels M-Mode-Aufnahmen entstanden. Die Aufnahmen entstanden in der Kurzachsenansicht auf proximaler Höhe der Papillarmuskeln (Papillarmuskelebene). Beim M-Mode (*motion*) erzeugt der Schallkopf einen Strahl mit einer hohen Impuls-Wiederholungsfrequenz (1.000 – 5.000 Hz), um eine hohe zeitliche Auflösung zu erreichen (Feigenbaum, 2010). So lassen sich die Bewegungsabläufe der Herzwände gegen die Zeit eindimensional aufzeichnen. Ferner wurde die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes an der Position der Aortenkonstriktion (V_{max}) mittels *pulse-waved* Doppler-Verfahren (PWD) erhoben. Dabei wird eine Schallwelle von den sich in der Aorta bewegendem Erythrozyten reflektiert. Die Geschwindigkeit lässt sich durch eine Verschiebung des reflektierten Signals zur vom Schallkopf ausgesendeten Frequenz ermitteln (Young *et al.*, 1980). Schließlich wurden die Auswurfleistung (Ejektionsfraktion, EF), die systolische Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS), die die Verkürzung des Herzens während der systolischen Auswurfphase darstellt (Yang *et al.*, 1999), sowie der Druckgradient der Aorta durch die Software

VisualSonics mit den erhobenen Parametern berechnet. Alle echokardiographischen Auswertungen wurden von Kristina Lorenz durchgeführt. Den Berechnungen liegen folgende Formeln zugrunde (Gao *et al.*, 2011; Tsujita *et al.*, 2005):

$$\text{Ejektionsfraktion [\%]} = 100 \times \left(\frac{LVID_D^3 - LVID_S^3}{LVID_D^3} \right)$$

$$\text{Verkürzungsfraktion [\%]} = 100 \times \left(\frac{LVID_D - LVID_S}{LVID_D} \right)$$

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

Pro Tier wurden sechs (basale Messungen) bzw. acht (Messungen nach TAC) vollständige Herzzyklen ausgewertet und die Daten als Mittelwert angegeben. Mäuse mit einer Herzfrequenz unter 450 Schlägen pro Minute wurden aus der Studie ausgeschlossen.

4.1.5 Isolation von DNA aus Ohrlochbiopsien

Um den Genotyp (transgen vs. nicht-transgen) der verwendeten Mäuse zu bestimmen, wurde eine Biopsie aus dem Ohr gewonnen. Die Probe wurde in 250 µl 50mM NaOH für 45 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Lösung mit 1 M TRIS (pH 8,0) und 10 mM EDTA neutralisiert, um die Reaktion zu beenden. Schließlich wurden nicht lysierte Bestandteile durch Zentrifugation (8.000g für 10 Minuten) sedimentiert.

4.1.6 Organentnahme

Im Anschluss an die Echokardiographie erfolgte die Herzentnahme der Mäuse zur weiteren Analyse. Noch unter Narkose wurden die Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts (KG) gewogen und durch Genickbruch euthanasiert. Das Herz wurde entnommen und das darin befindliche Blut durch vorsichtigen Druck auf ein saugfähiges Papier entfernt. Anschließend wurde das gesamte Herz gewogen, die Herzohren, die Vorhöfe sowie der rechte Ventrikel entfernt und das Gewicht des linken Ventrikels (VG) bestimmt. Etwa auf Höhe der Papillarmuskeln wurde das Herz transversal geteilt. Die obere Hälfte des Herzens wurde in Paraformaldehydlösung (PFA, 4%) zur weiteren histologischen Untersuchung fixiert. Dies dient dem Erhalt des Gewebes und seiner

ursprünglichen Architektur sowie der Verhinderung der Autolyse des Herzens (Romeis *et al.*, 2010). Die untere Herzhälfte wurde nochmals geteilt und für spätere biochemische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert.

Nach der Herzentnahme wurde außerdem die Lunge (LG) gewogen. Als Parameter für die Körpergröße der Maus wurde schließlich die Länge der Tibia der linken Hinterpfote (TL) bestimmt (Yin *et al.*, 1982).

4.1.7 Herstellung von Herzlysaten

Die Herzlysate wurden aus einem Teil des gefrorenen linken Ventrikels hergestellt. Dem noch gefrorenen Gewebe wurde eiskalter detergenthaltiger Lysepuffer (Kapitel 4.4.6) sowie Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt und mit einem Ultra-Turrax-Stab (*IKA Labortechnik*) für ca. 30 Sekunden homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss bei 1.000g abzentrifugiert (5 Minuten, 4°C, *Hettich EBA 12R*). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Herzlysate wurden nach Durchführung einer Gesamtproteinbestimmung (Kapitel 4.5.1) mit PBS auf eine äquivalente Proteinkonzentration (1.500 mg/dl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer (Kapitel 4.4.6) versetzt. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Herzlysate bei -20°C gelagert werden.

4.1.8 Isolierung von RNA

Das einzelsträngige Transkript einer zu einem Gen gehörenden DNA-Sequenz wird als mRNA (messenger RNA) bezeichnet (Lodish, 1999). Sie dient als Vorlage für die Aminosäuresequenz von Proteinen. Über die Isolierung von mRNA aus Herzlysaten kann somit die Genexpression der Kardiomyozyten quantifiziert werden.

Um RNA aus Herzen zu isolieren, wurde das *RNeasy Mini Kit (Qiagen)* verwendet, welches eine Entwicklung der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit Guanidiniumthiocyanat ist. Durch Denaturierung von Proteinen inaktiviert dieses Molekül RNAsen, die die freiwerdende Nukleotide ansonsten abbauen würden (Chomczynski & Sacchi, 1987). Da diese Methode nur Nukleotide mit mehr als 200 Basenpaaren extrahiert, werden andere RNA-Typen, wie die ribosomale oder Transfer-

RNA (rRNA bzw. tRNA), aufgrund ihrer Größe (Hyeon *et al.*, 2006) nicht isoliert. Somit ist dieses Kit nahezu selektiv für die mRNA.

Die RNA wurde aus dem Herzgewebe mithilfe des *RNeasy Mini Kit (Qiagen)* nach Angaben der Hersteller gewonnen. Um die Qualität der isolierten RNA zu beurteilen, wurden die Extinktionswerte (optische Dichte, OD) bei 260 nm und 280 nm in einem Spectrophotometer (NanoDrop™ 2000c, *Peqlab*) bestimmt. Bei einem Quotienten von $OD_{260}:OD_{280} \geq 2,0$ kann von einer gereinigten RNA ausgegangen werden. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2 Histologische Methoden

4.2.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die in Paraformaldehyd fixierten Herzen (Kapitel 4.1.6) wurde in Einbettungskassetten verschlossen. Da sich das im Gewebe befindliche Wasser nicht mit Paraffin mischt, mussten die Herzen vor der Einbettung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 2x 96%, 3x absolutes Ethanol für jeweils 1 Stunde) entwässert werden (Tissue-Tek®, *Sakura*). Das Lösungsmittel Xylol, das gleichermaßen alkohol- und paraffinlöslich ist, entfernt das Ethanol wieder aus dem Gewebe und entfettet dieses. Die entwässerten Herzen wurden in flüssiges Paraffin (56°C) gegeben und in einer Paraffin-Ausgießstation (EG 1150H, *Leica*) zur weiteren Aufarbeitung in Paraffinquader gegossen. Die Blöcke wurden schließlich mit einem Mikrotom (RM 2165, *Leica*) in $2\ \mu\text{m}$ dicke Gewebsschnitte geschnitten, die auf Polylysin-beschichtete Glasobjektträger (Superfrost™ Plus, *Thermoscientific*) aufgezogen wurden. Diese trockneten nun für mehrere Stunden bei 45°C und konnten im Anschluss gefärbt werden. Das Anfertigen der Paraffinschnitten sowie die Färbung der Schnitte erfolgten durch die technische Assistentin Marianne Babl.

4.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um das Ausmaß der Hypertrophie von Kardiomyozyten zu beurteilen, wurden Gewebsschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.-Färbung) gefärbt. Das basische Hämatoxylin färbt basophile Strukturen, insbesondere den Nukleus, blau, das saure

Eosin alle azidophilen (eosinophilen) Strukturen, insbesondere das Zytoplasma, rot. Da die Färbelösungen wasserlöslich sind, mussten die Gewebsschnitte zunächst nach diesem Schema entparaffiniert werden. Das Lösungsmittel Roti®-Histol (*CarlRoth*) wurde als Ersatz für das gesundheitsschädliche Xylol verwendet.

Entparaffinieren:

- Roti®-Histol 4 Minuten
- Roti®-Histol 4 Minuten
- Roti®-Histol 4 Minuten
- Ethanol (100%) 2 Minuten
- Ethanol (100%) 2 Minuten
- Ethanol (100%) 2 Minuten
- Ethanol (70%) 2 Minuten

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte durch mehrmaliges Spülen in destilliertem Wasser (für jeweils 30 Sekunden) rehydriert. Im ersten Schritt wurden die Objektträger für 10 Minuten in der Hämatoxylin-Färbelösung gefärbt und anschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Nun wurden die Schnitte im zweiten Schritt für ca. 50 Sekunden in Eosin-Lösung, versetzt mit 20 µl Eisessig, gefärbt. Der Eisessig erleichtert dabei die Kontrastfärbung, indem er die basische Hämatoxylin-Färbung abbricht. Die Schnitte wurden zweimalig für 30 Sekunden mit Leitungswasser gewaschen und nach diesem Schema mit einer Alkoholreihe und Roti®-Histol entwässert.

Entwässern:

- Ethanol (70%) 1 Minute
- Ethanol (100%) 2 Minuten
- Roti®-Histol 3 Minuten
- Roti®-Histol 3 Minuten

Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte mit dem Eindeckmittel Eukitt® eingedeckt, um sie dauerhaft verwenden zu können.

Hämatoxylin-Färbelösung:

Hämatoxylin	1 g
KAl(SO ₄) ₂	50 g
NaIO ₃	200 mg
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Eosin-Färbelösung:

Eosin G	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Die quantitative Analyse der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche erfolgte bei 400-facher Vergrößerung an einem *Leica* DM 4000B Lichtmikroskop (Objektiv: *Leica* HCX PL Fluotar 40x/0,75). Pro Gewebsschnitt wurden 10 Bildausschnitte digital abfotografiert. 6 repräsentative Zellen pro Ausschnitt wurden manuell umrandet. Alle Zellen mussten klar abgrenzbar sein sowie einen zentral angeschnittenen Zellkern besitzen. Die Ermittlung der Querschnittsfläche erfolgte verblindet und computergestützt über Pixelzählung mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop*®. Somit ergeben sich 60 ausgewertete Zellen pro Tier.

4.2.3 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung färbt Kollagenfasern rot, während das restliche Gewebe gelb angefärbt wird (Junqueira *et al.*, 1979). Um das Ausmaß der Myokardfibrose zu quantifizieren, wurden Paraffinschnitte nach Pikro-Siriusrot gefärbt.

Zunächst wurden die Gewebsschnitte entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss wurden sie in der Siriusrot-Färbelösung für 45 Minuten inkubiert. Überschüssige Farbe wurde mit Leitungswasser abgespült (2x für jeweils 30 Sekunden). Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte entwässert und mit Eukitt® eingedeckt.

Pikro-Siriusrot-Färbelösung:

Direct Red 80 (1% (m/v) in H ₂ O)	10% (v/v)
gesättigte Pikrinsäurelösung (in H ₂ O)	90% (v/v)

Die quantitative Analyse der interstitiellen Myokardfibrose erfolgte bei 50-facher Vergrößerung an einem *Leica* DM 4000B Lichtmikroskop (Objektiv: *Leica* HCX PL Fluotar 5x/0,15). Die Schnitte wurden digital abfotografiert und unter Verblindung die Pixel-Anzahl an fibrotisch verändertem Gewebe des Interstitiums sowie die Gesamtpixelzahl der Herzfläche des linken Ventrikels mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop*[®] ermittelt. Fibrosierte Blutgefäße und Herzklappen sowie der rechte Ventrikel und Papillarmuskulatur wurden dabei nicht berücksichtigt. Der prozentuale Anteil an fibrotisch verändertem Gewebe wurde berechnet. Die Angabe erfolgte als Mittelwert aller abfotografierten Bildausschnitte jeden Tieres.

Eine zweite Analyse widmete sich der Auswertung der im Paraffinschnitt angeschnittenen Blutgefäße. Dazu wurde die Querschnittsfläche des Gefäßlumens, der Gefäßwand sowie der perivaskulären Fibrose über Pixelzählung mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop*[®] ermittelt (Abbildung 14). Zudem erfolgte die Messung des größten Gefäßdurchmessers und des Lumens ibidem. Nicht vollständig abgebildete oder längsgeschnittene Gefäße wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Wand-zu-Lumen-Ratio zur Beurteilung der Wanddicke der Blutgefäße (Verhältnis der Querschnittsfläche der Gefäßwand zur Querschnittsfläche des Lumens) und zur Beurteilung der perivaskulären Fibrose (PVF) als Verhältnis der Fläche der perivaskulären Fibrose zur Fläche der äußeren Gefäßwand.

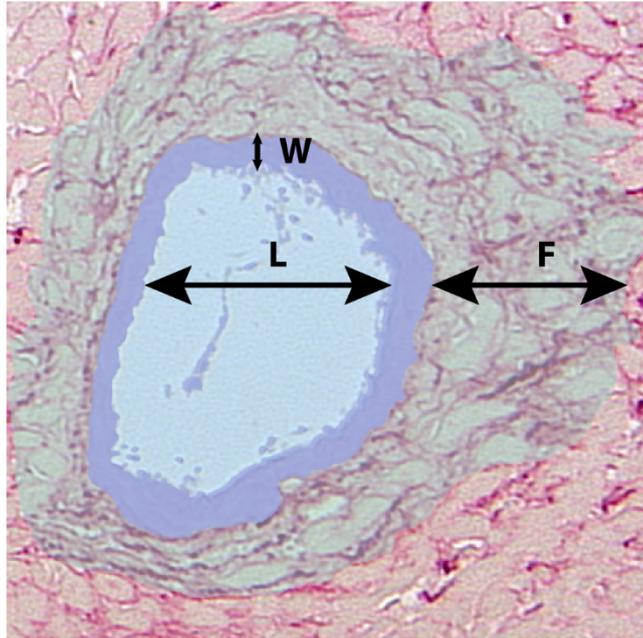


Abbildung 14: Schematische Darstellung zur Analyse der Koronargefäße und perivaskulären Fibrose.

Diese Abbildung zeigt schematisch die Analyse der Gefäße sowie der perivaskulären Fibrose. Mithilfe von *Adobe Photoshop®* wurde der Flächeninhalt des Gefäßlumens (L, *hellblaue Fläche*), der Gefäßwand (W, *violette Fläche*) sowie der perivaskulären Fibrose (F, *türkisfarbene Fläche*) bestimmt. Die Beurteilung einer Gefäßwandhypertrophie erfolgte durch die Berechnung der Mediadicke; analog wurde die perivaskuläre Fibrose durch die Ratio des fibrotischen Gewebes zur äußeren Gefäßwand beurteilt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Synthese von cDNA

Der Begriff cDNA (*complementary DNA*) beschreibt einen DNA-Strang, welcher, ausgehend von einer mRNA-Vorlage, durch das Enzym *Reverse Transkriptase* (RT) hergestellt wurde (Lodish, 1999). Dieses 1970 durch Baltimore und Temin in Retroviren entdeckte Enzym besitzt alle erforderlichen Aktivitäten, um aus einem mRNA-Strang einen doppelständigen DNA-Strang herzustellen (Baltimore; Temin & Mizutani, 1970).

Zuerst synthetisiert die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität dieses Enzyms einen RNA-DNA-Hybridstrang (*Erststrang*). Daraufhin wird der RNA-Strang durch die Ribonuclease H (RNase H) abgebaut. Im letzten Schritt katalysiert die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität einen vollständigen cDNA-Doppelstrang. Dieser kann nun mittels der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden (Reverse Transkriptase-

Polymerase-Kettenreaktion, RT-PCR; Abbildung 15).

Zur Synthese der cDNA, ausgehend von der aus Herzlysaten isolierten mRNA (Kapitel 4.1.8), wurde das SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit (*Invitrogen*) verwendet. Zunächst wurde die Sekundärstruktur der RNA denaturiert und die Anlagerung des Primers ermöglicht, indem der RNA-Mix für 10 Minuten auf 70°C erhitzt wurde. Es folgte eine Inkubation auf Eis (1 Minute). Um den Erststrang zu synthetisieren, wurde dem RNA-Mix 8 µl Mastermix zugegeben und zunächst für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde die SuperScript™ II RT dazu pipettiert und bei der gleichen Temperatur für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion der *Reversen Transkriptase* wurde schließlich durch Erhitzen auf 75°C (15 Minuten) gestoppt.

Als Kontrolle für einen erfolgreichen Umschrieb wurde eine RNA-Probe gewählt, die ohne Zugabe von SuperScript™ inkubiert wurde.

RNA-Mix:

RNA-Vorlage	1 µg
DEPC-H ₂ O	ad 9 µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	0,5 µM
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	1 µl (10 mM)

Mastermix:

5x First-Strand Buffer	4 µl
Dithiothreitol	100 mM
DEPC-H ₂ O	0,9 µl
RNasin® Ribonuclease-Inhibitor	0,1 µl

nach 2 Minuten:

SuperScript™ II RT	1 µl (200 U/µl)
--------------------	-----------------

5x First-Strand Buffer:

TRIS (pH 8,3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM

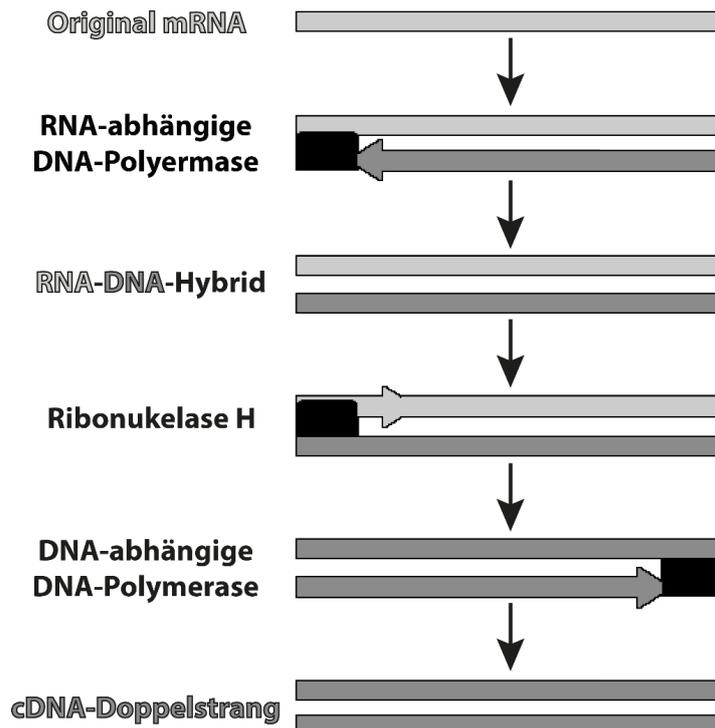


Abbildung 15: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese.

Diese Abbildung zeigt schematisch die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese: Nach der Synthese des Erststrangs durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase wird die RNA durch die Ribonuklease H abgebaut. Im letzten Schritt wird der DNA-Einzelstrang durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase zu einem vollständigen cDNA-Doppelstrang synthetisiert.

4.3.2 Genotypisierung der transgenen und nicht-transgenen Mäuse

Die Genotypisierung wurde vorwiegend von der technischen Assistentin Martina Fischer durchgeführt. Die aus der Schwanzspitze bzw. dem Ohr isolierte DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine einfache Methode, um Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch zu amplifizieren (Saiki *et al.*, 1988).

In Abbildung 16: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). ist das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion schematisch dargestellt. Sie besteht aus drei aufeinanderfolgenden Reaktionen:

Im ersten Schritt (*Denaturierung*) wird die doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen (94-96°C) denaturiert, damit letztlich DNA-Einzelstränge vorliegen. Im Anschluss wird die Temperatur rapide erniedrigt (auf 55°C), um in der zweiten Reaktion

(*Annealing*) die Anlagerung strangspezifischer Oligonukleotide, den sogenannten *Primern*, an die Einzelstränge zu ermöglichen. Die Primer sind Startpunkte für die DNA-Polymerasen. Sie enthalten die komplementäre Sequenz der Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Der dritte Schritt der Reaktion (*Elongation*) wird durch eine hitzestabile *taq*-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* bei 72-75°C durchgeführt. Dieses Enzym verlängert die Primer um die fehlenden Nukleotide gemäß der Vorlage des DNA-Strangs, bis diese wieder als komplementärer Doppelstrang vorliegt.

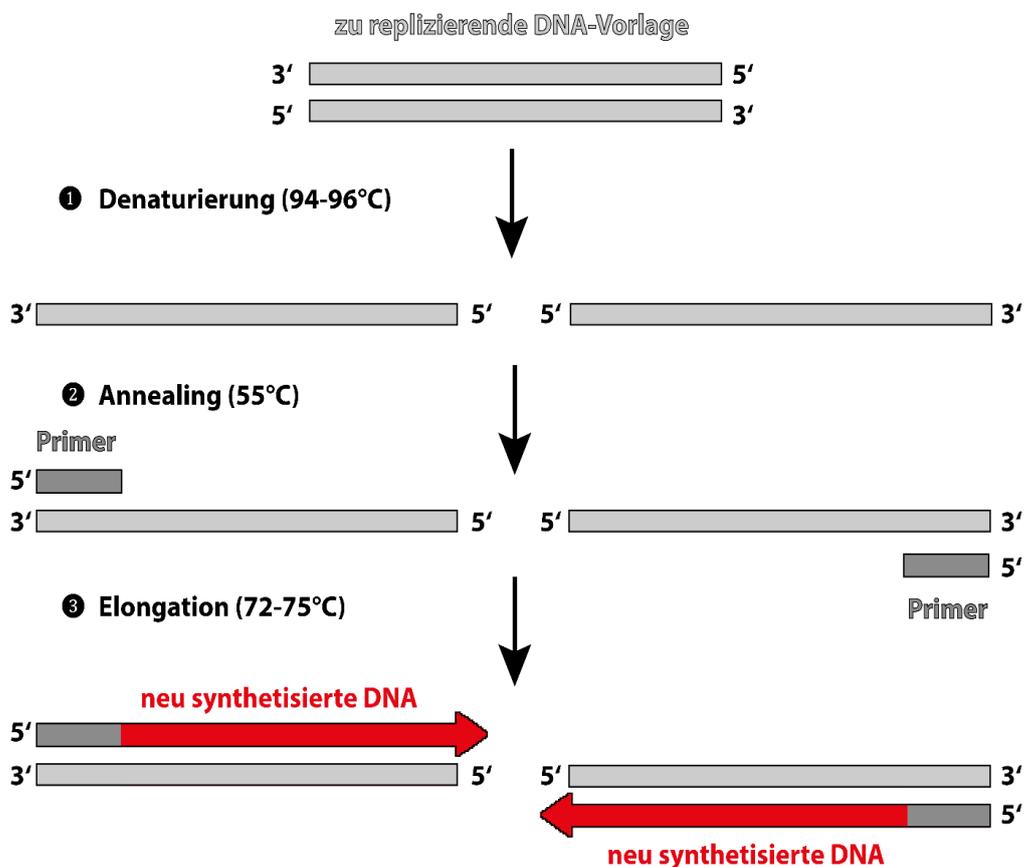


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

In dieser Abbildung sind die drei Schritte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) schematisch dargestellt. Im ersten Schritt denaturiert die zu replizierende DNA-Vorlage, sodass ein DNA-Einzelstrang vorliegt. Danach können sich die Primer (Startpunkte für die DNA-Polymerasen) an den Einzelstrang anlagern. In der letzten Reaktion verlängert die DNA-Polymerase die Primer um fehlende Nukleotide gemäß der DNA-Vorlage, bis ein komplementärer DNA-Doppelstrang vorliegt.

Die gesamte Reaktion wird nun wiederholt, bis die gewünschte DNA-Menge amplifiziert ist. Im Laufe dieser sich wiederholenden Zyklen dienen die Produkte der vorausgegangenen Reaktionen also als Ausgangsstoffe der nachfolgenden Zyklen; somit findet eine exponentielle Amplifikation der gewünschten Nukleotidsequenzen statt. Die *taq*-DNA-Polymerase sowie der dazugehörige PCR-Puffer wurde von der Firma *ThermoScientific (Invitrogen®*, Katalognummer: 10342-020) bezogen. 3 µl des gewonnenen Biopsielysats (Kapitel 4.1.5) wurde mit 23 µl des jeweiligen PCR-Mixes versehen. Diese unterscheiden sich hauptsächlich durch die verwendeten Primer: Während die PCR der Mauslinie CAG-T188D an einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer (*CAG-forward* bzw. *CAG-backward*, s. Kapitel 3.9) erfolgte, wurden bei der Mauslinie αMHC-T188D insgesamt vier Primer verwendet. Der erste Primer (RF, s. Kapitel 3.9) bindet diesen Promotor, der das ERK-Konstrukt kontrolliert, der zweite (EB) bindet direkt an ERK. Zwei weitere Primer (VF und VB) dienten als interne Kontrolle.

PCR-Mix:

Mauslinie	CAG-T188D	αMHC-T188D
taq-DNA-Polymerase	0,30 µl	0,35 µl
dNTPs (1.25 mM)	2µl	2 µl
Primer (10 µM)	je 1,25 µl	RF, EB: je 1,25 µl VF, VB: je 0,75 µl
Polymerase-Puffer (10x)	2,50 µl	2,50 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl	0,75 µl
H ₂ O	ad 23 µl	ad 23 µl

Folgender PCR-Zyklus wurde durchgeführt:

Denaturierung	94°C	1 Minute	} 38x
Denaturierung	94°C	20 Sekunden	
Annealing	57°C / 58°C	25 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C		

Die Temperatur für das *Annealing* betrug bei Linie CAG-ERK2^{T188D} 57°C und bei Linie αMHC-ERK2^{T188D} 58°C. Die amplifizierte DNA wurde schließlich in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Durch die Agarose-Gelelektrophorese können die amplifizierten DNA-Fragmente identifiziert und anhand ihrer Größe getrennt werden (Lee *et al.*, 2012). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die DNA-Fragmente (aufgrund der stark anionisch geladenen Phosphatgruppen im Gerüst der DNA) nach ihrer Größe aufgeteilt.

In der Arbeit wurden 2 % (m/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches die DNA interkaliert, kann diese bei UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde in 5x DNA-Ladepuffer gelöst und anschließend auf das Agarosegel aufgetragen. Bei 100 V trennten sich die Fragmente nach ihrer Größe auf, die durch einen DNA-Größenstandard (100bp- oder 1kb-Leiter, *New England Biolabs*) ermittelt werden konnte.

Agarose-Gel:

Agarose	1-2 % (m/v)
1x TAE-Puffer	ad 100ml

50x TAE-Puffer:

EDTA	50 mM
Essigsäure	6% (m/v)
TRIS-HCl	2 M

5x DNA-Ladepuffer:

EDTA	100 mM
Glycerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	0.1% (m/v)

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Beschichtung der *Multiwell*-Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin

Poly-D-Lysin ist ein positiv geladenes Aminosäure-Polymer (ca. 150.000 kDa), welches Zellen als Adhäsionsmolekül dient (Mazia *et al.*, 1975). Um die Adhäsion der Zellen bei der kleinen Oberfläche in den *Multiwell*-Zellkulturschalen zu verbessern, wurde deren Boden mit einer sterilen Lösung von Poly-D-Lysin in PBS (0,1 mg/ml) für 30 Minuten bedeckt. Die Lösung wurde im Anschluss abgenommen und die *Multiwell*-Zellkulturschalen mit PBS gewaschen.

4.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Neubauer-Zählkammer ist ein Hilfsmittel, um die Zellanzahl einer Suspension unter dem Lichtmikroskop zu zählen. Sie besteht aus einer Glasplatte, in die Vertiefungen und mehrere definierte Gitternetze eingearbeitet sind. Durch das Auflegen eines Deckgläschens entsteht eine Kammer mit einem definierten Volumen. Nun kann eine Zellsuspension vorsichtig an den Rand des Deckgläschens pipettiert werden, die durch Kapillarkräfte in die Kammer gezogen werden. Unter dem Mikroskop werden die 4 Großquadrate (bestehend aus 16 Einzelquadraten) der Zählkammer ausgezählt und der Wert mit einem Kammer-spezifischen Faktor ($\times 1.000$) multipliziert. So erhält man die Zellzahl der zu bestimmenden Suspension pro ml.

4.4.3 Zelllinien

4.4.3.1 Präparation und Kultivierung der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC)

Die glatten Muskelzellen aus der Media der Aorta (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) wurden durch Kristina Lorenz gemäß Lipskaia *et al.*, 2005 präpariert und kultiviert. Es wurden Zellen zwischen Passage 2 und 8 verwendet.

4.4.3.2 Präparation und Kultivierung der neonatalen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Die Präparation der neonatalen Fibroblasten und Kardiomyozyten erfolgte durch die technische Assistentin Nadine Yurdagül-Hemmerich.

Nach dem Euthanasieren der 1-3 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten wurde der Brustkorb mit einer sterilen Schere eröffnet, das Herz entnommen und sofort in ein

Falcon mit CBFHH-Puffer auf Eis gegeben.

Alle folgenden Arbeiten wurden an einem sterilen Arbeitsplatz mit Abzug durchgeführt. Die Herzen wurden nun auf eine Zellkulturplatte mit CBFHH gegeben und die Vorhöfe abgetrennt. Anschließend wurde vorsichtig das noch im Herz verbliebene Blut ausgedrückt. Nach dem Überführen auf eine neue Zellkulturplatte wurde das ventrikuläre Gewebe in kleine Stückchen geschnitten.

Das Gewebe wurde mit zunächst durch die im Wasserbad vorgewärmte Trypsinlösung vorverdaut (15 Minuten, Raumtemperatur). Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte der Verdau über mehrere Runden, indem die Trypsinlösung auf die Ventrikel pipettiert wurde. Nach 10 Minuten wurde der Überstand mit den bereits verdauten Zellen abgenommen und in Falcons mit FCS gesammelt, um die Reaktion zu stoppen. Zu dem unverdauten Gewebe wurde erneut die Enzymlösung gegeben und der Ablauf wiederholt, bis der Verdau komplett war.

Die Zellsuspension wurde gesammelt und für 10 Minuten bei 800g (*Eppendorf Centrifuge 5804*) und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet schließlich in *Preplating*-Medium resuspendiert.

Um die Zellen zu vereinzeln, wurden diese durch ein Zellsieb (40µm, Nylon, *BD Biosciences*) filtriert. Je 10ml des Filtrats wurden auf einer 10cm Zellkulturschale verteilt und bei 37°C und 1% CO₂ inkubiert. Fibroblasten haften schneller am Boden der Zellkulturschale an, während Kardiomyozyten im Überstand bleiben (Blondel *et al.*, 1971). Nach einer Stunde Inkubation, dem sogenannten *Preplating*, wurde der Überstand separiert und in ein steriles Becherglas überführt, die Schalen mit 10ml Fibroblasten-Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

CBFHH (Calcium- and bicarbonate free Hanks with HEPES) -Puffer:

Dextrose	5,55 mM
HEPES	20,06 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,34 mM
KCl	5,36 mM

KH ₂ PO ₄	0,44 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,81 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

pH 7,4; steril filtriert.

