
Genomweite Suche neuer Modulatoren der Signaltransduktion in kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz



Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

“Doctor rerum naturalium“

an der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Nadine Kramann

aus Bergisch Gladbach

Göttingen 2010

Referent: Professor Dr. Wolfgang Brück

Korreferent: Professor Dr. Uwe Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2011

1	Einleitung	1
1.1	Das Krankheitsbild der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz	1
1.2	Zelluläre Mechanismen kardialer Hypertrophie	2
1.3	Die MAPK Signalkaskade	4
1.4	Die Rolle der MAPK Signalkaskade in kardialer Hypertrophie	6
1.5	Die RAF Proteinfamilie	7
1.6	Die Bedeutung von B-RAF	10
1.7	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Chemikalien.....	12
2.2	Enzyme	14
2.3	Gebrauchswaren	15
2.4	Geräte.....	16
2.5	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	16
2.6	Sterilisation	17
2.7	Puffer und Stammlösungen	17
2.8	Nährmedien	21
2.8.1	Nährmedien für <i>Escherichia Coli</i>	21
2.8.2	Nährmedien für eukaryotische Zellkultur	22
2.9	Biologisches Material	23
2.9.1	Bakterienstämme	23
2.9.2	Eukaryotische Zelllinien.....	23
2.9.3	Adenoviren	23
2.9.4	Antikörper	24
2.9.5	DNA-Plasmide	25
2.9.6	DNA-Konstrukte	25
2.9.7	Synthetische Oligonukleotide	26
2.9.8	Längenstandards	28

2.9.9	Versuchstiere	28
2.9.10	Herkunft des Patientenmaterials	29
2.9.11	cDNA-Library	29
2.10	Datenbanken und Analyse-Software	30
2.11	Zellbiologische Arbeitsmethoden	31
2.11.1	Kultur eukaryotischer Zellen	31
2.11.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	31
2.11.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE®6.....	31
2.12	Primär-Zellbiologische Arbeitsmethoden	32
2.12.1	Isolation ventrikulärer Kardiomyocyten adulter Ratten	32
2.12.2	Kultivierung von Kardiomyocyten adulter Ratten.....	33
2.12.3	Isolation ventrikulärer Kardiomyocyten neonataler Ratten	34
2.12.4	Kultivierung von Kardiomyocyten neonataler Ratten.....	35
2.12.5	Immuncytochemische Färbung und Planimetrie von Kardiomyocyten neonataler Ratten.....	35
2.13	Adenoviraler Gentransfer	36
2.13.1	Herstellung eines Adenovirus	36
2.13.2	Adenoviraler Gentransfer in Kardiomyocyten der Ratte	38
2.14	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	38
2.14.1	Minipräparation von DNA	38
2.14.2	Midipräparation von DNA	39
2.14.3	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	39
2.14.4	Phenol-Chloroform Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	40
2.14.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgeweben.....	40
2.14.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40
2.14.7	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	41
2.14.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	42
2.14.9	Aufreinigung von DNA mittels PCR Purification.....	42
2.15	Enzymatische Modifikation von DNA.....	42

2.15.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	42
2.15.2	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	43
2.15.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
2.15.4	Rekombination von DNA-Fragmenten.....	44
2.15.5	Transformation elektrokompenter Zellen mit Plasmid-DNA.....	45
2.15.6	Transformation hitzekompenter Zellen mit Plasmid-DNA	46
2.16	Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion	46
2.16.1	Polymerase-Kettenreaktion an Plasmid-DNA und cDNA	46
2.16.2	Reverse Transkription	48
2.16.3	<i>Real-Time</i> Quantitative PCR.....	48
2.17	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	50
2.17.1	Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	50
2.17.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	50
2.17.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.17.4	Proteintransfer auf Nitrozellulose mittels Western-Blot.....	52
2.17.5	Detektion von membranengebundenen Proteinen mit Antikörpern	52
2.17.6	Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation	53
2.17.7	Ras-Aktivierungs-Assay	53
2.18	cDNA Library Screen.....	54
2.18.1	Luciferase Reporterassay	54
2.18.2	Screen der Maus cDNA Library	56
2.18.3	Subselektion interessanter Maus cDNA Pools	57
2.19	<i>Knockdown</i> der Expression von Genen mit miR RNAi.....	57
2.20	Ethik.....	58
2.21	Statistische Auswertung.....	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Die Inhibition von B-Raf verhindert die Phenylephrin induzierte Hypertrophie	59
3.2	Die Inhibition von B-Raf führt zu verminderter Mek1/2 Phosphorylierung	61

3.3	Optimierung der Transfektion von COS-7 Zellen	62
3.4	Validitätsprüfung der Fusionsproteine für den Luciferase Reporterassay	64
3.5	Screen der Maus cDNA-Library nach neuen Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion	67
3.6	Untersuchung identifizierter cDNA Klone auf Regulation im hypertrophen Myokard mittels <i>Real-Time</i> PCR	71
3.7	Rcn1 wird signifikant reguliert im hypertrophen Myokard	75
3.8	Expression der Rcn1 mRNA in verschiedenen Organen der Maus	76
3.9	Die Überexpression von Rcn1 führt zu verminderter MEK1/2 Phosphorylierung.....	77
3.10	Die Überexpression von Rcn1 verhindert die Phenylephrin induzierte Hypertrophie	79
3.11	<i>Knockdown</i> von Rcn1 in NIH3T3-Zellen	81
3.12	Der <i>Knockdown</i> von Rcn1 führt zu einer Verstärkten B-RAF/Mek1 Interaktion in NIH3T3-Zellen.....	82
3.13	Der <i>Knockdown</i> von Rcn1 führt zu einer erhöhten Mek1/2 Phosphorylierung in Kardiomyocyten	83
3.14	Der <i>Knockdown</i> von Rcn1 führt zu kardialer Hypertrophie	84
3.15	Rcn1 wirkt unterhalb von Ras	86
3.16	Rcn1 inhibiert die C-RAF Kinaseaktivität in Kardiomyocyten.....	87
3.17	Die Expression von RCN1 in humanem Myokard.....	88
3.18	Test der im cDNA Library Screen Modulatoren auf C-RAF/B-RAF Spezifität	89
3.19	Luciferase Reporterassay in Kardiomyocyten	91
4	Diskussion.....	93
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	93
4.2	B-RAF reguliert die kardiale Hypertrophie.....	95
4.3	Die Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion	97
4.3.1	Die Aktivoren der B-RAF/Mek1 Interaktion.....	97
4.3.2	Aktivoren der B-RAF/Mek1 Interaktion und ihre Regulation im hypertrophen Myokard	99
4.3.3	Inhibitoren der B-RAF/Mek1 Interaktion	101
4.4	Reticulocalbin ist ein Mitglied der CREC-Proteinfamilie	103

4.4.1	Rcn1 – ein Überblick.....	104
4.4.2	Rcn1 inhibiert B-RAF und C-RAF.....	106
4.4.3	Rcn1 Expression im hypertrophen Myokard.....	107
4.5	Die Regulation der MAPK Signalkaskade	108
4.6	Perspektiven.....	110
5	Zusammenfassung	112
6	Literaturverzeichnis.....	115
	Danksagung.....	136

A	Ampere
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Cyanin-3
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro = 10 ⁻⁶
m	milli = 10 ⁻³
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA = Boten-RNA
n	nano = 10 ⁻⁹
OD	Optische Dichte
p	pico = 10 ⁻¹²
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit = definierte Enzymeinheit
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Laut Angaben des statistischen Bundesamtes Deutschland lag im Jahr 2008 bei 43% aller Verstorbenen eine solche Erkrankung vor. Besonders häufig sind Menschen über dem 65sten Lebensjahr betroffen. Bei Ihnen gelten Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 91% als Haupttodesursache. Weltweit werden laut Schätzungen der WHO (*world health organisation*) bis 2015 etwa 20 Millionen Menschen an Herz-Kreislaferkrankungen und ihren Folgen sterben. Durch die hohe Anzahl an Krankheitsfällen sind auch die wirtschaftlichen Folgen nicht zu unterschätzen. Herz-Kreislaferkrankungen verursachen die höchsten Krankheitskosten. Für Prävention, Behandlung, Pflege und Rehabilitation von Patienten mit Herz-Kreislaferkrankungen wurden alleine in Deutschland im Jahr 2006 rund 35 Milliarden Euro benötigt. Daher soll die grundlegende Erforschung dieser Krankheit bis in die molekularen Mechanismen neue Ansatzmöglichkeiten für das Verständnis der Entstehung und des Ablaufes von Herz-Kreislaferkrankungen bieten (www.gbe-bund.de).

Bei der Herzinsuffizienz handelt es sich um eine Funktionsstörung der Pumpleistung des Herzens. Blut kann nicht in ausreichender Menge weitergeleitet werden um die Versorgung des Körpers und seiner Organe mit adäquaten Mengen Sauerstoff zu gewährleisten. Organversagen kann Folge dieser Mangelversorgung sein. Die Herzinsuffizienz kann durch eine Vielzahl von Vorerkrankungen induziert werden. Typischerweise handelt es sich dabei um langjährige Hypertonie, Myokardinfarkt, Herzklappendefekte, Myokarditis, angeborene Herzfehler, familiäre hypertrophe Kardiomyopathie und diabetische Kardiomyopathie (Klein et al., 2003; Lips et al., 2003). Folge dieser Vielzahl von Stimuli ist in der Regel zunächst ein kompensatorischer Zustand. In diesem wird durch physiologische Kompensationsprozesse wie einer kardialen Hypertrophie mit einem Wachstum der Myozyten die verminderte Pumpleistung des Herzens ausgeglichen (Seidman und Seidman 2001). Patienten in diesem Stadium zeigen kaum Symptome und sind weitgehend beschwerdefrei. Die Hypertrophie äußert sich typischerweise in einer Vergrößerung der Myozyten, einer veränderte Proteinbiosynthese und einem vermehrten Zusammenschluss kontraktile Untereinheiten im Myokard (Seidman und Seidman 2001; Olson und Schneider 2003). Die kardiale Hypertrophie ist mehr als eine globale Wachstumsreaktion der Myozyten. Sie führt auch zu intrinsischen Dysfunktionen als Folge einer Umprogrammierung des Transkriptionsapparates der Zelle. Diese Umprogrammierung geht mit einer Reaktivierung von

Genexpressions- und Proteinbiosynthesemustern einher, von denen viele normalerweise nur in der fetalen Entwicklungsperiode des Myokards vorkommen. So führt länger anhaltende Hypertrophie zu schwerer Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod (Song et al., 2006). In diesem späteren, dekompensierten Stadium leiden Patienten häufig unter Symptomen wie Ödemen, Herzrhythmusstörungen und schneller Ermüdung, was die Lebensqualität erheblich einschränkt. Aus diesem Grund stellt die frühe Behandlung der Hypertrophie, ungeachtet der jeweiligen Ursache, ein wichtiges Therapiekonzept in der Behandlung von Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod dar.

1.2 Zelluläre Mechanismen kardialer Hypertrophie

Adulte Kardiomyocyten sind terminal ausdifferenzierte Zellen, die den Zellzyklus seit der perinatalen Periode verlassen haben. Somit haben sie die Fähigkeit der Zellteilung verloren (Sugden und Clerk 1998). Daher scheidet Zellteilung als Reaktion auf die vermehrte Pumpleistung des Herzens aus. Bei einer Hypertrophie kommt es sowohl zu einer Volumenzunahme der Zellen aufgrund der gesteigerten Protein- und RNA-Biosynthese (Sudgen und Clerk, 1998; Yamazaki et al., 1998) als auch zu einer Vermehrung der funktionellen Substanz des Myokards bei konstanter Zellzahl (Olson und Schneider 2003). Man unterscheidet zwei Formen der Hypertrophie, die konzentrische und exzentrische Hypertrophie. Bei erhöhter Druckbelastung führt die gesteigerte systolische Wandspannung zu einer Neubildung von Myofibrillen. Das führt zu einer starken Zunahme der Wanddicke des Ventrikels bei gleichbleibendem Innenvolumen, was als konzentrische Hypertrophie bezeichnet wird. Sie ist assoziiert mit einem vergrößerten Myozytendurchmesser relativ zur Zelllänge mit paralleler Deposition der Sarkomere (Smith und Bishop 1985; Campbell et al., 1989; Campbell et al., 1991; Gerdes et al., 1988).

Bei gesteigerter Volumenbelastung durch Herzklappeninsuffizienz oder andere Gegebenheiten, bei denen der kardiale Ausstoß vergrößert ist, kommt es zu einer Steigerung der initialen diastolischen Wandspannung. Die Ventrikelwand nimmt proportional zu Ventrikelvolumen und -radius zu, und man spricht von einer exzentrischen Hypertrophie. Sie ist assoziiert mit einer Verlängerung des kontraktiven Apparats relativ zum Myozytendurchmesser durch die Synthese neuer Sarkomere (Gerdes et al., 1988).

Durch die hypertrophe Stimulation von Myozyten kommt es unverzüglich zu einer verstärkten Expression der Transkriptionsfaktoren Egr-1, c-fos, c-jun und c-Myc. Dabei wird vermutet, dass die Aktivierung dieser so genannten „early response genes“ eine unspezifische Antwort ausdifferenzierter Zellen ist auf die durch Wachstum induzierten Reize anzusprechen (Izumo et al., 1988; Kurabayashi et al., 1988; van Bilsen und Chien 1993). Eine weitere, spezifischere

Reaktion auf hypertrophe Stimuli folgt durch die Re-Expression von Genen, die während der Embryonalentwicklung im Herzen exprimiert werden. Die Re-Expression des *atrial natriuretic factor* (ANF) in den Myozyten ist sowohl in konzentrischer als auch exzentrischer Hypertrophie charakteristisch (Calderone et al., 1995). Andere fetale Gene, wie die Strukturproteine *skeletal muscle α -actinin* und *β -myosin heavy chain*, scheinen eher in der konzentrischen Hypertrophie spezifisch höher exprimiert zu werden (Calderone et al., 1995). Analog zur Steigerung der ANF Expression kommt es zu einer Steigerung der Expression des mit ihm nahe verwandten *brain natriuretic peptide* (BNP) (Hanford et al., 1994). Die Sekretion der Peptid-Hormone BNP und ANF stellen diagnostisch verwendete Marker der Herzinsuffizienz dar (Dao et al., 2001).