Trypsin-Lösung:

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

MEM-Medium:

Minimal Essential Medium (MEM)	10,5 g
NaHCO ₃	350 mg
Vitamin B ₁₂	2 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

pH 7,3; steril filtriert.

Preplating-Medium:

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

Fibroblasten-Kulturmedium (10% FCS) / - Hungermedium (0% FCS):

MEM-Medium	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
FCS	10% / 0% (v/v)

4.4.3.3 Passagierung der Fibroblasten

Da sich die Fibroblasten mit zunehmender Passagierung dedifferenzieren und deren typische Morphologie schrittweise ändert (Neuss *et al.*, 1996), wurden sie bis zur maximal fünften Passage kultiviert. Die Passagierung konfluent gewachsener Zellen war alle 2 – 3 Tage erforderlich.

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Dann wurden die Fibroblasten mit der Endoprotease Trypsin / EDTA beschichtet und für 5 – 7 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale lösten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt, die Zellen resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (110g, 3 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in 3 bis 4 neuen 10 cm Zellkulturschalen (1:3 bzw. 1:4) aufgeteilt, mit ausreichend Nährmedium aufgefüllt und unter oben genannten Bedingungen weiter kultiviert.

4.4.4 Transduktion eukaryotischer Zellen

Die Transduktion mittels Adenoviren erfolgte 6 – 8 Stunden nach dem Aussäen der Zellen in *Multiwell*-Zellkulturschalen.

Für die Transduktion der Zellen wurde das jeweilige Virus (Flag-ERK2^{T188A}, Flag-ERK2^{T188T}, Flag-ERK2^{T188D}) in 0%-Hungermedien suspendiert. Die Virus-Suspension wurde in das Zellkulturmedium zu den jeweiligen Zellen pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Die Expressionslevel wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse kontrolliert.

4.4.5 [³H]-Thymidin-Proliferationsassay

Um das Ausmaß der Zellproliferation zu messen, wurde der Einbau radioaktiv markierter [³H]-Thymidin-Moleküle in die DNA der Zellen unter verschiedenen Bedingungen gemessen (Naito *et al.*, 1987). Je höher die Teilungsrate der Zellen ist, desto mehr [³H]-Thymidin wird in die DNA eingebaut und desto höher ist der gemessene Wert, welcher mithilfe eines β -Zählers (Beckman Counter LS1801) als *counts per minute* (cpm) gemessen werden kann.

Die Zellen wurden in Poly-D-Lysin-beschichtete 24-*Multiwell*-Zellkulturschalen

(Fibroblasten und VSMC: je 15.000 Zellen pro *Well*) ausgesät und für 24 Stunden transfiziert. Nach dem Absaugen der Virussuspension wurden die Zellen zweimalig mit 0%-Medium gewaschen und für weitere 24 Stunden mit 0%-Medium inkubiert. Dieser Serumentzug dient dazu, alle Zellen in die gleiche Phase des Zellzyklus (G_0) zu synchronisieren (Langan & Chou, 2011).

Für die VSMC erfolgte anschließend der Wechsel in den [^3H]-Thymidin-Ansatz (1 $\mu\text{Ci/ml}$) des 0%-Mediums, dem zusätzlich, je nach Versuchsbedingungen, 10 μM Angiotensin II zugesetzt wurde. Die Fibroblasten wurden teilweise nach dem Serumentzug mit 10% FCS inkubiert (4 Stunden). Im Anschluss erfolgte ebenfalls der Wechsel in den [^3H]-Thymidin-Ansatz (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Nach Ablauf der Inkubationszeit (Fibroblasten: 48 Stunden, VSMC: 24 Stunden) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen, um überschüssiges [^3H]-Thymidin zu entfernen.

Um die DNA zu präzipitieren, wurden die Zellen mit 5% Trichloressigsäure (TCA) überschichtet (1 Stunde, 4°C). Die Lyse des Präzipitats erfolgte durch 500 μl 0,5M Natronlauge (1 Stunde, 37°C). Die Suspension der einzelnen Wells wurden dann in Zählerröhrchen überführt und in 4,5 ml Szintillationslösung (IRGA-SAFE PLUS, *Perkin Elmer*) gelöst. Jedes Zählerröhrchen wurde durch den β -Zähler für 5 Minuten ausgezählt und der Wert als *counts per minute* (cpm) angegeben.

4.4.6 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteinanalysen der Zellen vornehmen zu können, ist es notwendig, diese vollständig zu lysieren und alle darin befindlichen Proteine zu suspendieren.

Die Zellen wurden in 12-*Multiwell*-Zellkulturplatten (Fibroblasten: 35.000 Zellen pro *Well*; VSMC: 30.000 Zellen pro *Well*) ausgesät, für 24 Stunden transfiziert, durch Serumentzug für 24 Stunden gehungert und, abhängig von der Versuchsbedingung, mit FCS stimuliert (Fibroblasten: 1 Stunde, VSMC: 10 Minuten). Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 150 μl gekühltem Lysepuffer überschichtet. Um etwaige Aktivierungen von Proteinen nach der Zugabe von Lysepuffer zu verhindern, war diesem Phosphatase- und Protease-Inhibitoren sowie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 4°C für 20 Minuten lysiert, mit einem Zellschaber vom Boden der *Wells* gelöst und in Reaktionsgefäße

überführt. Nach einer Zentrifugation bei 25.000g (10 Minuten, 4°C, *Hettich EBA 12R*) wurde der Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weitere Analyse verwendet. Die Zelllysate wurden nach Durchführung einer Gesamtproteinbestimmung (Kapitel 4.5.1) mit PBS auf äquivalente Proteinkonzentrationen eingestellt und mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzt. Durch Ultraschallstöße (*Bandelin Sono Puls HD200*; 3 Stöße bei Cycle 30) wurden die Zellen aufgebrochen. Dann konnten die Lysate bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert werden.

Lysepuffer:

TRIS (pH 7,4)	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	5 mM
NaN ₃	1,5 mM
Triton-X-100	1% (v/v)

100x Phosphataseinhibitormix:

NaF	5 M
Na ₄ P ₂ O ₇	500 mM
Na ₃ VO ₄	100 mM
NaN ₃	30 mM
β-Glycerolphosphat	500 mM

100x Proteaseinhibitormix:

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1% (w/v)
Benzamidin	25 mM
TRIS (pH 7,4)	50 mM

100x PMSF:

Phenylmethylsulfonylfluorid in 99% Ethanol (v/v)	100 mM
---	--------

4x Laemmli-Puffer:

TRIS (pH 6,8)	200 mM
Natriumlaurylsulfat (SDS)	8% (m/v)
Glycerin	40% (m/v)
β -Mercaptoethanol	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (m/v)

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Quantifizierung der Gesamtproteinmenge mittels BCA

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge von Zell- und Herzlysaten erfolgte mittels *Pierce*[®] BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*). Diese Methode macht sich die Biuret-Reaktion zunutze: In Anwesenheit von Peptidbindungen in alkalischer Lösung werden Kupfer-Ionen Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Die Menge an reduziertem Kupfer ist dabei proportional zur Gesamtproteinmenge in der Lösung. Anschließend komplexieren zwei Moleküle Bicinchoninsäure (BCA) ein reduziertes Cu^+ -Ion, was zu einem violetten Farbumschlag der Lösung führt (Smith *et al.*, 1985). Die Extinktion dieses Farbkomplexes wurde schließlich bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch (*SpectraMax*, Molecular Devices) gemessen. Die Gesamtproteinmenge einer Probe wurde mithilfe einer Kalibrierstandardreihe (bovines Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen) quantitativ ermittelt.

4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung eines Lysats nach der Größe seiner Proteine (Laemmli, 1970). Das Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) denaturiert die Tertiärstrukturen von Proteinen und zerstört somit deren Konformation, sodass diese als linearer Strang vorliegen. Gleichzeitig bindet SDS die Proteine mit einer proteinunabhängigen Konzentration von ca. 1,4 g pro Gramm Protein und fügt ihnen so eine einheitliche negative Ladung hinzu (Smith, 1984). Aus diesem Grund können die Proteine in einem Polyacrylamidgel mit definierter Porengröße bei einem elektrischen Feld ausschließlich aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt

werden. Die SDS-PAGE erfolgt in einem TRIS/Glycin-Laufpuffersystem.

Die Matrix der verwendeten Gele bestand aus polymerisiertem Acrylamid. Der obere Teil des Gels (*Sammelgel*, 4% Acrylamid) konzentriert die Proben zunächst an einem Punkt auf, sodass die anschließende Auftrennung im unteren Teil des Gels (*Trenngel*, 12% Acrylamid) schärfer verläuft. Deshalb werden diese Gele als „diskontinuierliche Gele“ bezeichnet. Die Gele bestanden aus Rotiphorese®, einem Gelpuffer mit definiertem pH sowie Wasser. Durch die Zugabe des Polymerisationskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) und des Initiators Ammoniumperoxodisulfat (APS) wurde die Polymerisierung des Acrylamids gestartet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Nach dessen Aushärtung wurde das Sammelgel aufgeschichtet, in das ein Kamm zum Auftragen der Proben eingesetzt wurde.

Nach der Auspolymerisation wurden die Gele in eine Laufkammer (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, *Biorad*) eingesetzt und diese mit SDS-Ladepuffer befüllt. Die Beladung erfolgte mit einer äquivalenten Proteinmenge. Um die Proteingröße ermitteln zu können, wurde ein Molekulargewichtstandard (peqGold Proteinmarker III®, *Peqlab*) verwendet. Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V.

6 Trenngele (12% Acrylamid):

H ₂ O	10,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	12 ml
4x Trenngelpuffer	7,5 ml
TEMED	15 µl
APS 10% (m/v)	195 µl

6 Sammelgele (4% Acrylamid):

H ₂ O	7,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,5 ml
4x Sammelgelpuffer	3 ml
TEMED	12 µl
APS 10% (m/v)	120 µl

4x Trenngelpuffer:

TRIS (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4% (m/v)

4x Sammelgelpuffer:

TRIS (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,4% (m/v)

10x SDS-Laufpuffer:

TRIS/HCl	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1% (m/v)

Rotiphorese® Gel 30 (*Carl Roth*) besteht aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid (m/v) in wässriger Lösung. Bisacrylamid erzeugt Querverbindungen der Polyacrylamid-Ketten und erschafft damit ein Netz der Polymerketten.

4.5.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen

Die elektrophoretische Übertragung der negativ geladenen Proteine vom Gel auf eine proteinbindende Membran (Polyvinylidenfluorid-, PVDF-Membran) wird als Western Blot bezeichnet (Burnette, 1981). Durch senkrechtes Anlegen einer konstanten Spannung wandern die Proteine aufgrund ihrer Ladung zur Anode. Aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen bleiben sie jedoch an der PVDF-Membran-Oberfläche haften.

In dieser Arbeit wurde ein Wet-Blot-System (Mini Transblot Cell, Biorad) und PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore) mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Membran ist in wasserhaltigen Puffern eine vorherige Aktivierung in 100% Methanol für 1 Minute erforderlich, damit eine suffiziente Proteinbindung erreicht wird. In einer Blot-Kassette wurde die Membran zusammen mit dem proteinhaltigen Gel zwischen in Transferpuffer getränktem Filterpapier angeordnet. Die Transferkammer wurde mit Puffer befüllt und die Blot-

Kassette darin eingesetzt. Unter Kühlung erfolgte der Proteintransfer bei einer konstanten Spannung von 100V für 75 Minuten.

Transferpuffer:

TRIS	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20% (v/v)

4.5.4 Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Da die PVDF-Membran proteinbindend ist, muss vor dem Detektieren der gewünschten Zielproteine durch Antikörper unspezifische Bindungsstellen der Membran geblockt werden (Mahmood & Yang, 2012). Die in der Blockmilch enthaltenen Proteine sättigen alle Stellen der Membran, an denen sich die gewünschten Zielproteine nicht befinden. Dies führt zu genaueren Ergebnissen, weil der Hintergrund der Membran blockiert wird. Die Membran wurde im Anschluss an den Proteintransfer unter Schwenken in Blockmilch inkubiert (mindestens 1 Stunde, Raumtemperatur).

Blockmilch:

Trockenmilchpulver	5% (m/v)
NaCl	100 mM
TRIS (pH 7,4)	10 mM
Triton-X-100	0,1% (v/v)

4.5.5 Immundetektion immobilisierter Proteine (Western Blot)

Die Detektion der Proteinbanden auf der Membran erfolgte durch spezifische Antikörper. Ein antigenspezifischer monoklonaler Primärantikörper bindet an der für ihn passenden Proteinbande, während unspezifisch gebundene Antikörper durch mehrere Waschschriffe wieder abgelöst werden. Ein Sekundärantikörper, an den die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, bindet speziesspezifisch an die F_c-Region des Primärantikörpers. Dieses Enzym katalysiert die Chemilumineszenz-Reaktion, dessen Signal mithilfe von Audiographiefilmen detektiert und dokumentiert wird.

Die Membran wurde nach dem Blocken mit dem jeweiligen Primärantikörper, die in

BSA-Waschpuffer verdünnt wurden, über Nacht unter Schwenken inkubiert (4°C). Am nächsten Tag wurden nicht-gebundene Antikörper in drei Waschsritten à 10 Minuten von der Membran abgewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in BSA-Waschpuffer verdünnt wurde, erfolgte für 2 Stunden unter Schwenken (bei Raumtemperatur). Anschließend folgten erneut drei Waschschrte mit BSA-Waschpuffer, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mithilfe von Luminol-Lösung bzw. des *Pierce*[®] ECL (*enhanced chemoluminescence*) plus Western Blotting Substrate (*Thermo Scientific*). Luminol wird in Anwesenheit eines Oxidationsmittels, zum Beispiel H₂O₂, durch die Meerrettich-Peroxidase in 3-Aminophthalat reduziert. Da das Produkt in einem angeregten Zustand entsteht, emittiert es Energie in Form von blauen Photonen, um in den Grundzustand überzugehen (White *et al.*, 1964). Das *Pierce*[®] *enhanced chemoluminescence* (ECL)-Kit liefert ein Substrat auf Basis der Acridinsäure, die durch die Peroxidase verestert wird und dabei Photonen emittiert (Weeks *et al.*, 1983). Die Membran wurde in einer der frisch hergestellten Lösung kurz geschwenkt, bis die Lumineszenzreaktion einsetzte. Das Signal wurde unter Lichtausschluss auf Autoradiographiefilmen (Super RX, *Fujifilm*) festgehalten. Die in der Entwicklerlösung (Caresteam[®] Kodak[®] autoradiography GBX developer/replenisher, *Sigma-Aldrich*) enthaltenen Reduktionsmittel Hydrochinon und Dimezone reduzieren durch die Chemolumineszenz belichtete Silberhalogenide zu sichtbarem metallischem Silber. Nach kurzer Inkubation unter Schwenken wurde überschüssige Entwicklerlösung mit Leitungswasser abgewaschen. Nicht umgesetzte Silberhalogenide werden durch in der Fixierlösung (Caresteam[®] Kodak[®] autoradiography GBX fixer/replenisher, *Sigma-Aldrich*) enthaltendes Ammoniumthiosulfat vom Film entfernt, sodass nur noch reduziertes Silber zurückbleibt. Durch die Fixierung ist der Film außerdem gegen weiteres Licht unempfindlich. Die Fixierlösung wurde Leitungswasser abgewaschen und der Film getrocknet.

BSA-Waschpuffer:

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

Luminol-Lösung:

Lösung A:

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

Lösung B:

TRIS (pH 8,3)	100 mM
H ₂ O ₂ (30%)	0,06% (v/v)

Vor Gebrauch wurden Lösung A und B frisch hergestellt und zu gleichen Anteilen gemischt.

4.5.6 Entfernen gebundener Antikörper (*Stripping*)

Als *Stripping* wird das Entfernen der gebundenen Primär- und Sekundärantikörper nach erfolgter Detektion bezeichnet (Jansohn, 2007). Dies wird erforderlich, wenn dieselbe PVDF-Membran mit einem weiteren Antikörper analysiert werden soll (Legocki & Verma, 1981). Die Membran wurde dazu für zwei Stunden in einem sauren, SDS-haltigen Puffer (*Strippingpuffer*) bei Raumtemperatur geschwenkt. Der Puffer wurde dann dreimalig mit Leitungswasser entfernt, damit keine Rückstände der Säure zurückbleiben. Schließlich wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und die Membran, wie vorher beschrieben, analysiert.

Strippingpuffer:

Glycin	100 mM
SDS	0,1% (m/v)
HCl	ad pH 2,5

4.6 Statistische Analysen und Software

Histologische Bilder wurden mit der Software DISKUS (*Hilgers Technisches Büro*) aufgezeichnet und mit *Adobe Photoshop*® verblindet ausgewertet. Echokardiographische Messungen erfolgten mit der Software Vevo 2.100™ (*VisualSonics*). *Adobe Illustrator*® wurde zur Erstellung von Graphen und Figuren verwendet.

Statistische Analysen erfolgten mithilfe der Software *GraphPad Prism*® (Version 6.0). Die Signifikanz zwischen verschiedenen Gruppen wurde durch den *one-way analysis of variance* (ANOVA) – Test, dem post-hoc die *Bonferroni*-Korrektur folgte, ermittelt. Die Ergebnisse wurden für $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Jedes Einzelexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der ERK2^{T188D}-Mauslinien

In der Einleitung dieser Arbeit wurde die Rolle der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in der Entstehung kardialer Hypertrophie dargelegt. Lorenz *et al.* nutzten verschiedene *FVB/N*-Mauslinien, in denen ERK2 unter Kontrolle des α MHC-Promotors selektiv in Kardiomyozyten überexprimiert und diese zusätzliche Phosphorylierungsstelle entweder ausgeschaltet (ERK2^{T188A}) oder dauerhaft simuliert (ERK2^{T188D}) wurde. Diese Tiere wurden einer sechswöchigen operativen Nachlasterrhöhung durch *transverse aortic constriction* (TAC) unterzogen, um so die kardiale Hypertrophie zu induzieren (Lorenz *et al.*, 2009a). Die *gain-of-function*-Mauslinie zeigte im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtyp-Tieren (WT) sowie zu transgenen Mäusen mit einer kardialen Überexpression des Wildtyp-ERK2 (ERK2^{T188T}) nach hypertropher Stimulation eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie, interstitieller Fibrose und reduzierte Herzfunktion (Kapitel 1.2.5.3.10) (Lorenz *et al.*, 2009a). Die ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetische Mauslinie wurde also bereits durch Lorenz *et al.* charakterisiert.

In dieser Arbeit wurden transgene Mäuse mit *C57BL/6J*-Hintergrund verwendet, in denen die *gain-of-function*-Mutation unter Kontrolle des β -Actin-Promotors ubiquitär in allen Zellen (CAG-ERK2^{T188D}, vereinfacht CAG-T188D) und damit prinzipiell auch in kardialen Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen vorhanden ist. Diese Tiere wurden in dieser Arbeit mit Tieren der α MHC-ERK2^{T188D}-Gruppe (vereinfacht α MHC-T188D) verglichen, um die Rolle der nicht-Myozyten in der Entstehung kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu untersuchen.

In Abbildung 17[A] ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse von Herzlysaten dargestellt. Dieser Western-Blot zeigt die Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts in den transgenen Mauslinien im Vergleich zur endogenen ERK1/2-Expression in nicht-transgenen Wildtyp-Tieren. Beide transgenen Mauslinien weisen vergleichbare Level an überexprimiertem ERK2 auf. Die quantitative Auswertung aller durchgeführten Western-Blot-Experimente (anti-ERK1/2) zeigt ähnliche ERK2-Expressionslevel in CAG-ERK2^{T188D} und α MHC-ERK2^{T188D}-Mäusen (Abbildung 17[B]). Außerdem kann die ERK1/2-Kinaseaktivität über die Western-Blot-Analyse von phosphoryliertem ERK1/2 bestimmt

werden (anti-pERK1/2). Diese ist in beiden transgenen Mauslinien mit den Wildtyp-Mäusen nahezu identisch (Abbildung 17[A und C]).

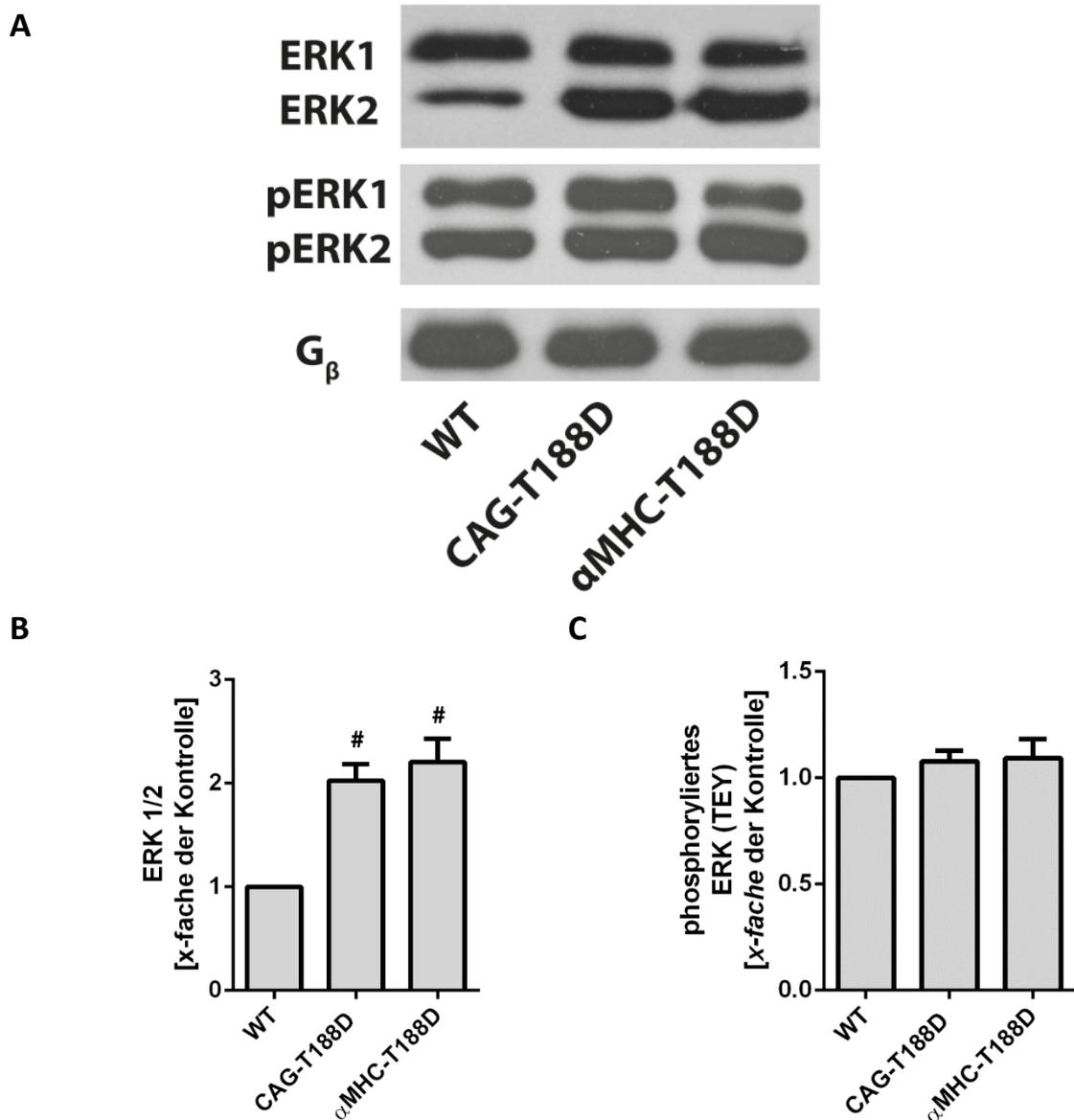


Abbildung 17: Kontrolle der ERK1/2-Expression in Herzen transgener Mäuse

Gezeigt sind exemplarische repräsentative Western-Blots von Herzlysaten nicht-transgener Kontrolltiere (WT) und transgenen Tieren mit ubiquitärer (CAG-T188D) und Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts. **[A]**: Die Expressionsmengen wurden mithilfe von Antikörpern gegen ERK1/2 sowie am TEY-Motiv phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) detektiert. Als Ladekontrolle wurde G_{β} verwendet. **[B-C]**: Quantitative Analyse der Western-Blots. $n=6$ Experimente, $\#p<0.001$. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

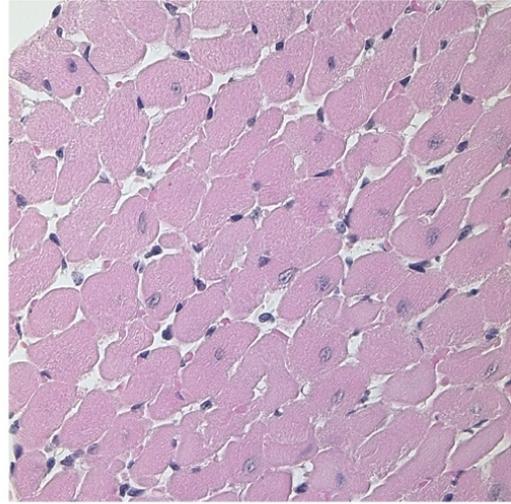
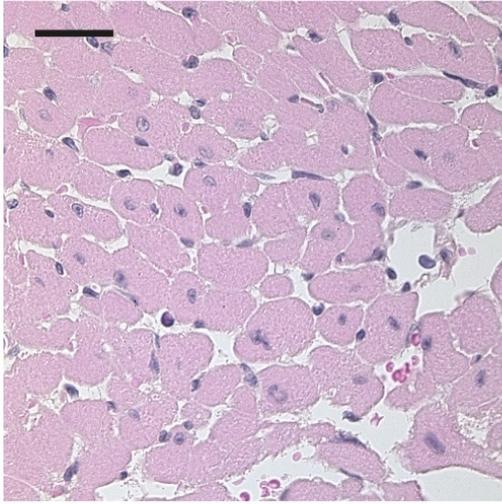
5.2 *Transverse Aortic Constriction (TAC)* induziert kardiale Hypertrophie

Ein wichtiges Werkzeug in der Erforschung von menschlichen Erkrankungen und den zugrundeliegenden Mechanismen stellen Tiermodelle dar (Tarnavski *et al.*, 2004). TAC ist eine der am häufigsten angewandten operativen Eingriffe, um eine pathologische Hypertrophie zu induzieren (Patten & Hall-Porter, 2009). Die operative Konstriktion der Aorta führt zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels durch einen Anstieg des intrakardialen Drucks (deAlmeida *et al.*, 2010). TAC führt also zu einer chronischen Nachlasterrhöhung, wie sie auch beispielsweise in Patienten mit Aortenklappenstenose oder der arteriellen Hypertonie zu finden ist (Kupari *et al.*, 2005). Um diese erhöhte Beanspruchung kompensieren zu können, reagieren die Kardiomyozyten mit Hypertrophie (Grossman *et al.*, 1975). Bei einer weiterhin anhaltenden Belastung des linken Ventrikels kommt es zu Veränderungen der myokardialen Gewebsarchitektur, die als kardiovaskuläres *Remodeling* bezeichnet werden (Cohn *et al.*, 2000). Im Endstadium kann sich schließlich eine Insuffizienz des Herzens mit systolischer und diastolischer Dysfunktion und deren Folgen, beispielsweise das Lungenödem, manifestieren (Gradman *et al.*, 2006). Somit stellt TAC eine Möglichkeit dar, die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung unter einem hypertrophen Stimulus *in vivo* zu untersuchen.

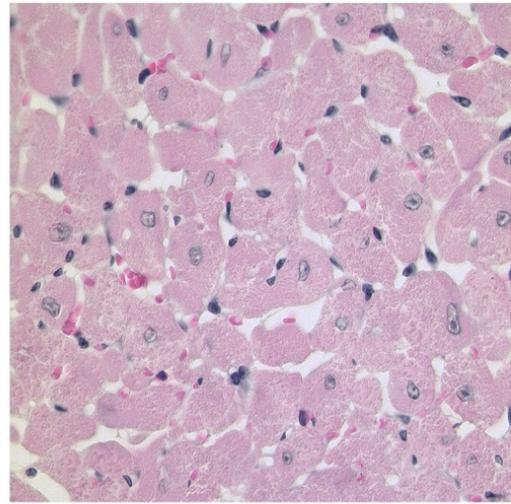
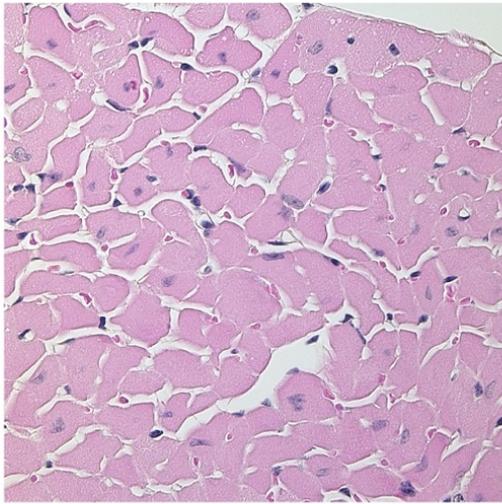
Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an Tieren 10±1 Tage nach TAC durchgeführt. Nakamura *et al.* zeigten einerseits, dass die Mäuse auf die gesteigerte Herzbelastung bereits zehn Tage nach der Operation mit einer signifikanten Zunahme der linksventrikulären Hinterwanddicke (LVPW) reagierten, während die Herzen derselben Mäuse in den Untersuchungen weitere zehn Tage später keine zunehmende Hypertrophie zeigten (Nakamura *et al.*, 2001). Wir entschieden uns für einen vergleichsweise kurzen Zeitraum, in dem die Tiere der Druckbelastung ausgesetzt waren, weil die ersten Untersuchungen ergaben, dass die transgenen Tiere die erhöhte Druckbelastung nicht gut tolerieren.

A

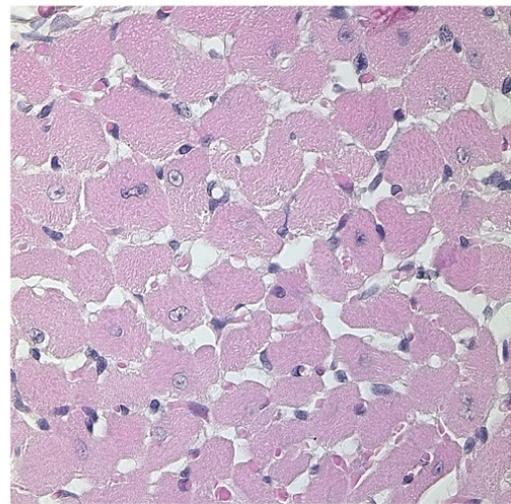
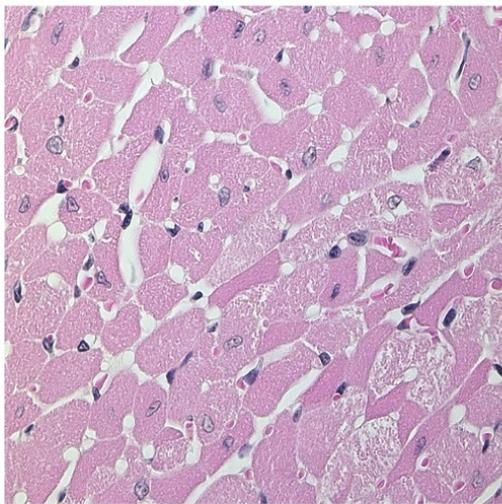
WT



CAG-T188D



α MHC-T188D



KON

TAC

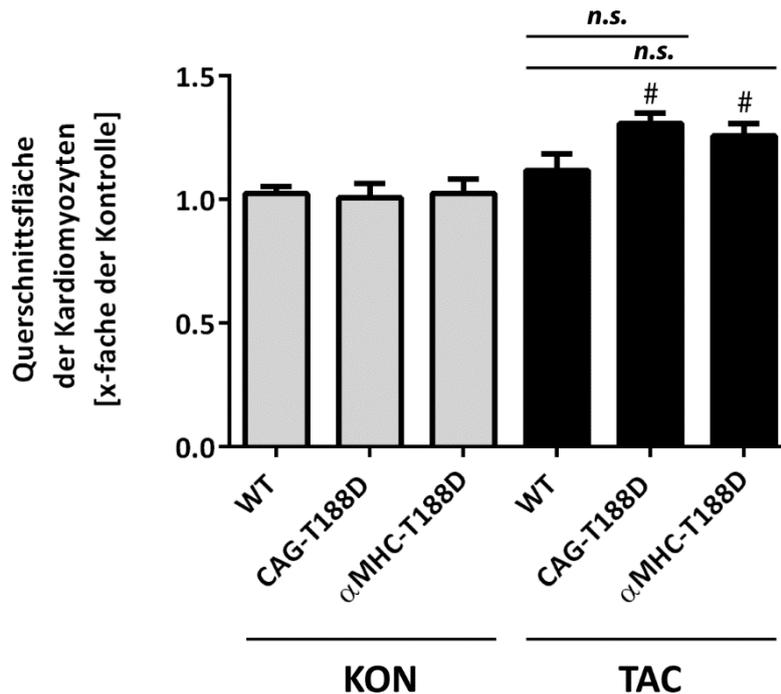
B

Abbildung 18: Vergleich der Querschnittsfläche von Kardiomyozyten nach TAC.

Histologische Analyse des linksventrikulären Myokards von Wildtyp-Tieren (WT) oder transgenen Tieren mit der ubiquitären (CAG-T188D) oder auf die Kardiomyozyten beschränkte (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC). **[A]**: Repräsentative Bildausschnitte H.E.-gefärbter histologischer Schnitte (Maßstab: 50 μ m). **[B]**: Analyse der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche. Pro Tier wurden 60 individuelle Zellen analysiert. $n=7-9$ Tiere pro Gruppe, [#] $p<0.05$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere, *n.s.*: nicht signifikant. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

TAC induzierte dennoch auch in diesem Zeitraum in den operierten transgenen Tieren eine kardiale Hypertrophie, wie die Auswertung der Ventrikelgewicht/Tibiallänge-Ratio, der Echokardiographie sowie der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in histologischen Schnitten zeigt.

Die analysierten Kardiomyozyten der nicht-operierten Tiere der verschiedenen Genotypen waren nahezu gleich groß (Abbildung 18). Die alleinige Überexpression des T188D-Konstrukts induziert im Herzen also keine Hypertrophie (Abbildung 18, Lorenz *et al.*, 2009a). Dies wurde durch die *transverse aortic constriction* (TAC) erreicht: Beide transgenen Mauslinien wiesen nach der operativen Nachlasterrhöhung eine signifikant größere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche auf als nicht-operierten Kontrolltiere.

Während die Zunahme der Querschnittsfläche in nicht-transgenen Kontrolltieren nach 10 Tagen TAC nur tendentiell, aber nicht signifikant angestiegen ist, war der Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und beiden transgenen Mauslinien nach TAC nicht signifikant (Abbildung 18).

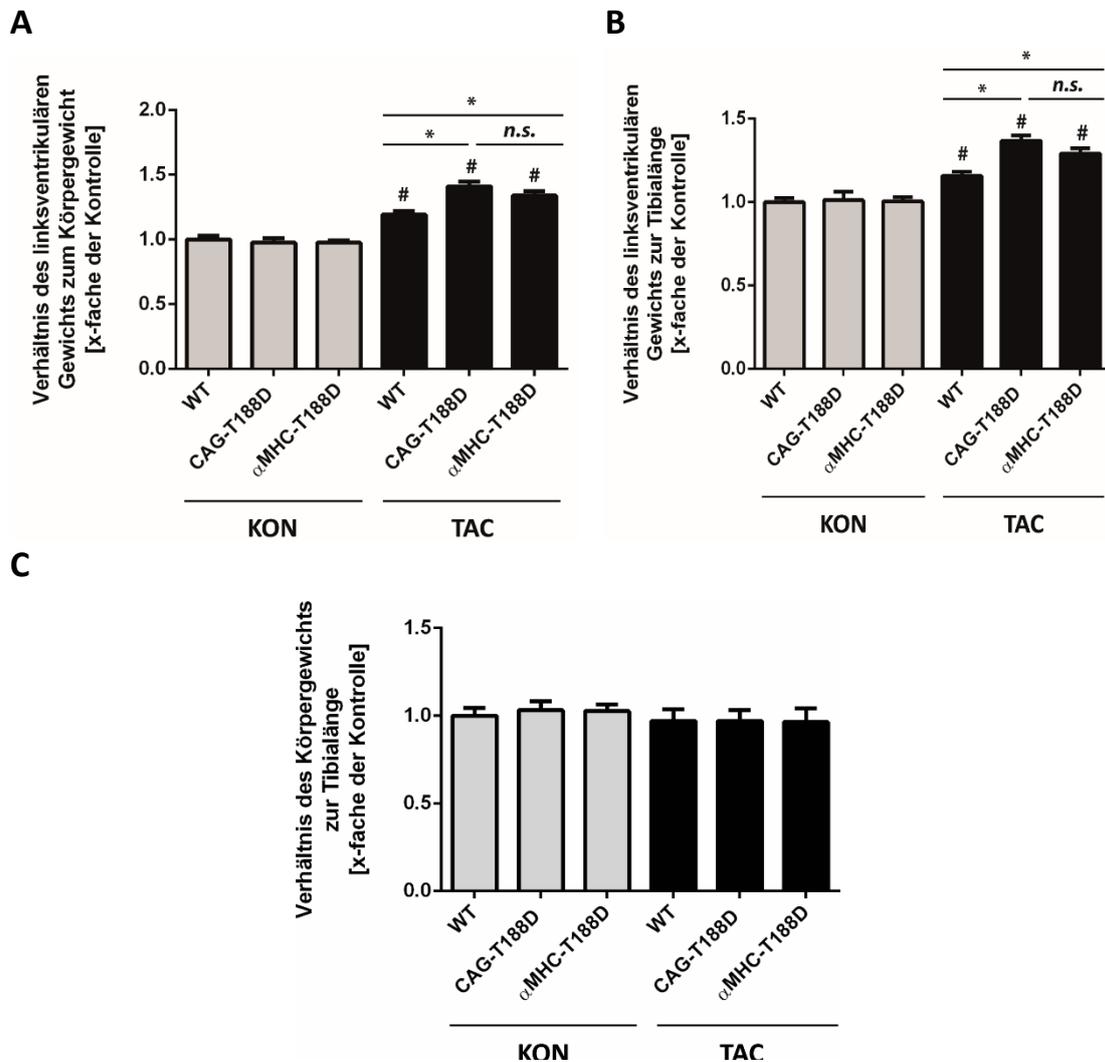


Abbildung 19: Analyse des Gewichts des linken Ventrikels nach TAC.

Analyse der an nicht-transgenen Wildtyp-Tieren (WT) und transgenen Mäusen mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger operativer Konstriktion der Aorta (TAC) erhobenen Parameter linksventrikuläres Gewicht (VG), Körpergewicht (KG) und Tibialänge (TL) und deren Ratios [A-C]. $n=9-11$ Tiere pro Gruppe, $*p<0.05$, $\#p<0.01$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere, *n.s.*: nicht signifikant. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Siehe auch Anhang, Kapitel 8.1.

Neben dem histologischen Nachweis der Hypertrophie ließen sich auch weitere Parameter erheben, die die erfolgreiche Induktion der kardialen Hypertrophie in den Tieren bestätigten: Wir ermittelten das Körpergewicht (KG), das Gewicht des linken Ventrikels (VG, Kapitel 4.1.6) sowie die Länge der Tibia (TL) und berechneten die Ratios dieser Parameter. Die Länge der Tibia stellt einen von der Änderung des Körpergewichts unabhängigen und daher konstanteren Parameter für die Körpergröße des Tieres dar (Yin *et al.*, 1982). Wenn man eine mögliche Herzhypertrophie anhand des Verhältnisses VG/KG bewertet, müsste das Körpergewicht entweder konstant bleiben oder sich das Herzgewicht unter basalen Bedingungen proportional zum Körpergewicht ändern. Genauso wenig lassen sich Rückschlüsse über die Hypertrophie alleine durch die Betrachtung des Herzgewichts schließen, ohne die Größe des Tieres miteinzubeziehen. Daher nutzten Yin *et al.* die Länge der Tibia als Referenzparameter, der die relative mittlere Körpergröße des Tieres unabhängig von Veränderungen des Körpergewichts oder vorhandenen Pathologien darstellt (Yin *et al.*, 1982). Das mittlere Körpergewicht der in dieser Arbeit untersuchten Tiere betrug $25,6 \pm 0,9$ g.

Abbildung 19 und Kapitel 8.1 zeigt die Analyse der ermittelten Parameter. Aus den Graphen [A] und [B] wird ersichtlich, dass durch TAC das ventrikuläre Gewicht größer wird: Während VG/TL beziehungsweise VG/KG in nicht-operierten Tieren zwischen den verschiedenen Genotypen nahezu identisch war, führte die chronische operative Nachlasterhöhung innerhalb von zehn Tagen zu einer signifikanten Zunahme dieser Ratios. Die Stimulation der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in CAG-T188D- oder α MHC-T188D-Tieren bewirkte eine signifikante Erhöhung dieser Ratios zugunsten des linksventrikulären Gewichts gegenüber nicht-transgenen Kontrolltieren (WT).

Im Gegensatz zur Kardiomyozyten-Querschnittsfläche zeigte die operative Nachlasterhöhung in allen Genotypen hier eine signifikante Zunahme der Ratios sowie einen signifikanten Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren.

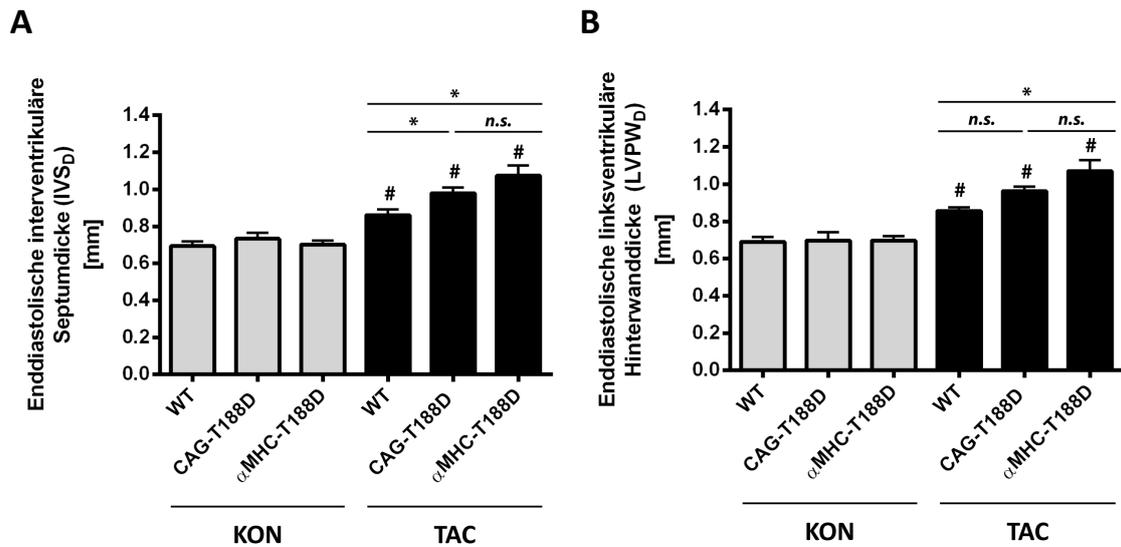


Abbildung 20: Analyse der Septum- und Hinterwanddicke des linken Ventrikels nach TAC.

Echokardiographische Analyse von Wildtyp-Tieren (WT) und transgenen Mäusen mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC). Enddiastolische Messung der Wanddicke des interventrikulären Septums (IVS_D) [A] und der linksventrikulären Hinterwand (LVPW_D) [B]. $n=6-10$ Tiere pro Gruppe; * $p<0.05$, # $p<0.01$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere, n.s.: nicht signifikant. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Zuletzt ergaben auch die durchgeführten echokardiographischen Messungen der Herzwände Hinweise auf hypertrophiertes Myokard. Echokardiographisch kann die Induktion der kardialen Hypertrophie über den Nachweis einer Verdickung der Herzwände erfolgen: Dabei wird die Dicke des interventrikulären Septums und der Hinterwand im Zustand ihrer maximalen Ausdehnung (also enddiastolisch) ermittelt und mit Erhebungen basaler Kontrolltiere verglichen (Gao *et al.*, 2011; Rottman *et al.*, 2007). Alle drei Genotypen zeigten nach der Konstriktion der Aorta eine Zunahme der Dicke des interventrikulären Septums und der Hinterwand (Abbildung 20). Beide transgenen Mauslinien zeigten nach TAC eine signifikant größere Zunahme der Septumdicke als Wildtyp-Tiere, wobei diese in α MHC-T188D-Mäusen tendenziell noch stärker ausgeprägt war.

Während histologische und echokardiographische Untersuchungen und das ventrikuläre Gewicht zeigten, dass die transgenen Mauslinien CAG-T188D und α MHC-

T188D im Alter von acht Wochen keinen signifikanten hypertrophen Phänotypen zeigten, wurde deutlich, dass die transgenen Tiere nach TAC deutlich mehr kardiale Hypertrophie entwickelten als nicht-transgene Kontrolltiere.

5.3 Beurteilung der kardialen Funktion nach TAC

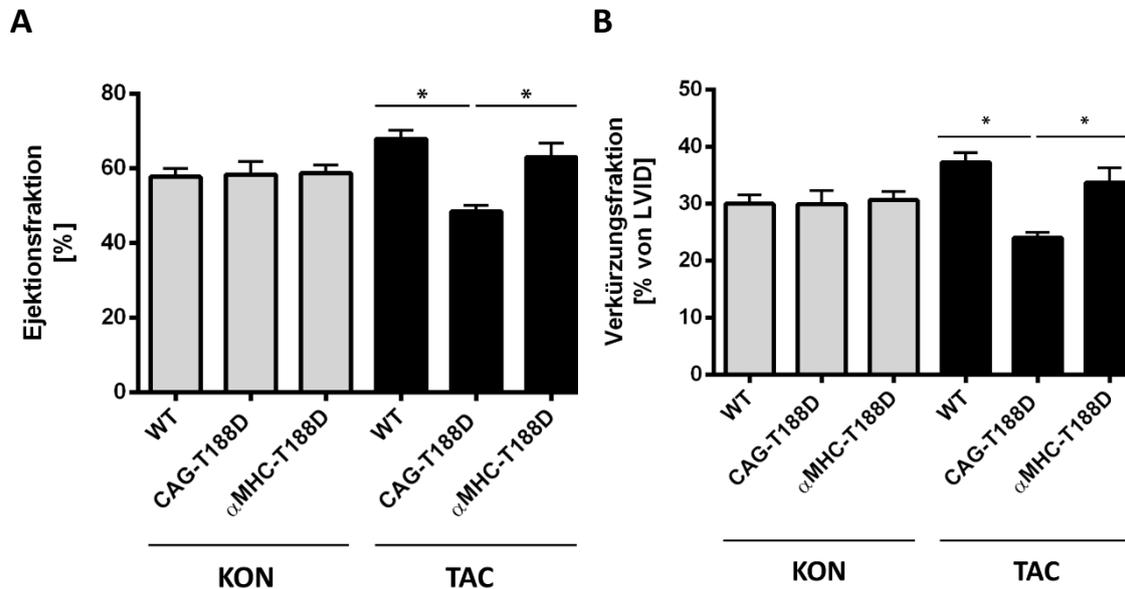


Abbildung 21: Analyse der kardialen Funktion nach TAC.

Echokardiographische Analyse von Wildtyp-Tieren (WT) oder transgenen Tieren mit der ubiquitären (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifische (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC). Die kardiale Funktion wurde anhand der Ejektionsfraktion **[A]** und der Verkürzungsfraktion **[B]** beurteilt.

LVID_D: enddiastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser. $n=6-10$ Tiere pro Gruppe, $*p<0.05$. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Die linksventrikuläre systolische Funktion kann echokardiographisch über die Ejektionsfraktion (EF) und die Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*, FS) beurteilt werden (Vinhas *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 1999). Die EF gibt die Menge des Blutes an, die mit jedem Herzschlag aus dem Ventrikel gepumpt wird, das FS entspricht der Verkürzungsfraktion des Ventrikels während der Auswurfphase; beide Parameter werden in [%] angegeben (Gao *et al.*, 2011; Kasper & Harrison, 2015; Yang *et al.*, 1999). Falls kaum kardialen Wandbewegungsstörungen vorliegen, wie es beispielsweise nach einem Myokardinfarkt der Fall wäre, stehen diese Parameter in einem proportionalen

Verhältnis zueinander und können demnach beide zur Beurteilung der kardialen Funktion herangezogen werden (Gao *et al.*, 2011).

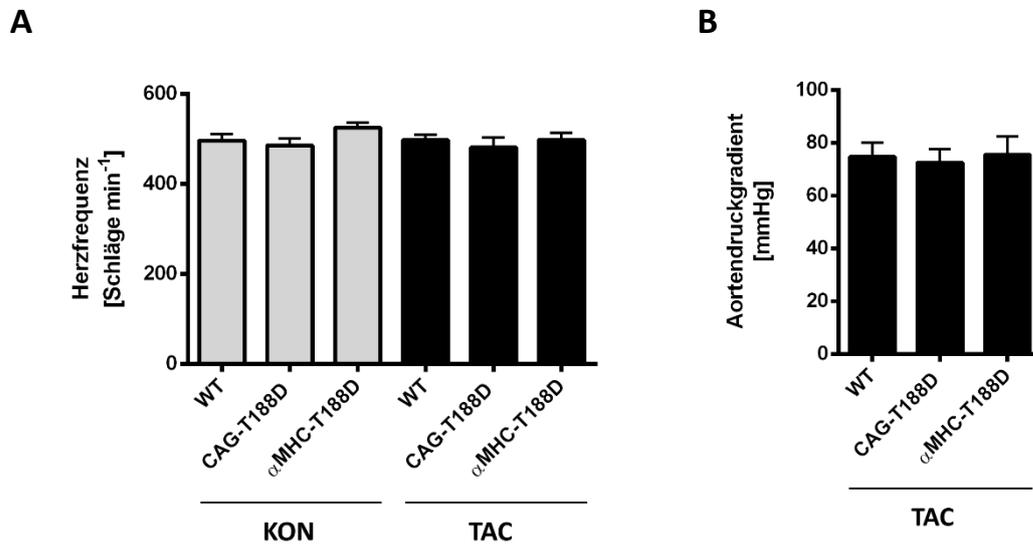


Abbildung 22: Vergleich der Herzfrequenz und des durch TAC induzierten Aortendruckgradienten.

Echokardiographie von Wildtyp-Tieren (WT) oder transgenen Tieren mit der ubiquitären (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC): Sowohl die Herzfrequenz **[A]**, als auch der durch TAC induzierte Druckgradient in der Aorta **[B]** unterscheiden sich in den verschiedenen Gruppen nicht wesentlich. $n=6-10$ Tiere pro Gruppe. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

In der Kontrollgruppe zeigten die drei Genotypen eine ähnliche Herzfunktion (Abbildung 21). Nach TAC stieg die Auswurfleistung in Wildtyp-Tieren und in der α MHC-T188D-Mauslinie leicht (nicht-signifikant) an, wohingegen die CAG-T188D-Mauslinie eine signifikant reduzierte kardiale Funktion aufwies (im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen nach TAC). Wie in der Einleitung dargelegt wurde, muss das Herz bei einer Verengung des Ausflustrakts eine größere Kraft aufbringen, um die suffiziente Blutversorgung des Gewebes zu erhalten (Diwan *et al.*, 2007; Sugden *et al.*, 1998). Dies scheint in Mäusen mit ubiquitärer Expression des ERK2^{T188D}-Konstrukts nicht mehr so gut möglich zu sein wie in den Kontrolltieren, die Auswurfleistung (EF) und die Wandbewegung (FS) zeigte sich echokardiographisch signifikant eingeschränkt. Der Anstieg der kardialen Auswurfleistung in den anderen beiden Linien zeigt außerdem, dass kardiale Hypertrophie innerhalb der 10 Tage nach TAC noch nicht unbedingt mit

einer Reduktion der Funktion einhergeht (Artham *et al.*, 2009; Gradman *et al.*, 2006; Tardiff, 2006).

Abbildung 22 zeigt die Analyse der Herzfrequenz und des Druckgradienten über der operativen Aortenstenose. Da bei beiden Parametern keine wesentlichen Unterschiede innerhalb aller Genotypen festgestellt wurden, wird gezeigt, dass die Erhebungen und Messungen der funktionellen Parameter unter vergleichbaren Versuchsbedingungen erfolgt sind.

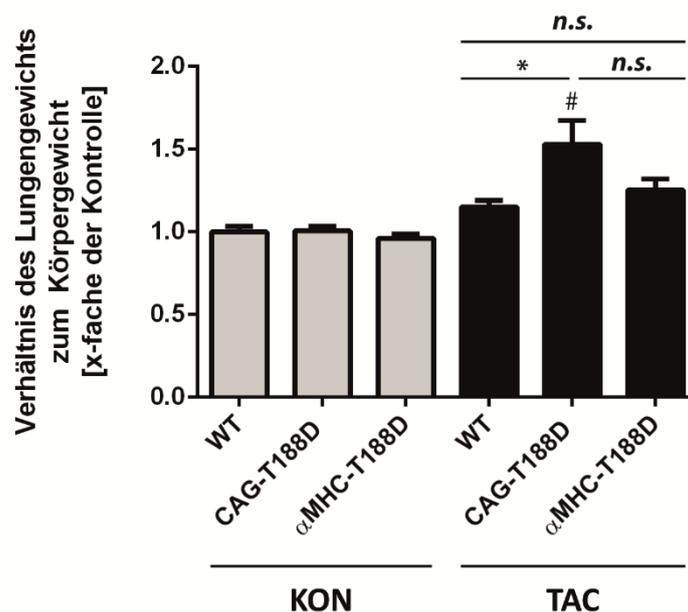


Abbildung 23: Evaluation des kardiogenen Lungenödems nach TAC.

Analyse der an nicht-transgenen Wildtyp-Tieren (WT) und transgenen Mäusen mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger operativer Konstriktion der Aorta (TAC) erhobenen Parameter Lungengewicht (LG) und Körpergewicht (KG). TAC führt in CAG-T188D-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung von LG/KG im Vergleich zu operierten Wildtyp-Tieren. $n=9-11$ Tiere pro Gruppe, $*p<0.05$, $^{\#}p<0.05$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere, *n.s.*: nicht signifikant. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler. Siehe auch Anhang, Kapitel 8.1.

Eine akute Abnahme der linksventrikulären Kontraktilität, die eine verminderte Auswurfleistung bedingt, führt zu einer Zunahme des enddiastolischen Blutvolumens und über den Rückstau des Blutes in die Lungenvenen zu einem Ödem der Lunge

(Gropper *et al.*, 1994; Ware & Matthay, 2005). Das Lungenödem ist durch einen gesteigerten Austritt von Flüssigkeit in das Lungeninterstitium gekennzeichnet, durch den der Gasaustausch in den Lungen deutlich beeinträchtigt wird und unbehandelt tödlich endet (Kasper *et al.*, 2015).

Die einfachste Methode zur Evaluation eines Lungenödems ist die Bestimmung der Ratio aus Lungengewicht (LG) und Körpergewicht (KG) (Parker & Townsley, 2004). Aus Abbildung 23 und Kapitel 8.1 wird ersichtlich, dass vor allem die CAG-T188D-Mäuse nach operativer Nachlasterrhöhung eine deutlich erhöhte LG/KG-Ratio aufweisen. Die ödematöse Zunahme des Lungengewichts steht somit in pathophysiologischer Relation zur echokardiographisch ermittelten reduzierten Ejektionsfraktion in diesen Tieren.

5.4 Beurteilung des kardiovaskulären *Remodelings*

Der Umbau des myokardialen Gewebes durch die exzessive Ablagerung von extrazellulärer Matrix ist ein wichtiger Pathomechanismus des kardialen *Remodelings* (Kapitel 1.1.1.4.2) (Burchfield *et al.*, 2013). Das sezernierte Bindegewebe versteift den Ventrikel und führt auf diese Weise zu einer diastolischen Dysfunktion, also vorwiegend zu Störungen der Relaxation und der Ventrikelfüllung (Chaturvedi *et al.*, 2010; Kasper *et al.*, 2015). Da Fibrose histopathologisch eine Akkumulation von Kollagen ist, kann betroffenes Gewebe über die Kollagenfärbung (Pikro-Sirius-Rot) angefärbt werden (Junqueira *et al.*, 1979).

Abbildung 24[A] zeigt repräsentative Ausschnitte des fibrosierten Myokards, [B] die quantitative Analyse. Kontrolltiere der verschiedenen Genotypen zeigen eine ähnliche Pikro-Sirius-Rot-Färbung. Die operative Konstriktion der Aorta führt in allen Mauslinien zu einer Zunahme der myokardialen Fibrosierung. In den transgenen Mauslinien ist die Kollagen-Ablagerung signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren, in der CAG-T188D-Mauslinie auch signifikant gegenüber den operierten nicht-transgenen Wildtyp-Tieren.

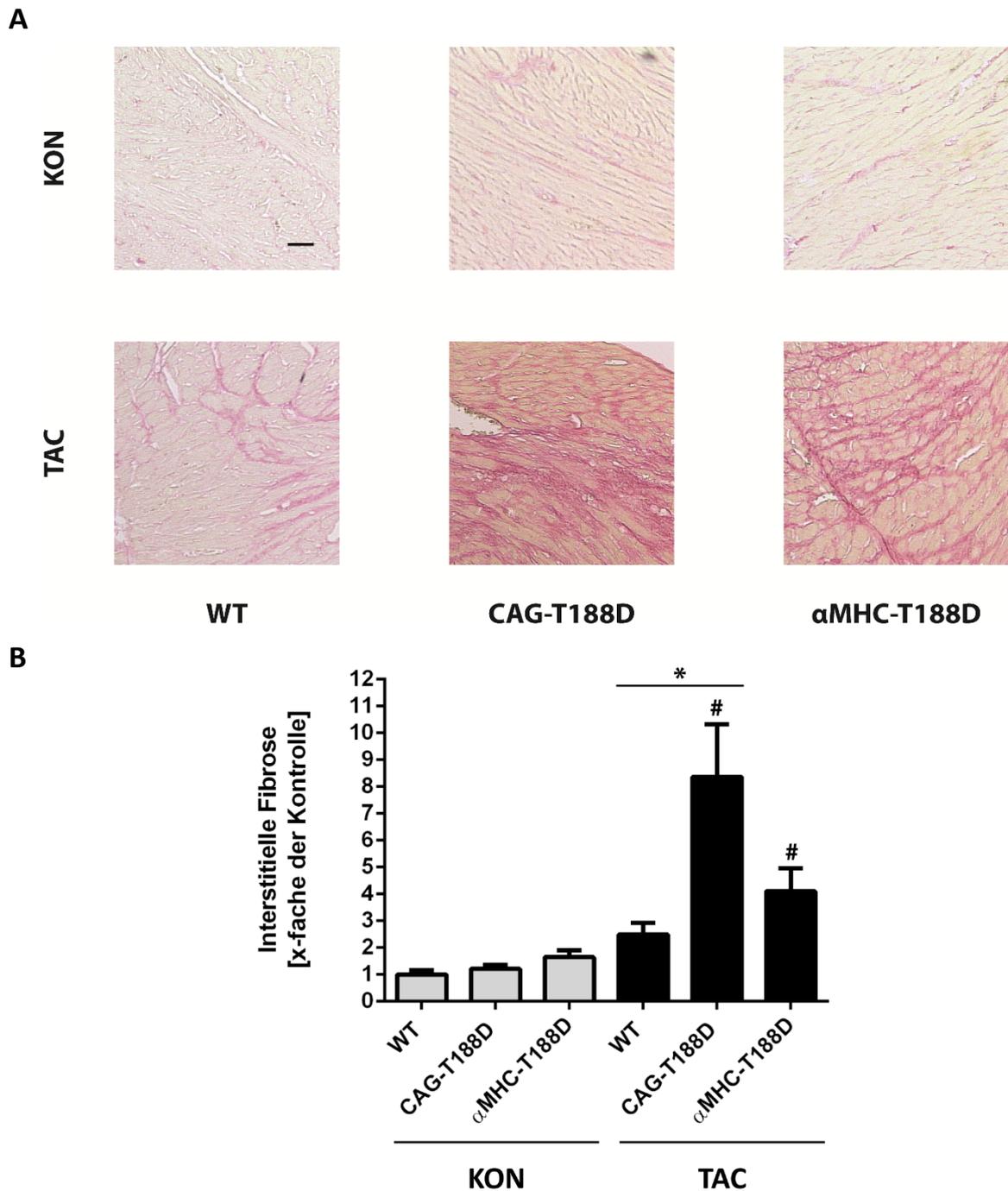


Abbildung 24: Analyse der interstitiellen Fibrose nach TAC.

Histologische Analyse des linksventrikulären Myokards von Wildtyp-Tieren (WT) oder transgenen Tieren mit der ubiquitären (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC). **[A]**: Repräsentative Bildausschnitte Picro-Sirius-Rot gefärbter histologischer Schnitte (Maßstab: 100 μ m). **[B]**: Quantifizierung der interstitiellen Fibrose. $n=7-11$ Tiere pro Gruppe, $*p<0.05$, $\#p<0.05$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Bei persistierender hypertropher Stimulation und Schädigung kann der Ventrikel dilatieren (Cohn *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2000). Die Dilatation des Ventrikels stellt eine weitere Veränderung im Rahmen des *Remodelings* dar und ist vermutlich der wichtigste Risikofaktor der Herzinsuffizienz, weil das Herz die Kraft zur adäquaten Aufrechterhaltung des Kreislaufes nicht mehr aufbringen kann (Diwan *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008; Vasan *et al.*, 1997).