Die Zunahme des Proteingehalts in der Zelle wird vor allem durch den Anstieg der allgemeinen Proteinsynthese verursacht (Sugden und Fuller 1991), während die Proteindegradation weitgehend unverändert bleibt (McDermott und Morgan 1989). Notwendig dafür ist eine Zunahme der Ribosomen, da bereits im nicht hypertrophen Zustand 90% der Ribosomen ausgelastet sind (Morgan et al., 1992; Hannan und Rothblum 1995).

Auch der Zelltod spielt eine bedeutende Rolle in der Herzinsuffizienzentstehung. Kommt es zur Entwicklung einer pathologischen Herzinsuffizienz geht diese häufig mit dem progressiven Untergang von Kardiomyocyten einher. Diese werden teilweise durch Bindegewebe ersetzt, was zu einer Versteifung des Myokards und damit zu einer verminderten diastolischen Füllung und systolischen Pumpfunktion führt. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei Arten des Zelltods: Apoptose, Autophagie und Nekrose. Die Apoptose wird über zwei zentrale Signalwege vermittelt und ist während der Evolution hoch konserviert. Der intrinsische Signalweg stimuliert die Bindung des Multiprotein Komplexes DISC (*death inducing signaling complex*), was zur Aktivierung von Procaspase-8 führt. Die aktivierte Caspase-8 induziert die proteolytische Spaltung der Procaspase-3, die anschließend als Caspase-3 den Zelltod einleitet. Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung von Liganden an einen Zelloberflächenrezeptor initiiert, die über Proteine der Bcl-2-Familie zu den Mitochondrien transmittiert werden (Crow et al., 2004). Langlebige Proteine und Organellen werden mit Hilfe von Autophagie degradiert. Dieser Prozess ist primär abhängig von den Lysosomen und bewirkt durch den Abbau von Proteinen einen erhöhten Anteil von freien Aminosäuren und Fettsäuren in der Zelle (Dunn 1990). Bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen tritt vermehrt Autophagie auf (Decker und Wildenthal, 1980; Shimomura et al., 2001). Ob diese zu direktem Zelltod führt oder eine eher protektive Wirkung auf die Zelle hat, ist noch unklar (Zhu et al., 2007; Hamacher-Brady et al., 2006). Nekrose ist ein irreversibler Prozess, hervorgerufen durch oxidativen Stress oder toxische Substanzen. Zunächst kommt es zu einem typischen Anschwellen der Zelle. In der Folge stellen sich eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes und eine Rekrutierung von Makrophagen ein. Diese schütten entzündliche

Botenstoffe wie den Tumornekrosefaktor (TNF) aus, was zur Apoptose betreffender Zellen führt. Nach einem Herzinfarkt wird der nekrotische Gewebeteil durch eine bindegewebsartige Narbe ersetzt, was zu entsprechenden Funktionseinschränkungen führt (Eichbaum 1975).

1.3 Die MAPK Signalkaskade

Der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalweg reguliert Wachstum, Proliferation, Überleben und Alterung der Zelle als Folge extrazellulärer Signale (Robbins und Cobb 1997; Wellenbrock et al., 2004) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung kardialer Hypertrophie (Sugden und Clerk 1998; Lips et al., 2003; Bueno et al., 2000).

Dieser Signalweg beginnt mit Ras (*Rat sarcoma*), das an der inneren Plasmamembran lokalisiert ist. Ras ist ein Guanin-Nukleotid-bindendes Protein, welches stimulationsabhängig zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechselt (Downward, 1996). Die Ras-Proteinfamilie von Säugern umfasst die vier Proteine H-Ras, N-Ras, K-(A)Ras und K-(B)Ras (Barbacid, 1987). Wahrscheinlich kodieren diese Gene Proteine mit nicht redundanten Funktionen. Einen Hinweis darauf liefern die unterschiedlichen Expressionsmuster der Ras Proteine in den verschiedenen Organen und während der Entwicklung. H-Ras zeigt die höchste Expression in Gehirn, Haut und Muskel, während K-Ras am höchsten in Darm, Lunge und Thymus, und NRas hauptsächlich in Testis und Thymus exprimiert wird (Leon et al., 1987). Zudem zeigen verschiedene *Knockout* Studien, dass k-ras eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielen muss (Johnson et al., 1997; Koera et al., 1997), da k-ras defiziente Mäuse am Entwicklungstag 12.5 sterben, während weder h-ras noch n-ras für die Embryonalentwicklung essentiell zu sein scheinen. Auch das gleichzeitige Fehlen von h-ras und n-ras führt weder zu Entwicklungsdefekten noch zu einem postnatalen Phänotyp (Esteban et al., 2001).

Ras ist der übergeordnete Regulator der RAF-Proteine (*rat fibrosarcoma*) (Robbins et al., 1994). Die Bindung von extrazellulären Liganden wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Hormonen an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert Ras. Aktiviertes Ras transloziert RAF zur Plasmamembran, um den Signalweg, der die Änderung des Phosphorylierungsstatus und die Bindung an andere Enzyme und Scaffold Proteine beinhaltet, zu starten (Kolch 2000). Darauf folgend phosphoryliert RAF die dual-spezifischen Proteinkinasen MEK1/2 (*mitogen activated protein kinase*) und diese wiederum die Proteine ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase*). Die Komplexität dieses Signalwegs spiegelt sich in der Vielzahl seiner Komponenten wieder. Es gibt neben den vier beschriebenen Ras-Genen drei RAF-Gene (A-RAF, B-RAF, C-RAF), sowie zwei MEK- (MEK1, MEK2) und ERK- (ERK1 und ERK2) Gene, die Proteine mit nicht redundanten Funktionen kodieren. Desweiteren ist der

Signalweg nicht linear. Durch die Heterodimerisierung von B-RAF mit C-RAF ist B-RAF in der Lage, C-RAF auf Ras-unabhängige Weise zu aktivieren (Garnett et al., 2005), (Abb.1.3). Außerdem unterscheiden sich die RAF-Isoformen unter anderem in ihrer Fähigkeit, MEK zu aktivieren (Marais et al., 1997). B-RAF besitzt die höchste MEK-Kinaseaktivität, gefolgt von C-RAF und A-RAF (Pritchard et al., 1995). Abhängig vom zellulären Kontext steuert dieser Signalweg diverse biologische Funktionen wie Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung überwiegend durch die Regulation von Transkription, Metabolismus und Cytoskelettorganisation.

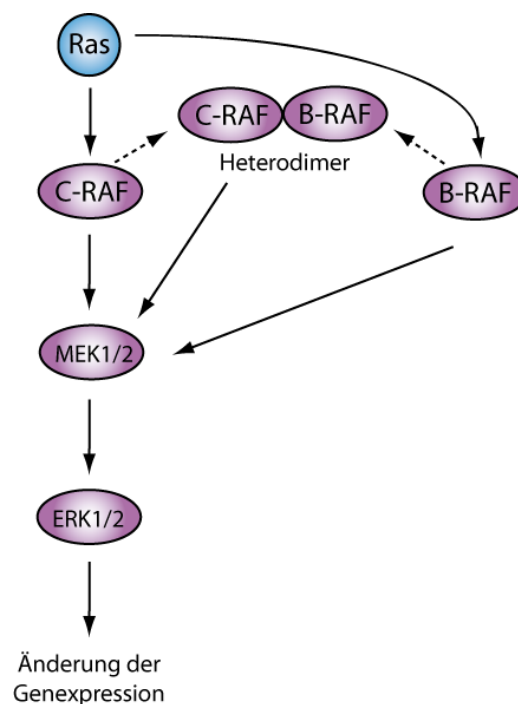


Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung der MAPK Signalkaskade. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Hormonen aktiviert der G-Protein gekoppelte Rezeptor Ras. Ras aktiviert und phosphoryliert anschließend RAF. Durch die Bildung von Heterodimeren ist aktives B-RAF in der Lage C-RAF zu aktivieren. RAF phosphoryliert die dual-spezifischen Proteinkinasen MEK1/2 und diese wiederum die Proteine ERK1/2. Aktiviertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern und bewirkt dort eine Änderung der Genexpression. Abhängig vom Startstimulus steuert dieser Signalweg wichtige Funktionen wie Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung der Zelle.

1.4 Die Rolle der MAPK Signalkaskade in kardialer Hypertrophie

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen die Bedeutung der MAPK Signalkaskade in der kardialen Hypertrophie.

Ras spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie. Durch Mikroinjektion von aktiviertem Ras Protein in kultivierte Kardiomyocyten kommt es zu einer gesteigerten ANF-Expression und einer Veränderung der Struktur der Myofibrillen (Thorburn et al., 1993). Beides sind charakteristische Anzeichen einer kardialen Hypertrophie. Dieses Ergebnis wird durch eine herzspezifische Überexpression von konstitutiv aktivem H-Ras in transgenen Mäusen bestätigt. Sie führt zu kardialer Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion des Herzens (Hunter et al. 1995).

Der herzspezifische *c-raf Knockout* führt in Mäusen zu Herzdilatationen und Dysfunktion des linken Ventrikels. Weiterhin kann ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen festgestellt werden. Allerdings entwickeln diese Mäuse keine Hypertrophie und keine erhöhte Letalität. Die Expressionsmuster von Mek und Erk sind unverändert, was darauf hinweist, dass es einen weiteren Aktivator von Mek und Erk geben muss, der den Ausfall von C-Raf kompensieren kann (Yamaguchi et al., 2004).

Eine herzspezifische Überexpression von Mek1 führt in transgenen Mäusen zu einer kompensierten konzentrischen Hypertrophie. Da die Herzen eine erhöhte Pumpleistung aufweisen, handelt es sich bei diesem Phänotyp um einen kompensierten Zustand der Hypertrophie, der sich nicht zu einer Herzinsuffizienz weiterentwickelt (Bueno et al., 2000).

Die Aktivierung von ERK1/2 kann zahlreiche Vorgänge wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose auslösen (Reddy et al., 2003). Die Funktion von ERK wird hauptsächlich durch die intrazelluläre Lokalisation bestimmt. Abhängig vom Stimulus wechselt ERK zwischen Zellkern und Zytoplasma. Durch eine mitogene Stimulation akkumuliert aktiviertes ERK für einige Minuten im Zellkern (Pouyssegur et al., 2002), wo es weitere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Elk-1 aktiviert (Sharrocks 2001). Ein neu entdeckter Mechanismus, der ERK1/2 involviert, führt ebenfalls zu kardialer Hypertrophie. Über einen komplizierten Prozess autophosphoryliert ERK1/2 an Thr188. Das aktivierte ERK1/2 wandert anschließend in den Zellkern, um dort seine Zielproteine zu aktivieren (Lorenz et al., 2009). Die ERK1/2 Substrate Elk1, Msk1 und c-Myc, sind an der Entstehung der kardialen Hypertrophie beteiligt (Bueno und Molkentin 2002; Zhong et al., 2006; Markou et al., 2004).

1.5 Die RAF Proteinfamilie

Alle RAF Proteine zeigen eine ähnliche Architektur mit drei konservierten Regionen (CRs). Zwei davon (CR1 und CR2) befinden sich am N-Terminus, die dritte (CR3), welche die Kinasedomäne kodiert, befindet sich am C-Terminus (Abb. 1.5). RAF Proteine unterliegen einer komplexen Regulation, die sich in einer Vielzahl von Phosphorylierungsstellen widerspiegelt. Diese verteilen sich über das gesamte Protein. Ras bindet direkt an die N-terminale Regulierungsdomäne der RAF Proteine (Wittinghofer und Nassar 1996), wenn es selbst in der aktiven, GTP gebundenen Form vorliegt. Die Bindung von Ras erfolgt an die sogenannte *Ras binding domain* (RBD). Diese formt anschließend eine sekundäre Interaktion mit der Cystein-reichen Domäne (CRD) aus, die sich ebenfalls in CR1 befindet. Die vier bekannten Ras Proteine (HRas, NRas, K(A)Ras, K(B)Ras) binden mit unterschiedlicher Affinität an die RBD der individuellen RAF Proteine (Weber et al., 2000). Auch wenn die Bedeutung dieser Unterschiede noch nicht klar ist, weist dies auf eine unterschiedliche Regulation der RAF Isoformen hin. Die Fähigkeit von Ras an RAF zu binden, wird durch weitere Signalmoleküle wie 14-3-3 gesteuert. Dieses dimere Adaptorprotein bindet eine Vielzahl von Proteinen abhängig von deren Phosphorylierungsstatus (Tzivion und Avruch 2002). Es bindet an die CR2-Domäne von C-RAF, wenn dieses an S259 phosphoryliert ist. Diese Bindung von 14-3-3 vermittelt die Bindung an Ras (Dhillon et al., 2002; Light et al., 2002) und B-RAF (Avruch et al., 2001). Ras-GTP ist in der Lage die Bindung von 14-3-3 an die CR2 Domäne *in vitro* wieder zu zerstören (Clark et al., 1997; Rommel et al., 1996). RBD und CRD sind hoch konserviert in allen RAF Isoformen.

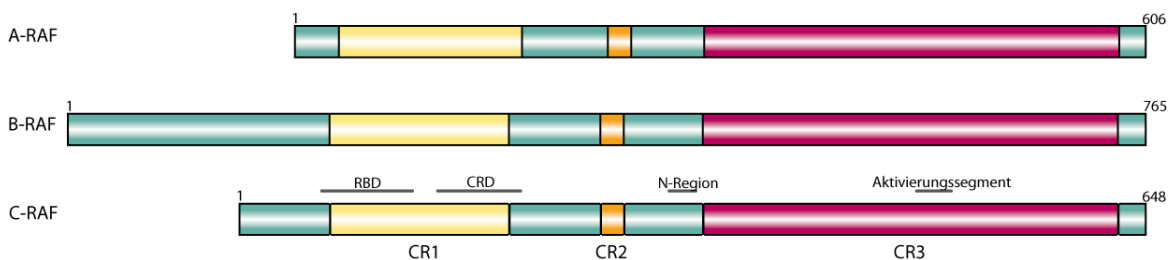


Abbildung 1.5 Struktur der RAF Proteine. Die RAF Isoformen A-RAF, B-RAF und C-RAF haben 3 konservierte Regionen gemeinsam: CR1 (gelb), CR2 (orange) und CR3 (rot). CR1 enthält die Ras Bindungsdomäne (RBD) und die Cystein-reiche Domäne (CRD), die beide für die Rekrutierung zur Membran benötigt werden. CR2 enthält die 14-3-3 Bindungsdomäne. CR3 enthält die katalytische Domäne mit dem Aktivierungssegment. Die sogenannte *negative charged regulatory region* oder N-Region liegt vor der CR3 Region und ist in allen RAF Isoformen konserviert.