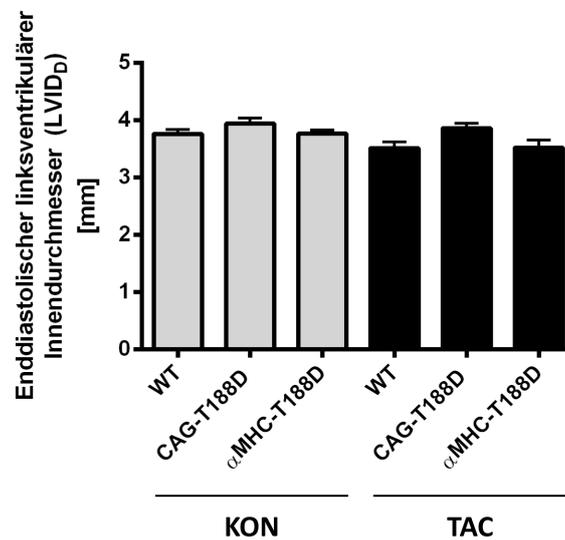


Abbildung 25: Echokardiographische Analyse des linksventrikulären Innendurchmessers.

Analyse des echokardiographisch ermittelten enddiastolischen linksventrikulären Innendurchmessers (LVID_D) in Wildtyp-Tieren (WT) und transgenen Mäusen mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger Konstriktion der Aorta (TAC). $n=6-10$ Tiere pro Gruppe. Die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Auch die Ventrikeldilatation ist echokardiographisch quantifizierbar: zum Zeitpunkt der maximalen Ausdehnung des Ventrikels (am Ende der Diastole) wird der linksventrikuläre Innendurchmesser (LVID_D) bestimmt (Gao *et al.*, 2011; Vasan *et al.*, 1997; Vinhas *et al.*, 2013). Abbildung 25 zeigt die Analyse dieses Parameters. Die zehntägige operative Konstriktion der Aorta führte in allen Gruppen zu keinem Anstieg des LVID_D und damit zu keiner Dilatation des linken Ventrikels.

5.5 Analyse der koronaren Blutgefäße nach TAC

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit (KHK), der pathophysiologisch in den meisten Fällen die Manifestation der Arteriosklerose in den Koronargefäßen mit einer temporären Sauerstoffminderversorgung (Ischämie) des Myokards zugrunde liegt (Burke *et al.*, 1996; Ghali *et al.*, 1992; Kasper *et al.*, 2015; Pierdomenico, 2007). Die kardiale Hypertrophie trägt auf zwei verschiedene Arten zur Ischämie bei: einerseits können die Koronargefäße durch massiv hypertrophiertes myokardiales Gewebe komprimiert werden (Kasper *et al.*, 2015). Auf der anderen Seite führt die hypertensive linksventrikuläre Hypertrophie zu Veränderungen an den myokardialen Koronargefäßen, die sich unter anderem in der Hypertrophie der Media und perivaskulärer Fibrose manifestiert (Drazner, 2011; Ritt & Schmieder, 2009; Schiffrin, 2010; Schwartzkopff *et al.*, 1993).

Die Quantifizierung der vaskulären Veränderungen kann über das Verhältnis der Querschnittsfläche von äußerer Gefäßwand zum Gefäßlumen erfolgen (Wand-zu-Lumen-Ratio, entspricht der Dicke der Media) (Harazny *et al.*, 2007; Intengan & Schiffrin, 2001; Schiffrin, 2004). Um den Einfluss der ERK2^{T188D}-Überexpression auf die koronaren Blutgefäße zu untersuchen, wurde die Querschnittsfläche des Gefäßlumens, der äußeren Blutgefäßwand sowie der perivaskulären Fibrose Picro-Sirius-Rot-gefärbter Schnitte bestimmt.

Abbildung 26[A] zeigt exemplarische Bildausschnitte, [B] die Analyse der Querschnittsfläche der Media. Die zehntägige operative Konstriktion der Aorta bewirkt eine relative Vergrößerung des Lumens zugunsten der Gefäßwand. Daher scheinen sich Veränderungen an der Gefäßwand noch nicht innerhalb des kurzen Zeitraums nach TAC zu manifestieren. Die ERK^{T188D}-Überexpression als zusätzlicher prohypertropher Faktor scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die vaskulären Veränderungen an den Koronargefäßen zu haben (zumindest nicht innerhalb von zehn postoperativen Tage nach TAC).

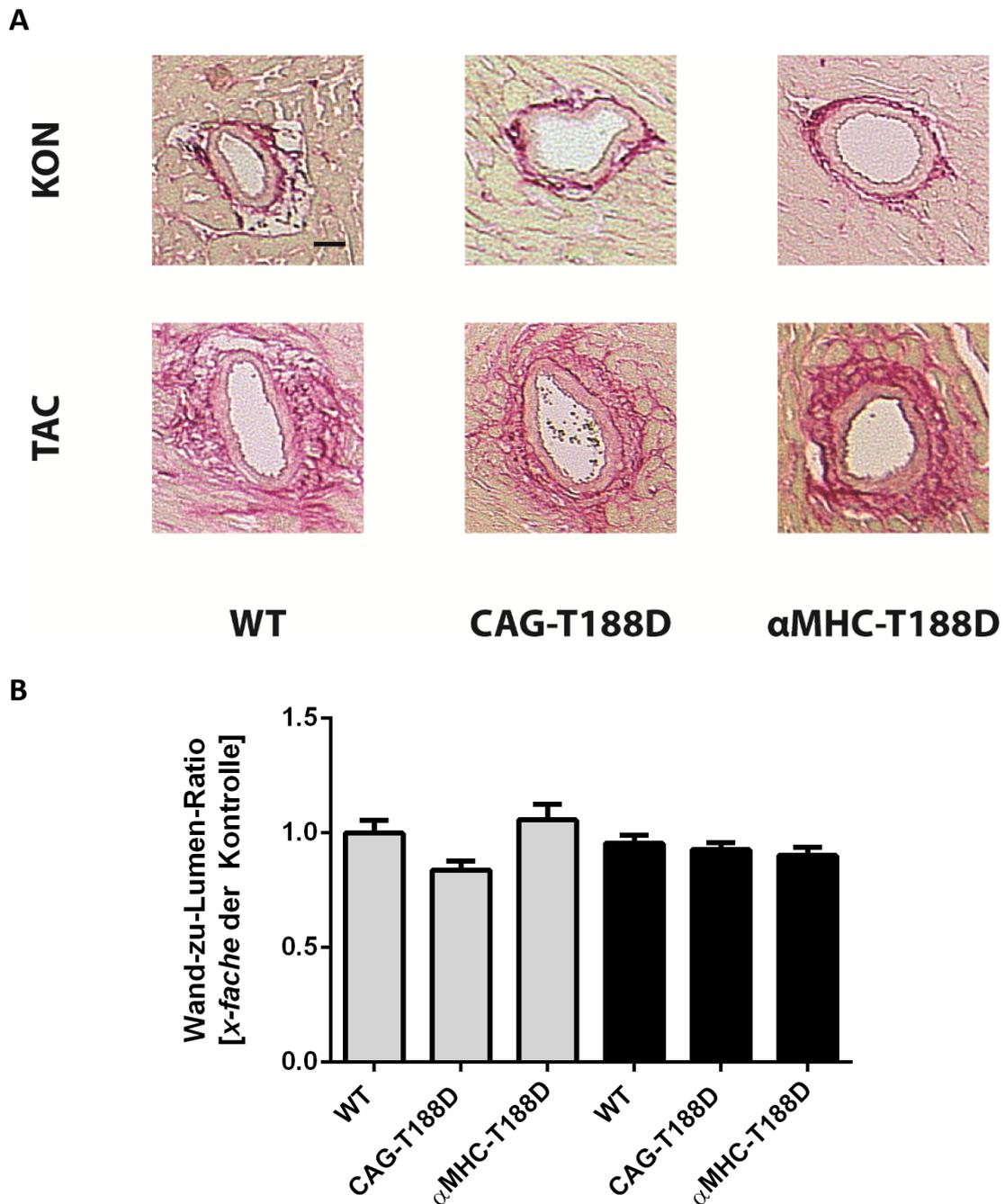


Abbildung 26: Analyse der Mediadicke koronarer Blutgefäße nach TAC.

Analyse der Ratios Gefäßwand zu Gefäßlumen nicht-transgener Wildtypmäuse (WT) und transgener Tiere mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger operativer Konstriktion der Aorta (TAC). **[A]:** Repräsentative Bildausschnitte im Myokard mit analysierten Koronargefäßen und deren perivaskulären Fibrose (Pikro-Sirius-Rot-Färbung, Maßstab: 100 μ m). **[B]:** Analyse der Mediadicke (Querschnittsfläche von äußerer Gefäßwand zum Lumen). $n=7-11$ Tiere pro Gruppe. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

Auffällig war in allen TAC-operierten Genotypen allerdings eine signifikant erhöhte perivaskuläre Fibrose. Diese Fibrose umgibt die äußere Wand der Blutgefäße; sie führt zu einer besonders in der koronaren Mikrovaskulatur betroffenen Dysfunktion und trägt erheblich zur Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff bei (Camici & Crea, 2007; Dai *et al.*, 2012). In Abbildung 26[A] sind repräsentative Koronargefäße und deren perivaskuläre Fibrose gezeigt. Nach TAC entwickelten die Mauslinien aller Genotypen einen signifikant höheren Anteil an perivaskulärer Fibrose als nicht-operierte Kontrolltiere (Abbildung 27).

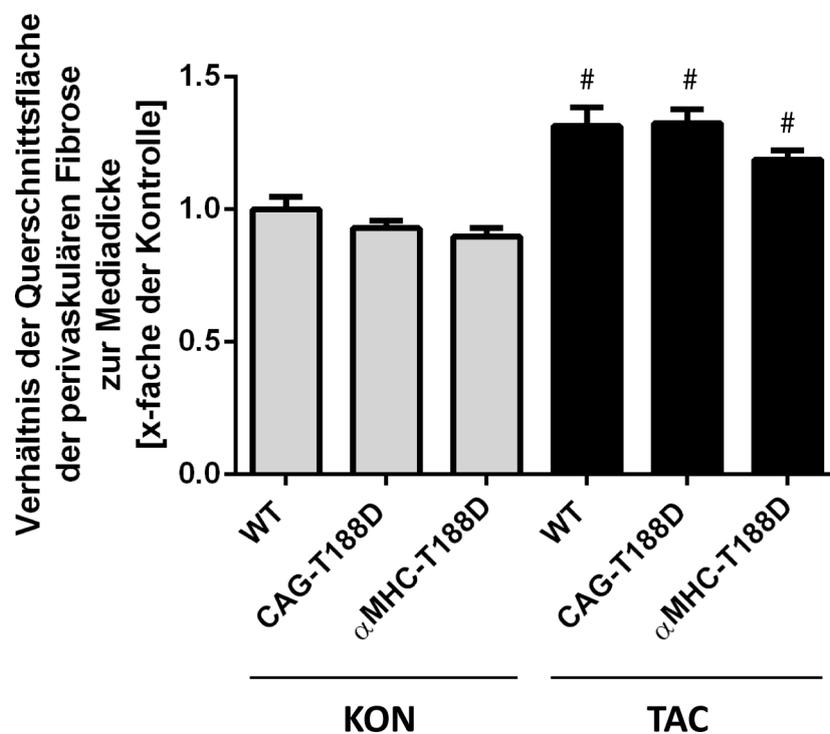


Abbildung 27: Analyse der perivaskulären Fibrose koronarer Blutgefäße nach TAC.

Analyse der Ratio perivaskuläre Fibrose (PVF) zur äußeren Gefäßwand nicht-transgener Wildtypmäuse (WT) und transgener Tiere mit ubiquitärer (CAG-T188D) oder Kardiomyozyten-spezifischer (α MHC-T188D) Überexpression des ERK2^{T188D}-Konstrukts vor (KON) oder nach zehntägiger operativer Konstriktion der Aorta (TAC). TAC führt zu einer signifikant höheren Ausprägung der perivaskuläre Fibrose in allen drei Genotypen als in nicht-operierten Kontrolltieren. Repräsentative histologische Bilder sind in Abbildung 26[A] gezeigt. $n=7-11$ Tiere pro Gruppe, # $p<0.001$ vs. nicht-operierte Kontrolltiere. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert \pm Standardfehler.

5.6 Analyse der *gain-of-function*-Mutation ERK2^{T188D} in kardialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen

Die ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetische Mutante (ERK2^{T188D}) führt in Kardiomyozyten, wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits beschrieben (Kapitel 1.2.5.3.10), zu einem *gain-of-function*-Phänotypen mit signifikanter Zunahme des Wachstums dieser Zellen (Lorenz *et al.*, 2009a). Das folgende Kapitel behandelt die Rolle von ERK2^{T188D} in kardialen Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen. Diese Versuche dienen vor allem als Ergänzung zu den Untersuchungen der Mauslinie mit ubiquitärer ERK2^{T188D}-Überexpression, um die Funktionen dieser Mutation in anderen kardialen Zelltypen im Zusammenhang der kardialen Hypertrophie beurteilen zu können.

5.6.1 ERK2^{T188D} in kardialen Fibroblasten

Kardiale Fibroblasten bilden die größte Entität kardialer Zellen (Adler *et al.*, 1981; Banerjee *et al.*, 2007; Camelliti *et al.*, 2005). Sie synthetisieren Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und nehmen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der myokardialen Gewebsstruktur und dem Auf- und Abbau des Bindegewebes ein (Camelliti *et al.*, 2005; MacKenna *et al.*, 2000). Eine Schädigung des Herzmuskels bewirkt jedoch die exzessive Ablagerung von ECM, was sich als Fibrose äußert (Eghbali *et al.*, 1990).

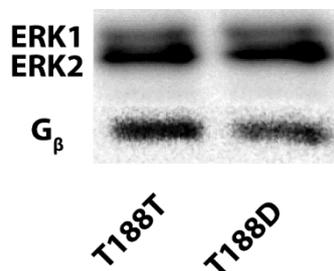


Abbildung 28: Expressionskontrolle der adenoviral transduzierten ERK2-Konstrukte.

Exemplarische Western-Blot-Analyse von Lysaten aus kardialen Fibroblasten, die mit ERK2-Wildtyp (T188T) und der an Position Thr188 phosphorylierungsmimetischen (T188D) Mutante adenoviral transduziert wurden. Die Expressionsmengen wurden mithilfe von Antikörpern gegen ERK1/2 detektiert. Als Ladekontrolle wurde G_β verwendet. *n*=4 Experimente.

Die Untersuchung der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung an kardialen Fibroblasten wurde gemeinsam mit Olga Wiens durchgeführt. Die Zellen wurden, wie unter Kapitel 4.4.4 beschrieben, präpariert, kultiviert und gemäß dem Versuchsprotokoll mit den ERK2-Konstrukten (T188T, T188D) adenoviral transduziert. Abbildung 28 zeigt die Expressionskontrolle der beiden Konstrukte. Beide Gruppen zeigen vergleichbare ERK2-Expressionslevel.

Zur Beurteilung der Proliferation wurde der Einbau des radioaktiv markierten [³H]-Thymidins in die DNA der Zellen gemessen. Die Versuche folgten dem Protokoll aus Kapitel 4.4.5.

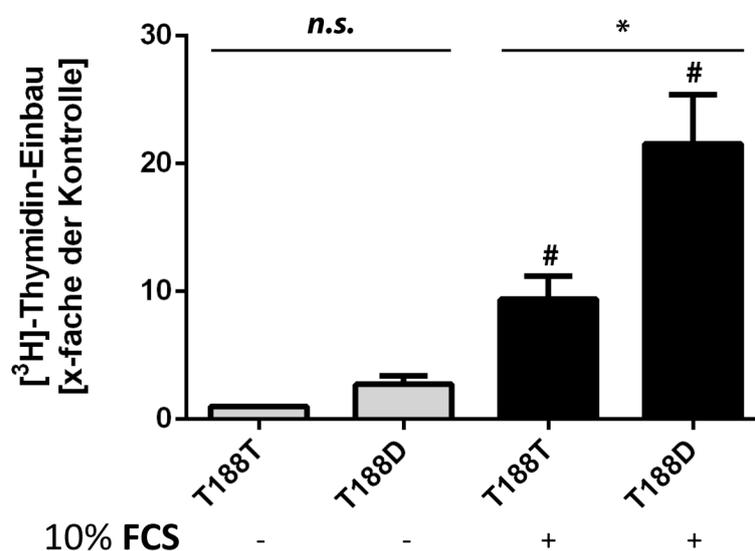


Abbildung 29: Proliferationsverhalten der ERK2^{T188D}-Mutante in kardialen Fibroblasten.

In dieser Abbildung ist die Analyse der von kardialen Fibroblasten aufgenommenen Menge an [³H]-Thymidin unter basalen oder stimulierten (10% fetal calf serum (FCS) für 4 Stunden) Bedingungen. Die Zellproliferation ist in der ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetischen Mutante (T188D) signifikant gesteigert. **p*<0.001, #*p*<0.05 vs. nicht-stimulierte Kontrollen; *n*=7 Experimente. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler. Die Untersuchungen erfolgten mithilfe von Olga Wiens.

Die Analysen zeigen, dass die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung dabei ebenso eine wichtige Funktion auf die Proliferation der kardialen Fibroblasten übernimmt, wie es Lorenz *et al.* auf das Wachstum von Kardiomyozyten beobachten konnten (Lorenz *et al.*, 2009a). Bereits unter nicht-stimulierten Bedingungen zeigten Zellen mit Überexpression von ERK2^{T188D} eine nicht signifikant erhöhte Inkorporation von [³H]-Thymidin (Abbildung 29).

Die vierstündige Stimulation mit FCS bewirkte in T188D-überexprimierenden Fibroblasten einen signifikant gesteigerten Einbau von [³H]-Thymidin im Vergleich zu Zellen mit Überexpression von Wildtyp-ERK2.

Die permanente Simulation der Phosphorylierung an ERK2^{Thr188} führt also auch in kardialen Fibroblasten zu einem proliferativen Phänotyp.

5.6.2 ERK2^{T188D} in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC)

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) bilden, wie in Kapitel 1.3.2 dargelegt, das kontraktile Gewebe von Blutgefäßen. Sie können in zwei unterschiedlichen Phänotypen vorliegen: einem niedrig-proliferativen Zustand, in dem die VSMC vor allem kontraktile Proteine exprimieren, oder einem Zustand der Migration und Proliferation, in der sie Bestandteile der extrazellulären Matrix synthetisieren, um die Gefäßmorphologie durch Änderung des Bindegewebes und der Zellzahl der Media auch langfristig anzupassen. Dieser Wechsel wird über viele humorale Faktoren, unter anderem Angiotensin II (Ang II) oder Endothelin-1, oder durch Signalwege geschädigter Endothelzellen vermittelt (Beamish *et al.*, 2010; Hughes, 1998; Owens *et al.*, 2004).

Kristina Lorenz untersuchte die Rolle der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in glatten Muskelzellen. Sie nutzte dafür die Überexpression von drei unterschiedlichen ERK2-Konstrukten (Wildtyp-ERK2: T188T, ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsdefizient: T188A und ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetisch: T188D) und untersuchte das Proliferationsverhalten der VSMC. Ihre Ergebnisse werden im Folgenden kurz dargestellt.

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung scheint eine große Rolle in der Proliferation von VSMC zu einzunehmen: Wird durch den Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin die Phosphorylierung verhindert (T188A), bauen die VSMC auch nach Stimulation mit Angiotensin II eine signifikant reduzierte Menge an [³H]-Thymidin (im Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen) ein (Abbildung 30). Die Überexpression des ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetischen Konstrukts (T188D) bedingt hingegen eine gesteigerte Inkorporation des Nukleotids nach Stimulation der Zellen. Somit ist die ERK2-Phosphorylierung an der Position Threonin-188 nicht nur in den Kardiomyozyten,

sondern auch in VSMC proliferationsfördernd. Deren Inhibition verhindert hingegen eine Ang II-induzierte Zellproliferation.

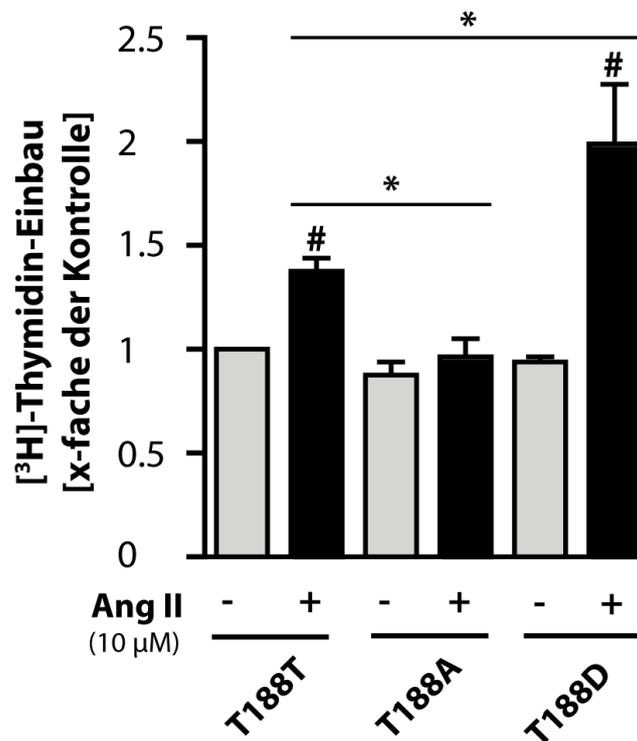


Abbildung 30: Proliferationsverhalten der ERK2^{T188D}-Mutante in vaskulären glatten Muskelzellen.

Diese Grafik zeigt die von den vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) aufgenommene Menge an [³H]-Thymidin unter basalen und für 24-36 Stunden mit Angiotensin II (Ang II, 10 μM) stimulierten Bedingungen. Die Proliferation der ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsdefizienten Mutante (T188A) ist nach Stimulation signifikant reduziert im Vergleich zum ERK2^{Thr188}-Wildtyp (T188T). Außerdem bedingt die ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetische Mutante (T188D) eine signifikant gesteigerte Proliferation nach Stimulation der VSMC. **p*<0.05, #*p*<0.05 vs. nicht-stimulierte Kontrollen. Das Signifikanzniveau wurde durch ANOVA ermittelt, die Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler. Die Untersuchungen erfolgten durch Kristina Lorenz.

5.6.3 Zusammenfassung der *in vitro*-Versuche

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung nimmt also *in vivo* und *in vitro* eine wichtige Rolle nach hypertropher Stimulation der kardialen Zellen ein. Wird diese Phosphorylierung permanent stimuliert, beispielsweise durch den Austausch von Threonin zu Asparaginsäure, zeigen Kardiomyozyten (Kapitel 1.2.5.3.10, Lorenz *et al.*, 2009), Fibroblasten (Kapitel 5.6.1) und VSMC (Kapitel 5.6.2) einen *gain-of-function*-Phänotypen

mit signifikant gesteigerter Proliferation. Umgekehrt bewirkt die Inhibition dieser Phosphorylierung auch die Hemmung der Proliferation in Kardiomyozyten (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013) und glatten Muskelzellen. Weitere Untersuchungen sollten sich mit der Hemmung der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in kardialen Fibroblasten und der Rolle dieser Phosphorylierung im vierten wichtigen kardialen Zelltypen, den Endothelzellen, anschließen.

6. Diskussion

6.1 Die Rolle von ERK1/2 im Herzen

Die MAPK-Signalkaskade ist an der Entstehung kardialer Hypertrophie maßgeblich beteiligt (Kapitel 1.2.5.3.8) (Barry *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2009b; Yue *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2003). Daneben übernimmt diese bei anderen kardialen Ereignissen gleichermaßen physiologische und pathologische Funktionen, die entweder protektiv oder schädlich für das Herz sind (Rose *et al.*, 2010).

Bereits in der Embryogenese trägt ERK1/2 zur Entwicklung des Herzens bei, vor allem über die Signaltransduktion des *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) (Bottcher & Niehrs, 2005). Während sich Stammzellen von FGFR^{-/-}-Knockout-Mäusen nicht in kontrahierende Kardiomyozyten differenzieren, konnten sich Zellen mit einer Kopie des Gens (FGFR^{+/-}) zu funktionellen Kardiomyozyten entwickeln. Werden letztere allerdings mit einem MEK1/2-Inhibitor behandelt, wurde die kardiogene Differenzierung der FGFR^{+/-} embryonalen Stammzellen verhindert (Dell'Era *et al.*, 2003). Auf diese Weise wurde die Beteiligung der Kinasen an der Kardiogenese nachgewiesen (Rose *et al.*, 2010). Außerdem scheinen Mutationen von Ras, B-Raf oder MEK1/2 für kongenitale Fehlbildungssyndrome wie das Costello-Syndrom verantwortlich zu sein (Aoki *et al.*, 2005; Duesbery & Vande Woude, 2006).

Allerdings übernimmt dieser Signalweg auch protektive Funktionen im Herzen: Die Überexpression von MEK1 *in vivo* schützt das Myokard vor Schädigungen durch Ischämie und reduziert das Ausmaß des myokardialen Schadens nach Reperfusion des Herzens (Bueno *et al.*, 2002; Lips *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2000b). Demgegenüber fördert die Hemmung der MAPK-Kaskade durch c-Raf- oder ERK2-Knockout-Mutationen Zellschädigungen und Apoptose (Lips *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2004). Außerdem wird die durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin vermittelte Kardiotoxizität reduziert, wenn Substrate appliziert werden, die die ERK1/2-Aktivität steigern (Su *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2009).

Diese gegensätzlichen Funktionen erschweren die Entwicklung von Substanzen zur Therapie von Herzerkrankungen, die ihre Wirkung über den MAPK-Signalweg vermitteln sollen. Es gibt scheinbar unterschiedliche Arten der ERK1/2-Aktivierung im Herzen, die

unter anderem vom Zeitpunkt und der Dauer der Signale, der intrazellulären Lokalisierung der Kinasen und der parallelen Aktivierung regulatorischer Signalwege abhängig ist (Beyar, 2010).

Die Hemmung der katalytischen Aktivität von ERK1/2 ist schädlich für das Herz (Purcell *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2004), ebenso fördert die Inhibition des Signalwegs den stressinduzierten Zelltod der Kardiomyozyten (Harris *et al.*, 2004; Lips *et al.*, 2004). Demnach stehen beide Optionen nicht als therapeutische Option zur Behandlung der kardialen Hypertrophie zu Verfügung. Allerdings bietet die Inhibition der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung die Möglichkeit, selektiv die pathologische Hypertrophie zu hemmen, ohne die anti-apoptotischen Funktionen von ERK1/2 zu blockieren (Ruppert *et al.*, 2013), und könnte daher der Schlüssel zur Behandlung der ERK1/2-vermittelten kardialen Hypertrophie darstellen.

6.2 Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung als hypertropher Signalweg

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung ist eine G_{βγ}-vermittelte Autophosphorylierung eines Threonin-Restes an Position T188, der die nukleäre Akkumulation von ERK1/2 fördert sowie kardiale Hypertrophie begünstigt. Die Interaktion von G_{βγ} mit c-Raf und ERK1/2 erfordert die Stimulierung eines GPCR mit einem hypertrophen Agonisten, der die gesamte Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade aktiviert (Lorenz *et al.*, 2009a).

In dieser Studie wurden ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsmimetische Mauslinien (T188D) als Ergänzung zu den Veröffentlichungen mit phosphorylierungsdefizienten Tieren aus der Arbeitsgruppe von Kristina Lorenz untersucht (Lorenz *et al.*, 2009a; Ruppert *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012). Lorenz *et al.* charakterisierten die Mauslinie αMHC-T188D als *gain-of-function*-Phänotypen mit ausgeprägter Hypertrophie, interstitieller Fibrose und reduzierter Herzfunktion (Lorenz *et al.*, 2009a). Um die Rolle von nicht-Kardiomyozyten im Zusammenhang der ERK2^{Thr188}-abhängigen kardialen Hypertrophie zu untersuchen, wurde neben der Mauslinie αMHC-T188D eine zweite erzeugt, in denen T188D ubiquitär (CAG-T188D) überexprimiert ist. Besonders in kardialen Fibroblasten scheint die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung einen Einfluss auf das Herz auszuüben, weil a) CAG-T188D-Tiere nach TAC eine deutlich reduzierte Herzfunktion (Abbildung 21) mit schon beginnenden Zeichen der Herzinsuffizienz (Abbildung 23) bei vergleichbarer Ausprägung

der Hypertrophie von Kardiomyozyten (Abbildung 18) zeigten; b) die interstitielle Fibrosierung nach TAC signifikant stärker ausgeprägt war als in Wildtyp- oder α MHC-T188D-Tieren (Abbildung 24). Diese Hypothese wird durch die signifikant gesteigerte Proliferation von kardialen Fibroblasten nach Stimulation der Zellen (Abbildung 29) unterstützt.

Interessanterweise wiesen die echokardiographischen Untersuchungen in Mäusen mit Überexpression von α MHC-T188D nach TAC stärker hypertrophierte linksventrikuläre Wände auf als CAG-T188D-Tiere (Abbildung 20). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass das Ausmaß der Hypertrophie nicht entscheidend für den Schweregrad der Herzinsuffizienz ist.

Andere häufige Ursachen für eine Herzinsuffizienz stellen Herzrhythmusstörungen dar (Segovia Cubero *et al.*, 2004), denen typischerweise eine Entkopplung der Kardiomyozyten, beispielsweise durch die interstitielle Fibrosierung im Rahmen des *Remodelings*, zugrunde liegen (Pellman *et al.*, 2016). Fibroblasten sind zudem an der elektrischen Signalweiterleitung beteiligt (McArthur *et al.*, 2015). Daher könnte die Simulation der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in kardialen Fibroblasten einen zusätzlichen negativen Einfluss auf die Herzfunktion über die Entstehung von Arrhythmien oder eine diastolische Dysfunktion darstellen.

Welche Bedeutung die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) hat, bleibt nach diesen Untersuchungen weiterhin unklar: die Überexpression von T188D führte zwar zu einer erhöhten Proteinsynthese und Proliferation (Abbildung 30), es ließen sich jedoch keine Unterschiede an den Wanddicken der Blutgefäße zwischen den verschiedenen Mauslinien feststellen (Abbildung 26). Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung scheint im Hinblick auf die Koronargefäße im Hypertrophie-Mausmodell demnach nicht relevant zu sein.

Da eine Proliferation der VSMC nach einer Gefäßwandschädigung an der Ausbildung der Atherosklerose beteiligt ist (Bennett *et al.*, 2016; Isenovic *et al.*, 2010), könnte die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung in diesem Zelltyp eine entscheidende Rolle einnehmen.

6.3 Funktionen von ERK1/2 in Zellwachstum und -proliferation

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) kontrollieren neben der kardialen Hypertrophie außerdem die Proliferation, den Zellzyklus und die Apoptose (Cargnello *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 1997).

Der Zellzyklus stellt die periodische Abfolge von Ereignissen in einer eukaryotischen Zelle dar, die zur Teilung und Duplikation ihrer DNA führt und schließlich in der Entstehung von zwei Tochterzellen resultiert (Alberts, 2015). Generell besteht dieser Zyklus aus zwei Wachstumsphasen (G_1 und G_2), der Synthesephase (S), in der die DNA repliziert wird, sowie der Mitosephase (M), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet (Alberts, 2015). Die Progression innerhalb der G_1 -Phase und auch der Wechsel in die sich anschließende S-Phase ist dabei von der Aktivierung von ERK1/2 im Nukleus abhängig (Roovers & Assoian, 2000; Yamamoto *et al.*, 2006). Die Kinasen regulieren die Synthese von Proteinen und Ribosomen (Stefanovsky *et al.*, 2006) und die Induktion der Bildung des für den Eintritt in den Zellzyklus essentiellen Cyclin-Komplexes (Weber *et al.*, 1997).