A-RAF ist mit 69 kDa die kleinste der drei Isoformen. C-RAF ist 72-74 kDa groß und B-RAF unterliegt alternativem Spleißen was zu verschiedenen Proteinen führt, deren Größe zwischen 75-100 kDa variiert (Barnier et al., 1995; Storm et al., 1990). RAF mRNA wird ubiquitär exprimiert, wobei A-RAF sowohl in embryonalem und adultem Mausgewebe exprimiert wird (Luckett et al., 2000). B-RAF wird ebenfalls in allen Mausgeweben hoch exprimiert, allerdings in den meisten Geweben niedriger als in neuronalen Geweben.

Genetische Studien an Mäusen haben gezeigt, dass RAF Proteine während der Entwicklung nicht redundante Funktionen steuern. A-raf defiziente *Knockout* Mäuse überleben zwar die Geburt, sterben aber 7-21 Tage danach an neurologischen und gastrointestinalen Defekten (Pritchard et al., 1996). Dagegen sterben b-raf und c-raf defiziente Mausembryonen *in utero* zwischen Tag 10.5 und 12.5 der Embryonalentwicklung (Wojonowski et al., 1997; Hüser et al., 2001; Mikula et al., 2001). Die b-raf defizienten Embryonen zeigen Wachstumsverzögerungen und vaskuläre sowie neuronale Defekte. C-raf defiziente Embryonen sterben offenbar an massiver Apoptose in der Leber. Die fehlende Kompensation der RAF Proteine in der Maus untereinander scheint nicht die Folge von unterschiedlichen Expressionsmustern zu sein, was impliziert, dass den Isoformen individuelle Funktionen zufallen.

Die Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung der RAF Proteine. Der Fokus der Untersuchungen lag bis jetzt auf C-RAF, daher ist das Verständnis der Aktivierung von C-RAF nahezu vollständig. Einige Phosphorylierungsstellen inhibieren die C-RAF Aktivität (Dumaz et al., 2001). Diese Stellen werden durch die Protein Kinase A (PKA) angesprochen (Dumaz und Marais 2003) einer Cyclin-abhängigen Kinase (Mischak et al., 1996). Steigt der cAMP Spiegel in der Zelle werden drei Phosphorylierungsstellen aktiviert: S43, S233 und S259 (Dhillon et al., 2002; Wu et al., 1993; Sidovar et al., 2000; Dumaz et al., 2001; Dumaz und Marais 2003). Die Phosphorylierung von S43 scheint die Bindung des N-Terminus von C-RAF an Ras sterisch zu hindern (Wu et al., 1993). Fünf Phosphorylierungsstellen innerhalb und in unmittelbarer Nähe der Kinasedomäne stimulieren die C-RAF Aktivität. Zwei wichtige Phosphorylierungsstellen, S338 und Y341, liegen in der N-terminalen CR3 Region (King et al., 1998; Marais et al., 1995; Fabian et al., 1993, Mason et al., 1999). Dort liegen sie in einer Subdomäne, der N-Region. Die negative Ladung innerhalb dieser N-Region ist essentiell für die C-RAF Kinaseaktivität (Mason et al., 1999). Eine Phosphorylierung beider Reste hebt die inhibierende Funktion der N-Region auf die Kinasedomäne auf (Avruch et al., 2001; Wellenbrock et al., 2004). SRC (*sarcoma*) Kinasen sind in der Lage Y341 *in vitro* und in Zellkultur zu phosphorylieren (Marais et al., 1995; Marais et al., 1997; Fabian et al., 1993, Chow et al., 1995; King et al., 2001; Tilbrook et al., 2001). Zwei weitere Phosphorylierungsstellen T491 und S494 liegen innerhalb der Kinasedomäne in dem sogenannten Aktivierungssegment. Mutationen in diesem Bereich lassen die Kinaseaktivität vollständig zum Erliegen kommen (Chong et al.,

2001). Analog zu B-RAF wird vermutet, dass die Phosphorylierung von T491 die Aktivierung durch die Trennung der Interaktion von Glycin-reichem Loop und Aktivierungssegment sterisch begünstigt (Wan et al., 2004). Abschließend ermöglicht die Phosphorylierung von S621 im C-Terminus von C-RAF die Bindung des 14-3-3 Adaptorproteins (Light et al., 2002; Jaumot und Hancock 2001; Tzivion et al., 1998; Yip-Schneider et al., 2000). Dieser Schritt ist ebenfalls für die Aktivierung von C-RAF notwendig (Avruch et al., 2001; Wellenbrock et al., 2004). Die Bindung von 14-3-3 an diese konservierte Region scheint die Formation eines C-RAF/B-RAF Heterodimers herbeizuführen (Weber et al., 2000). In B-RAF ist diese konservierte Region im C-Terminus verantwortlich für die Kupplung der Signale zu MEK (MacNicol et al., 2000). Die Bindung von 14-3-3 an diese Region der RAF Isoformen scheint unterschiedlich und dynamisch reguliert (Hekman et al., 2004). Kinasen die für diese Phosphorylierungsstelle zuständig sein könnten, wurden bis jetzt noch nicht entdeckt.

Bei der Phosphorylierung zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den RAF Isoformen. Die fünf Phosphorylierungsstellen, die für die vollständige C-RAF Aktivität benötigt werden, sind auch in A-RAF konserviert. Daher wird vermutet, dass A-RAF durch einen ähnlichen Mechanismus aktiviert wird wie C-RAF (Marais et al., 1997). B-RAF weist dagegen deutliche Unterschiede auf. Zum einem sind nur vier der fünf aktivierenden Phosphorylierungsstellen konserviert und nur drei von ihnen scheinen über eine ähnliche Funktion zu verfügen. S728 aus B-RAF entspricht S621 in C-RAF und vermittelt ebenfalls die Bindung des Adaptorproteins 14-3-3 an den C-Terminus von B-RAF. Wie in C-RAF sind die Phosphorylierungsstellen des Aktivierungssegments T598 und S601 in B-RAF notwendig für die Aktivierung (Zhang und Guan, 2000). Der deutlichste Unterschied von B-RAF zu den anderen beiden RAF Isoformen befindet sich in der N-Region. B-RAF fehlt eine Phosphorylierungsstelle äquivalent zu Y341 aus C-RAF. Das Äquivalent zu der zweiten Phosphorylierungsstelle S338 ist konserviert in B-RAF (S445) aber konstitutiv phosphoryliert (Mason et al., 1999). Während die N-Region von A-RAF und C-RAF phosphoryliert werden muss um eine negative Ladung zu erhalten, die für die vollständige Aktivität beider Isoformen notwendig ist trägt die N-Region von B-RAF durch die konstitutive Phosphorylierung eine konstante negative Ladung. Somit besitzt B-RAF eine starke basale Kinaseaktivität im Gegensatz zu C-RAF (Mason et al., 1999). B-RAF benötigt zusätzlich nur die Ras vermittelte Aktivierung während C-RAF und A-RAF auf weitere Signale von Tyrosin Kinasen wie z.B. SRC und anderen unbekanntenen Kinasen angewiesen sind. Wahrscheinlich ist genau diese konstitutive Phosphorylierung in der N-Region und die damit verbundene starke basale Aktivität dafür verantwortlich, dass B-RAF in vielen Krebsarten mutiert ist während Mutationen in A-RAF und C-RAF extrem selten sind (Emuss et al., 2005).

1.6 Die Bedeutung von B-RAF

In den letzten Jahren rückte B-RAF weiter in den Fokus des Interesses, allerdings blieben viele Fragen bislang ungeklärt. B-RAF könnte eine weitaus wichtigere Rolle spielen, als bislang angenommen. Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass B-RAF der Hauptaktivator von MEK1/2 in Zellen sein könnte (Jaiswal et al., 1994; Catling et al., 1994; Wojnowski et al., 2000; Pritchard et al., 2004).

B-RAF ist in der Lage C-RAF im Cytosol auf Ras unabhängige Weise zu aktivieren. Dafür benötigt C-RAF die Phosphorylierung des Aktivierungssegments (T491, S494) und die Bindung des Adaptorproteins 14-3-3. Unter basalen Bedingungen besitzt B-RAF eine geschlossene Konformation, wodurch die Bindung an C-RAF sterisch verhindert wird. Die intramolekulare Interaktion eines Glycin-reichen Loops mit dem Aktivierungssegment von B-RAF hält es in einer inaktiven Konformation (Wan et al., 2004). Durch eine Phosphorylierung im Aktivierungssegment von B-RAF nimmt es seine offene Konformation an und die 14-3-3 abhängige Bindung an C-RAF wird ermöglicht. Die benötigte Phosphorylierung des Aktivierungssegments von C-RAF ist abhängig von der B-RAF Kinaseaktivität. Daher wird vermutet, dass B-RAF die Phosphorylierung des Aktivierungssegments von C-RAF entweder direkt oder indirekt durch die Rekrutierung weiterer Kinasen steuert (Avruch et al., 2001). Anders als bei einer Aktivierung durch Ras scheint die N-Region nicht wichtig für die Aktivierung von C-RAF durch B-RAF (Garnett et al., 2004).

Obwohl alle drei RAF Isoformen in der Lage sind MEK1/2 *in vitro* zu aktivieren (Marais et al., 1997), bindet und phosphoryliert B-RAF MEK1/2 effizienter als A-RAF und C-RAF (Marais et al., 1997; Papin et al., 1996). Eine induzierbare Form von B-RAF stimuliert außerdem zuverlässiger und konstanter die ERK Phosphorylierung als gleiche C-RAF und A-RAF Konstrukte (Pritchard et al., 1995). Eine Studie von Zellfraktionen zeigt, dass B-RAF und nicht C-RAF die hauptsächliche MEK Kinase in Zellen ist (Jaiswal et al., 1994; Catling et al., 1994). Der Abbau von B-RAF in Hirnlysaten führt zu einem 96%igen Verlust von Ras assoziierter MEK Aktivierung (Jaiswal et al., 1994). Zusätzlich weisen embryonale *b-raf*^{-/-} Mausfibroblasten eine stark reduzierte ERK Aktivität auf (Wojnowski et al., 2000), während die ERK Aktivität in *c-raf*^{-/-} und *a-raf*^{-/-} Fibroblasten weitgehend normal bleibt (Hüser et al., 2001; Mikula et al., 2001; Mercer et al., 2002). Die ERK Aktivierung durch Wachstumsfaktoren ist in *b-raf* defizienten Fibroblasten der Maus stark eingeschränkt (Pritchard et al., 2004). Dies weist darauf hin, dass B-RAF diejenige RAF Isoform ist, die hauptsächlich die Signale in der Zelle an ERK weiterleitet.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In über 25 Jahren Forschung auf dem Gebiet der MAPK Signalkaskade und der RAF Proteine wurde der primäre Fokus bis jetzt auf C-RAF gelegt. Aber es ist wichtig zu erkennen, dass alle drei RAF-Isoformen wichtige Vermittler der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale sind, da ihnen nicht redundante Aufgaben zufallen. Lange Zeit wurde angenommen, dass das Signal von Ras sowohl an B-RAF und C-RAF weitergeleitet wird, und diese unabhängig voneinander MEK1/2 aktivieren. Mittlerweile zeigen neue Ergebnisse das B-RAF eine weitaus wichtigere Rolle spielen könnte als bislang angenommen. Daher ist die genauere Untersuchung der Rolle von B-RAF in der Entstehung kardialer Hypertrophie sehr interessant und kann neue Ansatzpunkte für das Verständnis und die Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen liefern.