Eine Fehlregulation der MAPK-Signalwege ist mit einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten assoziiert, darunter neben kardiovaskulären Erkrankungen (Lorenz *et al.*, 2009b; Muslin, 2008) auch Morbus Alzheimer (Giovannini *et al.*, 2008), polyzystische Nierenerkrankungen (Omori *et al.*, 2006), Lungenerkrankungen (Mercer *et al.*, 2004; Pelaia *et al.*, 2005) und viele Tumoren (Roberts & Der, 2007). Üblicherweise verhindert eine normale Funktion der MAPK unkontrolliertes Zellwachstum, weil gealterte Proteine, die für die Progression des Zellzyklus, Zellmigration und -überleben erforderlich sind, ERK1/2-abhängig durch das Proteasom degradiert werden (Deschenes-Simard *et al.*, 2013). Aufgrund der beschriebenen Funktionen im Zellzyklus kann die Fehlregulation oder Mutation nur eines Bausteins der MAPK-Kaskade zum unkontrollierten Wachstum der betroffenen Zellen führen (Montagut & Settleman, 2009). 15% aller Tumoren des Menschen zeigen beispielsweise konstitutiv aktiviertes Ras, vor allem bei Karzinomen des Pankreas (90%), des Colons (50%) oder der Schilddrüse (50%) (Mebratu & Tesfaigzi, 2009; Montagut *et al.*, 2009). Mutationen in den Raf-Genen (hauptsächlich B-Raf und c-Raf) führen ebenfalls zu unkontrolliertem Zellwachstum und können unter anderem das maligne Melanom oder die akute

myeloische Leukämie verursachen (Halilovic & Solit, 2008; Zebisch *et al.*, 2006). Zusätzlich führen auch die (irrtümliche) Überexpression oder eine Mutation der vorangeschalteten RTKs (zum Beispiel EGFR) zu einer Hyperaktivierung von Ras und der nachfolgenden MAPK-Signalwege, wie es beispielsweise bei Lungen- oder Mamma-Karzinomen auftritt (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004).

6.4 Inhibitoren der MAPK-Signalkaskade in antitumoraler und antihypertropher Therapie

Die oben beschriebene Fehlregulation der MAPK-Signalkaskade in der Genese vieler Tumore bietet die Möglichkeit einer gezielten antitumoralen Therapie (McCain, 2013; Roberts *et al.*, 2007): Derzeit sind Pharmaka, die gegen den EGFR (Cetuximab: Colonkarzinom, Erlotinib: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom), Raf (Vemurafenib, Dabrafenib: Melanom) und MEK1/2 (Trametinib: Melanom) gerichtet sind, ein fester Bestandteil in vielen Behandlungsprotokollen (Samatar & Poulidakos, 2014; Santarpia *et al.*, 2012). Inhibitoren gegen ERK1/2 werden aktuell noch in klinischen Studien getestet (Morris *et al.*, 2013; Samatar *et al.*, 2014).

Ob die pharmakologische Hemmung der MAPK-Kaskade in der Onkologie einen langfristigen Benefit bringt, ist fraglich, weil häufig das spätere Auftreten von Zweitmalignomen beobachtet wurde (Burotto *et al.*, 2014). Beispielsweise können Raf-Inhibitoren durch die paradoxe Aktivierung der MAPK-Signalkaskade in tumorfreien Keratinozyten unnatürliche Hautproliferationen verursachen, die in fast 20% der Patienten zu Plattenzellkarzinomen entarteten (Hauschild *et al.*, 2012; Sosman *et al.*, 2012). Durch eine Kombination von Dabrafenib mit dem MEK1/2-Inhibitor Trametinib konnte die Häufigkeit der Hautveränderungen (und damit auch der Zweitmalignome) reduziert werden (Flaherty *et al.*, 2012). In der Entwicklung von MAPK-Kaskade-Inhibitoren in kardialen Fragestellungen sollten daher neben dem Wegfall der anti-apoptotischen Funktion auch unnatürliche Proliferationen der Zellen berücksichtigt und beobachtet werden.

Während Inhibitoren der MAPK-Signalkaskade in der Behandlung einiger Karzinome

bereits bei Patienten eingesetzt werden, sind zurzeit noch keine Medikamente zur Therapie der kardialen Hypertrophie zugelassen (Li *et al.*, 2016; Mutlak *et al.*, 2015). Li *et al.* konnten jedoch zeigen, dass der MEK1/2-Inhibitor Selumetinib, der derzeit in klinischen Studien zur Behandlung solider Tumoren getestet wird, die ERK1/2-Aktivität selektiv im Herzen hemmt und auf diese Weise vor kardialer Hypertrophie schützt. Da das Medikament gemäß den Aussagen der Autoren nur eine relativ milde Hemmung der MAPK ausübt, erhöht die Behandlung mit Selumetinib die Apoptoserate in den Herzen des Mausmodells nicht (Li *et al.*, 2016). Daher könnte dieses Pharmakon nach Validation der Funktion in klinischen Studien zukünftig zur pharmakologischen Behandlung der kardialen Hypertrophie eingesetzt werden. Interessant wäre eine Untersuchung dieses Chemotherapeutikums im Zusammenhang der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung.

6.5 Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung als pharmakologisches Target in der Behandlung der kardialen Hypertrophie

Die permanente Simulation der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung bewirkt *in vivo* einen *gain-of-function*-Phänotypen mit einer signifikant gesteigerten kardialen Hypertrophie, kardialen *Remodeling* und reduzierter kardialen Funktion (Lorenz *et al.*, 2009a). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen zusätzlich, dass sich diese Veränderungen bereits innerhalb eines kurzen Zeitraums manifestieren. Da die Mauslinie mit konstitutiv simulierter ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung nach Nachlasterhöhung einen ausgeprägten hypertrophen Phänotyp entwickelt, ist eine Interferenz notwendig und könnte in der Behandlung der kardialen Hypertrophie ein vielversprechendes Target darstellen.

Untersuchungen mit ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsdefizienten Mauslinien erbrachten den Nachweis, dass die pathologische kardiale Hypertrophie selektiv ohne Einfluss auf das physiologische Wachstum oder den anti-apoptischen Eigenschaften der MAPK inhibiert werden kann (Ruppert *et al.*, 2013). Zwar wäre die Gentherapie einer ERK2^{Thr188}-phosphorylierungsdefizienten Mutante, mit der die DNA des Patienten durch (non)-virale Vektoren transfiziert wird, eine Therapieoption (Ermak, 2016). Allerdings scheint die Entwicklung von Molekülen zur spezifischen Hemmung der ERK2^{Thr188}-

Phosphorylierung jedoch attraktiver zu sein. Da die Vermittlung des Zellüberlebens ebenfalls über die enzymatische Aktivität der Kinasen erfolgt (Ruppert *et al.*, 2013) und deren Inhibition das Herz zusätzlich schädigt (Purcell *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2010), müssen andere Strategien, die insbesondere in den Aktivierungsmechanismus der Autophosphorylierung eingreifen, zu deren Inhibition entwickelt werden. Für die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung sind mehrere zelluläre Ereignisse erforderlich: a) Aktivierung der gesamten MAPK-Kaskade durch eine hypertrophe Stimulation mit der Phosphorylierung von ERK1/2 im TEY-Motiv; b) Dimerisierung aktivierter ERK1/2-Monomere; c) Bindung von freigesetzten G_{βγ}-Untereinheiten (Lorenz *et al.*, 2009b; Vidal *et al.*, 2012).

Die Inhibierung der ERK1/2-Dimerisierung oder der Interaktion mit G_{βγ} könnten also Möglichkeiten darstellen, die ERK1/2-vermittelte kardiale Hypertrophie zu hemmen, ohne die anti-apoptischen Eigenschaften der Kinase zu beeinflussen.

6.5.1 Inhibition der ERK1/2-Dimerisierung

Die ERK1/2-Dimerisierung tritt nach Aktivierung der Kinase auf und ist notwendig für zytoplasmatische (jedoch nicht nukleäre) Signalweiterleitung (Casar *et al.*, 2008). Herrero *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibition der Dimerisierung die zelluläre Transformation und Tumorprogression verhindert (Herrero & Crespo, 2016; Herrero *et al.*, 2015). Sie identifizieren das Molekül DEL-22379 als einen für ERK1/2 spezifischen Inhibitor, der *in vitro und in vivo* die Dimerisierung (und demnach die zytoplasmatische Signalweiterleitung) verhindert, ohne die Phosphorylierung oder die Kinase-Aktivität zu beeinflussen. Bislang sind jedoch noch keine Untersuchungen mit diesem Molekül an Kardiomyozyten erfolgt, sodass über deren Rolle im Aktivierungsmechanismus der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung nur spekuliert werden kann.

Gentechnisch wurde schon 1998 eine dimerisierungsdefiziente ERK2-Mutante (ERK2^{Δ174-177}) entwickelt und erfolgreich getestet (Khokhlatchev *et al.*, 1998; Lidke *et al.*, 2010). Lorenz *et al.* nutzten diese Mutante in murinen Herzen und wiesen die Dimerisierung als Voraussetzung der Aktivierung der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung nach (Lorenz *et al.*, 2009a).

6.5.2 Inhibition der ERK1/2-Interaktion mit G_{βγ}

Die G_{βγ}-Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen dissoziiert nach der Aktivierung des GPCR von G_α (Kapitel 1.2.4.2.3). Eine der wichtigsten Aufgaben der Untereinheit stellt die Desensibilisierung von GPCR dar: G_{βγ} bildet einen Komplex mit der GRK2, das den aktivierten GPCR phosphoryliert, wodurch die Bindung von β-Arrestin ermöglicht und der Rezeptor internalisiert wird (Kapitel 1.2.4.2.6) (Lohse *et al.*, 1990; Lohse *et al.*, 2014a; Lorenz *et al.*, 2003; Smrcka, 2008). Eine wichtige Hypothese in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist eine chronische Desensibilisierung β-adrenerger Rezeptoren aufgrund einer permanenten Katecholamin-vermittelten Stimulation (Schmid *et al.*, 2015; Smrcka, 2008). Wird die Interaktion der GRK2 mit G_{βγ} inhibiert, verbessert sich aufgrund der gehemmten Desensibilisierung β-adrenerger GPCR die kardiale Funktion (Fu *et al.*, 2013; Raake *et al.*, 2008). Dabei ist phosphoryliertes RKIP ein endogener Inhibitor der GRK2 (Lorenz *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2015). Die Blockade der G_{βγ}-Interaktion, die ebenfalls zur Hemmung der GRK2 führt, kann demnach die Herzfunktion verbessern (Iaccarino & Koch, 2003).

Neben der GRK2 reguliert die G_{βγ}-Untereinheit weitere Zielproteine, unter anderem PI3K, PLCβ, c-Raf oder ERK1/2 (Kapitel 1.2.5.3.9), indem sie ihre Zielmoleküle an einer spezifischen Interaktionsfläche bindet (Bonacci *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001). Bonacci *et al.* entdeckten das Molekül M119 (und das Analogon Gallein), das als selektiver Inhibitor dieser Fläche die Interaktion von G_{βγ} mit GRK2 verhindert (Bonacci *et al.*, 2006; Lin & Smrcka, 2011). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Progression der Herzinsuffizienz *in vitro* und *in vivo* durch M119 bzw. Gallein verhindert werden konnte (Casey *et al.*, 2010; Kamal *et al.*, 2014; Kamal *et al.*, 2011).

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung benötigt, wie GRK2 auch, die Interaktion von G_{βγ} mit aktiviertem ERK2 (Lorenz *et al.*, 2009a). Bislang ist allerdings noch unklar, ob die Hemmung der G_{βγ}-Interaktionsfläche die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung verhindern kann und somit einen möglichen molekularen Angriffspunkt in der Therapie der kardialen Hypertrophie darstellt.

Die Formation des G_{βγ}/ERK2-Komplexes kann außerdem durch die Bindung von β-Arrestin2 an ERK1/2 verhindert werden (Ruppert *et al.*, 2013). Die Kinase wird durch die

Interaktion im Zytosol gehalten, nukleäre Zielproteine können also nicht mehr durch ERK1/2 phosphoryliert werden (Cervantes *et al.*, 2010). β -Arrestin2 ist ein wichtiger kardioprotektiver Mediator, der neben der Herunterregulierung β -adrenerger Rezeptoren auch als endogener Inhibitor der ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung fungiert.

6.6 Das Zusammenspiel von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Mäuse der Linie CAG-T188D entwickelten nach TAC einen etwas stärkeren hypertrophen Phänotyp als Tiere der Linie α MHC-T188D. Die ubiquitäre Expression des ERK2^{T188D}-Konstrukts bewirkte eine stärker ausgeprägte kardiale Hypertrophie mit schon beginnenden Zeichen einer insuffizienten Herzfunktion und des kardialen *Remodelings*. Da das Herz neben Kardiomyozyten vor allem aus kardialen Bindegewebszellen besteht, die addiert circa 80% aller kardialen Zellen ausmachen, ist die Hypothese naheliegend, dass vor allem das Zusammenspiel und Interaktion dieser beiden Zellarten für die Exazerbation der ERK2^{Thr188}-abhängigen kardialen Hypertrophie in CAG-T188D-Tieren verantwortlich ist. Anhand von kardiomyozytenspezifischen Gendelektionen, die nicht nur die Funktionalität der Kardiomyozyten, sondern auch die der Fibroblasten einschränkte, konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion beider Zellarten auftritt und für die regelrechte Funktion relevant ist (Manabe *et al.*, 2002).

Im Allgemein geht die pathologische kardiale Hypertrophie mit strukturellen Umbauprozessen des myokardialen Gewebes einher, die die interstitielle Fibrosierung und Akkumulation von ECM beinhalten (Kapitel 1.1.1.4) (Burchfield *et al.*, 2013). Folgen sind eine diastolische (aufgrund der Zunahme der Steifigkeit) und systolische (aufgrund der Behinderung der elektromechanischen Kopplung der Kardiomyozyten durch ECM-Ablagerungen) Dysfunktion (Chaturvedi *et al.*, 2010; Spach *et al.*, 1997). Auf zellulärer Ebene kommt es als Antwort auf hypertrophe Stimulation zur Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie zur Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten (Kapitel 1.3.1) (Burchfield *et al.*, 2013; Rohini *et al.*, 2010). Die Differenzierung in Myofibroblasten bewirkt eine gesteigerte Interaktion mit anderen Zellarten, hauptsächlich Kardiomyozyten (Fujiu & Nagai, 2014; Kamo *et al.*, 2015; Takeda & Manabe, 2011). Es besteht ein ausgeprägtes reziprokes Kommunikationssystem über verschiedene parakrine Faktoren, aber auch direkt über Zell-Zell-Kontakte (*gap*

junctions) und durch die ECM (Baudino *et al.*, 2006; Manabe *et al.*, 2002; Pellman *et al.*, 2016). Wichtige parakrine Mediatoren sind Angiotensin II, der *transforming growth factor* β (TGF- β) und andere Wachstumsfaktoren (PDGF, IGF-1, FGF-2), Serotonin, Entzündungsmediatoren und natriuretische Peptide (Cartledge *et al.*, 2015; Fujiu *et al.*, 2014; Manabe *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang der kardialen Hypertrophie ist vor allem TGF- β relevant, der die Antwort des Herzens auf eine Nachlastserhöhung oder unterschiedliche Gewebeschädigungen (Infarkt, Fibrose) reguliert (Bujak & Frangogiannis, 2007; Dobaczewski *et al.*, 2011; Leask & Abraham, 2004). Der Wachstumsfaktor wird von Fibroblasten und Kardiomyozyten nach Stimulation durch Ang II sezerniert (Campbell & Katwa, 1997; Kakkar & Lee, 2010; van Wamel *et al.*, 2002), induziert die Differenzierung in Myofibroblasten und steigert die Synthese von ECM (Desmouliere *et al.*, 1993; Mauviel, 2005). TGF- β bewirkt außerdem das Wachstum der Kardiomyozyten, ist dabei jedoch von der Anwesenheit von Fibroblasten abhängig: in Kardiomyozyten-Monokulturen konnte keine Ang II-vermittelte kardiale Hypertrophie festgestellt werden (Gray *et al.*, 1998; Schultz Jel *et al.*, 2002).

Interessanterweise stimuliert Ang II die parakrine Sekretion von Mediatoren und Wachstumsfaktoren, darunter Endothelin-1 und TGF- β , auch in Kardiomyozyten (Porter & Turner, 2009; Takeda *et al.*, 2011). Daher scheint das reziproke Zusammenspiel von Kardiomyozyten und Myofibroblasten über parakrine Mediatoren verantwortlich für die hypertrophe Antwort des Herzens auf die Stimulation durch Ang II zu sein (Takeda *et al.*, 2011). Die pharmakologische Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch einen Inhibitor des *angiotensin converting enzyme* (ACE) oder des *Angiotensin II-Rezeptors 1* (AT₁) führt in klinischen Studien zu einer Reduktion des kardialen *Remodelings*. Daher stellt die medikamentöse Inhibition des ACE oder des AT₁-Rezeptors einen wichtigen mortalitätssenkenden Therapiebaustein bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder nach einem Myokardinfarkt dar (Azevedo *et al.*, 2016; Cohn *et al.*, 2000).

Kardiomyozyten und Fibroblasten stehen zudem über *gap junctions* in direktem Kontakt (Kakkar *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass auch Fibroblasten die rhythmischen

Depolarisationen benachbarter Kardiomyozyten übernehmen (Feld *et al.*, 2002; Goshima, 1970), die Depolarisationen der Myozyten über Zellinteraktionen sogar induzieren und auf diese Weise in die Automatismen der Erregungsbildung eingreifen können (Gaudesius *et al.*, 2003; Miragoli *et al.*, 2007; Pedrotty *et al.*, 2009). Außerdem können sie die Leitfähigkeit bestimmter Ionen nach mechanischem Stress verändern (Kamkin *et al.*, 2003; Pedrotty *et al.*, 2009).

6.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zur Charakterisierung der CAG-T188D-Mauslinie nach hypertropher Stimulation durch TAC durchgeführt. TAC induzierte die Hypertrophie der Kardiomyozyten, die Fibrosierung des Myokards und eine Abnahme der kardialen Funktion.

Das kardiale *Remodeling* sollte in Zukunft weiter untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die Reexpression fetaler Gene und den Anstieg der Herzinsuffizienzmarker ANF und BNP.

Die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung bewirkt die nukleäre Akkumulation der Kinasen und nachgeschalteter Signaltransduktion und Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten (Lorenz *et al.*, 2009a). Daher wäre interessant, ob ERK1/2 in CAG-T188D-Tieren nach TAC auch in Fibroblasten und VSMC in den Nukleus transloziert und dort seine Zielproteine aktiviert – analog zu den Untersuchungen von Lorenz *et al.* Folglich sollten zytoplasmatische Targets bei diesen Tieren deutlich weniger phosphoryliert werden.

Zuletzt wäre auch eine Analyse der ubiquitären ERK2^{T188D}-Überexpression in kardialen Endothelzellen interessant.

7. Zusammenfassung

Kardiale Hypertrophie ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, die derzeit die häufigste Todesursache weltweit darstellt. Auf molekularer Ebene sind diverse Signaltransduktionskaskaden an der Genese beteiligt, wobei die MAPK-Kaskade eine zentrale Rolle einnimmt. Eine Inhibition von ERK1/2 wird als pharmakologisches Target zur Vorbeugung der kardialen Hypertrophie diskutiert. Allerdings führt diese unter anderem zur Apoptose der Kardiomyozyten und steht demnach nicht als Zielstruktur zu Verfügung.

Die ERK2^{Thr188}-Autophosphorylierung stellt einen regulatorischen Signalweg dar, der infolge einer hypertrophen Stimulation die kardiale Hypertrophie begünstigt. Eine Hemmung dieser Phosphorylierung in Kardiomyozyten verhindert die Ausbildung der kardialen Hypertrophie ohne Beeinflussung der kardioprotektiven Funktionen von ERK1/2. Demgegenüber führt die dauerhafte Simulation zu einem *gain-of-function*-Phänotypen mit ausgeprägter Hypertrophie, Fibrose und einer reduzierten Herzfunktion. In dieser Arbeit wurde die dauerhafte Simulation ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung (T188D) in einem Mausmodell mit ubiquitärer Expression dieser Mutation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich nach Stimulation durch TAC in diesen Tieren ein etwas stärkerer hypertropher Phänotyp mit vergrößerten Kardiomyozyten, gesteigerter interstitieller Fibrosierung und reduzierter Herzfunktion ausbildet als in Mäusen mit kardiomyozyten-spezifischer Überexpression dieser Mutante. In Fibroblasten- und VSMC-Zelllinien wurde eine gesteigerte Proliferation der T188D-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollen festgestellt. Somit scheint die ERK2^{Thr188}-Phosphorylierung auch in kardialen Nicht-Myozyten einen maladaptiven Einfluss auf das Herz auszuüben.

8. Anhang

8.1 Gewichte und Längen der analysierten Tiere

	KON			TAC		
	WT	CAG-T188D	α MHC-T188D	WT	CAG-T188D	α MHC-T188D
VG/TL [g mm^{-1}]	5.92 \pm 0.06	5.99 \pm 0.11	5.95 \pm 0.06	6.85 \pm 0.06	8.10 \pm 0.06	7.64 \pm 0.07
VG/KG [mg g^{-1}]	4.40 \pm 0.06	4.29 \pm 0.07	4.29 \pm 0.03	5.25 \pm 0.05	6.21 \pm 0.06	5.89 \pm 0.06
LG/KG [mg g^{-1}]	5.86 \pm 0.08	5.89 \pm 0.02	5.63 \pm 0.05	6.75 \pm 0.08	8.98 \pm 0.06	7.36 \pm 0.01

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. VG: linksventrikuläres Gewicht; LG: Lungengewicht; TL: Tibialänge; VG: Gewicht des linken Ventrikels. $n=7-11$ Tiere.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout (homozygot)
+/-	Knockout (heterozygot)
α MHC	<i>α-Myosin Heavy Chain</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriophosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BrdU	<i>Bromodesoxyuridin</i>
bzw	beziehungsweise
CAG	<i>CMV Early Enhancer/Chicken β Actin</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosinmonophosphat</i>
CBFHH	<i>calcium- and bicarbonate free hanks with HEPES</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemoluminescence
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FS	<i>fractional shortening</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IVS	<i>interventricular septum</i>
KG	Körpergewicht
LG	Lungengewicht
LVPW _D	<i>end-diastolic left ventricular posterior wall thickness</i>
LVID _D	<i>end-diastolic left ventricular internal diameter</i>
m/v	Masse pro Volumen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MEM	<i>minimal essential medium</i>
n	Anzahl der Versuche bzw. Versuchstiere pro Gruppe
p	Signifikanzwert; Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PI	Proteaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVF	perivaskuläre Fibrose
PWD	<i>pulse-waved Doppler</i>
RKIP	<i>Raf kinase inhibitor protein</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAC	<i>transverse aortic constriction</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tg	transgene Maus
TL	Tibia-Länge
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

v/v	Volumen pro Volumen
VG	linksventrikuläres Gewicht
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WT	nicht-transgene Wildtyp-Maus

8.3 Puffer- und Stocklösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer- und Stocklösungen sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt.

8.3.1 Histologische Färbelösungen

Eosin-Färbelösung:

Eosin G	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Hämatoxylin-Färbelösung:

Hämatoxylin	1 g
KAl(SO ₄) ₂	50 g
NaIO ₃	200 mg
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Pikro-Siriusrot-Färbelösung:

Direct Red 80 (1% (m/v) in H ₂ O)	10% (v/v)
gesättigte Pikrinsäurelösung (in H ₂ O)	90% (v/v)

8.3.2 Molekularbiologische Puffer

Agarose-Gel:

Agarose	1-2 % (m/v)
1x TAE-Puffer	ad 100ml

DNA-Ladepuffer (5x):

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

First-Strand Buffer (5x):

TRIS (pH 8,3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM

Mastermix cDNA-Synthese:

5x First-Strand Buffer	4 µl
Dithiothreitol	100 mM
DEPC-H ₂ O	0,9 µl
RNasin® Ribonuclease-Inhibitor	0,1 µl
SuperScript™ II RT	1 µl (200 U/µl)

PCR-Mix Genotypisierung:

<u>Mauslinie</u>	<u>CAG-T188D</u>	<u>αMHC-T188D</u>
taq-DNA-Polymerase	0,30 µl	0,35 µl
dNTPs (1,25 mM)	2µl	2 µl
Primer (10 µM)	je 1,25 µl	RF, EB: je 1,25 µl VF, VB: je 0,75 µl
Polymerase-Puffer (10x)	2,50 µl	2,50 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl	0,75 µl
H ₂ O	ad 23 µl	ad 23 µl

RNA-Isolations-Mix:

RNA-Vorlage	1 µg
DEPC-H ₂ O	ad 9 µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	0,5 µM
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	1 µl (10 mM)

TAE-Puffer (50x):

EDTA	50 mM
Essigsäure	6% (m/v)
TRIS-HCl	2 M

8.3.3 Zellbiologische Medien und Puffer

CBFHH (Calcium- and bicarbonate free Hanks with HEPES) –Puffer:

Dextrose	5,55 mM
HEPES	20,06 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,34 mM
KCl	5,36 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,81 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Fibroblasten-Kulturmedium (10% FCS) / - Hungermedium (0% FCS):

MEM-Medium	
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
FCS	10% / 0% (v/v)

MEM-Medium (pH 7,3):

Minimal Essential Medium (MEM)	10,5 g
NaHCO ₃	350 mg
Vitamin B ₁₂	2 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Preplating-Medium:

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

8.3.4 Proteinbiochemische Puffer und Reagenzien

Blockmilch:

Trockenmilchpulver	5% (m/v)
NaCl	100 mM
TRIS (pH 7,4)	10 mM
Triton-X-100	0,1% (v/v)

BSA-Waschpuffer:

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

Laemmli-Puffer (4x):

TRIS (pH 6,8)	200 mM
Natriumlaurylsulfat (SDS)	8% (m/v)
Glycerin	40% (m/v)
β -Mercaptoethanol	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (m/v)

Luminol-Lösung:

- Lösung A:

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

- Lösung B:

TRIS (pH 8,3)	100 mM
H ₂ O ₂ (30%)	0,06% (v/v)

Lysepuffer:

TRIS (pH 7,4)	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	5 mM
NaN ₃	1,5 mM
Triton-X-100	1% (v/v)

Phosphataseinhibitormix (100x):

NaF	5 M
Na ₄ P ₂ O ₇	500 mM
Na ₃ VO ₄	100 mM
NaN ₃	30 mM
β -Glycerolphosphat	500 mM

PMSF (100x):

Phenylmethylsulfonylfluorid in 99% Ethanol (v/v)	100 mM
---	--------

Proteaseinhibitormix (100x):

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1% (w/v)
Benzamidin	25 mM
TRIS (pH 7,4)	50 mM

6 Sammelgele (4% Acrylamid):

H ₂ O	7,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,5 ml
4x Sammelgelpuffer	3 ml
TEMED	12 µl
APS 10% (m/v)	120 µl

Sammelgelpuffer (4x):

TRIS (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,4% (m/v)

SDS-Laufpuffer (10x):

TRIS/HCl	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1% (m/v)

Strippingpuffer:

Glycin	100 mM
SDS	0,1% (m/v)
HCl	ad pH 2,5

Transferpuffer:

TRIS	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20% (v/v)

6 Trenngele (12% Acrylamid):

H ₂ O	10,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	12 ml
4x Trenngelpuffer	7,5 ml
TEMED	15 µl
APS 10% (m/v)	195 µl

Trenngelbuffer (4x):

TRIS (pH 8,8)

1,5 M

SDS

0,4% (m/v)

9. Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STADIEN DER ENTWICKLUNG KARDIALER HYPERTROPHIE.	3
ABBILDUNG 2: MORPHOLOGIE DER KARDIALEN HYPERTROPHIE.	4
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON AN DER KARDIALEN HYPERTROPHIE BETEILIGTEN SIGNALWEGEN.	8
ABBILDUNG 4: VERGLEICH DER PHYSIOLOGISCHEN VS. PATHOLOGISCHEN KARDIALEN HYPERTROPHIE.	16
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHER AUFBAU DER MAP-KINASE-SIGNALKASKADE.	19
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RAS-ZYKLUS.	20
ABBILDUNG 7: ÜBERBLICK ÜBER DIE AKTIVIERUNGSMECHANISMEN DER MAPK-SIGNALKASKADE.	22
ABBILDUNG 8: AUFBAU UND KONFORMATIONSÄNDERUNG VON NICHT-PHOSPHORYLIERTEM UND DUAL- PHOSPHORYLIERTEM ERK2.	33
ABBILDUNG 9: MODELL DER GBF-INDUZIERTEN ERK2 ^{Thr188} -AUTOPHOSPHORYLIERUNG.	42
ABBILDUNG 10: PROLIFERATIONSANALYSE IN KARDIOMYOZYTEN MIT ÜBEREXPRESSION VON ERK2 ^{T188D}	44
ABBILDUNG 11: TRANSVERSALSCHNITTE VON WILD-TYP- UND TRANSGENEN ERK2 ^{T188D} -MÄUSEN NACH TAC.	45
ABBILDUNG 12: SCHEMA DES GENKONSTRUKTS FÜR DIE GENERIERUNG TRANSGENER MÄUSE.	55
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER <i>TRANSVERSE AORTIC CONSTRICTION</i> (TAC).	56
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR ANALYSE DER KORONARGEFÄßE UND PERIVASKULÄREN FIBROSE.	64
ABBILDUNG 16: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER cDNA-SYNTHESE.	66
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).	67
ABBILDUNG 17: KONTROLLE DER ERK1/2-EXPRESSION IN HERZEN TRANSGENER MÄUSE.	84
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER QUERSCHNITTSLÄCHE VON KARDIOMYOZYTEN NACH TAC.	87
ABBILDUNG 19: ANALYSE DES GEWICHTS DES LINKEN VENTRIKELS NACH TAC.	88
ABBILDUNG 20: ANALYSE DER SEPTUM- UND HINTERWANDDICKE DES LINKEN VENTRIKELS NACH TAC.	90
ABBILDUNG 21: ANALYSE DER KARDIALEN FUNKTION NACH TAC.	91
ABBILDUNG 22: VERGLEICH DER HERZFREQUENZ UND DES DURCH TAC INDUZIERTEN AORTENDRUCKGRADIENTEN.	92
ABBILDUNG 23: EVALUATION DES KARDIOGENEN LUNGENÖDEMS NACH TAC.	93
ABBILDUNG 24: ANALYSE DER INTERSTITIELLEN FIBROSE NACH TAC.	95
ABBILDUNG 25: ECHOKARDIOGRAPHISCHE ANALYSE DES LINKSVENTRIKULÄREN INNENDURCHMESSERS.	96
ABBILDUNG 26: ANALYSE DER MEDIADICKE KORONARER BLUTGEFÄßE NACH TAC.	98
ABBILDUNG 27: ANALYSE DER PERIVASKULÄREN FIBROSE KORONARER BLUTGEFÄßE NACH TAC.	99
ABBILDUNG 28: EXPRESSIONSKONTROLLE DER ADENOVIRAL TRANSDUZIERTEN ERK2-KONSTRUKTE.	100
ABBILDUNG 29: PROLIFERATIONSVERHALTEN DER ERK2 ^{T188D} -MUTANTE IN KARDIALEN FIBROBLASTEN.	101
ABBILDUNG 30: PROLIFERATIONSVERHALTEN DER ERK2 ^{T188D} -MUTANTE IN VASKULÄREN GLATTEN MUSKELZELLEN.	103