1. Bisher ist die Bedeutung von B-RAF in Kardiomyocyten nahezu nicht untersucht. Daher galt zu beweisen, dass B-RAF ein essentieller MEK1/2 Aktivator in Kardiomyocyten ist und dass B-RAF eine wichtige Rolle in der Entstehung kardialer Hypertrophie spielt.
2. Mit Hilfe eines genomweiten cDNA Library Screen können neue Modulatoren der B-RAF/MEK Interaktion ermittelt werden. Diese sollen anschließend auf ihre Relevanz in der kardialen Hypertrophie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Sigma-Aldrich, München
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, low melting GQT	Severn Biotech, Kidderminster, UK
Agarose Sea Plaque® GTG	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic/Mycotic-Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bacto-Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Carbenicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Carnitin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Cäsiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Cytosine β -D-arabinoturanoside hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Creatin anhydrous	Sigma-Aldrich, München
Cytosin- β -D-arabinofuranosid Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München

Chemikalie	Bezugsquelle
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Formalin	Merck, Darmstadt
FuGENE®6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Gelantine	Sigma-Aldrich, München
Glukose (Dextrose)	AppliChem, Darmstadt
Glutaminsäure D- ,L-	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kollagenase CLS-2	Biochrom, Berlin
Laminin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Biomol, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin	Biomol, Hamburg
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalie	Bezugsquelle
Phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20)	Bio-Rad Laboratories, München
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, München
Röntgen Superfix	Tetenal AG, Norderstedt
Roti®-Blue	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
SuperFect® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Taurin	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris-Base)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Vecta Shield ohne DAPI	VectorLab, Burlingame, USA
XRay-Developer LX24	Kodak, Darmstadt
Xylenxanol FF	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München

2.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkaline Phosphatase Claf Intestinal (CIAP)	Promega, Mannheim
Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood, USA
DNase, RNase-free	Qiagen, Hilden
Fast-Link™ DNA-Ligase	Biozym Scientific, Oldendorf
Gateway®BP Clonase™ Enzyme Mixtures	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway®LR Clonase™ Enzyme Mixtures	Invitrogen, Karlsruhe
iScript™ Reverse Transkriptase	Biozym Scientific, Oldendorf
Mango <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
<i>Pfu</i> Ultra Hotstart DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Promega, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega, Mannheim

2.3 Gebrauchswaren

Gebrauchsware	Bezugsquelle
2 well Lab-Tek™ Chamber Slides Permanox™	Nunc, Wiesbaden
6 well Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24 well Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
96 well RealTime-PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories, München
96 well twin.tec PCR Platten	Eppendorf, Hamburg
96 well Microtiterplatten, klar	Nunc, Wiesbaden
96 well Kollektionsplatten	5prime, Hamburg
96 well deepwell Kulturplatten	5prime, Hamburg
Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Elektroporationsküvetten	Biozym Scientific, Oldendorf
Filterplatte A	5prime, Hamburg
Filterplatte DB	5prime, Hamburg
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten, UVette	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm GmbH, Düsseldorf
Sterilfilter	Millipore Corporate, Billerica, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Easyjec T Elektroporationsgerät	Wolf Laboratories Limited, York, England
Evolution RC Superspeed Centrifuge	Sorvall, Newtown, USA
epMotion 5075	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Hamburg
Gelelektrophoresekammer SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, München
iQ5™ Multicolor <i>Real-Time</i> PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
L-70 Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Hamburg
Mithras LB 940 Multimode Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Multi Image Light Cabinet	AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA
µQuant Universal Microplate-Spektralphotometer	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA

2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockfort, USA
B-Raf Kinase Assay Kit	Millipore Corporate, Billerica, USA
BLOCK iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Check-Mate™ Mammalian Two Hybrid System	Promega, Mannheim
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick change® II XL Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Reaktionssystem	Bezugsquelle
Ras Activation Assay Kit	Upstate, Lake Placid, USA
Perfectprep® Plasmid 96 Vac Direct Bind Kit	5prime, Hamburg
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Immobilon™ Western Chemiluminescent Substrate	Millipore Corporate, Billerica, USA

2.6 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen und Kulturmedien erfolgte im Dampfdruckautoklaven bei 121°C und 1,5 Bar. Gebrauchswaren wurden autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril-filtriert (Porengröße 0,2 µm).

2.7 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
Carbenicillin-Stammlösung	100 mg Carbenicillin/ml in H ₂ O
Chloramphenicol-Stammlösung	30 mg Chloramphenicol/ml in Methanol
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat Inkubation für 24 Stunden unter Rühren mit anschließender Dampfdrucksterilisation
Kanamycin-Stammlösung	50 mg Kanamycin in H ₂ O
Kollagenaselösung	60 mM Taurin 8 mM D-, L-Glutaminsäure 2 mM D-, L-Carnitin

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
	1,3 mg/ml Collagenase II 26 µg/ml Protease XIV 0,025 mM CaCl ₂ in 1x Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺ pH 7,54
Ladepuffer für PCR-Produkte	40% Sucrose 1 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylenxanol FF
Lämmli-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCL pH 6,8 50% Glycerol 10% SDS 150 mM DTT 5 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau
Lysepuffer für Zellen/Gewebe	1% (v/v) NP 40 10% (v/v) Glycerol 137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 7,0 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat 1 mM Natrium-Pyrophosphat 50 mM β-Glycerophosphat 4 µg/ml Aprotinin 4 µg/ml Leupeptin 4 µg/ml Pepstatin A 1 mM PMSF

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
NP40-Lysepuffer	100 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 20 mM NaF 50 mM β -Glycerolphosphat 5 μ g/ml Aprotinin 5 μ g/ml Leupeptin
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	125 mM Tris Base 96 mM Glycin 0,5% (w/v) SDS
Ras-Aktivierungs-Assay-Lysepuffer	125 mM HEPES pH 7,5 750 mM NaCl 5% IGEPAL 10% Glycerol 50 mM $MgCl_2$ 5 mM EDTA 4 μ g/ml Aprotinin 4 μ g/ml Leupeptin 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Sucrosepuffer	10 mM Tris 2 mM $MgCl_2$ 4% (w/v) Sucrose pH 8,0
5x TBE-Puffer	445 mM Tris/HCl pH 8,0 445 mM Borsäure 10 mM EDTA

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
10x TBS	0,2 M Tris 2 M NaCl pH 7,5
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
1x Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3
10x Thyrodepuffer	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,2 mM MgSO ₄ 1,2 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM HEPES
1x Thyrodepuffer ohne Kalzium	10% 10x Thyrodepuffer 2,7 g/l Glukose 1% 100x Penicillin/Streptomycin
1x Thyrodepuffer mit Kalzium	1 M CaCl ₂ in Thyrodepuffer ohne Ca ²⁺
1x Transferpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3
Trenngelbuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

2.8 Nährmedien

2.8.1 Nährmedien für *Escherichia Coli*

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
SOC-Medium	2,0% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ nach dem Autoklavieren: 10 mM MgCl ₂ (steril-filtriert) 20 mM Glukose (steril-filtriert)

Die Nährmedien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Zusätze für die Selektion wurden nach dem Autoklavieren zugegeben. Der jeweiligen Resistenz entsprechend wurde Carbenicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml), Chloramphenicol (Endkonzentration: 30 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) zugegeben. Für Agarplatten wurde 1,5% Agar-Agar beigemischt.

2.8.2 Nährmedien für eukaryotische Zellkultur

Die zur Kultur eukaryotischer Zellen verwendeten Medien wurden als sterile Lösungen oder Pulver bezogen und vor Gebrauch mit folgenden Komponenten (siehe unten) versetzt. Für die Langzeitlagerung von Zellen wurde Gefriermedium benutzt.

Medium	Zusammensetzung /Hersteller
Medium für HeLa und QBI-HEK293A Zellen	basal Iscove Medium (Biochrom AG, Berlin) 8% FKS 100 U/ml Antibiotic/Antimycotic Solution
Medium für COS7 und NIH3T3 Zellen	DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) 10% FCS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung
Medium für neonatale Kardiomyocyten	4 Teile DMEM (Sigma-Aldrich, München) 1 Teil M199, Sigma-Aldrich 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1% (v/v) L-Glutamin
Medium für adulte Kardiomyocyten	M199 (Sigma-Aldrich, München) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1% (v/v) L-Glutamin 5 mM Taurin 5 mM D-, L-Carnitin 5 mM Creatin

2.9 Biologisches Material

2.9.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α (Hanahan, 1983)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] ccdB survival 2 T1	Invitrogen Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] Top 10	Invitrogen, Karlsruhe

2.9.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
COS-7	LGC Prochem, London, England
NIH3T3	ATCC, Rockville, USA
HeLa (Scherer et al., 1953)	DSMZ, Braunschweig
QBI-HEK-293A (Graham et al., 1977)	Microbix, Toronto, Canada

2.9.3 Adenoviren

Adenovirus	biologische Aktivität
Ad-Balt-CMV β gal (lacZ)	5,4x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-GAL4-Mek1	8,84x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-pG5luc	6,43x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-Raf-BXB (Klesse et al., 1999)	2,07x10 ¹⁰ Pfu/ml
zu Verfügung gestellt von Dr. Luis Parada	
Ad-Rcn1	1,26x10 ¹¹ Pfu/ml
Ad-Rcn1-miR2	3,71x10 ¹¹ Pfu/ml
Ad-Rcn1-miR3	1,59x10 ¹¹ Pfu/ml
Ad-Pkm2	1,56x10 ¹¹ Pfu/ml
Ad-VP16-BRaf	1,11x10 ¹¹ Pfu/ml

2.9.4 Antikörper

Primärantikörper	Bezugsquelle
anti- α Actinin (Sarcomeric), monoklonaler Antikörper (#A7811), Maus	Sigma-Aldrich, München
anti-GAPDH, monoklonaler Antikörper, Maus	Biotrend Chemikalien, Köln
anti-MEK1/2, polyklonaler Antikörper (#9122), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-phospho-MEK1/2, polyklonaler Antikörper (#9154), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-B-RAF (L12G7), monoklonaler Antikörper (#9434), Maus	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
anti-KSR1, monoklonaler Antikörper (611511), Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
anti-Raf1, polyklonaler Antikörper (sc-133), Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Ras, Clone Ras 10, monoklonaler Antikörper (05-516), Maus	Millipore Corporate, Billerica, USA
anti-Rcn1, polyklonaler Antikörper (A300-407A), Kaninchen	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Anti-mouse IgG, <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (Schaf)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-mouse IgG Cy3-linked Antibody (Ziege)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Anti-rabbit IgG <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (Esel)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.9.5 DNA-Plasmide

Plasmid/Vektor	Bezugsquelle
pBHGfrtΔE1,3FLP	Microbix, Toronto, Kanada
pDC511	Microbix, Toronto, Kanada
pDC515	Microbix, Toronto, Kanada
pDC516	Microbix, Toronto, Kanada
pACT	Promega, Mannheim
pBIND	Promega, Mannheim
pG5luc	Promega, Mannheim
pcDNA™6.2-GW/miR	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR221	Invitrogen, Karlsruhe

2.9.6 DNA-Konstrukte

Konstrukt	Datenbank-Nr.	Insertposition	Primer	Enzyme
pACT-BRAF	NM_004333.4	120-2340 B-RAF (Human)	BRAF-BamHI-f BRAF-EcoRV-r2	BamHI / EcoRV
pACT-CRaf	NM_029780	426-2380 C-Raf (Maus)	CRaf-EcoRV-f CRaf-KpnI-r	EcoRV / KpnI
pACT-CRAF-BXB	NM_002880.3	1324-2469 C-RAF (Human)	CRAF-BXB-BamHI-f CRAF-BXB-XbaI-r	BamHI / XbaI
pBIND-Mek1	NM_008927.3	312-1502 Mek1 (Maus)	Mek1-BamHI-f Mek1-KpnI-r	BamHI / KpnI
pDC511-pG5luc	AF264724	37-3128 Luciferase aus pG5luc	pG5luc-SacI-f pG5luc-SalI-r	SacI / SalI
pDC515-VP16- BRAF	NM_004333.4	120-2340 VP16-BRAF aus pACT-BRAF	pAct-BRAF-NheI-AS pAct-BRAF-NheI-S	NheI
pDC515-Gal4- Mek1	NM_008927.3	312-1502 Mek1 Gal4 aus pBIND-Mek1	pAct-BRAF-NheI-AS pAct-BRAF-NheI-S	NheI
pDC516-CfB-Rcn1	NM_009037.2	107-1103 Rcn1 (Maus) aus pcDNA- DEST40		BxP Klonase

Konstrukt	Datenbank-Nr.	Insertposition	Primer	Enzyme
pDONR221-Rcn1	NM_009037.2	107-1103 Rcn1 (Maus) aus pcDNA- DEST40		LxR Klonase
pDC515-Pkm2	NM_011099.2	52-1665 Pkm2 (Maus) aus CMV-Sport6		EcoRI
pDC516-CfB		Gateway Kasette		EcoRI

2.9.7 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon oder Sigma-Aldrich bezogen, mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und als Stocklösung bei -20°C gelagert.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
18S-RT-f	CGAAAGCATTTGCCAAGAAT
18S-RT-r	GAGGTTTCCCGTGTTGAGTC
Ankr13a-RT-f	CCGAGACTACCACAACACGTC
Ankr13a-RT-r	GTGAACTCCCCTTCATCTGC
attR-f	CACATTATACGAGCCGGAAGCAT
attR-r	CAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCG
BRAF-BamHI-f	CGGATCCACGGGGACATGGAG
BRAF-EcoRV-f	CATGGAGCAGAAGCTGATATC
BRAF-EcoRV-r2	GCAAGATATCGAGCTTAGTGA
BRaf-RT-f	AATTTGGTGGAGAGCATAACC
BRaf-RT-r	CAAAAGCTGCTGTTCTCTTTG
BRAF-Seq	TTTGAACAGTTGTCTGGGTCC
BRAF-Seq1	CTCTCTGCCGAAAATCAACAG
BRAF-XbaI-r	TTCCTTTTCTAGATACTCTCCTG
Calsequestrin-mouse-f	AAGACCCAGTGGAGATCGTG
Calsequestrin-mouse-r	TGACATTGGGCTCATCCATA
CRaf-EcoRV-f	TTAAACGATATCAATGGAGCACA

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
CRaf-KpnI-r	ACAGGTACCTCATCAGCTAGAA
CRaf-Seq	TCATGAGCACTGTAGCACCA
CRaf-Seq2	GGACGAGCTCCACTTAGACG
CRAF-BxB-BamHI-f	CCAGGATCCATATGGCTTACC
CRAF-BxB-XbaI-r	CCTGTCTTCTAGTCTAGATTGCA
Ddx46-RT-f	GAGACAGAGACCGGAGGAGAG
Ddx46-RT-r	ACTCCTTGAGCGCCTTCTATC
G3bp1_2-RT-f	CCTGACAGTCACCAGCTCTTC
G3bp1_2-RT-r	GGCAGCTCGAGTCTTCTTCTC
Mek1-BamHI-f	CGGGATCCAGATGCCAAGAAGAA
Mek1-KpnI-r	TTGCTGGTACCTAAAGGCTCA
miRNA1_Rcn1_358_bottom	CCTGATCACTGTCAACGATCCACGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACGTGGATCGAATTGACAGTGATC
miRNA1_Rcn1_358_top	TGCTGATCACTGTCAATTGATCCACGTTTTGGCCACTGA
	CTGACGTGGATCGTTGACAGTGAT
miRNA2_Rcn1_374_bottom	CCTGTAACAAGGCCAACCATCACGTCAGTCAGTGGCCAA
	AACGTGATGGTGATGGCCTTGTTAC
miRNA2_Rcn1_374_top	TGCTGTAACAAGGCCATCACCATCACGTTTTGGCCACTG
	ACTGACGTGATGGTTGGCCTTGTTA
miRNA3_Rcn1_414_bottom	CCTGTTCTGTACCCGTGATCCAAGTCAGTCAGTGGCCAA
	AAC TTGGATCAAACGGGTACAGAAC
miRNA3_Rcn1_414_top	TGCTGTTCTGTACCCGTTTGATCCAAGTTTTGGCCACTGA
	CTGACTTGGATCACGGGTACAGAA
miRNA4_Rcn1_455_bottom	CCTGAATCCTTCCAGTTTAGCGAGTCAGTCAGTGGCCAA
	AAC TCGCTAAAGTCTGGAAGGATTC
miRNA4_Rcn1_455_top	TGCTGAATCCTTCCAGACTTTAGCGAGTTTTGGCCACTGA
	CTGACTCGCTAAACTGGAAGGATT
Kontroll-miR_top	AAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAAC
	GTCTCCACGCGCAGTACATTTT
Kontroll-miR_top	GAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTG
	ACGTCTCCACGCGCAGTACATTT
pAct-BRAF-NheI-AS	CCTACTAAAGGCTAGCGGCCTTAGTTATTCAGGTACC
pAct-BRAF-NheI-S	GGTACCTGAATAACTAAGGCCGCTAGCCTTTAGTGAGG
pDC511-f	TTTGACCGTTTACGTGGAGAC
pDC515-f	AGCTGCGTTCTACGTGGGTA