ABBILDUNG 8 MIT ERLAUBNIS VON ELSEVIER; ABBILDUNG 10 UND 11 MIT ERLAUBNIS VON SPRINGER NATURE

9.2 Literaturverzeichnis

- ADAMS, J. M., HARRIS, A. W., PINKERT, C. A., CORCORAN, L. M., ALEXANDER, W. S., CORY, S., . . . BRINSTER, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, 318(6046), 533-538.
- ADLER, C. P., RINGLAGE, W. P. & BOHM, N. (1981). [DNA content and cell number in heart and liver of children. Comparable biochemical, cytophotometric and histological investigations (author's transl)]. *Pathol Res Pract*, 172(1-2), 25-41.
- AHN, N. G. & KREBS, E. G. (1990). Evidence for an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. Activation of serine peptide kinase activity by myelin basic protein kinases in vitro. *J Biol Chem*, 265(20), 11495-11501.
- AKHTER, S. A., LUTTRELL, L. M., ROCKMAN, H. A., IACCARINO, G., LEFKOWITZ, R. J. & KOCH, W. J. (1998). Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, 280(5363), 574-577.
- ALBERTS, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). New York, N.Y.: Garland Science.
- ALESSI, D. R., GOMEZ, N., MOORHEAD, G., LEWIS, T., KEYSE, S. M. & COHEN, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol*, 5(3), 283-295.
- ALESSI, D. R., SAITO, Y., CAMPBELL, D. G., COHEN, P., SITHANANDAM, G., RAPP, U., . . . COWLEY, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, 13(7), 1610-1619.
- ALLARD, M. F., SCHONEKESS, B. O., HENNING, S. L., ENGLISH, D. R. & LOPASCHUK, G. D. (1994). Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*, 267(2 Pt 2), H742-750.
- AMIRAK, E., FULLER, S. J., SUGDEN, P. H. & CLERK, A. (2013). p90 ribosomal S6 kinases play a significant role in early gene regulation in the cardiomyocyte response to G(q)-protein-coupled receptor stimuli, endothelin-1 and alpha(1)-adrenergic receptor agonists. *Biochem J*, 450(2), 351-363. doi:10.1042/BJ20121371
- ANDERSON, K. R., SUTTON, M. G. & LIE, J. T. (1979). Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol*, 128(2), 79-85. doi:10.1002/path.1711280205

- ANDERSON, M. E. (2005). Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther*, *106*(1), 39-55. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.11.002
- ANDERSON, N. G., MALLER, J. L., TONKS, N. K. & STURGILL, T. W. (1990). Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, *343*(6259), 651-653. doi:10.1038/343651a0
- AOKI, Y., NIIHORI, T., KAWAME, H., KUROSAWA, K., OHASHI, H., TANAKA, Y., . . . MATSUBARA, Y. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet*, *37*(10), 1038-1040. doi:10.1038/ng1641
- ARTHAM, S. M., LAVIE, C. J., MILANI, R. V., PATEL, D. A., VERMA, A. & VENTURA, H. O. (2009). Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis*, *52*(2), 153-167. doi:10.1016/j.pcad.2009.05.002
- AUGER-MESSIER, M., ACCORNERO, F., GOONASEKERA, S. A., BUENO, O. F., LORENZ, J. N., VAN BERLO, J. H., . . . MOLKENTIN, J. D. (2013). Unrestrained p38 MAPK activation in Dusp1/4 double-null mice induces cardiomyopathy. *Circ Res*, *112*(1), 48-56. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.272963
- AZEVEDO, P. S., POLEGATO, B. F., MINICUCCI, M. F., PAIVA, S. A. & ZORNOFF, L. A. (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*, *106*(1), 62-69. doi:10.5935/abc.20160005
- BALTIMORE, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, *226*(5252), 1209-1211.
- BANERJEE, I., FUSELER, J. W., PRICE, R. L., BORG, T. K. & BAUDINO, T. A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *293*(3), H1883-1891. doi:10.1152/ajpheart.00514.2007
- BARRY, S. P., DAVIDSON, S. M. & TOWNSEND, P. A. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(10), 2023-2039. doi:10.1016/j.biocel.2008.02.020
- BAUDINO, T. A., CARVER, W., GILES, W. & BORG, T. K. (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *291*(3), H1015-1026. doi:10.1152/ajpheart.00023.2006
- BAUML, M. A. & UNDERWOOD, D. A. (2010). Left ventricular hypertrophy: an overlooked cardiovascular risk factor. *Cleve Clin J Med*, *77*(6), 381-387. doi:10.3949/ccjm.77a.09158

- BEAMISH, J. A., HE, P., KOTTKE-MARCHANT, K. & MARCHANT, R. E. (2010). Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, *16*(5), 467-491. doi:10.1089/ten.TEB.2009.0630
- BELANGER, L. F., ROY, S., TREMBLAY, M., BROTT, B., STEFF, A. M., MOURAD, W., . . . CHARRON, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*, *23*(14), 4778-4787.
- BELCHEVA, M. M. & COSCIA, C. J. (2002). Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals*, *11*(1), 34-44. doi:57320
- BENNETT, M. R., SINHA, S. & OWENS, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*, *118*(4), 692-702. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
- BERNARDO, B. C., WEEKS, K. L., PRETORIUS, L. & MCMULLEN, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, *128*(1), 191-227. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.005
- BERS, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, *70*, 23-49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- BEYAR, R. (2010). *Analysis of cardiac development from embryo to old age*. Boston, Mass.: Blackwell Publishing on behalf of the New York Academy of Sciences.
- BISHOP, S. P. & ALTSCHULD, R. A. (1970). Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol*, *218*(1), 153-159.
- BISHOPRIC, N. H., JAYASENA, V. & WEBSTER, K. A. (1992). Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, *267*(35), 25535-25540.
- BJARNADOTTIR, T. K., GLORIAM, D. E., HELLSTRAND, S. H., KRISTIANSSON, H., FREDRIKSSON, R. & SCHIOTH, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, *88*(3), 263-273. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.001
- BLONDEL, B., ROIJEN, I. & CHENEVAL, J. P. (1971). Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia*, *27*(3), 356-358.

- BONACCI, T. M., MATHEWS, J. L., YUAN, C., LEHMANN, D. M., MALIK, S., WU, D., . . . SMRCKA, A. V. (2006). Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules. *Science*, 312(5772), 443-446. doi:10.1126/science.1120378
- BOSMAN, F. T. & STAMENKOVIC, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*, 200(4), 423-428. doi:10.1002/path.1437
- BOTTCHER, R. T. & NIEHRS, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*, 26(1), 63-77. doi:10.1210/er.2003-0040
- BOULTON, T. G. & COBB, M. H. (1991a). Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*, 2(5), 357-371.
- BOULTON, T. G., NYE, S. H., ROBBINS, D. J., IP, N. Y., RADZIEJEWSKA, E., MORGENBESSER, S. D., . . . YANCOPOULOS, G. D. (1991b). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65(4), 663-675.
- BRAZ, J. C., BUENO, O. F., LIANG, Q., WILKINS, B. J., DAI, Y. S., PARSONS, S., . . . MOLKENTIN, J. D. (2003). Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest*, 111(10), 1475-1486. doi:10.1172/JCI17295
- BRIETZ, A., SCHUCH, K. V., WANGORSCH, G., LORENZ, K. & DANDEKAR, T. (2016). Analyzing ERK 1/2 signalling and targets. *Mol Biosyst*, 12(8), 2436-2446. doi:10.1039/c6mb00255b
- BROOKS, W. W. & CONRAD, C. H. (2000). Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol*, 32(2), 187-195. doi:10.1006/jmcc.1999.1065
- BRUNET, A., PAGES, G. & POUYSSEGUR, J. (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett*, 346(2-3), 299-303.
- BUCHWALTER, G., GROSS, C. & WASYLYK, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1-14.
- BUENO, O. F., DE WINDT, L. J., TYMITZ, K. M., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., KLEVITSKY, R., . . . MOLKENTIN, J. D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*, 19(23), 6341-6350. doi:10.1093/emboj/19.23.6341

- BUENO, O. F. & MOLKENTIN, J. D. (2002). Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*, 91(9), 776-781.
- BUJAK, M. & FRANGOIANNIS, N. G. (2007). The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 74(2), 184-195. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.002
- BURCHFIELD, J. S., XIE, M. & HILL, J. A. (2013). Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*, 128(4), 388-400. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001878
- BURKE, A. P., FARB, A., LIANG, Y. H., SMIALEK, J. & VIRMANI, R. (1996). Effect of hypertension and cardiac hypertrophy on coronary artery morphology in sudden cardiac death. *Circulation*, 94(12), 3138-3145.
- BURKHARD, K., SMITH, S., DESHMUKH, R., MACKERELL, A. D., JR. & SHAPIRO, P. (2009). Development of extracellular signal-regulated kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 9(8), 678-689.
- BURNETTE, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195-203.
- BUROTTO, M., CHIOU, V. L., LEE, J. M. & KOHN, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446-3456. doi:10.1002/cncr.28864
- CAMELLITI, P., BORG, T. K. & KOHL, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65(1), 40-51. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.020
- CAMICI, P. G. & CREA, F. (2007). Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med*, 356(8), 830-840. doi:10.1056/NEJMra061889
- CAMPBELL, S. E. & KATWA, L. C. (1997). Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*, 29(7), 1947-1958. doi:10.1006/jmcc.1997.0435
- CANAGARAJAH, B. J., KHOKHLATCHEV, A., COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, 90(5), 859-869.
- CARGNELLO, M. & ROUX, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10

- CARRENO, J. E., APABLAZA, F., OCARANZA, M. P. & JALIL, J. E. (2006). [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol*, *59*(5), 473-486.
- CARTLEDGE, J. E., KANE, C., DIAS, P., TEFOM, M., CLARKE, L., MCKEE, B., . . . TERRACCIANO, C. M. (2015). Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc Res*, *105*(3), 260-270. doi:10.1093/cvr/cvu264
- CASAR, B., PINTO, A. & CRESPO, P. (2008). Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell*, *31*(5), 708-721. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.024
- CASEY, L. M., PISTNER, A. R., BELMONTE, S. L., MIGDALOVICH, D., STOLPNIK, O., NWAKANMA, F. E., . . . BLAXALL, B. C. (2010). Small molecule disruption of G beta gamma signaling inhibits the progression of heart failure. *Circ Res*, *107*(4), 532-539. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217075
- CATTANEO, F., GUERRA, G., PARISI, M., DE MARINIS, M., TAFURI, D., CINELLI, M. & AMMENDOLA, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, *15*(11), 19700-19728. doi:10.3390/ijms151119700
- CATTANEO, F., PARISI, M. & AMMENDOLA, R. (2013). WKYMVm-induced cross-talk between FPR2 and HGF receptor in human prostate epithelial cell line PNT1A. *FEBS Lett*, *587*(10), 1536-1542. doi:10.1016/j.febslet.2013.03.036
- CERVANTES, D., CROSBY, C. & XIANG, Y. (2010). Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. *Circ Res*, *106*(1), 79-88. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.198580
- CHARDIN, P., CAMONIS, J. H., GALE, N. W., VAN AELST, L., SCHLESSINGER, J., WIGLER, M. H. & BAR-SAGI, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, *260*(5112), 1338-1343.
- CHATURVEDI, R. R., HERRON, T., SIMMONS, R., SHORE, D., KUMAR, P., SETHIA, B., . . . KENTISH, J. C. (2010). Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. *Circulation*, *121*(8), 979-988. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.850677
- CHEN, R. H., SARNECKI, C. & BLENIS, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, *12*(3), 915-927.

- CHEN, Z., GIBSON, T. B., ROBINSON, F., SILVESTRO, L., PEARSON, G., XU, B., . . . COBB, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev*, *101*(8), 2449-2476.
- CHENG, X., JI, Z., TSALKOVA, T. & MEI, F. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *40*(7), 651-662.
- CHERFILS, J. & ZEGHOUF, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, *93*(1), 269-309. doi:10.1152/physrev.00003.2012
- CHIONG, M., WANG, Z. V., PEDROZO, Z., CAO, D. J., TRONCOSO, R., IBACACHE, M., . . . LAVANDERO, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*, *2*, e244. doi:10.1038/cddis.2011.130
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*(1), 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- CHONG, H., LEE, J. & GUAN, K. L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J*, *20*(14), 3716-3727. doi:10.1093/emboj/20.14.3716
- CHOUKROUN, G., HAJJAR, R., FRY, S., DEL MONTE, F., HAQ, S., GUERRERO, J. L., . . . FORCE, T. (1999). Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal kinases. *J Clin Invest*, *104*(4), 391-398. doi:10.1172/JCI6350
- CHUDERLAND, D., KONSON, A. & SEGER, R. (2008). Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell*, *31*(6), 850-861. doi:10.1016/j.molcel.2008.08.007
- CICIRELLI, M. F., PELECH, S. L. & KREBS, E. G. (1988). Activation of multiple protein kinases during the burst in protein phosphorylation that precedes the first meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, *263*(4), 2009-2019.
- CIRIT, M., WANG, C. C. & HAUGH, J. M. (2010). Systematic quantification of negative feedback mechanisms in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling network. *J Biol Chem*, *285*(47), 36736-36744. doi:10.1074/jbc.M110.148759
- CIULLO, I., DIEZ-ROUX, G., DI DOMENICO, M., MIGLIACCIO, A. & AVVEDIMENTO, E. V. (2001). cAMP signaling selectively influences Ras effectors pathways. *Oncogene*, *20*(10), 1186-1192. doi:10.1038/sj.onc.1204219

- COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, 270(25), 14843-14846.
- COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*, 25(1), 7-9.
- COBB, M. H., ROBBINS, D. J. & BOULTON, T. G. (1991). ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol*, 3(6), 1025-1032.
- COHN, J. N., FERRARI, R. & SHARPE, N. (2000). 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*, 35(3), 569-582.
- COLE, M. D. (1986). The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet*, 20, 361-384. doi:10.1146/annurev.ge.20.120186.002045
- COOK, S. J. & MCCORMICK, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 262(5136), 1069-1072.
- CORBIT, K. C., TRAKUL, N., EVES, E. M., DIAZ, B., MARSHALL, M. & ROSNER, M. R. (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem*, 278(15), 13061-13068. doi:10.1074/jbc.M210015200
- COSPEDAL, R., LOBO, M. & ZACHARY, I. (1999). Differential regulation of extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) 1 and 2 by cAMP and dissociation of ERK inhibition from anti-mitogenic effects in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochem J*, 342 (Pt 2), 407-414.
- CREEMERS, E. E. & PINTO, Y. M. (2011). Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*, 89(2), 265-272. doi:10.1093/cvr/cvq308
- CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W. F. & GUTKIND, J. S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 369(6479), 418-420. doi:10.1038/369418a0
- CREWS, C. M. & ERIKSON, R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(17), 8205-8209.

- CSEH, B., DOMA, E. & BACCARINI, M. (2014). "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett*, 588(15), 2398-2406. doi:10.1016/j.febslet.2014.06.025
- DAHLOF, B., DEVEREUX, R. B., KJELDSEN, S. E., JULIUS, S., BEEVERS, G., DE FAIRE, U., . . . GROUP, L. S. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, 359(9311), 995-1003. doi:10.1016/S0140-6736(02)08089-3
- DAHLOF, B., PENNERT, K. & HANSSON, L. (1992). Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens*, 5(2), 95-110.
- DAI, Z., AOKI, T., FUKUMOTO, Y. & SHIMOKAWA, H. (2012). Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol*, 60(5), 416-421. doi:10.1016/j.jcc.2012.06.009
- DAKSIS, J. I., LU, R. Y., FACCHINI, L. M., MARHIN, W. W. & PENN, L. J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene*, 9(12), 3635-3645.
- DAUB, H., WALLASCH, C., LANKENAU, A., HERRLICH, A. & ULLRICH, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*, 16(23), 7032-7044. doi:10.1093/emboj/16.23.7032
- DAUB, H., WEISS, F. U., WALLASCH, C. & ULLRICH, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379(6565), 557-560. doi:10.1038/379557a0
- DAVIS, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 268(20), 14553-14556.
- DAVIS, T. L., BONACCI, T. M., SPRANG, S. R. & SMRCKA, A. V. (2005). Structural and molecular characterization of a preferred protein interaction surface on G protein beta gamma subunits. *Biochemistry*, 44(31), 10593-10604. doi:10.1021/bi050655i
- DE VRIES, L., ZHENG, B., FISCHER, T., ELENKO, E. & FARQUHAR, M. G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 235-271. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.235
- DEALMEIDA, A. C., VAN OORT, R. J. & WEHRENS, X. H. (2010). Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*(38). doi:10.3791/1729

- DEFEA, K. A., ZALEVSKY, J., THOMA, M. S., DERY, O., MULLINS, R. D. & BUNNETT, N. W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*, 148(6), 1267-1281.
- DELL'ERA, P., RONCA, R., COCO, L., NICOLI, S., METRA, M. & PRESTA, M. (2003). Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ Res*, 93(5), 414-420. doi:10.1161/01.RES.0000089460.12061.E1
- DERIJARD, B., RAINGEAUD, J., BARRETT, T., WU, I. H., HAN, J., ULEVITCH, R. J. & DAVIS, R. J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, 267(5198), 682-685.
- DESCHENES-SIMARD, X., GAUMONT-LECLERC, M. F., BOURDEAU, V., LESSARD, F., MOISEEVA, O., FOREST, V., . . . FERBEYRE, G. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev*, 27(8), 900-915. doi:10.1101/gad.203984.112
- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122(1), 103-111.
- DHILLON, A. S., MEIKLE, S., YAZICI, Z., EULITZ, M. & KOLCH, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J*, 21(1-2), 64-71.
- DING, Q., GROS, R., GRAY, I. D., TAUSSIG, R., FERGUSON, S. S. & FELDMAN, R. D. (2004). Raf kinase activation of adenylyl cyclases: isoform-selective regulation. *Mol Pharmacol*, 66(4), 921-928. doi:10.1124/mol.66.4.
- DIWAN, A. & DORN, G. W., 2ND. (2007). Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)*, 22, 56-64. doi:10.1152/physiol.00033.2006
- DOBACZEWSKI, M., CHEN, W. & FRANGOGIANNIS, N. G. (2011). Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 51(4), 600-606. doi:10.1016/j.jmcc.2010.10.033
- DOMINICZAK, A. F., DEVLIN, A. M., LEE, W. K., ANDERSON, N. H., BOHR, D. F. & REID, J. L. (1996). Vascular smooth muscle polyploidy and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. *Hypertension*, 27(3 Pt 2), 752-759.

- DONG, C., WATERS, S. B., HOLT, K. H. & PESSIN, J. E. (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *J Biol Chem*, 271(11), 6328-6332.
- DORN, G. W., 2ND, ROBBINS, J. & SUGDEN, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, 92(11), 1171-1175. doi:10.1161/01.RES.0000077012.11088.BC
- DOUGHERTY, M. K., MULLER, J., RITT, D. A., ZHOU, M., ZHOU, X. Z., COPELAND, T. D., . . . MORRISON, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell*, 17(2), 215-224. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.055
- DOUVILLE, E. & DOWNWARD, J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*, 15(4), 373-383. doi:10.1038/sj.onc.1201214
- DRAZNER, M. H. (2011). The progression of hypertensive heart disease. *Circulation*, 123(3), 327-334. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.845792
- DUESBERY, N. & VANDE WOUDE, G. (2006). BRAF and MEK mutations make a late entrance. *Sci STKE*, 2006(328), pe15. doi:10.1126/stke.3282006pe15
- EBLEN, S. T., CATLING, A. D., ASSANAH, M. C. & WEBER, M. J. (2001). Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2. *Mol Cell Biol*, 21(1), 249-259. doi:10.1128/MCB.21.1.249-259.2001
- EGHBALI, M. & WEBER, K. T. (1990). Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem*, 96(1), 1-14.
- EISHINGDRELO, H. & KONGSAMUT, S. (2013). Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genom Transl Med*, 7, 9-15. doi:10.2174/2213988501307010009
- EISHINGDRELO, H., SUN, W., LI, H., WANG, L., EISHINGDRELO, A., DAI, S., . . . ZHENG, W. (2015). ERK and beta-arrestin interaction: a converging point of signaling pathways for multiple types of cell surface receptors. *J Biomol Screen*, 20(3), 341-349. doi:10.1177/1087057114557233
- ELLISON, G. M., WARING, C. D., VICINANZA, C. & TORELLA, D. (2012). Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*, 98(1), 5-10. doi:10.1136/heartjnl-2011-300639

- ENDO, M. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*, 57(1), 71-108.
- ENGELHARDT, S. (2005). Beta-adrenergic receptors in heart failure. *Heart Fail Clin*, 1(2), 183-191. doi:10.1016/j.hfc.2005.04.005
- ENGELHARDT, S. (2007). Alternative signaling: cardiomyocyte beta1-adrenergic receptors signal through EGFRs. *J Clin Invest*, 117(9), 2396-2398. doi:10.1172/JCI33135
- ENGELHARDT, S., GRIMMER, Y., FAN, G. H. & LOHSE, M. J. (2001). Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol*, 60(4), 712-717.
- ENGELHARDT, S., HEIN, L., DYACHENKOW, V., KRANIAS, E. G., ISENBERG, G. & LOHSE, M. J. (2004). Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation*, 109(9), 1154-1160. doi:10.1161/01.CIR.0000117254.68497.39
- ENGELHARDT, S., HEIN, L., WIESMANN, F. & LOHSE, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 7059-7064.
- ENGLISH, J., PEARSON, G., WILSBACHER, J., SWANTEK, J., KARANDIKAR, M., XU, S. & COBB, M. H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res*, 253(1), 255-270. doi:10.1006/excr.1999.4687
- EOM, G. H. & KOOK, H. (2015). Role of histone deacetylase 2 and its posttranslational modifications in cardiac hypertrophy. *BMB Rep*, 48(3), 131-138.
- ERMAK, G. (2016). *Emerging medical technologies*. New Jersey: World Scientific.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 245(1), C1-14.
- FAGARD, R. H. (1995). Reversibility of left ventricular hypertrophy by antihypertensive drugs. *Neth J Med*, 47(4), 173-179.
- FAN, D., TAKAWALE, A., LEE, J. & KASSIRI, Z. (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(1), 15. doi:10.1186/1755-1536-5-15

- FEIGENBAUM, H. (2010). Role of M-mode technique in today's echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*, 23(3), 240-257; 335-247. doi:10.1016/j.echo.2010.01.015
- FELD, Y., MELAMED-FRANK, M., KEHAT, I., TAL, D., MAROM, S. & GEPSTEIN, L. (2002). Electrophysiological modulation of cardiomyocytic tissue by transfected fibroblasts expressing potassium channels: a novel strategy to manipulate excitability. *Circulation*, 105(4), 522-529.
- FISCHER, A., BALJULS, A., REINDERS, J., NEKHOROSHKOVA, E., SIBILSKI, C., METZ, R., . . . RAPP, U. R. (2009). Regulation of RAF activity by 14-3-3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and heterodimeric forms of 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 284(5), 3183-3194. doi:10.1074/jbc.M804795200
- FISCHMANN, T. O., SMITH, C. K., MAYHOOD, T. W., MYERS, J. E., REICHERT, P., MANNARINO, A., . . . MADISON, V. S. (2009). Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry*, 48(12), 2661-2674. doi:10.1021/bi801898e
- FLAHERTY, K. T., INFANTE, J. R., DAUD, A., GONZALEZ, R., KEFFORD, R. F., SOSMAN, J., . . . WEBER, J. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367(18), 1694-1703. doi:10.1056/NEJMoa1210093
- FOERSTER, K., KAEFERSTEIN, T., GRONER, F., ENGELHARDT, S., MATTHES, J., KOCH, W. J., . . . HERZIG, S. (2004). Calcium channel function and regulation in beta 1- and beta 2-adrenoceptor transgenic mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369(5), 490-495. doi:10.1007/s00210-004-0928-3
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63(6), 1256-1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256
- FREEMAN, A. K., RITT, D. A. & MORRISON, D. K. (2013). The importance of Raf dimerization in cell signaling. *Small GTPases*, 4(3), 180-185. doi:10.4161/sgtp.26117
- FREY, N., KATUS, H. A., OLSON, E. N. & HILL, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580-1589. doi:10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB
- FRODIN, M., PERALDI, P. & VAN OBBERGHEN, E. (1994). Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem*, 269(8), 6207-6214.

- FU, X., KOLLER, S., ABD ALLA, J. & QUITTERER, U. (2013). Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biol Chem*, 288(11), 7738-7755. doi:10.1074/jbc.M112.428078
- FUJIIU, K. & NAGAI, R. (2014). Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 70, 64-73. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.013
- FUKUDA, M., GOTOH, I., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem*, 271(33), 20024-20028.
- FUKUDA, M., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. (1997). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*, 16(8), 1901-1908. doi:10.1093/emboj/16.8.1901
- FUKUHARA, S., MURGA, C., ZOHAR, M., IGISHI, T. & GUTKIND, J. S. (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*, 274(9), 5868-5879.
- GAO, S., HO, D., VATNER, D. E. & VATNER, S. F. (2011). Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 1, 71-83. doi:10.1002/9780470942390.mo100130
- GARCIA, D. E., LI, B., GARCIA-FERREIRO, R. E., HERNANDEZ-OCHOA, E. O., YAN, K., GAUTAM, N., . . . HILLE, B. (1998). G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *J Neurosci*, 18(22), 9163-9170.
- GARDNER, D. G., CHEN, S., GLENN, D. J. & GRIGSBY, C. L. (2007). Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*, 49(3), 419-426. doi:10.1161/01.HYP.0000258532.07418.fa
- GAUDESIOUS, G., MIRAGOLI, M., THOMAS, S. P. & ROHR, S. (2003). Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res*, 93(5), 421-428. doi:10.1161/01.RES.0000089258.40661.0C
- GEARHART, J., PASHOS, E. E. & PRASAD, M. K. (2007). Pluripotency redux--advances in stem-cell research. *N Engl J Med*, 357(15), 1469-1472. doi:10.1056/NEJMp078126
- GEISTERFER, A. A., PEACH, M. J. & OWENS, G. K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 62(4), 749-756.

- GHALI, J. K., LIAO, Y., SIMMONS, B., CASTANER, A., CAO, G. & COOPER, R. S. (1992). The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. *Ann Intern Med*, *117*(10), 831-836.
- GIOVANNINI, M. G., CERBAI, F., BELLUCCI, A., MELANI, C., GROSSI, C., BARTOLOZZI, C., . . . CASAMENTI, F. (2008). Differential activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways in the hippocampus of CRND8 transgenic mouse, a model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *153*(3), 618-633. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.061
- GIROUX, S., TREMBLAY, M., BERNARD, D., CARDIN-GIRARD, J. F., AUBRY, S., LAROUCHE, L., . . . CHARRON, J. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*, *9*(7), 369-372.
- GJESDAL, O., BLUEMKE, D. A. & LIMA, J. A. (2011). Cardiac remodeling at the population level--risk factors, screening, and outcomes. *Nat Rev Cardiol*, *8*(12), 673-685. doi:10.1038/nrcardio.2011.154
- GLENNON, P. E., SUGDEN, P. H. & POOLE-WILSON, P. A. (1995). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J*, *73*(6), 496-499.
- GOEL, R. & BALDASSARE, J. J. (2004). Killing two birds with one RKIP. *Trends Endocrinol Metab*, *15*(3), 91-92.
- GOETZ, C. A., O'NEIL, J. J. & FARRAR, M. A. (2003). Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *J Biol Chem*, *278*(51), 51184-51189. doi:10.1074/jbc.M309183200
- GONZALEZ, F. A., RADEN, D. L. & DAVIS, R. J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*, *266*(33), 22159-22163.
- GOSHIMA, K. (1970). Formation of nexuses and electrotonic transmission between myocardial and FL cells in monolayer culture. *Exp Cell Res*, *63*(1), 124-130.
- GRADMAN, A. H. & ALFAYOUMI, F. (2006). From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*, *48*(5), 326-341. doi:10.1016/j.pcad.2006.02.001

- GRAY, M. O., LONG, C. S., KALINYAK, J. E., LI, H. T. & KARLINER, J. S. (1998). Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res*, *40*(2), 352-363.
- GROPPER, M. A., WIENER-KRONISH, J. P. & HASHIMOTO, S. (1994). Acute cardiogenic pulmonary edema. *Clin Chest Med*, *15*(3), 501-515.
- GROSSMAN, W., JONES, D. & MCLAURIN, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, *56*(1), 56-64. doi:10.1172/JCI108079
- GUO, L., CHEN, C., LIANG, Q., KARIM, M. Z., GORSKA, M. M. & ALAM, R. (2013). Nuclear translocation of MEK1 triggers a complex T cell response through the corepressor silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor. *J Immunol*, *190*(1), 159-167. doi:10.4049/jimmunol.1201657
- GUREVICH, V. V. & GUREVICH, E. V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, *110*(3), 465-502. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.09.008
- GUTKIND, J. S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, *273*(4), 1839-1842.
- GUTKIND, J. S. (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*, *2000*(40), re1. doi:10.1126/stke.2000.40.re1
- HALILOVIC, E. & SOLIT, D. B. (2008). Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr Opin Pharmacol*, *8*(4), 419-426. doi:10.1016/j.coph.2008.06.014
- HAMM, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*, *273*(2), 669-672.
- HANG, T., HUANG, Z., JIANG, S., GONG, J., WANG, C., XIE, D. & REN, H. (2006). Apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy is mediated, in part, by adenine nucleotide translocator-1. *Ann Clin Lab Sci*, *36*(1), 88-95.
- HANKS, S. K., QUINN, A. M. & HUNTER, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, *241*(4861), 42-52.
- HARAZNY, J. M., RITT, M., BALEANU, D., OTT, C., HECKMANN, J., SCHLAICH, M. P., . . . SCHMIEDER, R. E. (2007). Increased wall:lumen ratio of retinal arterioles in male patients

with a history of a cerebrovascular event. *Hypertension*, 50(4), 623-629. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.090779

HARRIS, I. S., ZHANG, S., TRESKOV, I., KOVACS, A., WEINHEIMER, C. & MUSLIN, A. J. (2004). Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation*, 110(6), 718-723. doi:10.1161/01.CIR.0000138190.50127.6A

HATANO, N., MORI, Y., OH-HORA, M., KOSUGI, A., FUJIKAWA, T., NAKAI, N., . . . OGATA, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells*, 8(11), 847-856.

HAUSCHILD, A., GROB, J. J., DEMIDOV, L. V., JOUARY, T., GUTZMER, R., MILLWARD, M., . . . CHAPMAN, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380(9839), 358-365. doi:10.1016/S0140-6736(12)60868-X

HAYSTEAD, T. A., DENT, P., WU, J., HAYSTEAD, C. M. & STURGILL, T. W. (1992). Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett*, 306(1), 17-22.

HEIN, L. (2011). [Structure and evolution of adrenergic receptors]. *Pharm Unserer Zeit*, 40(6), 470-473. doi:10.1002/pauz.201100441

HEIN, L. & SCHMITT, J. P. (2003). alpha(1)-adrenoceptors in the heart - friend or foe? *J Mol Cell Cardiol*, 35(10), 1183-1185.

HEINEKE, J. & MOLKENTIN, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 589-600. doi:10.1038/nrm1983

HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. doi:10.1038/35037710

HERNANDEZ, J. S., BARRETO-TORRES, G., KUZNETSOV, A. V., KHUCHUA, Z. & JAVADOV, S. (2014). Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. *J Cell Mol Med*, 18(4), 709-720. doi:10.1111/jcmm.12220

HERRERO, A. & CRESPO, P. (2016). Tumors topple when ERKs uncouple. *Mol Cell Oncol*, 3(2), e1091875. doi:10.1080/23723556.2015.1091875

- HERRERO, A., PINTO, A., COLON-BOLEA, P., CASAR, B., JONES, M., AGUDO-IBANEZ, L., . . . CRESPO, P. (2015). Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer Cell*, 28(2), 170-182. doi:10.1016/j.ccell.2015.07.001
- HERRLICH, A., DAUB, H., KNEBEL, A., HERRLICH, P., ULLRICH, A., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8985-8990.
- HILDEBRANDT, J. D., SEKURA, R. D., CODINA, J., IYENGAR, R., MANCLARK, C. R. & BIRNBAUMER, L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature*, 302(5910), 706-709.
- HILL, J. A. & OLSON, E. N. (2008). Cardiac plasticity. *N Engl J Med*, 358(13), 1370-1380. doi:10.1056/NEJMra072139
- HIROSE, S., HAGIWARA, H. & TAKEI, Y. (2001). Comparative molecular biology of natriuretic peptide receptors. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(8), 665-672.
- HIXON, M. L. & GUALBERTO, A. (2003). Vascular smooth muscle polyploidization--from mitotic checkpoints to hypertension. *Cell Cycle*, 2(2), 105-110. doi:10.4161/cc.2.2.341
- HIXON, M. L., MURO-CACHO, C., WAGNER, M. W., OBEJERO-PAZ, C., MILLIE, E., FUJIO, Y., . . . GUALBERTO, A. (2000). Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest*, 106(8), 1011-1020. doi:10.1172/JCI8252
- HOELZ, A., DEBLER, E. W. & BLOBEL, G. (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem*, 80, 613-643. doi:10.1146/annurev-biochem-060109-151030
- HORIO, T., NISHIKIMI, T., YOSHIHARA, F., MATSUO, H., TAKISHITA, S. & KANGAWA, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*, 35(1 Pt 1), 19-24.
- HOU, J. & KANG, Y. J. (2012). Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacol Ther*, 135(3), 337-354. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.06.006
- HU, H. & SACHS, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 29(6), 1511-1523. doi:10.1006/jmcc.1997.0392

- HUBBARD, S. R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4), 343-358.
- HUBBARD, S. R. & TILL, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 69, 373-398. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.373
- HUGHES, A. D. (1998). Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle. *J Hum Hypertens*, 12(5), 275-281.
- HUNTER, J. J., TANAKA, N., ROCKMAN, H. A., ROSS, J., JR. & CHIEN, K. R. (1995). Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem*, 270(39), 23173-23178.
- HUNTER, T. (2000). Signaling - 2000 and beyond. *Cell*, 100(1), 113-127.
- HUROWITZ, E. H., MELNYK, J. M., CHEN, Y. J., KOUROS-MEHR, H., SIMON, M. I. & SHIZUYA, H. (2000). Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res*, 7(2), 111-120.
- HYEON, C., DIMA, R. I. & THIRUMALAI, D. (2006). Size, shape, and flexibility of RNA structures. *J Chem Phys*, 125(19), 194905. doi:10.1063/1.2364190
- IACCARINO, G. & KOCH, W. J. (2003). Transgenic mice targeting the heart unveil G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets. *Assay Drug Dev Technol*, 1(2), 347-355. doi:10.1089/154065803321204484
- IMPEY, S., FONG, A. L., WANG, Y., CARDINAUX, J. R., FASS, D. M., OBRIETAN, K., . . . GOODMAN, R. H. (2002). Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron*, 34(2), 235-244.
- INTENGAN, H. D. & SCHIFFRIN, E. L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 581-587.
- ISENOVIC, E. R., SOSKIC, S., TRPKOVIC, A., DOBUTOVIC, B., POPOVIC, M., GLUVIC, Z., . . . MARCHE, P. (2010). Insulin, thrombin, ERK1/2 kinase and vascular smooth muscle cells proliferation. *Curr Pharm Des*, 16(35), 3895-3902.
- ITO, A., SATOH, T., KAZIRO, Y. & ITOH, H. (1995). G protein beta gamma subunit activates Ras, Raf, and MAP kinase in HEK 293 cells. *FEBS Lett*, 368(1), 183-187.

- ITO, H., HIRATA, Y., HIROE, M., TSUJINO, M., ADACHI, S., TAKAMOTO, T., . . . MARUMO, F. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, *69*(1), 209-215.
- ITO, H., HIROE, M., HIRATA, Y., TSUJINO, M., ADACHI, S., SHICHIRI, M., . . . MARUMO, F. (1993). Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation*, *87*(5), 1715-1721.
- IWAKI, K., SUKHATME, V. P., SHUBEITA, H. E. & CHIEN, K. R. (1990). Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem*, *265*(23), 13809-13817.
- IZUMO, S., LOMPRES, A. M., MATSUOKA, R., KOREN, G., SCHWARTZ, K., NADAL-GINARD, B. & MAHDAVI, V. (1987). Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*, *79*(3), 970-977. doi:10.1172/JCI112908
- JANSOHN, M. (2007). *Gentechnische Methoden eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (4. Aufl. ed.). München: Elsevier.
- JAUMOT, M. & HANCOCK, J. F. (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene*, *20*(30), 3949-3958. doi:10.1038/sj.onc.1204526
- JI, T. H., GROSSMANN, M. & JI, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, *273*(28), 17299-17302.
- JO, C., CHO, S. J. & JO, S. A. (2011). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) stabilizes MyoD through direct phosphorylation at tyrosine 156 during myogenic differentiation. *J Biol Chem*, *286*(21), 18903-18913. doi:10.1074/jbc.M111.225128
- JOHNSTON, C. A. & SIDEROVSKI, D. P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*, *72*(2), 219-230. doi:10.1124/mol.107.034348
- JUNQUEIRA, L. C., BIGNOLAS, G. & BRENTANI, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, *11*(4), 447-455.
- KAKKAR, R. & LEE, R. T. (2010). Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res*, *106*(1), 47-57. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.207456

- KAMAL, F. A., MICKELSEN, D. M., WEGMAN, K. M., TRAVERS, J. G., MOALEM, J., HAMMES, S. R., . . . BLAXALL, B. C. (2014). Simultaneous adrenal and cardiac g-protein-coupled receptor-gbetagamma inhibition halts heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*, *63*(23), 2549-2557. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.587
- KAMAL, F. A., SMRCKA, A. V. & BLAXALL, B. C. (2011). Taking the heart failure battle inside the cell: small molecule targeting of Gbetagamma subunits. *J Mol Cell Cardiol*, *51*(4), 462-467. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.01.006
- KAMKIN, A., KISELEVA, I. & ISENBERG, G. (2003). Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, *57*(3), 793-803.
- KAMO, T., AKAZAWA, H. & KOMURO, I. (2015). Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, *117*(1), 89-98. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305349
- KANG, Y. J., ZHOU, Z. X., WANG, G. W., BURIDI, A. & KLEIN, J. B. (2000). Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, *275*(18), 13690-13698.
- KASPER, D. L. & HARRISON, T. R. (2015). *Harrison's principles of internal medicine* (19th edition ed.). New York: McGraw Hill Education Medical.
- KATHOLI, R. E. & COURI, D. M. (2011). Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *Int J Hypertens*, *2011*, 495349. doi:10.4061/2011/495349
- KAWAGUCHI, M., TAKAHASHI, M., HATA, T., KASHIMA, Y., USUI, F., MORIMOTO, H., . . . IKEDA, U. (2011). Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, *123*(6), 594-604. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777
- KEE, H. J. & KOOK, H. (2011). Roles and targets of class I and IIa histone deacetylases in cardiac hypertrophy. *J Biomed Biotechnol*, *2011*, 928326. doi:10.1155/2011/928326
- KEHAT, I., DAVIS, J., TIBURCY, M., ACCORNERO, F., SABA-EL-LEIL, M. K., MAILLET, M., . . . MOKKENTIN, J. D. (2011). Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res*, *108*(2), 176-183. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.231514

- KHOKHLATCHEV, A. V., CANAGARAJAH, B., WILSBACHER, J., ROBINSON, M., ATKINSON, M., GOLDSMITH, E. & COBB, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93(4), 605-615.
- KIM, J., AHN, S., RAJAGOPAL, K. & LEFKOWITZ, R. J. (2009). Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 284(18), 11953-11962. doi:10.1074/jbc.M808176200
- KIM, N. N., VILLARREAL, F. J., PRINTZ, M. P., LEE, A. A. & DILLMANN, W. H. (1995). Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 1), E426-437.
- KING, A. J., SUN, H., DIAZ, B., BARNARD, D., MIAO, W., BAGRODIA, S. & MARSHALL, M. S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*, 396(6707), 180-183. doi:10.1038/24184
- KLEUSS, C., RAW, A. S., LEE, E., SPRANG, S. R. & GILMAN, A. G. (1994). Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21), 9828-9831.
- KLINGER, J. R., PETIT, R. D., CURTIN, L. A., WARBURTON, R. R., WRENN, D. S., STEINHELPER, M. E., . . . HILL, N. S. (1993). Cardiopulmonary responses to chronic hypoxia in transgenic mice that overexpress ANP. *J Appl Physiol* (1985), 75(1), 198-205.
- KOCH, W. J., HAWES, B. E., ALLEN, L. F. & LEFKOWITZ, R. J. (1994). Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26), 12706-12710.
- KOLCH, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289-305.
- KOLCH, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 827-837. doi:10.1038/nrm1743
- KOMURO, I., KAIDA, T., SHIBAZAKI, Y., KURABAYASHI, M., KATOH, Y., HOH, E., . . . YAZAKI, Y. (1990). Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem*, 265(7), 3595-3598.
- KORNEV, A. P., HASTE, N. M., TAYLOR, S. S. & EYCK, L. F. (2006). Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47), 17783-17788. doi:10.1073/pnas.0607656103

- KRENNING, G., ZEISBERG, E. M. & KALLURI, R. (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*, 225(3), 631-637. doi:10.1002/jcp.22322
- KRUK, J. S., VASEFI, M. S., HEIKKILA, J. J. & BEAZELY, M. A. (2013). Reactive oxygen species are required for 5-HT-induced transactivation of neuronal platelet-derived growth factor and TrkB receptors, but not for ERK1/2 activation. *PLoS One*, 8(9), e77027. doi:10.1371/journal.pone.0077027
- KUNAPULI, S., ROSANIO, S. & SCHWARZ, E. R. (2006). "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail*, 12(5), 381-391. doi:10.1016/j.cardfail.2006.02.002
- KUPARI, M., TURTO, H. & LOMMI, J. (2005). Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure? *Eur Heart J*, 26(17), 1790-1796. doi:10.1093/eurheartj/ehi290
- KYRIAKIS, J. M., APP, H., ZHANG, X. F., BANERJEE, P., BRAUTIGAN, D. L., RAPP, U. R. & AVRUCH, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417-421. doi:10.1038/358417a0
- LACOLLEY, P., REGNAULT, V., NICOLETTI, A., LI, Z. & MICHEL, J. B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*, 95(2), 194-204. doi:10.1093/cvr/cvs135
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- LAJINESS, J. D. & CONWAY, S. J. (2014). Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*, 70, 2-8. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.003
- LANGAN, T. J. & CHOU, R. C. (2011). Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol Biol*, 761, 75-83. doi:10.1007/978-1-61779-182-6_5
- LATTION, A. L., MICHEL, J. B., ARNAULD, E., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. (1986). Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am J Physiol*, 251(5 Pt 2), H890-896.
- LAVIE, C. J., MILANI, R. V. & MESSERLI, F. H. (1996). Prevention and reduction of left ventricular hypertrophy in the elderly. *Clin Geriatr Med*, 12(1), 57-68.

- LAVIE, C. J., VENTURA, H. O. & MESSERLI, F. H. (1992). Left ventricular hypertrophy. Its relationship to obesity and hypertension. *Postgrad Med*, 91(7), 131-132, 135-138, 141-133.
- LEASK, A. & ABRAHAM, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*, 18(7), 816-827. doi:10.1096/fj.03-1273rev
- LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C. Y. & KIM, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*(62). doi:10.3791/3923
- LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308(5721), 512-517. doi:10.1126/science.1109237
- LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J. & LENORMAND, P. (2008). Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol*, 28(1), 511-527. doi:10.1128/MCB.00800-07
- LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J. & LENORMAND, P. (2009). Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle*, 8(5), 705-711.
- LEINWEBER, B. D., LEAVIS, P. C., GRABAREK, Z., WANG, C. L. & MORGAN, K. G. (1999). Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J*, 344 Pt 1, 117-123.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- LENORMAND, P., SARDET, C., PAGES, G., L'ALLEMAIN, G., BRUNET, A. & POUYSSEGUR, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, 122(5), 1079-1088.
- LI, C., CHEN, Z., YANG, H., LUO, F., CHEN, L., CAI, H., . . . RAO, L. (2016). Selumetinib, an Oral Anti-Neoplastic Drug, May Attenuate Cardiac Hypertrophy via Targeting the ERK Pathway. *PLoS One*, 11(7), e0159079. doi:10.1371/journal.pone.0159079
- LIANG, Q., BUENO, O. F., WILKINS, B. J., KUAN, C. Y., XIA, Y. & MOLKENTIN, J. D. (2003a). c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J*, 22(19), 5079-5089. doi:10.1093/emboj/cdg474

- LIANG, Q. & MOLKENTIN, J. D. (2003b). Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol*, 35(12), 1385-1394.
- LIAO, J. J. (2007). Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J Med Chem*, 50(3), 409-424. doi:10.1021/jm0608107
- LIAO, P., GEORGAKOPOULOS, D., KOVACS, A., ZHENG, M., LERNER, D., PU, H., . . . WANG, Y. (2001). The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21), 12283-12288. doi:10.1073/pnas.211086598
- LIDKE, D. S., HUANG, F., POST, J. N., RIEGER, B., WILSBACHER, J., THOMAS, J. L., . . . LENORMAND, P. (2010). ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J Biol Chem*, 285(5), 3092-3102. doi:10.1074/jbc.M109.064972
- LIM, H. W., DE WINDT, L. J., STEINBERG, L., TAIGEN, T., WITT, S. A., KIMBALL, T. R. & MOLKENTIN, J. D. (2000). Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 101(20), 2431-2437.
- LIN, Y. & SMRCKA, A. V. (2011). Understanding molecular recognition by G protein betagamma subunits on the path to pharmacological targeting. *Mol Pharmacol*, 80(4), 551-557. doi:10.1124/mol.111.073072
- LIPS, D. J., BUENO, O. F., WILKINS, B. J., PURCELL, N. H., KAISER, R. A., LORENZ, J. N., . . . MOLKENTIN, J. D. (2004). MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*, 109(16), 1938-1941. doi:10.1161/01.CIR.0000127126.73759.23
- LIPSKAIA, L., DEL MONTE, F., CAPIOD, T., YACOUBI, S., HADRI, L., HOURS, M., . . . LOMPRES, A. M. (2005). Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circ Res*, 97(5), 488-495. doi:10.1161/01.RES.0000180663.42594.aa
- LIU, R. & MOLKENTIN, J. D. (2016). Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs). *J Mol Cell Cardiol*, 101, 44-49. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.08.018
- LLOYD, A. C. (2006). Distinct functions for ERKs? *J Biol*, 5(5), 13. doi:10.1186/jbiol46
- LODISH, H. (1999). *Molecular cell biology* (4th ed.).

- LOGOTHETIS, D. E., KURACHI, Y., GALPER, J., NEER, E. J. & CLAPHAM, D. E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*, 325(6102), 321-326. doi:10.1038/325321a0
- LOHSE, M. J., BENOVIC, J. L., CODINA, J., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248(4962), 1547-1550.
- LOHSE, M. J., ENGELHARDT, S. & ESCHENHAGEN, T. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*, 93(10), 896-906. doi:10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA
- LOHSE, M. J. & HOFFMANN, C. (2014a). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 219, 15-56. doi:10.1007/978-3-642-41199-1_2
- LOHSE, M. J., MAIELLARO, I. & CALEBIRO, D. (2014b). Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Cell Biol*, 27, 87-93. doi:10.1016/j.ceb.2013.11.009
- LONG, C. S. (2001). The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev*, 6(2), 81-94.
- LORELL, B. H. & CARABELLO, B. A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 102(4), 470-479.
- LORENZ, K., LOHSE, M. J. & QUITTERER, U. (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*, 426(6966), 574-579. doi:10.1038/nature02158
- LORENZ, K., SCHMID, E. & DEISS, K. (2014). RKIP: a governor of intracellular signaling. *Crit Rev Oncog*, 19(6), 489-496.
- LORENZ, K., SCHMITT, J. P., SCHMITTECKERT, E. M. & LOHSE, M. J. (2009a). A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 15(1), 75-83. doi:10.1038/nm.1893
- LORENZ, K., SCHMITT, J. P., VIDAL, M. & LOHSE, M. J. (2009b). Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(12), 2351-2355. doi:10.1016/j.biocel.2009.08.002
- LORENZEN, J. A., BAKER, S. E., DENHEZ, F., MELNICK, M. B., BROWER, D. L. & PERKINS, L. A. (2001). Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. *Development*, 128(8), 1403-1414.

- LOTHER, A. & HEIN, L. (2016). Pharmacology of heart failure: From basic science to novel therapies. *Pharmacol Ther.* doi:10.1016/j.pharmthera.2016.07.004
- LOWENSTEIN, E. J., DALY, R. J., BATZER, A. G., LI, W., MARGOLIS, B., LAMMERS, R., . . . SCHLESSINGER, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, *70*(3), 431-442.
- LOWES, B. D., GILBERT, E. M., ABRAHAM, W. T., MINOBE, W. A., LARRABEE, P., FERGUSON, D., . . . BRISTOW, M. R. (2002). Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med*, *346*(18), 1357-1365. doi:10.1056/NEJMoa012630
- LOWES, B. D., MINOBE, W., ABRAHAM, W. T., RIZEQ, M. N., BOHLMAYER, T. J., QUAIFFE, R. A., . . . BRISTOW, M. R. (1997). Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest*, *100*(9), 2315-2324. doi:10.1172/JCI119770
- LUO, Z., TZIVION, G., BELSHAW, P. J., VAVVAS, D., MARSHALL, M. & AVRUCH, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature*, *383*(6596), 181-185. doi:10.1038/383181a0
- LUTTRELL, D. K. & LUTTRELL, L. M. (2004). Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene*, *23*(48), 7969-7978. doi:10.1038/sj.onc.1208162
- LUTTRELL, L. M. (2005). Composition and function of g protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity. *J Mol Neurosci*, *26*(2-3), 253-264. doi:10.1385/JMN:26:2-3:253
- LYNCH, C. C., CRAWFORD, H. C., MATRISIAN, L. M. & MCDONNELL, S. (2004). Epidermal growth factor upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through activation of PEA3 transcription factors. *Int J Oncol*, *24*(6), 1565-1572.
- MA, X. M. & BLENIS, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(5), 307-318. doi:10.1038/nrm2672
- MACKENNA, D., SUMMEROUR, S. R. & VILLARREAL, F. J. (2000). Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*, *46*(2), 257-263.

- MAHDAVI, V., LOMPRES, A. M., CHAMBERS, A. P. & NADAL-GINARD, B. (1984). Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability. *Eur Heart J*, 5 Suppl F, 181-191.
- MAHMOOD, T. & YANG, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- MAILLET, M., VAN BERLO, J. H. & MOLKENTIN, J. D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(1), 38-48. doi:10.1038/nrm3495
- MAKI, K. & IKUTA, K. (2008). MEK1/2 induces STAT5-mediated germline transcription of the TCRgamma locus in response to IL-7R signaling. *J Immunol*, 181(1), 494-502.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 459-465. doi:10.1038/nrc1097
- MANABE, I., SHINDO, T. & NAGAI, R. (2002). Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 91(12), 1103-1113.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
- MARAIS, R., LIGHT, Y., PATERSON, H. F., MASON, C. S. & MARSHALL, C. J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 272(7), 4378-4383.
- MARAIS, R., WYNNE, J. & TREISMAN, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73(2), 381-393.
- MARSHALL, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179-185.
- MARTELLI, A. M., EVANGELISTI, C., CHAPPELL, W., ABRAMS, S. L., BASECKE, J., STIVALA, F., . . . MCCUBREY, J. A. (2011). Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia*, 25(7), 1064-1079. doi:10.1038/leu.2011.46

- MASON, C. S., SPRINGER, C. J., COOPER, R. G., SUPERTI-FURGA, G., MARSHALL, C. J. & MARAIS, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J*, 18(8), 2137-2148. doi:10.1093/emboj/18.8.2137
- MATALLANAS, D., BIRTWISTLE, M., ROMANO, D., ZEBISCH, A., RAUCH, J., VON KRIEGSHEIM, A. & KOLCH, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*, 2(3), 232-260. doi:10.1177/1947601911407323
- MATSUDA, S., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. (1993). Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *J Biol Chem*, 268(5), 3277-3281.
- MAUDSLEY, S., PIERCE, K. L., ZAMAH, A. M., MILLER, W. E., AHN, S., DAAKA, Y., . . . LUTTRELL, L. M. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 275(13), 9572-9580.
- MAUVIEL, A. (2005). Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med*, 117, 69-80. doi:10.1385/1-59259-940-0:069
- MAZIA, D., SCHATTEN, G. & SALE, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, 66(1), 198-200.
- MARTHUR, L., CHILTON, L., SMITH, G. L. & NICKLIN, S. A. (2015). Electrical consequences of cardiac myocyte: fibroblast coupling. *Biochem Soc Trans*, 43(3), 513-518. doi:10.1042/BST20150035
- MCCAIN, J. (2013). The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*, 38(2), 96-108.
- MCCANN, G. P., MUIR, D. F. & HILLIS, W. S. (2000). Athletic left ventricular hypertrophy: long-term studies are required. *Eur Heart J*, 21(5), 351-353. doi:10.1053/euhj.1999.1783
- MCCORMICK, F. (1995). Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev*, 42(4), 500-506. doi:10.1002/mrd.1080420419
- MCCUDDEN, C. R., HAINS, M. D., KIMPLE, R. J., SIDEROVSKI, D. P. & WILLARD, F. S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, 62(5), 551-577. doi:10.1007/s00018-004-4462-3

- MCKAY, M. M., FREEMAN, A. K. & MORRISON, D. K. (2011). Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSR structure studies. *Small GTPases*, 2(5), 276-281. doi:10.4161/sgtp.2.5.17740
- MCKINSEY, T. A., ZHANG, C. L. & OLSON, E. N. (2000). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14400-14405. doi:10.1073/pnas.260501497
- MCMULLEN, J. R., SHERWOOD, M. C., TARNAVSKI, O., ZHANG, L., DORFMAN, A. L., SHIOI, T. & IZUMO, S. (2004). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*, 109(24), 3050-3055. doi:10.1161/01.CIR.0000130641.08705.45
- MCMULLEN, J. R., SHIOI, T., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., SHERWOOD, M. C., KANG, P. M. & IZUMO, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21), 12355-12360. doi:10.1073/pnas.1934654100
- MEBRATU, Y. & TESFAIGZI, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*, 8(8), 1168-1175. doi:10.4161/cc.8.8.8147
- MERCER, B. A., KOLESNIKOVA, N., SONETT, J. & D'ARMIENTO, J. (2004). Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem*, 279(17), 17690-17696. doi:10.1074/jbc.M313842200
- MIN, J. & DEFEA, K. (2010). Functional characterization of β -arrestin 1/ERK scaffolding complex downstream of PAR2. *The FASEB Journal*, 24(1 Supplement), 586.582.
- MIRAGOLI, M., SALVARANI, N. & ROHR, S. (2007). Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res*, 101(8), 755-758. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160549
- MISKA, E. A., KARLSSON, C., LANGLEY, E., NIELSEN, S. J., PINES, J. & KOUZARIDES, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J*, 18(18), 5099-5107. doi:10.1093/emboj/18.18.5099
- MITCHELL, M. D., LAIRD, R. E., BROWN, R. D. & LONG, C. S. (2007). IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(2), H1139-1147. doi:10.1152/ajpheart.00881.2005

- MITCHELL, S., OTA, A., FOSTER, W., ZHANG, B., FANG, Z., PATEL, S., . . . WANG, Y. (2006). Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiol Genomics*, 25(1), 50-59. doi:10.1152/physiolgenomics.00224.2005
- MIYAZAKI, J., TAKAKI, S., ARAKI, K., TASHIRO, F., TOMINAGA, A., TAKATSU, K. & YAMAMURA, K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*, 79(2), 269-277.
- MOLKENTIN, J. D., JOBE, S. M. & MARKHAM, B. E. (1996). Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J Mol Cell Cardiol*, 28(6), 1211-1225. doi:10.1006/jmcc.1996.0112
- MOLKENTIN, J. D. & MARKHAM, B. E. (1993). Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 268(26), 19512-19520.
- MONTAGUT, C. & SETTLEMAN, J. (2009). Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett*, 283(2), 125-134. doi:10.1016/j.canlet.2009.01.022
- MOREIRA, I. S. (2014). Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1840(1), 16-33. doi:10.1016/j.bbagen.2013.08.027
- MORI, T., CHEN, Y. F., FENG, J. A., HAYASHI, T., OPARIL, S. & PERRY, G. J. (2004). Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res*, 61(4), 771-779. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.005
- MORIMOTO, T., HASEGAWA, K., KABURAGI, S., KAKITA, T., WADA, H., YANAZUME, T. & SASAYAMA, S. (2000). Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 275(18), 13721-13726.
- MORRIS, E. J., JHA, S., RESTAINO, C. R., DAYANANTH, P., ZHU, H., COOPER, A., . . . SAMATAR, A. A. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov*, 3(7), 742-750. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0070
- MUSLIN, A. J. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)*, 115(7), 203-218. doi:10.1042/CS20070430

- MUTLAK, M. & KEHAT, I. (2015). Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol*, 6, 149. doi:10.3389/fphar.2015.00149
- NADAL-GINARD, B., KAJSTURA, J., LERI, A. & ANVERSA, P. (2003). Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*, 92(2), 139-150.
- NAITO, K., SKOG, S., TRIBUKAIT, B., ANDERSSON, L. & HISAZUMI, H. (1987). Cell cycle related [3H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet*, 20(4), 447-457.
- NAKAMURA, A., ROKOSH, D. G., PACCANARO, M., YEE, R. R., SIMPSON, P. C., GROSSMAN, W. & FOSTER, E. (2001). LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3), H1104-1112.
- NEKRASOVA, T., SHIVE, C., GAO, Y., KAWAMURA, K., GUARDIA, R., LANDRETH, G. & FORSTHUBER, T. G. (2005). ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 175(4), 2374-2380.
- NEUSS, M., REGITZ-ZAGROSEK, V., HILDEBRANDT, A. & FLECK, E. (1996). Isolation and characterisation of human cardiac fibroblasts from explanted adult hearts. *Cell Tissue Res*, 286(1), 145-153.
- NEWTON, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 270(48), 28495-28498.
- NIAULT, T. & BACCARINI, M. (2010). Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 31(7), 1165-1174. doi:10.1093/carcin/bgp337
- NISHIDA, K., YAMAGUCHI, O., HIROTANI, S., HIKOSO, S., HIGUCHI, Y., WATANABE, T., . . . OTSU, K. (2004). p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol*, 24(24), 10611-10620. doi:10.1128/MCB.24.24.10611-10620.2004
- OBATA, K., NAGATA, K., IWASE, M., ODASHIMA, M., NAGASAKA, T., IZAWA, H., . . . YOKOTA, M. (2005). Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(2), 1299-1305. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.083

- OHREN, J. F., CHEN, H., PAVLOVSKY, A., WHITEHEAD, C., ZHANG, E., KUFFA, P., . . . HASEMANN, C. A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, *11*(12), 1192-1197. doi:10.1038/nsmb859
- OIE, E., BJORNERHEIM, R., CLAUSEN, O. P. & ATTRAMADAL, H. (2000). Cyclosporin A inhibits cardiac hypertrophy and enhances cardiac dysfunction during postinfarction failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *278*(6), H2115-2123.
- OKADA, T., HU, C. D., JIN, T. G., KARIYA, K., YAMAWAKI-KATAOKA, Y. & KATAOKA, T. (1999). The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. *Mol Cell Biol*, *19*(9), 6057-6064.
- OLIVETTI, G., ANVERSA, P., MELISSARI, M. & LOUD, A. V. (1980). Morphometry of medial hypertrophy in the rat thoracic aorta. *Lab Invest*, *42*(5), 559-565.
- OMORI, S., HIDA, M., FUJITA, H., TAKAHASHI, H., TANIMURA, S., KOHNO, M. & AWAZU, M. (2006). Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, *17*(6), 1604-1614. doi:10.1681/ASN.2004090800
- ORDAN, M., PALLARA, C., MAIK-RACHLINE, G., HANOCH, T., GERVASIO, F. L., GLASER, F., . . . SEGER, R. (2018). Intrinsically active MEK variants are differentially regulated by proteinases and phosphatases. *Sci Rep*, *8*(1), 11830. doi:10.1038/s41598-018-30202-5
- ORY, S., ZHOU, M., CONRADS, T. P., VEENSTRA, T. D. & MORRISON, D. K. (2003). Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol*, *13*(16), 1356-1364.
- OVERINGTON, J. P., AL-LAZIKANI, B. & HOPKINS, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, *5*(12), 993-996. doi:10.1038/nrd2199
- OWENS, D. M. & KEYSE, S. M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, *26*(22), 3203-3213. doi:10.1038/sj.onc.1210412
- OWENS, G. K. (1989). Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, *257*(6 Pt 2), H1755-1765.
- OWENS, G. K., KUMAR, M. S. & WAMHOFF, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, *84*(3), 767-801. doi:10.1152/physrev.00041.2003

- PAEZ, J. G., JANNE, P. A., LEE, J. C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., . . . MEYERSON, M. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, *304*(5676), 1497-1500. doi:10.1126/science.1099314
- PAGES, G., GUERIN, S., GRALL, D., BONINO, F., SMITH, A., ANJUERE, F., . . . POUYSSEGUR, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, *286*(5443), 1374-1377.
- PARKER, J. C. & TOWNSLEY, M. I. (2004). Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *286*(2), L231-246. doi:10.1152/ajplung.00049.2003
- PASSIER, R., ZENG, H., FREY, N., NAYA, F. J., NICOL, R. L., MCKINSEY, T. A., . . . OLSON, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*, *105*(10), 1395-1406. doi:10.1172/JCI8551
- PATEL, R. Y. & DOERKSEN, R. J. (2010). Protein kinase-inhibitor database: structural variability of and inhibitor interactions with the protein kinase P-loop. *J Proteome Res*, *9*(9), 4433-4442. doi:10.1021/pr100662s
- PATTEN, R. D. & HALL-PORTER, M. R. (2009). Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail*, *2*(2), 138-144. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.839761
- PAYNE, D. M., ROSSOMANDO, A. J., MARTINO, P., ERICKSON, A. K., HER, J. H., SHABANOWITZ, J., . . . STURGILL, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, *10*(4), 885-892.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, *22*(2), 153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
- PEDROTTY, D. M., KLINGER, R. Y., KIRKTON, R. D. & BURSAC, N. (2009). Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, *83*(4), 688-697. doi:10.1093/cvr/cvp164
- PELAIA, G., CUDA, G., VATRELLA, A., GALLELLI, L., CARAGLIA, M., MARRA, M., . . . MARSICO, S. A. (2005). Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol*, *202*(3), 642-653. doi:10.1002/jcp.20169

- PELLMAN, J., ZHANG, J. & SHEIKH, F. (2016). Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol*, *94*, 22-31. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.03.005
- PETERSON, R. T. & SCHREIBER, S. L. (1998). Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr Biol*, *8*(7), R248-250.
- PETRICH, B. G., GONG, X., LERNER, D. L., WANG, X., BROWN, J. H., SAFFITZ, J. E. & WANG, Y. (2002). c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes. *Circ Res*, *91*(7), 640-647.
- PETRICH, B. G., MOLKENTIN, J. D. & WANG, Y. (2003). Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB J*, *17*(6), 749-751. doi:10.1096/fj.02-0438fje
- PFEFFER, J. M., PFEFFER, M. A., MIRSKY, I. & BRAUNWALD, E. (1983). Prevention of the development of heart failure and the regression of cardiac hypertrophy by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Eur Heart J*, *4 Suppl A*, 143-148.
- PFEFFER, M. A. & BRAUNWALD, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, *81*(4), 1161-1172.
- PFLEIDERER, P., SUMANDEA, M. P., RYBIN, V. O., WANG, C. & STEINBERG, S. F. (2009). Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase. *J Muscle Res Cell Motil*, *30*(1-2), 67-72. doi:10.1007/s10974-009-9176-y
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(9), 639-650. doi:10.1038/nrm908
- PIERDOMENICO, S. D. (2007). Left-ventricular hypertrophy and coronary artery disease. *Am J Hypertens*, *20*(10), 1036-1037. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.06.002
- PIPPIG, S., ANDEXINGER, S., DANIEL, K., PUZICHA, M., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & LOHSE, M. J. (1993). Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, *268*(5), 3201-3208.
- POLLACK, P. S., HOUSER, S. R., BUDJAK, R. & GOLDMAN, B. (1994). c-myc gene expression is localized to the myocyte following hemodynamic overload in vivo. *J Cell Biochem*, *54*(1), 78-84. doi:10.1002/jcb.240540109

- PORTER, K. E. & TURNER, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*, 123(2), 255-278. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.002
- PROSKURYAKOV, S. Y., KONOPLYANNIKOV, A. G. & GABAI, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, 283(1), 1-16.
- PROUD, C. G. (2004). Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 63(3), 403-413. doi:10.1016/j.cardiores.2004.02.003
- PSCHYREMBEL, W. & ARNOLD, U. (2014). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch [2015]* (266., aktualisierte Aufl. ed.). Berlin: De Gruyter.
- PULIDO, R., ZUNIGA, A. & ULLRICH, A. (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J*, 17(24), 7337-7350. doi:10.1093/emboj/17.24.7337
- PURCELL, N. H., WILKINS, B. J., YORK, A., SABA-EL-LEIL, M. K., MELOCHE, S., ROBBINS, J. & MOKKENTIN, J. D. (2007). Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35), 14074-14079. doi:10.1073/pnas.0610906104
- RAAKE, P. W., VINGE, L. E., GAO, E., BOUCHER, M., RENGO, G., CHEN, X., . . . KOCH, W. J. (2008). G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res*, 103(4), 413-422. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.168336
- RAJABI, M., KASSIOTIS, C., RAZEGHI, P. & TAEGTMEYER, H. (2007). Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev*, 12(3-4), 331-343. doi:10.1007/s10741-007-9034-1
- RAMAN, M., CHEN, W. & COBB, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392
- RASMUSSEN, S. G., CHOI, H. J., ROSENBAUM, D. M., KOBILKA, T. S., THIAN, F. S., EDWARDS, P. C., . . . KOBILKA, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387. doi:10.1038/nature06325
- RAY, L. B. & STURGILL, T. W. (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(6), 1502-1506.