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
pDC515-r	TTGTGAAATTTGTGATGCTA
pG5luc-Sacl-f	GGTACCGAGCTCCTAGACGGAGTAC
pG5luc-Sall-r	CGGAAGGAGTCGACTGGGTTGAA
Pja1-RT-f	TGAGGAACAGCACCAGATTTTC
Pja1-RT-r	CTCAAAGCGTCATTTTCGTTTC
Pkm2-RT-f	TTTGCATCTGATCCCATTCTC
Pkm2-RT-r	TAGTCCAGCCACAGGATGTTTC
Rcn1-RT-f	GCTTCCAGTACGATCATGAGG
Rcn1-RT-r	ACCCGTTTGGATCCAAAGTTTC
Wdr92-RT-f	CAAGCCATTAAATGTGGAAC
Wdr92-RT-r	TCCAAGTCCACCTACACCATC
Zfand2a-RT-f	TTTCTACGTGGGTCATAAGTG
Zfand2a-RT-r	TGAAAGGTGCAATCTCTGTCC

2.9.8 Längenstandards

Zur Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen wurden folgende Längenstandards mitgeführt:

Längenstandard	Bezugsquelle
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.9.9 Versuchstiere

Versuchstiere	Bezugsquelle
Adulte und neonatale Wistar Ratten	Tierzucht Universitätsmedizin Göttingen
FVB/N Mäuse	European Neuroscience Institute, Göttingen Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

Die Versuchstiere wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55±5% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.9.10 Herkunft des Patientenmaterials

Im Rahmen dieser Arbeit fanden molekularbiologische Untersuchungen an Protein aus Myokardbiopsien von Patienten mit der klinischen Diagnose einer Aortenklappeninsuffizienz statt. Die Gewebe-Proben der Patienten wurden zum Zweck der Grundlagenforschung aus der Abteilung Herz-Thorax-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Göttingen und aus dem Herzzentrum Bad Oeynhausen bezogen. Die Verwendung ist durch die Ethikkommission der Universität Göttingen genehmigt und die Patienten haben schriftlich ihre Zustimmung erklärt. Es sich um den Antrag 21/10/00 "Funktionelle, biochemische undmolekularbiologische Charakterisierung von menschlichem Vorhofmyokard anhand von Gewebeproben aus dem rechten Vorhofohr". Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. Samuel Sossalla zur Verfügung gestellt.

2.9.11 cDNA-Library

Die *Mouse Embryo Uncut Full-length cDNA Library @ pENTR222* wurde bei Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Die Untersuchung der Primärlibrary mit insgesamt $1,6 \times 10^7$ Primärklonen ergab eine durchschnittliche Insertgröße von 3 kb. Insgesamt enthielten 96% der Primärklone ein Insert und 87% davon ein *Full-length* cDNA Insert. Diese Primärlibrary wurde von der Firma Invitrogen mit Hilfe der Gateway Cloning Technology in einer LxR Klonasereaktion in den gewünschten Expressionsvektor pcDNA-DEST40 transferiert.

2.10 Datenbanken und Analyse-Software

Folgende Programme wurden zur Bearbeitung und Auswertung von Daten verwendet:

Programm	Verwendung
Axio-Vision 4.0 (Carl Zeiss, Hamburg)	Fluoreszenzmikroskop
BLAST-Programm (Altschul et al., 1990) http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Analyse von DNA-Sequenzen
BLAST-Programm (Altschul et al., 1990) http://www.ensembl.org/index.html	Analyse von DNA-Sequenzen
BLAT-Search (Kent, 2002) http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat	Überprüfung der Spezifität von Primern
DNASTar Lasergene SeqBuilder (Version 7.2.1)	Erstellung von Klonierungsstrategien und veranschaulichen von Sequenzen
GraphPad Prism (Version 5.0)	Statistische Auswertungen
ImageJ 1.38x http://rsb.info.nih.gov/ij/	Vermessung von Zelloberflächen
IQ5 (Bio-Rad Laboratories, München)	Auswertung von <i>Real-Time</i> PCR Daten
Ligation Calculator http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html	Berechnung des Ligationsansatzes bei Ligationen
NEB Cutter 2.0 http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen
Primer3 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi	Auswahl von Oligonukleotiden für PCR
BLOCK-iT™ RNAi Designer https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/	Auswahl von miRNAs

2.11 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.11.1 Kultur eukaryotischer Zellen

Die adhärent wachsenden QBI-HEK-293A- und HeLa-Zellen wurden in basal Iscove-Medium (Biochrom AG, Berlin) mit Zusatz von 1% Antibiotic/Mycotic-Solution und 8% FCS (fetales Kälberserum) kultiviert. Die ebenfalls adhärent wachsenden COS-7- und NIH3T3-Zellen wurden in DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C. In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche umgesetzt. Die Zellen wurden dabei mit 1× DPBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA in Ca²⁺/Mg²⁺-freier PBS-Lösung) so lange inkubiert bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösten. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Medium gestoppt. 5-10% der Zellsuspension wurden zur weiteren Kultivierung verwendet.

2.11.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Langzeitkultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90% in DPBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in einer entsprechenden Menge FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden langsam in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nunc, Wiesbaden) eingefroren. In dieser findet eine Abnahme der Temperatur mit einem Grad Celsius pro Minute statt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert. Zur Revitalisierung wurden die Zellen möglichst schnell aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium zur vollständigen Entfernung des DMSO gewechselt.

2.11.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE®6

Die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde mit FuGENE®6 (Roche, Mannheim) durchgeführt. Bei dieser transienten Transfektion integriert die DNA nicht in das Genom der Zellen. Diese Methode nutzt man, um die Aktivität von Reportergenen zu detektieren. Da zahlreiche Kopien der transfizierten Plasmide in der Zelle vorliegen, werden große Proteinmengen exprimiert.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 24 well Platten, oder Zellkulturschalen (55 cm²) ausplattiert und in geeignetem Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ herangezogen, bis sie eine Konfluenz von 60-80% erreichten. Das Verhältnis FuGENE[®]6 zu DNA wurde wie vom Hersteller empfohlen ausgetestet. Das Verhältnis von 3:1 von FuGENE[®]6 zu DNA (1 µg DNA entsprechen 3 µl FUGENE[®]6) lieferte die beste Transfektionseffizienz und wurde daher für alle nachgehenden Versuche verwendet. Zunächst wurde die für die verwendete Zellkulturschale empfohlene Menge serumfreies DMEM mit FuGENE[®]6 versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der DNA und eine erneute Inkubation des Transfektionsansatzes für 2 h bei RT. Danach wurde der Transfektionsansatz zu dem Medium der Zellen zugegeben und je nach Versuch für 24-72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Mengenangaben für den Transfektionsansatz und Menge des Zellkulturmediums wurden den Angaben des Herstellers entnommen.

2.12 Primär-Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.12.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyocyten adulter Ratten

Für die Gewinnung isolierter Rattenkardiomyocyten wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200-250 g aus der Tierzucht der Universitätsmedizin Göttingen verwendet. Die Isolation erfolgte an einer modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage. Die Zellgewinnung erforderte die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ nach §4 TierSchG. Die gesetzlich geforderte Mitteilung an die Landesbehörde erfolgte über den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen. Die Tierhaltung erfolgte bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur zwischen 19°C und 23°C mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Futter.

Die Ratten wurden durch Isofluraninhalation tiefanästhesiert. Nach dem Eintritt der Anästhesie wurde der Thorax der Tiere schnellstmöglich geöffnet, um das Herz freizulegen und 625 Injektionseinheiten (I.E.) Heparin in das linke Atrium zu injizieren. Das Herz wurde mit einem möglichst langen Aortenstumpf entnommen. Das im Herzen verbliebene Blut wurde in eisgekühlter Tyrodelösung (inklusive 1,25 mM Kalziumchlorid) behutsam ausgespült. Anschließend wurde eine Kanüle in den Aortenstumpf eingeführt und das Herz an die Langendorff-Apparatur für die Perfusion aufgehängt. Mit Hilfe einer Pumpe wurde das Herz mit einer Flussrate von 8-10 ml/min retrograd perfundiert (Langendorff-Perfusion nach Marsh, 1979). Die für die Perfusion verwendeten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt und während des Isolationsprozesses mit 100% Sauerstoff begast. Die 1895 von Oscar Langendorff beschriebene

Apparatur erhält die Herzfunktion durch die Zufuhr einer oxigenierten, alle notwendigen Nährstoffe enthaltenden, Flüssigkeit über die Aorta ascendens aufrecht. Die retrograde Applikation der Nährlösung über die Aorta ascendens bewirkt einen Verschluss der Aortenklappe und konsekutiv eine Perfusion der Koronargefäße (Langendorff, 1895). Die Perfusion mit einer kalziumchloridhaltigen Tyrodelösung erfolgte solange bis das Herz kräftig und regelmäßig zu schlagen begann. Im Anschluss folgte eine etwa fünfminütige Perfusion mit 400 ml einer kalziumfreien Tyrodelösung bis zum vollständigen Sistieren der Perfusion. Das Herz wurde daraufhin circa 15-20 min mit einer kollagenasehaltigen Enzymlösung perfundiert, wodurch das Organ eine weiche Konsistenz erhielt. Die Ventrikel wurden dann vom Herz abgetrennt und in einem Erlenmeyerkolben mit der Kollagenaselösung vorsichtig zerteilt.

Der Gewebeaufschluss erfolgte 20 min bei 37°C schüttelnd bei 100 U/min. Durch behutsames Auf- und Abpipettieren des verbleibenden Gewebes wurden möglichst viele Zellen aus dem Zellverband gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz gefiltert. Die Kollagenaselösung wurde mit Tyrodelösung (0,125 mM Kalzium) 1:1 verdünnt. Nach der Sedimentation der Zellen wurde die Kollagenaselösung abgenommen. Es folgten mehrfache Waschvorgänge der Zellen mit Tyrodelösungen ansteigender Kalziumkonzentrationen (0,125 mM, 0,24 mM, 0,5 mM und 1 mM). Nach dem letzten Sedimentationsschritt wurden die Zellen in M199-Medium mit Zusatz von 6% Albumin überführt. Die Zellen wurden mit Tryptan-Blau gefärbt, um unvitalen Zellen kenntlich zu machen und die Morphologie der Zellen beurteilen zu können. Dafür wurden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl Tryptan-Blau-Lösung gemischt und die Zellen anschließend gezählt. Durchschnittlich betrug die Gesamtzahl an vitalen Zellen etwa vier Millionen. Das Verhältnis der Anzahl vitaler Zellen zu der Gesamtzahl sichtbarer Zellen betrug etwa 70%.

2.12.2 Kultivierung von Kardiomyocyten adulter Ratten

Die isolierten Kardiomyocyten adulter Ratten wurden auf mit Laminin beschichteten Kulturschalen ausplattiert. Dafür wurde Laminin 1:100 in M199-Medium verdünnt und die Platten nach der Beschichtung mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abnehmen der Laminin-Medium Lösung wurde eine je nach Versuch angemessene Zellzahl in M199-Medium verdünnt und ausplattiert. Im Anschluss erfolgte gegebenenfalls die adenovirale Transfektion der Zellen (2.15.4.2). Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde das M199-Medium gewechselt. So wurden nicht adhärenente Zellen entfernt oder die Virustransfektion terminiert. Nach der Zugabe von frischem M199-Medium wurden die Kardiomyocyten über 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.12.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyocyten neonataler Ratten

Die Isolation der Kardiomyocyten neonataler Ratten erfolgte aus einem Wurf von maximal zwei Tage alten Wistar-Ratten (meistens 8-14 Tiere). Die Tiere stammten aus der Tierzucht des European Neuroscience Institute, Göttingen. Die Zellgewinnung erforderte die „Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“ nach §4 TierSchG. Die gesetzlich geforderte Mitteilung an die Landesbehörde erfolgte durch den Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Göttingen unter dem Aktenzeichen T 13.07.

Die durch Dekapitation getöteten Tiere wurden auf einer Styroporunterlage fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, das Herz entnommen und die Ventrikel abgetrennt. Die Ventrikel wurden in einem Becherglas mit 1x DPBS-Lösung gesammelt. Die weiteren Schritte der Isolation erfolgen unter sterilen Bedingungen. Zu Beginn wurden die Ventrikel in einer 10 cm Zellkulturschale mit 3 ml einer Enzymlösung, bestehend aus 0,2% Trypsin und 0,1% Collagenase in 1x DPBS mechanisch mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde dann in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Es folgten vier Inkubationsschritte, während denen das Ventrikelgewebe jeweils 14 min lang auf einer magnetischen Heizplatte bei 37°C in Enzymlösung inkubiert und dabei mittels eines Rührmagneten mit einer Geschwindigkeit von 180 rpm gerührt wurde. In dieser Phase der Isolation wurden die Zellen durch die Enzymaktivität aus dem Zellverband herausgelöst. Nach abgeschlossenem Inkubationsschritt wurde der Überstand und damit die herausgelösten Zellen vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein vorbereitetes 50 ml Falcon-Röhrchen mit 37°C warmen DMEM:F12-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) überführt. Die Zellen wurden darauf im Zellkulturinkubator bei 37°C gelagert. Zu der im Erlenmeyerkolben verbleibenden Zellsuspension wurden vor jedem der vier Inkubationszyklen erneut 10 ml vorgewärmte Enzymlösung zugegeben. Die vier 50 ml Falcon-Röhrchen mit der Zellsuspension wurden nun bei 400 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in insgesamt 20 ml DMEM:F12-Medium resuspendiert. Um die Kardiomyocyten von den im Herzgewebe befindlichen Fibroblasten zu separieren, wurde die Zellsuspension für 45 min bei 37°C in zwei 10 cm Zellkulturschalen inkubiert. Bei diesem so genannten Präplattieren adhären Fibroblasten im Gegensatz zu Kardiomyocyten schneller an unbeschichteten Zellkulturschalen. Die im Überstand enthaltenen Kardiomyocyten wurden von den Platten abgenommen. Um noch verbliebene Fibroblasten am Wachstum zu hindern, wurde dem Kulturmedium der Fibroblasten-Wachstumsinhibitor Cytosin- β -D-arabinofuranosid (AraC) zugefügt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-*improved* Zellzählkammer ausgezählt und auf zuvor mit Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert.

2.12.4 Kultivierung von Kardiomyocyten neonataler Ratten

Die isolierten Kardiomyocyten neonataler Ratten wurden auf Zellkulturschalen ausplattiert. Die Zellkulturschalen wurden vorher mit einer Gelatinelösung, bestehend aus 2% Gelatine gelöst in 0,1 N HCl, beschichtet. Die frisch isolierten Zellen wurden in DMEM/M199-Medium 4:1 ausplattiert. Nach 18 h wurden tote Zellen durch mehrmaliges Waschen mit DMEM-Medium entfernt und die adhären Zellen mit frischem DMEM/M199-Medium 4:1 überschichtet. Dann erfolgte der adenovirale Gentransfer (2.13.2) oder die Behandlung der Zellen mit dem B-RAF Inhibitor SB590885. Die Zellen wurden anschließend 24-72 h lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und analysiert.

2.12.5 Immuncytochemische Färbung und Planimetrie von Kardiomyocyten neonataler Ratten

Durch α -adrenerge Stimulation können Kardiomyocyten neonataler Ratten zu hypertrophem Wachstum angeregt werden. Für die Analyse der zellulären Hypertrophie wurden die Kardiomyocyten auf 2 well Chamber Slides mit einer PermanoxTM Beschichtung ausplattiert (Nunc, Wiesbaden). Dabei dürfen sich kaum Kontakte zwischen den Zellen ausbilden, damit anschließend der Zellumfang von Einzelzellen bestimmt werden kann. Auf ein well wurden jeweils 100.000 Zellen ausplattiert. 18 h nach der Zellisolation wurden die Zellen mehrfach gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte der Adenovirale Gentransfer oder die Behandlung mit dem B-RAF Inhibitor SB590885. Zur Induktion hypertrophen Wachstums wurde dem Medium Phenylephrin (10 mM) zugesetzt. 48 h nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung in Methanol:Aceton im Verhältnis 7:3 bei -20°C für 10 min. Nach der Fixierung wurde erneut dreimal in eiskaltem DPBS gewaschen, wobei der mittlere Waschschriff etwa 10 min bei RT inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Zellen in 1% BSA in DPBS bei 4°C für mindestens 40 min geblockt. Nach dem Blocken wurden die Zellen erneut in 1% BSA in DPBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellkerne erfolgte mit 0,1% Triton X-100 in 1% BSA in DPBS 10 min bei RT. Dann wurden die Zellen in 1% BSA in DPBS für 30-40 min bei RT geblockt. Der primäre Antikörper Anti- α -Actinin (Sigma-Aldrich, München) ist spezifisch für α -kardiales Muskelactinin und wurde in einer 1:200 Verdünnung in 1% BSA in DPBS eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C. Nach drei erneuten Waschschriffen wurde der Cy3-gekoppelte sekundäre Antikörper Anti-mouse IgG in einer 1:600 Verdünnung ebenfalls für 1 h bei

37°C inkubiert. Ab jetzt erfolgten alle weiteren Inkubationsschritte im Dunkeln. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde DAPI zur Anfärbung der Zellkerne in einer 1:5000 Verdünnung zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte in 1% BSA in DPBS und ein Waschschrtritt in H₂O. Abschließend wurden zwei Tropfen Vecta Shield Mounting Medium für Immunfluoreszenz (VectorLab, Burlingame, USA) zugegeben, Deckgläschen aufgesetzt und versiegelt.

Die Auswertung des Versuches erfolgte verblindet. Das Ausmessen der Kardiomyocyten erfolgte mit dem Programm ImageJ Version 1.38. Es wurden mindestens 300 Zellen pro Slide vermessen. Der Versuch wurde stets in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.13 Adenoviraler Gentransfer

2.13.1 Herstellung eines Adenovirus

Um Proteine von Interesse in Kardiomyocyten überexprimieren zu können, wurden modifizierte Typ-5-Adenoviren als Gentransfervektoren hergestellt. Dazu wurde die für das Protein kodierende cDNA in einen Plasmidvektor (*shuttle*-Vektor) kloniert. Dieser Vektor enthält die kodierende DNA unter der Kontrolle eines *Zytomegalie-Virus* (CMV)-Promotors und kurze Bereiche des viralen Genoms. Durch die sequenzspezifische Rekombination des *shuttle*-Vektors mit dem Vektor pBHGfrtΔE1,3FLP vervollständigt sich das virale Genom nach simultaner Transfektion in QBI-HEK-293A-Zellen. Katalysiert wird die Rekombination durch das Enzym FLP-Rekombinase. QBI-HEK-293A-Zellen enthalten das für die Virus-Replikation essentielle E1-Gen, welches aus dem ursprünglichen Zielvektor deletiert wurde. Daher können sich die modifizierten Adenoviren nur in QBI-HEK-293A-Zellen vermehren (Abb. 2.13.1).

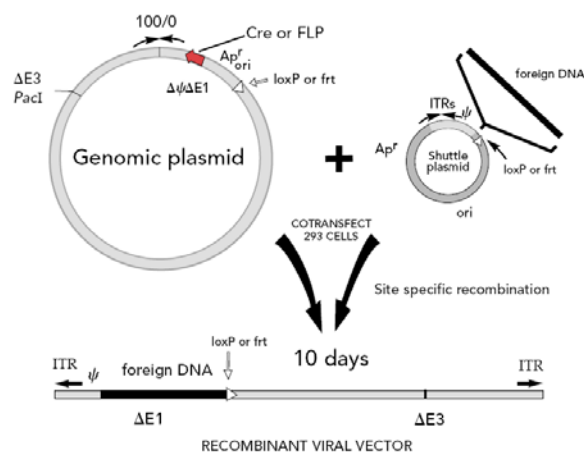


Abbildung 2.13.1 Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Adenoviren. QBI-HEK-293A Zellen wurden zeitgleich mit dem 40 kb großen Virus-Genom-Vektor und dem *shuttle*-Vektor transfiziert. Durch sequenzspezifische Rekombination entstand der rekombinante Virusvektor.

Die Transfektion der beiden Vektoren basiert auf der Lipofektations-Methode. Hierzu wurden die in 6 well Schalen zu 80% konfluent gewachsenen QBI-HEK-293A-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect (Qiagen, Hilden) für 2 Stunden mit je 0,5-1,5 µg DNA beider Plasmide und 8 µl Superfect pro well transfiziert. Im Anschluss wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit einem Agarose-Medium-*Overlay* überschichtet. Dieser *Overlay* bestand aus je einem Teil *Low melting point*-Agarose (1,5% LM GQT Agarose in dH₂O, Severn Biotech, Kidderminster) und einem Teil zweifach konzentriertem basal Iscove-Medium. Nach 10-14 Tagen wurden Stellen lokaler Zellyse im vorher konfluenten QBI-HEK-293A-Zellrasen sichtbar. Die sogenannten Plaques wurden mit einer Luer-Einwegspritze aus der Agarose ausgestanzt. Die Plaques entsprechen einem Bereich, in dem es vermittelt durch die FLP-Rekombinase zu einer Rekombination beider Plasmide kam. Dies führt zu einer Vermehrung des Virus in den Zellen dieses Bereiches. Zur Vermehrung des Virus eines solchen Plaques wurden QBI-HEK-293A-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit dem Virus infiziert und nach deren vollständiger Lyse der Überstand entnommen. Mit diesem Überstand wurde dann eine größere Menge QBI-HEK-293A-Zellen in einer 175 cm² Flasche infiziert. So entstanden ausreichende Mengen an virushaltigem Überstand für die Infektion von 35 Zellkulturschalen (15 cm Ø). Die Infektion der QBI-HEK-293A-Zellen erfolgte stets in basal Iscove-Medium mit 5% FKS bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Lyse der Zellen wurde der Mediumüberstand abgenommen. Um noch verbliebene Zellen vollständig aufzuschließen, wurden sie mit 0,1% NP-40 versetzt und unter konstanter Bewegung für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 25 min bei 18000 x g und 4°C zur Pelletierung der Zellreste. Der Überstand wurde anschließend mit einem halben Volumen 20% Polyethylenglykol 8000/2,5 M NaCl versetzt und die Suspension für 4 h in einem 4°C kalten Eisbad inkubiert um die Viruspartikel zu präzipitieren. Die Viren wurden durch eine erneute Zentrifugation für 25 min bei 18000 x g und 4°C pelletiert und anschließend unter kontinuierlicher Rotation in 11 ml DPBS, pH 8,0 ü. N. gelöst. Zur Eliminierung von ungelösten Aggregaten folgte am nächsten Tag eine Zentrifugation bei 800 x g für 2 min. Durch Ultrazentrifugation bei 137000 x g und 16°C für 12 h in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten wurden die Viruspartikel von beschädigten Viren und den übrigen Zellresten getrennt. Durch zweifache Dialyse gegen je fünf Liter Sucrosepuffer (Nyberg-Hoffmann und Aguilar-Cordova, 1999) wurde das zelltoxische Cäsiumchlorid entfernt. Die Konzentrationsbestimmung des Virus erfolgte zunächst photometrisch bei 260 nm. Mit Hilfe dieses Wertes wurde eine Verdünnungsreihe der Viruslösung erstellt. Diese Verdünnungen wurden zur endgültigen Konzentrationsbestimmung in der oben beschriebenen Agarose-*Overlay*-Methode eingesetzt. Die

Konzentration intakter Viruspartikel wurde in der Einheit *plaque forming units* (Pfu)/ml angegeben.

2.13.2 Adenoviraler Gentransfer in Kardiomyocyten der Ratte

Bei dem adenoviralen Gentransfer handelt es sich um eine transiente Transfektion, bei der die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Die Virusmenge für eine Infektion wird in MOI (*multiplicity of infection*) angegeben. MOI ist definiert als die Anzahl aktiver Viruspartikel pro Zelle. Die biologische Aktivität eines hergestellten Virus basiert auf der im Plaque-Assay errechneten Viruskonzentration und wird angegeben in Pfu/ml. Zur Infektion wurden verschiedene MOIs verwendet, um verschiedene Konzentrationen der genetischen Überexpression zu erreichen. Die jeweilige MOI wurde in Abhängigkeit von der zu transfizierenden Zellzahl und der biologischen Virusaktivität dem Kulturmedium der Zellen zugesetzt. Bei den nicht mehr teilungsfähigen adulten Kardiomyocyten wurde nach 4 h Inkubation die Virusinfektion durch Mediumwechsel abgestoppt. Die noch teilungsfähigen neonatalen Kardiomyocyten wurden einen Tag nach der Isolation nach Entfernen der toten Zellen durch waschen in DMEM transfiziert. Der Virus wurde für 24-48 h auf den Zellen belassen.

2.14 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.14.1 Minipräparation von DNA

Zur Isolierung rekombinanter Plasmide im analytischen Maßstab wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dazu wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 16000 × g zentrifugiert und das entstandene Pellet in 250 µl RNase enthaltener P1-Lösung resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 250 µl der alkalischen P2-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Unter diesen Bedingungen wurde die DNA denaturiert. Durch Zugabe der P3-Lösung spätestens 5 min nach Start der Lyse, erfolgte die Neutralisation. Die genomische DNA fällt aus, während die Plasmid DNA renaturiert und gelöst bleibt. Die denaturierten Proteine und die genomische DNA wurden durch Zentrifugation gefällt und der Überstand auf Silika-Säulen gegeben. Plasmid DNA bindet bei hoher Salzkonzentration und niedrigem pH Wert an der Silika-Membran. Die Elution erfolgte unter geringer Salzkonzentration und einem neutralen pH Wert in Ampuwa-Wasser.

Die Qualität der so gewonnenen DNA ist ausreichend, um sie in Restriktionsanalysen und für die Isolierung von DNA-Fragmenten einzusetzen.

2.14.2 Midipräparation von DNA

Zur Isolierung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das HiSpeed® Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983; Birnboim et al., 1979), um Plasmid DNA zu isolieren. Die so gewonnene DNA wird über Anionen-Austausch Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der alkalischen Lyse wurde die Plasmid-DNA an das Anionen-Austausch Säulenmaterial gebunden. Dies erfolgte bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH Wert. RNA und Proteine wurden durch Waschen mit Pufferlösungen mittlerer Salzkonzentration entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe von Isopropanol gefällt.

Die durch diese Methode isolierte Plasmid-DNA kann unter anderem für die Transfektion von Zelllinien, für Restriktionsanalysen, Subklonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden.

2.14.3 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Alkoholische Lösungen haben im Vergleich zu wässrigen Lösungen niedrigere Dielektrizitätskonstanten. Dadurch wird die Bildung großer Molekülaggregate begünstigt. Durch Zugabe monovalenter Kationen werden die negativen Ladungen des Phosphatrückrats der DNA abgesättigt, die Abstoßung zwischen den Molekülen verringert und die Aggregatbildung verstärkt. Dadurch fällt die DNA aus. Die Ethanolfällung wurde eingesetzt, um DNA zu konzentrieren und sie von Salzverunreinigungen zu befreien. Zur Fällung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen 96%igem Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte durch Inkubation für 15 min bei RT oder für mehrere Stunden bei -20°C . Der Ansatz wurde für 30 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H_2O aufgenommen.