- REED, A., KOHL, P. & PEYRONNET, R. (2014). Molecular candidates for cardiac stretch-activated ion channels. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014(2), 9-25. doi:10.5339/gcsp.2014.19
- RENSEN, S. S., DOEVENDANS, P. A. & VAN EYS, G. J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*, 15(3), 100-108.
- RHEE, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 70, 281-312. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.281
- RICHARDS, A. M. (2007). Natriuretic peptides: update on Peptide release, bioactivity, and clinical use. *Hypertension*, 50(1), 25-30. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.069153
- RITT, D. A., DAAR, I. O. & MORRISON, D. K. (2006). KSR regulation of the Raf-MEK-ERK cascade. *Methods Enzymol*, 407, 224-237. doi:10.1016/S0076-6879(05)07019-9
- RITT, M. & SCHMIEDER, R. E. (2009). Wall-to-lumen ratio of retinal arterioles as a tool to assess vascular changes. *Hypertension*, 54(2), 384-387. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133025
- RITTER, O., HACK, S., SCHUH, K., ROTHLEIN, N., PERROT, A., OSTERZIEL, K. J., . . . NEYSES, L. (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation*, 105(19), 2265-2269.
- ROBBINS, D. J., ZHEN, E., OWAKI, H., VANDERBILT, C. A., EBERT, D., GEPPERT, T. D. & COBB, M. H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem*, 268(7), 5097-5106.
- ROBERTS, P. J. & DER, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291-3310. doi:10.1038/sj.onc.1210422
- ROBINSON, D. R., WU, Y. M. & LIN, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548-5557. doi:10.1038/sj.onc.1203957
- ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2), 180-186.
- ROCKMAN, H. A., ROSS, R. S., HARRIS, A. N., KNOWLTON, K. U., STEINHELPER, M. E., FIELD, L. J., . . . CHIEN, K. R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(18), 8277-8281.

- RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L. & ROZENGURT, E. (1996). Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 271(44), 27895-27901.
- ROHINI, A., AGRAWAL, N., KOYANI, C. N. & SINGH, R. (2010). Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res*, 61(4), 269-280. doi:10.1016/j.phrs.2009.11.012
- ROMEIS, B., MULISCH, M. & AESCHT, E. (2010). *Mikroskopische Technik* (18. Aufl. ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- ROOVERS, K. & ASSOIAN, R. K. (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*, 22(9), 818-826. doi:10.1002/1521-1878(200009)22:9<818::AID-BIES7>3.0.CO;2-6
- ROSE, B. A., FORCE, T. & WANG, Y. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev*, 90(4), 1507-1546. doi:10.1152/physrev.00054.2009
- ROSENWALD, I. B., RHOADS, D. B., CALLANAN, L. D., ISSELBACHER, K. J. & SCHMIDT, E. V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(13), 6175-6178.
- ROSKOSKI, R., JR. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 399(3), 313-317. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.092
- ROSKOSKI, R., JR. (2012a). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66(2), 105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
- ROSKOSKI, R., JR. (2012b). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(1), 5-10. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.145
- ROSS, E. M. & GILMAN, A. G. (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*, 252(20), 6966-6969.
- ROTTMAN, J. N., NI, G. & BROWN, M. (2007). Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography*, 24(1), 83-89. doi:10.1111/j.1540-8175.2006.00356.x
- RUBINFELD, H., HANOCH, T. & SEGER, R. (1999). Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem*, 274(43), 30349-30352.

- RUKNUDIN, A., SACHS, F. & BUSTAMANTE, J. O. (1993). Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *Am J Physiol*, 264(3 Pt 2), H960-972.
- RUPPERT, C., DEISS, K., HERRMANN, S., VIDAL, M., OEZKUR, M., GORSKI, A., . . . LORENZ, K. (2013). Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18), 7440-7445. doi:10.1073/pnas.1221999110
- RUSHWORTH, L. K., HINDLEY, A. D., O'NEILL, E. & KOLCH, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*, 26(6), 2262-2272. doi:10.1128/MCB.26.6.2262-2272.2006
- SACK, M. N., RADER, T. A., PARK, S., BASTIN, J., MCCUNE, S. A. & KELLY, D. P. (1996). Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, 94(11), 2837-2842.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, 73(3), 413-423.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., . . . ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- SAMATAR, A. A. & POULIKAKOS, P. I. (2014). Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 13(12), 928-942. doi:10.1038/nrd4281
- SANTARPIA, L., LIPPMAN, S. M. & EL-NAGGAR, A. K. (2012). Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(1), 103-119. doi:10.1517/14728222.2011.645805
- SCHIFFRIN, E. L. (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*, 17(12 Pt 1), 1192-1200. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.05.023
- SCHIFFRIN, E. L. (2010). Circulatory therapeutics: use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med*, 14(5), 1018-1029. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01056.x
- SCHLESSINGER, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2), 211-225.

- SCHMID, E., NEEF, S., BERLIN, C., TOMASOVIC, A., KAHLERT, K., NORDBECK, P., . . . LORENZ, K. (2015). Cardiac RKIP induces a beneficial beta-adrenoceptor-dependent positive inotropy. *Nat Med*, 21(11), 1298-1306. doi:10.1038/nm.3972
- SCHULTZ JEL, J., WITT, S. A., GLASCOCK, B. J., NIEMAN, M. L., REISER, P. J., NIX, S. L., . . . DOETSCHMAN, T. (2002). TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest*, 109(6), 787-796. doi:10.1172/JCI14190
- SCHUNKERT, H., JAHN, L., IZUMO, S., APSTEIN, C. S. & LORELL, B. H. (1991). Localization and regulation of c-fos and c-jun protooncogene induction by systolic wall stress in normal and hypertrophied rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24), 11480-11484.
- SCHWARTZ, S. M. (1995). <<The>> vascular smooth muscle cell molecular and biological responses to the extracellular matrix. San Diego etc.: Academic Press.
- SCHWARTZKOPFF, B., MOTZ, W., FRENZEL, H., VOGT, M., KNAUER, S. & STRAUER, B. E. (1993). Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation*, 88(3), 993-1003.
- SCOTT, J. K., HUANG, S. F., GANGADHAR, B. P., SAMORISKI, G. M., CLAPP, P., GROSS, R. A., . . . SMRCKA, A. V. (2001). Evidence that a protein-protein interaction 'hot spot' on heterotrimeric G protein betagamma subunits is used for recognition of a subclass of effectors. *EMBO J*, 20(4), 767-776. doi:10.1093/emboj/20.4.767
- SEARS, R., NUCKOLLS, F., HAURA, E., TAYA, Y., TAMAI, K. & NEVINS, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*, 14(19), 2501-2514.
- SEARS, R. C. (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle*, 3(9), 1133-1137.
- SEELAND, U., SELEJAN, S., ENGELHARDT, S., MULLER, P., LOHSE, M. J. & BOHM, M. (2007). Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic Res Cardiol*, 102(2), 183-193. doi:10.1007/s00395-006-0635-y
- SEGOVIA CUBERO, J., ALONSO-PULPON RIVERA, L., PERAIRA MORAL, R. & SILVA MELCHOR, L. (2004). [Heart failure: etiology and approach to diagnosis]. *Rev Esp Cardiol*, 57(3), 250-259.

- SEIDMAN, C. E., WONG, D. W., JARCHO, J. A., BLOCH, K. D. & SEIDMAN, J. G. (1988). Cis-acting sequences that modulate atrial natriuretic factor gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(11), 4104-4108.
- SHAH, B. H. & CATT, K. J. (2004). Matrix metalloproteinases in reproductive endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, *15*(2), 47-49.
- SHENOY, S. K. & LEFKOWITZ, R. J. (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*, *375*(Pt 3), 503-515. doi:10.1042/BJ20031076
- SHIMOYAMA, M., HAYASHI, D., TAKIMOTO, E., ZOU, Y., OKA, T., UOZUMI, H., . . . KOMURO, I. (1999). Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, *100*(24), 2449-2454.
- SHIN, S. Y., RATH, O., CHOO, S. M., FEE, F., MCFERRAN, B., KOLCH, W. & CHO, K. H. (2009). Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci*, *122*(Pt 3), 425-435. doi:10.1242/jcs.036319
- SILVER, M. A., PICK, R., BRILLA, C. G., JALIL, J. E., JANICKI, J. S. & WEBER, K. T. (1990). Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*, *24*(9), 741-747.
- SLACK-DAVIS, J. K., EBLEN, S. T., ZECEVIC, M., BOERNER, S. A., TARCSAFALVI, A., DIAZ, H. B., . . . CATLING, A. D. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol*, *162*(2), 281-291. doi:10.1083/jcb.200212141
- SLEPAK, T. I., WEBSTER, K. A., ZANG, J., PRENTICE, H., O'DOWD, A., HICKS, M. N. & BISHOPRIC, N. H. (2001). Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor-2D. *J Biol Chem*, *276*(10), 7575-7585. doi:10.1074/jbc.M004625200
- SMITH, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*, *1*, 41-55. doi:10.1385/0-89603-062-8:41
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., . . . KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, *150*(1), 76-85.
- SMRCKA, A. V. (2008). G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*, *65*(14), 2191-2214. doi:10.1007/s00018-008-8006-5

- SOSMAN, J. A., KIM, K. B., SCHUCHTER, L., GONZALEZ, R., PAVLICK, A. C., WEBER, J. S., . . . RIBAS, A. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*, *366*(8), 707-714. doi:10.1056/NEJMoa1112302
- SOULDERS, C. A., BOWERS, S. L. & BAUDINO, T. A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, *105*(12), 1164-1176. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209809
- SOZERI, O., VOLLMER, K., LIYANAGE, M., FRITH, D., KOUR, G., MARK, G. E., 3RD & STABEL, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene*, *7*(11), 2259-2262.
- SPACH, M. S. & BOINEAU, J. P. (1997). Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol*, *20*(2 Pt 2), 397-413.
- SPARROW, D. B., MISKA, E. A., LANGLEY, E., REYNAUD-DEONAUTH, S., KOTECHA, S., TOWERS, N., . . . MOHUN, T. J. (1999). MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *EMBO J*, *18*(18), 5085-5098. doi:10.1093/emboj/18.18.5085
- SPINALE, F. G. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, *87*(4), 1285-1342. doi:10.1152/physrev.00012.2007
- STATISTISCHES BUNDESAMT. (2010). Krankheitskosten. Retrieved from https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten2120720089004.pdf?__blob=publicationFile
- STATISTISCHES BUNDESAMT. (2016). Todesursachen in Deutschland. Retrieved from https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400147004.pdf;jsessionid=428D68BC16DD4F88F425B7F4AB5BD300.cae2?__blob=publicationFile
- STEFANOVSKY, V., LANGLOIS, F., GAGNON-KUGLER, T., ROTHBLUM, L. I. & MOSS, T. (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell*, *21*(5), 629-639. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.023
- STEPHENS, L., SMRCKA, A., COOKE, F. T., JACKSON, T. R., STERNWEIS, P. C. & HAWKINS, P. T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell*, *77*(1), 83-93.

- STEVENS, F. C. (1983). Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol*, 61(8), 906-910.
- STEWART, S., SUNDARAM, M., ZHANG, Y., LEE, J., HAN, M. & GUAN, K. L. (1999). Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5523-5534.
- STORK, P. J. & SCHMITT, J. M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, 12(6), 258-266.
- STORM, S. M., CLEVELAND, J. L. & RAPP, U. R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*, 5(3), 345-351.
- STRATHMANN, M. P. & SIMON, M. I. (1991). G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13), 5582-5586.
- STREICHER, J. M., REN, S., HERSCHMAN, H. & WANG, Y. (2010). MAPK-activated protein kinase-2 in cardiac hypertrophy and cyclooxygenase-2 regulation in heart. *Circ Res*, 106(8), 1434-1443. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213199
- STURGILL, T. W., RAY, L. B., ERIKSON, E. & MALLER, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334(6184), 715-718. doi:10.1038/334715a0
- SU, H. F., SAMSAMSHARIAT, A., FU, J., SHAN, Y. X., CHEN, Y. H., PIOMELLI, D. & WANG, P. H. (2006). Oleylethanolamide activates Ras-Erk pathway and improves myocardial function in doxorubicin-induced heart failure. *Endocrinology*, 147(2), 827-834. doi:10.1210/en.2005-1098
- SUGDEN, P. H. & CLERK, A. (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med (Berl)*, 76(11), 725-746.
- SUN, H., CHARLES, C. H., LAU, L. F. & TONKS, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 75(3), 487-493.
- SUSSMAN, M. A., LIM, H. W., GUDE, N., TAIGEN, T., OLSON, E. N., ROBBINS, J., . . . MOKKENTIN, J. D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*, 281(5383), 1690-1693.
- SUTTON, M. G. & SHARPE, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101(25), 2981-2988.

- TAKEDA, N. & MANABE, I. (2011). Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflam*, 2011, 535241. doi:10.4061/2011/535241
- TANOUE, T., ADACHI, M., MORIGUCHI, T. & NISHIDA, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, 2(2), 110-116. doi:10.1038/35000065
- TARDIFF, J. C. (2006). Cardiac hypertrophy: stressing out the heart. *J Clin Invest*, 116(6), 1467-1470. doi:10.1172/JCI28884
- TARNAVSKI, O., MCMULLEN, J. R., SCHINKE, M., NIE, Q., KONG, S. & IZUMO, S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*, 16(3), 349-360. doi:10.1152/physiolgenomics.00041.2003
- TAYLOR, S. S. & KORNEV, A. P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*, 36(2), 65-77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006
- TEMIN, H. M. & MIZUTANI, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252), 1211-1213.
- THEODOSIOU, A. & ASHWORTH, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol*, 3(7), REVIEWS3009.
- THORBURN, A., THORBURN, J., CHEN, S. Y., POWERS, S., SHUBEITA, H. E., FERAMISCO, J. R. & CHIEN, K. R. (1993). HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*, 268(3), 2244-2249.
- TOHGO, A., PIERCE, K. L., CHOY, E. W., LEFKOWITZ, R. J. & LUTTRELL, L. M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem*, 277(11), 9429-9436. doi:10.1074/jbc.M106457200
- TORII, S., NAKAYAMA, K., YAMAMOTO, T. & NISHIDA, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem*, 136(5), 557-561. doi:10.1093/jb/mvh159
- TORNIG, J., GROSS, M. L., SIMONAVICIENE, A., MALL, G., RITZ, E. & AMANN, K. (1999). Hypertrophy of intramyocardial arteriolar smooth muscle cells in experimental renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 10(1), 77-83.

- TRAN, N. H. & FROST, J. A. (2003). Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem*, 278(13), 11221-11226. doi:10.1074/jbc.M210318200
- TRAN, N. H., WU, X. & FROST, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *J Biol Chem*, 280(16), 16244-16253. doi:10.1074/jbc.M501185200
- TRZASKOWSKI, B., LATEK, D., YUAN, S., GHOSHDASTIDER, U., DEBINSKI, A. & FILIPEK, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem*, 19(8), 1090-1109.
- TSUJITA, Y., KATO, T. & SUSSMAN, M. A. (2005). Evaluation of left ventricular function in cardiomyopathic mice by tissue Doppler and color M-mode Doppler echocardiography. *Echocardiography*, 22(3), 245-253. doi:10.1111/j.0742-2822.2005.04014.x
- TSYGANKOVA, O. M., KUPPERMAN, E., WEN, W. & MEINKOTH, J. L. (2000). Cyclic AMP activates Ras. *Oncogene*, 19(32), 3609-3615. doi:10.1038/sj.onc.1203680
- TURNER, N. A. (2014). Effects of interleukin-1 on cardiac fibroblast function: relevance to post-myocardial infarction remodelling. *Vascul Pharmacol*, 60(1), 1-7. doi:10.1016/j.vph.2013.06.002
- TUTEJA, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*, 4(10), 942-947.
- UBERSAX, J. A. & FERRELL, J. E., JR. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 530-541. doi:10.1038/nrm2203
- VAN BIESEN, T., LUTTRELL, L. M., HAWES, B. E. & LEFKOWITZ, R. J. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 17(6), 698-714. doi:10.1210/edrv-17-6-698
- VAN WAMEL, A. J., RUWHOF, C., VAN DER VALK-KOKSHOORN, L. J., SCHRIER, P. I. & VAN DER LAARSE, A. (2002). Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF-beta1 expression in cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*, 236(1-2), 147-153.
- VANTAGGIATO, C., FORMENTINI, I., BONDANZA, A., BONINI, C., NALDINI, L. & BRAMBILLA, R. (2006). ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol*, 5(5), 14. doi:10.1186/jbiol38

- VASAN, R. S., LARSON, M. G., BENJAMIN, E. J., EVANS, J. C. & LEVY, D. (1997). Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N Engl J Med*, 336(19), 1350-1355. doi:10.1056/NEJM199705083361903
- VENKATAKRISHNAN, A. J., DEUPI, X., LEBON, G., TATE, C. G., SCHERTLER, G. F. & BABU, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185-194. doi:10.1038/nature11896
- VETTER, I. R. & WITTINGHOFER, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. doi:10.1126/science.1062023
- VIDAL, M., WIELAND, T., LOHSE, M. J. & LORENZ, K. (2012). beta-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gbetagamma/Erk-dependent pathway. *Cardiovasc Res*, 96(2), 255-264. doi:10.1093/cvr/cvs249
- VINHAS, M., ARAUJO, A. C., RIBEIRO, S., ROSARIO, L. B. & BELO, J. A. (2013). Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice. *Cardiovasc Ultrasound*, 11, 12. doi:10.1186/1476-7120-11-12
- VLIEGEN, H. W., VAN DER LAARSE, A., CORNELISSE, C. J. & EULDERINK, F. (1991). Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J*, 12(4), 488-494.
- VON KRIEGSHEIM, A., BAIOCCHI, D., BIRTWISTLE, M., SUMPTON, D., BIENVENUT, W., MORRICE, N., . . . KOLCH, W. (2009). Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1458-1464. doi:10.1038/ncb1994
- VON KRIEGSHEIM, A., PITT, A., GRINDLAY, G. J., KOLCH, W. & DHILLON, A. S. (2006). Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5. *Nat Cell Biol*, 8(9), 1011-1016. doi:10.1038/ncb1465
- WALSH, R. A., SCHNEIDER, M., VATNER, S., MARBAN, E., SEIDMAN, J. & C.E., S. (2005). *Molecular Mechanisms of Cardiac Hypertrophy and Failure* (pp. 971).
- WANG, A. H., KRULAK, M. J., WU, J., BERTOS, N. R., VEZMAR, M., POSNER, B. I., . . . YANG, X. J. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol*, 20(18), 6904-6912.
- WANG, D., OPARIL, S., FENG, J. A., LI, P., PERRY, G., CHEN, L. B., . . . CHEN, Y. F. (2003). Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension*, 42(1), 88-95. doi:10.1161/01.HYP.0000074905.22908.A6

- WANG, L. & PROUD, C. G. (2002). Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ Res*, 91(9), 821-829.
- WARE, L. B. & MATTHAY, M. A. (2005). Clinical practice. Acute pulmonary edema. *N Engl J Med*, 353(26), 2788-2796. doi:10.1056/NEJMcp052699
- WEBER, J. D., RABEN, D. M., PHILLIPS, P. J. & BALDASSARE, J. J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J*, 326 (Pt 1), 61-68.
- WEBER, K. T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, 13(7), 1637-1652.
- WEEKS, I., BEHESHTI, I., MCCAPRA, F., CAMPBELL, A. K. & WOODHEAD, J. S. (1983). Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. *Clin Chem*, 29(8), 1474-1479.
- WEEKS, K. L. & MCMULLEN, J. R. (2011). The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)*, 26(2), 97-105. doi:10.1152/physiol.00043.2010
- WELLBROCK, C., KARASARIDES, M. & MARAIS, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(11), 875-885. doi:10.1038/nrm1498
- WERRY, T. D., SEXTON, P. M. & CHRISTOPOULOS, A. (2005). "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol Metab*, 16(1), 26-33. doi:10.1016/j.tem.2004.11.008
- WHITE, E. H., KAGI, H. H. & HILL, J. H. M. (1964). Chemilunimescence of Luminol: The Chemical Reaction. *J Am Chem Soc*, 86(5), 940-941. doi:10.1021/ja01059a050
- WILLIAMS, R. H. & LARSEN, P. R. (2002). *Williams textbook of endocrinology* (10th ed.). Philadelphia, Pa.: Saunders.
- WITTINGHOFER, A. & NASSAR, N. (1996). How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci*, 21(12), 488-491.
- WOODCOCK, E. A. & MATKOVICH, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(9), 1746-1751. doi:10.1016/j.biocel.2005.04.011

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2015). Cardiovascular Diseases (CVDs). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- WU, J., DENT, P., JELINEK, T., WOLFMAN, A., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, 262(5136), 1065-1069.
- XIANG, P., DENG, H. Y., LI, K., HUANG, G. Y., CHEN, Y., TU, L., . . . SUNG, R. Y. (2009). Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(2), 343-349. doi:10.1007/s00280-008-0744-4
- XIAO, G., MAO, S., BAUMGARTEN, G., SERRANO, J., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., . . . MACLELLAN, W. R. (2001). Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ Res*, 89(12), 1122-1129.
- XU, D., FARMER, A. & CHOOK, Y. M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 20(6), 782-790. doi:10.1016/j.sbi.2010.09.008
- XU, L. & MASSAGUE, J. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3), 209-219. doi:10.1038/nrm1331
- YAMAGUCHI, O., WATANABE, T., NISHIDA, K., KASHIWASE, K., HIGUCHI, Y., TAKEDA, T., . . . OTSU, K. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest*, 114(7), 937-943. doi:10.1172/JCI20317
- YAMAMOTO, T., EBISUYA, M., ASHIDA, F., OKAMOTO, K., YONEHARA, S. & NISHIDA, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*, 16(12), 1171-1182. doi:10.1016/j.cub.2006.04.044
- YANG, X. P., LIU, Y. H., RHALEB, N. E., KURIHARA, N., KIM, H. E. & CARRETERO, O. A. (1999). Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 2), H1967-1974.
- YANO, M., KIM, S., IZUMI, Y., YAMANAKA, S. & IWAO, H. (1998). Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res*, 83(7), 752-760.

- YAO, Y., LI, W., WU, J., GERMANN, U. A., SU, M. S., KUIDA, K. & BOUCHER, D. M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(22), 12759-12764. doi:10.1073/pnas.2134254100
- YEUNG, K., JANOSCH, P., MCFERRAN, B., ROSE, D. W., MISCHAK, H., SEDIVY, J. M. & KOLCH, W. (2000). Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol*, *20*(9), 3079-3085.
- YIN, F. C., SPURGEON, H. A., RAKUSAN, K., WEISFELDT, M. L. & LAKATTA, E. G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*, *243*(6), H941-947.
- YOKOTA, T. & WANG, Y. (2016). p38 MAP kinases in the heart. *Gene*, *575*(2 Pt 2), 369-376. doi:10.1016/j.gene.2015.09.030
- YOUNG, J. B., QUINONES, M. A., WAGGONER, A. D. & MILLER, R. R. (1980). Diagnosis and quantification of aortic stenosis with pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*, *45*(5), 987-994.
- YUE, T. L., GU, J. L., WANG, C., REITH, A. D., LEE, J. C., MIRABILE, R. C., . . . OHLSTEIN, E. H. (2000a). Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, *275*(48), 37895-37901. doi:10.1074/jbc.M007037200
- YUE, T. L., WANG, C., GU, J. L., MA, X. L., KUMAR, S., LEE, J. C., . . . OHLSTEIN, E. H. (2000b). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res*, *86*(6), 692-699.
- ZANG, M., GONG, J., LUO, L., ZHOU, J., XIANG, X., HUANG, W., . . . LUO, Z. (2008). Characterization of Ser338 phosphorylation for Raf-1 activation. *J Biol Chem*, *283*(46), 31429-31437. doi:10.1074/jbc.M802855200
- ZANNAD, F., DOUSSET, B. & ALLA, F. (2001). Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension*, *38*(5), 1227-1232.
- ZARICH, N., OLIVA, J. L., MARTINEZ, N., JORGE, R., BALLESTER, A., GUTIERREZ-EISMAN, S., . . . ROJAS, J. M. (2006). Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol Biol Cell*, *17*(8), 3591-3597. doi:10.1091/mbc.E05-12-1104

- ZEBISCH, A., STABER, P. B., DELAVAR, A., BODNER, C., HIDEN, K., FISCHEREDER, K., . . . SILL, H. (2006). Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Res*, *66*(7), 3401-3408. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0115
- ZEHORAI, E., YAO, Z., PLOTNIKOV, A. & SEGER, R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol Cell Endocrinol*, *314*(2), 213-220. doi:10.1016/j.mce.2009.04.008
- ZHANG, C. L., MCKINSEY, T. A., CHANG, S., ANTOS, C. L., HILL, J. A. & OLSON, E. N. (2002). Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*, *110*(4), 479-488.
- ZHANG, F., STRAND, A., ROBBINS, D., COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*, *367*(6465), 704-711. doi:10.1038/367704a0
- ZHANG, W., ELIMBAN, V., NIJJAR, M. S., GUPTA, S. K. & DHALLA, N. S. (2003). Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Exp Clin Cardiol*, *8*(4), 173-183.
- ZHENG, C. F. & GUAN, K. L. (1993). Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem*, *268*(15), 11435-11439.
- ZHENG, C. F. & GUAN, K. L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J*, *13*(5), 1123-1131.
- ZHOU, T., SUN, L., HUMPHREYS, J. & GOLDSMITH, E. J. (2006). Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure*, *14*(6), 1011-1019. doi:10.1016/j.str.2006.04.006
- ZHU, J., BALAN, V., BRONISZ, A., BALAN, K., SUN, H., LEICHT, D. T., . . . TZIVION, G. (2005). Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding. *Mol Biol Cell*, *16*(10), 4733-4744. doi:10.1091/mbc.E05-02-0090
- ZIOGAS, A., MOELLING, K. & RADZIWIŁŁ, G. (2005). CNK1 is a scaffold protein that regulates Src-mediated Raf-1 activation. *J Biol Chem*, *280*(25), 24205-24211. doi:10.1074/jbc.M413327200

Danksagung

Nachfolgenden Personen möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank entgegenbringen, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre:

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Kristina Lorenz für die Möglichkeit der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe bedanken, für die langjährige hervorragende Betreuung, ihre Ratschläge und die Unterstützung in allen Belangen. Mein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Catharina Ruppert, die mich mit viel Geduld ins wissenschaftliche Arbeiten einleitete und für die Hilfestellungen bei allen Fragestellungen. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Olga Wiens für die Unterstützung und Mithilfe bei Fibroblasten-Versuchen recht herzlich bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Lorenz, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Hierbei sind besonders Martina Fischer, Nadine Yurdagül-Hemmrich und Marianne Babl zu nennen, die mich in zahlreiche Methoden einarbeiteten und während der gesamten Dauer ausgezeichnet unterstützen.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Freundin Anna, meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Verständnis bedanken.

Curriculum vitae