2.14.4 Phenol-Chloroform Aufreinigung von Nukleinsäuren

Zur Reinigung der DNA wurde eine Phenol-Chloroform Aufreinigung durchgeführt (Kirby, 1956; Marmur, 1960). Die zu extrahierenden DNA-Proben wurden mit gleichem Volumen Phenol versetzt und intensiv gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 16000 x g für 2-5 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. Die sich in der wässrigen Phase befindende DNA wurde anschließend einer Ethanol-fällung (2.14.3) unterzogen.

2.14.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgeweben

Herzgewebe unterscheidet sich durch seinen hohen Anteil an kontraktilen Proteinen und Bindegewebe von anderen Organgeweben. Diese erschweren den Zellaufschluss und die RNA-Isolierung. Zur Isolierung von RNA aus Herzgeweben wurde daher das RNeasy® fibrous tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Der RNA-Isolierung geht eine Inkubation mit Proteinase K voraus. In ein Reaktionsgefäß mit 300 µl RLT-Puffer (inklusive β-Mercaptoethanol) wurden circa 30 mg Herzgewebe in gefrorenem Zustand überführt und umgehend mittels eines Rotor-Stator Homogenisators (ART Labortechnik, Mühlheim) homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte durch eine Säulenaufreinigung über eine Silika-Membran. Zum Schutz vor RNasen wurden RNase-freie Kunststoff-Einweggefäße und Filterspitzen verwendet.

2.14.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektrometer (Eppendorf, BioPhosphometer) bestimmt. Nach Abgleich des Nullwertes konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt werden. Gleichzeitig wurden Verunreinigungen durch Proteine bei 280 nm bzw. Salze bei 230 nm festgelegt. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz korreliert die Konzentration der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm linear mit der Extinktion. Der Quotient E260/E280 ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte $\geq 2,0 \pm 0,2$ betragen. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

C = Nukleinsäurekonzentration der gemessenen Probe

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

c = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

für doppelsträngige DNA: $c = 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

für einzelsträngige DNA: $c = 0,025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

für RNA: $c = 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Zur Bestimmung von niedrigen Konzentrationen wurde eine kleine Menge der DNA-Lösung auf ein Agarosegel neben einem DNA-Standard aufgetragen, bei dem für jede Bande die entsprechende Menge DNA bekannt ist.

2.14.7 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophoresen aufgetrennt. Die negativ geladene DNA wandert dabei innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Größentrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einer Gelmatrix, in der die Laufgeschwindigkeit der Moleküle im elektrischen Feld mit steigender Molekülgröße abnimmt.

Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% bis 2% in 1x TBE-Puffer hergestellt. Um die Agarose in TBE-Puffer zu lösen wurde das Gemisch aufgekocht. Beim Erkalten bildet sich ein Netzwerk aus Zuckerketten, wodurch eine Gelmatrix verschiedener Porengröße je nach Agarosekonzentration entsteht. Den Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Anschließend wurden die Agarosegele in eine Gelkammer gegossen. Nach der Aushärtung wurden die Gele mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Loading Dye versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde dann im Spannungsbereich von 60 bis 120 V durchgeführt. Dadurch wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 354 nm als Banden sichtbar. Daraufhin konnte das Gel auf dem UV-Transilluminator analysiert und photographisch dokumentiert werden. Ein Längenstandard, der gleichzeitig mit der Probe läuft, ermöglicht die Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente.

2.14.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die gewünschte Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht (354nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA den Herstellerangaben entsprechend extrahiert. Nach dem Lösen der Agarose wurde die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze selektiv an eine Silika-Membran gebunden und anschließend mit Wasser eluiert.

2.14.9 Aufreinigung von DNA mittels PCR Purification

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von Salzresten, Primern und nicht eingebauten dNTPs gereinigt. Dazu wurde die DNA-Probe mit der 5fachen Menge an PB Puffer aufgefüllt und auf eine Silika-Säule gegeben. Darauf folgte eine Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 1000 x g für 15 min bei RT. Zur Elution der DNA aus der Silika-Membran wurden 30 µl Ampuwa-Wasser auf die Membran pipettiert. Dann wurde die Säule in ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt und erneut bei 1000 x g für 2 min bei RT zentrifugiert.

2.15 Enzymatische Modifikation von DNA

2.15.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurde ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von mindestens 20 µl bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) für 1-2 h oder ü. N. inkubiert. Dabei wurden pro µg DNA 2-3 U des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Für den simultanen Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde ein Puffer eingesetzt, der beiden Enzymen eine ausreichende Aktivität erlaubte. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Restriktionsendonukleasen wurden vor der Durchführung weiterer enzymatischer Modifikationen für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.15.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern wurde gegebenenfalls, eine Dephosphorylierung durchgeführt. Die endständigen 5'-Phosphatgruppen des DNA-Plasmids wurden mit Hilfe der Enzyme *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) oder der *Alkaline Phosphatase Claf Intestinal* (CIAP) entfernt. Dazu wurde entweder eine Unit SAP pro μg DNA für 15 min bei 37°C inkubiert oder 0,01 Units CIAP pro pmol DNA-Enden für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Inkubationsschritt der CIAP konnte gegebenenfalls wiederholt werden. Eine Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte für 15 min bei 65°C.

2.15.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Während der Ligation wurden linearisierte DNA-Fragmente miteinander verbunden. Das Enzym Fast-Link™ DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der linearisierten DNA. Auf diese Weise entstehen rekombinante DNA-Moleküle. Folgende Mengen wurden für einen Ligationsansatz eingesetzt:

5-25 ng	Vektor-DNA
30-120 ng	Insert-DNA
1 μl	Fast-Link™ DNA-Ligase (2 U/ μl)
1,5 μl	10× Ligationspuffer
1,5 μl	10 mM ATP
add 15 μl H ₂ O	

Bei einer Ligation cohesiver Enden wurde ein Insert zu Vektor Verhältnis von 3:1 (DNA in mol) gewählt. Bei *Blunt End* Ligationen wurde die ATP-Konzentration auf 0,5 mM verringert und das Vektor zu Insert Verhältnis auf 5:1 erhöht.

Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und die Ligase anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert.

2.15.4 Rekombination von DNA-Fragmenten

Der pcDNA-DEST40 Vektor der Maus cDNA Library enthält die sogenannten *attB-Sites*, die die cDNAs flankiert. Daher wurde die Gateway® Recombinant Cloning Technology (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt, um cDNAs in einen anderen Vektor zu transferieren. Hierzu musste dem Zielvektor zunächst eine Gateway Kasette eingesetzt werden. Mit Hilfe des Gateway® Vector Conversion Systems wurde die gewählte C_{fb}-Kasette nach Angaben des Herstellers in die *shuttle*-Vektoren für die Herstellung eines Adenovirus (pDC-511 und pDC-516) kloniert.

Das Gateway® System nutzt ein Phänomen aus dem Bakteriophagen *Lambda*. Bakterien enthalten einen DNA-Abschnitt flankiert von *attB-Sites* und Phagen einen DNA-Abschnitt, der von *attP-Sites* flankiert wird. Infiziert ein Phage ein Bakterium rekombinieren die *att*-Abschnitte der DNA des Phagen in Anwesenheit von integrationspezifischen Enzymen mit denen des Bakteriums. Die *attB-Site* und die *attP-Site* rekombinieren miteinander und es kommt es zu einer Integration der DNA des Phagen in das bakterielle Genom. Einmal integriert nennen sich die Rekombinationsstellen *attL* und *attR*, wobei L für Links und R für Rechts steht. Diese Rekombinationsreaktionen „LR“ und „BP“ bilden die Basis für das Gateway® System. Geht der Phage in den lytischen Vermehrungszyklus, wird seine DNA wieder aus dem bakteriellen Genom entfernt. Dies geschieht durch die Anwesenheit spezieller Enzyme und führt zu einer Rekombination der *attR-Site* mit der *attL-Site*, was in der Entfernung der DNA des Phagen resultiert.

Das Gateway® System enthält zwei Klonasereaktionen: die LxR und die BxP Klonasereaktion. Da die cDNA Library in den *attB-Sites* vorliegt, muss zunächst eine BxP Klonasereaktion durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die gewünschte cDNA nach Protokoll des Herstellers zunächst in einen sogenannten Donor Vektor (pDONR221™) transferiert. Anschließend erfolgte in einer LxR Klonasereaktion die Rekombination der gewünschten cDNA in den vorher mit der Gateway Kasette versehenen *shuttle*-Vektor (Abb. 2.15.4).

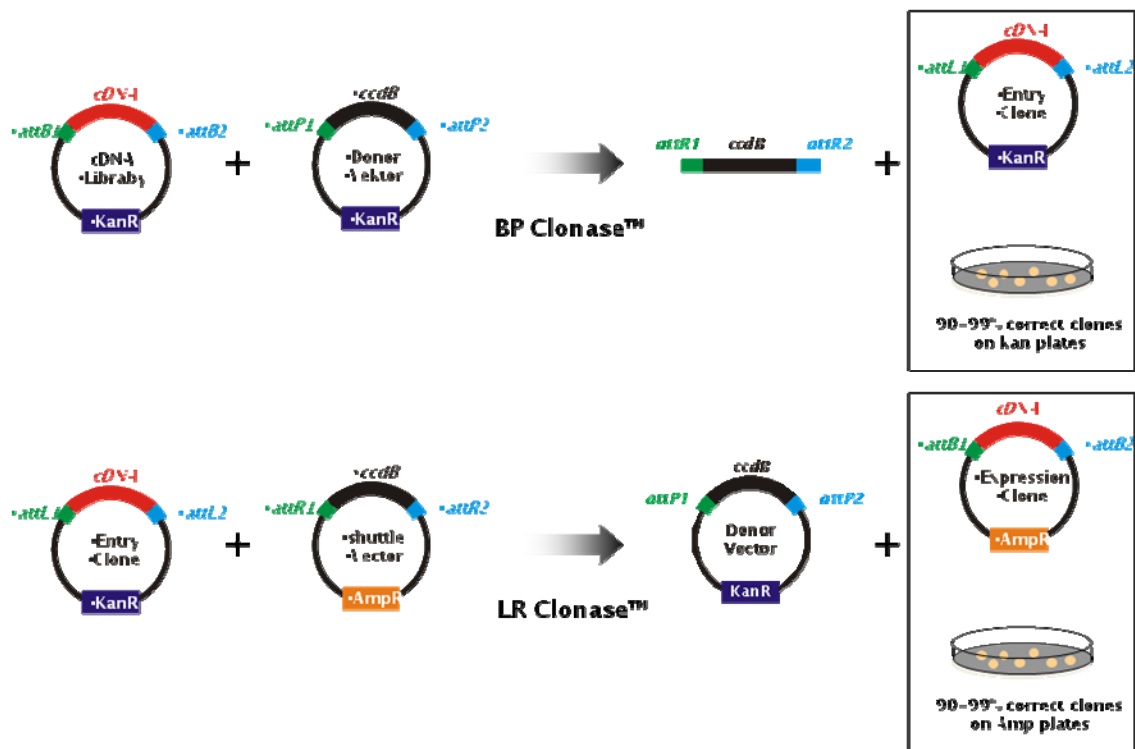


Abbildung 2.15.4 Prinzip der Gateway® Cloning Technology. In der BxP Klonasereaktion rekombiniert die *attB*- mit der *attP*-Site, wobei *attB1* nur mit *attP1* und *attB2* nur mit *attP2* rekombinieren kann. Anschließend wird die LxR Klonasereaktion basierend auf demselben Prinzip durchgeführt. Dabei rekombinieren *attL*- und *attR*-Sites miteinander (Abbildung entnommen bei Gateway The basis-seminar von Invitrogen (modifiziert)).

2.15.5 Transformation elektrokompenter Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen (Dower et al., 1988) wurde zunächst ein 50 µl Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zu dem Zellen wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes hinzugefügt und schnellstmöglich in eine auf -20°C gekühlte *E. coli* Pulser® Cuvette (Bio-Rad Laboratories, München) überführt. Die elektrokompenter Zellen wurden dann einem elektrischen Impuls von 2,5 kV, 25 µF (Easyject basic Elektroporationssystem, Equi Bio, Kent, UK) ausgesetzt. Direkt im Anschluss wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben, die Bakterien darin vorsichtig resuspendiert und in ein Kulturröhrchen überführt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln wurden 50-500 µl der transformierten Zellen auf der Resistenz entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation ü. N. bei 37°C zeigten sich Einzelkolonien.

2.15.6 Transformation hitzekompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu den hitzekompetenten *E. coli* Zellen gegeben und dieser Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 sec. Danach wurden die Zellen erneut auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC-Medium überschichtet. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln wurden 50-200 µl der transformierten Zellen auf Agarplatten entsprechender Resistenz ausgestrichen. Nach einer Inkubation ü. N. bei 37°C zeigten sich Einzelkolonien.

2.16 Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion

2.16.1 Polymerase-Kettenreaktion an Plasmid-DNA und cDNA

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985) können kleinste Mengen von Nukleinsäuren amplifiziert werden. Durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) wird die Genauigkeit der Amplifikation gewährleistet. Die Primer flankieren den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Von ihnen ausgehend werden zu den Einzelsträngen komplementäre DNA-Fragmente von einer thermostabilen DNA-Polymerase synthetisiert. So wird der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern in einem Zyklus verdoppelt. Die dabei entstehenden DNA-Stränge stehen als Matrize für die Synthese weiterer Stränge in folgenden Zyklen zur Verfügung.

Der Zyklus der DNA-Amplifikation beginnt mit der Denaturierung der DNA. Anschließend folgt die Bindung der Primer an die komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstrangs (*Annealing*). Dann beginnt die Synthese der DNA durch die gewählte Polymerase in 5'→3'-Richtung (*Elongation*). Die ständige Wiederholung dieses Zyklus führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz. Eingesetzt werden *Taq*-Polymerasen des Archaeabakteriums *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976), wodurch die Automatisierung der PCR in programmierbaren Thermocyclern ermöglicht wurde.

Zur Durchführung einer PCR wurden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß gegeben:

x μ l	<i>template</i> -DNA (10– 200 ng DNA)
2 μ l	<i>forward</i> Primer (10 pmol/ μ l)
2 μ l	<i>reverse</i> Primer (10 pmol/ μ l)
1 μ l	dNTPs (10 mM)
5 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase Puffer (10 \times)
3 μ l	MgCl ₂ (50 mM)
1 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/ μ l)
add 50 μ l	dH ₂ O

Die Amplifikation von Nukleinsäuren erfolgte in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research (Watertown, USA). Abhängig von erwarteten Fragmentgrößen und Primereigenschaften wurden die Zeit für die Elongation und die Temperatur des Annealings des folgenden Standard-Programms modifiziert:

95°C	3 min	} 30-35 Zyklen	<i>Vordenaturierung</i>
94°C	30 s		<i>Denaturierung</i>
58-65°C	30 s		<i>Annealing</i>
72°C	1 min/kb		<i>Elongation</i>
72°C	5 min		<i>Endelongation</i>
4°C	∞		<i>Aufbewahrung</i>

Um optimale Bedingungen für neue Primer zu finden, wurde eine sogenannte Gradienten-PCR in einem iCycler IQ5 der Firma BioRad Laboratories (München) durchgeführt. Dieser Cycler ermöglicht, in einer PCR verschiedene Annealingtemperaturen auszutesten und damit die perfekte Annealingtemperatur des betreffenden Primerpaars zu finden.

Für eine Erhöhung der Spezifität unspezifisch bindender Primer wurde eine "*touchdown*"-PCR durchgeführt. Dabei wurde über sieben Zyklen sukzessive die Annealingtemperaturen um 1°C pro Zyklus herabgesetzt und im Anschluss erfolgten 30 Zyklen bei konstanter Anlagerungstemperatur.

2.16.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, welches die Umschreibung von mRNA in komplementäre cDNA katalysiert. Bei dieser Erststrang-Synthese dient die mRNA als Matrize. Dazu wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und das Protokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Loh et al., 1989). Als Primer wurden Random-Hexamere verwendet. Diese hybridisieren an verschiedenen Stellen der mRNA und gewährleisten somit dass alle Bereiche der mRNA in der cDNA vertreten sind. Auf diese Weise gelingt auch der Nachweis von mRNAs mit einer Länge größer als 1-2 kb. Die verwendete SuperScript™ II Reverse-Transkriptase ist eine aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) modifizierte Reverse Transkriptase. Dabei handelt sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die über keine intrinsische RNase H Aktivität verfügt. Sie zeichnet sich ebenfalls durch eine erhöhte Temperaturtoleranz aus. Durch diese Fähigkeiten wird die Synthese längerer Transkripte ermöglicht. Die so synthetisierte cDNA diente darauf als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion.

2.16.3 Real-Time Quantitative PCR

Bei der *Real-Time* PCR handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Menge der entstandenen Produkte während der PCR in Echtzeit gemessen wird. Die Messung der Produktzunahme geschieht anhand von Fluoreszenz, die in Abhängigkeit der Produktmenge emittiert wird. Um produktabhängige Fluoreszenz zu generieren, wurden dsDNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. In den vorliegenden Versuchen wurde der Cyaninfarbstoff SYBR-Green I (Jin et al., 1994; Singer et al., 1994) iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, München) verwendet. Der Farbstoff bindet sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Dabei ist die Affinität dieses Farbstoffes etwa 100mal höher als die von Ethidiumbromid. Der an die DNA gebundene SYBR-Green Farbstoff fluoresziert nach Anregung etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff. Daher ist SYBR-Green sehr gut geeignet, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen (Morrison et al., 1998). SYBR-Green wird in Gegenwart von doppelsträngiger DNA mit blauem Licht (480 nm) angeregt und zeigt ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 520 nm.

Die Analyse wurde im 96 well Maßstab durchgeführt. Genutzt wurde das iQ5™ Multicolor *Real-Time* PCR Detection System der Firma BioRad (München). Dieses System arbeitet mit einem

Temperatur-Cycler und einer Wolfram-Halogen Lampe die mit entsprechenden Filtern die Fluoreszenz des SYBR-Green Farbstoffs anregt. Mit einem *Charge-coupled Device* (CCD) Detektor wurde ein simultanes Bild aller 96 wells erfasst. Die Daten können mithilfe der iQTM5 Optical System Software (Version 2.0) bearbeitet, in Excel (Microsoft) exportiert und ausgewertet werden. Jeder Reaktions-Ansatz enthielt 0,5 µM der Oligonukleotide und 10 µl 2× iQTM SYBR Green Supermix. Dieser beinhaltet die *iTaq* DNA-Polymerase [50 U/ml] in einem optimierten Puffer, einen dNTP-Mix (0,4 mM pro dNTP) und den SYBR[®] Green I Fluoreszenzfarbstoff. Jedem Ansatz wurden 2,5 µl einer 1:1 verdünnten cDNA zugegeben. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde die Konzentration des spezifischen Produkts der PCR Reaktion photometrisch bestimmt und eine Verdünnungsreihe angesetzt. Zur Erhöhung der Stabilität wurde die DNA mit sterilem Wasser (für Injektionszwecke) versetzt mit Hefe-t-RNA, auf Konzentrationen zwischen 1 ng/µl bis 0,5 fg/µl gebracht. Für jedes Gen musste abhängig von seiner Expression der Bereich der Standardkurve angepasst werden. Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um das Auftreten von unspezifischen Produkten auszuschließen. Dabei wurde die Fluoreszenz (F) bei steigender Temperatur (T) gemessen und die Steigung dF/dT (1. Ableitung) errechnet. Diese wurde gegen die Temperatur aufgetragen und damit das Maximum der Primer-spezifischen Schmelztemperaturen aufgezeigt. Zusätzliche Maxima innerhalb der Schmelzkurve verrieten unspezifische Produkte oder Primer-Dimere.

Folgendes Programm wurde für alle Primer verwendet:

95°C	1 min		
95°C	15 s	} 35 Zyklen	<i>Vordenaturierung</i>
60°C	10 s		<i>Denaturierung</i>
72°C	20 s		<i>Annealing</i>
95°C	15 s		<i>Elongation</i>
60°C	10 s		
60°C-95°C	+0,5°C/10 s		<i>Schmelzkurve</i>
10°C	Hold		

Die Quantifizierung der Expression erfolgt bei der *Real-Time* PCR anhand des Verhältnisses eines Referenzamplikons zu der initialen Template-Menge des zu untersuchenden Zielamplikons. Beide werden unter identischen Bedingungen amplifiziert. Durch die Verwendung eines *housekeeping* Gens wie der 18S-rRNA als Referenzamplikon kann auf die eingesetzte cDNA-Menge normalisiert

werden. Bei der Auswertung wird ein Signal-Schwellenwert definiert. Bei diesem sollte sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befinden. Der Zeitpunkt in den Zyklen, zu dem das Signal diesen Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus oder C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Der C_T -Wert korreliert mit der Template-Menge, die für die Reaktion eingesetzt wurde. Eine höhere oder niedrigere Template-Menge zeigt sich in einem signifikant früheren oder späteren Anstieg der Fluoreszenz-Emission.

Aus den Daten der Standardkurven für jedes einzelne Amplikon interpoliert das Programm iQTM5 die theoretisch eingesetzte Menge an cDNA für Referenzamplikon und Testamplikon jeder Probe. Die Berechnung zur Auswertung der Ergebnisse wurde in Excel (Microsoft) durchgeführt.

2.17 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.17.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Die in einer Kulturschale gewachsenen adhärennten Zellen wurden nach entsprechender Inkubation mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml DPBS mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 900 x g für 3 min wurde das Pellet je nach Größe in 100-200 µl Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe einer 40G-Kanüle mechanisch lysiert. Für Immunpräzipitations-Experimente wurde der entsprechende Lysepuffer nach dem Waschen der Zellen direkt auf die Kulturplatten gegeben und die Zellen lysiert. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min entfernt. Der Überstand mit den Zellproteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt (2.14.6) und das Lysat bei -80°C aufbewahrt.

Für den Luciferase Reporterassay wurden die Zellen in der 24 well Platte einmal in DPBS gewaschen und der 1x PLB Lysepuffer direkt auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min schüttelnd bei RT wurden diese Lysate bei -20°C eingefroren und anschließend die Luciferase Expression gemessen.

2.17.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Protein-Lysaten wurde nach der BCA-Methode (Smith, 1985) mit Hilfe des BCATM Protein Assay Kits (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) bestimmt. Die Methode basiert auf Cu^{2+} -Ionen in einer alkalischen Lösung, die Proteine binden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -

Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese bilden mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbstoffkomplex aus. Die Komplexe besitzen ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Als interner Standard wurde eine BSA-Eichreihe (0-2000 $\mu\text{g/ml}$ BSA) verwendet, anhand der die Proteinkonzentration der Eichgeraden extrapoliert wurde. Die Lösungen A und B wurden 50:1 gemischt und je 200 μl davon zu einer 1:10 oder 1:20 Verdünnung der zu messenden Protein-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Extinktion in 96well Mikrotiterplatten bei 562 nm im μQuant Universal Microplate-Spektralphotometer (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

2.17.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen System mit Tris-Glycinpuffern durchgeführt (Lämmli, 1970). Hierzu wurde das SDS-PAGE Mini-System PROTEAN II bzw. III verwendet (BioRad Laboratories, München). Die Proteinproben wurden mit Lysepuffer auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt, mit 4x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 60°C erhitzt. Für die Analyse phosphorylierter Proteine wurden die Proben nur auf 37°C für 10 min erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x PAGE-Laufpuffer bei 50 mA pro Gel für etwa 1 h. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde parallel zu den Proteinproben ein vorgefärbter Proteinstandard (BioRad Laboratories, München) aufgetragen. Es wurde in der Regel ein 10-12,5%tiges Trenngel mit einem 4%tigen Sammelgel verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden nach den unten aufgeführten Angaben gemischt und die Gele nach Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gegossen:

	10% Trenngel	12,5% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamid-Biscrylamid	3,33 ml	4,17 ml	3,33 ml
4x Tris/SDS, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	
4x Tris/SDS, pH 6,8			2,5 ml
H ₂ O	4,16 ml	3,33 ml	4,16 ml
APS	33 μl	33 μl	33 μl
TEMED	7 μl	7 μl	7 μl
	10 ml	10 ml	10 ml

2.17.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose mittels Western-Blot

Um Proteine immunologisch nachweisen zu können, erfolgte ein elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran® Nitrozellulose Transfer Membran, Whatman, Dassel). Der Transfer wurde in Mini-Trans-Blot® Kammern (BioRad Laboratories, München) durchgeführt. Folgende Komponenten wurden in 1x Transferpuffer getränkt und nacheinander in die Blot-Kassette gestapelt: Schwamm, zwei Filterpapiere (Whatman GB003 Filter, Schleicher & Schüll, Dassel) und die Nitrozellulosemembran. Darauf wurde das SDS-PAGE Gel luftblasenfrei aufgelegt und wieder mit zwei Filterpapieren und einem Schwamm bedeckt. Die Kassette wurde geschlossen und in einen mit 1x Transferpuffer gefüllten Tank eingehängt. Bei 500 mA wandert der SDS-Protein-Komplex für 2 h Richtung der Anode und wird so aus dem SDS-PAGE Gel auf die Membran transferiert. Im Anschluss daran wurde die Membran mittels Ponceau-Rot reversibel gefärbt, um die Vollständigkeit des Transfers zu prüfen. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixiert gleichzeitig die Proteine auf der Membran.

2.17.5 Detektion von membranengebundenen Proteinen mit Antikörpern

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer auf die Nitrozellulose mit 5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach einem kurzen Waschschriff in 1x TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Je nach Antikörper wurde eine entsprechende Verdünnung in 0,5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween oder 5% BSA in 1x TBS-Tween verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C ü. N. oder für 1-2 h bei Raumtemperatur. Darauf wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x TBS-Tween gewaschen. Dann wurde der entsprechende *HRP-* (*Horseradish peroxidase*) gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in 0,5% Magermilchpulver gelöst und in 1x TBS-Tween für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut 3 x 5 min in 1x TBS-Tween gewaschen. Für jede Membran wurden 4 ml Lösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) aus einer 1:1 Mischung von Luminol/*Enhancer*-Lösung und stabiler Peroxid-Lösung angesetzt. Die Lösung wurde auf die Nitrozellulosemembran gegeben und für 5 min inkubiert. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol katalysiert was eine Chemilumineszenz-Reaktion auslöst. In der Dunkelkammer wurde anschließend der Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) in Abhängigkeit von der Intensität der Reaktion aufgelegt und der Film entwickelt.

2.17.6 Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation

Für die Koimmunpräzipitation von den mit His-Tag versehenen Proteinen der cDNA-Library wurden gleiche Mengen Protein (mindestens 1 mg) eingesetzt. Dem Lysat wurde 30 µl Maus-IgG-Agarose (Sigma-Aldrich, München) zugefügt und für 3 h bei 4°C rotierend inkubiert. In diesem *preclearing*-Schritt sollten unspezifisch an Maus-IgG-Agarose bindende Proteine vor der Immunpräzipitation entfernen werden. Die Agarose wurde für 30 s bei 6000 x g abzentrifugiert und der Überstand erneut mit 30 µl Maus-IgG Agarose versetzt. Dieser zweite *preclearing*-Schritt wurde ü. N. durchgeführt. Die Agarose wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 50 µl des Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Nach einer Inkubation für 10 min bei 4°C, rotierend wurde mit Hilfe eines Magneten der Dynabeads®-Protein-Komplex sedimentiert. Anschließend wurde viermal in Waschpuffer gewaschen. Für den Pulldown von Proteinen wurde zunächst der Pulldown-Puffer zugegeben und erneut für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten im 1x Pulldown-Puffer erfolgte die Elution der Protein-Komplexe kompetitiv mittels 100 µl Elutionspuffer für 5 min bei RT.

Für die Immunpräzipitation von HA-cDNA Library Protein aus transfizierten NIH3T3-Zellen wurden jeweils 2 Mio. Zellen auf zwei 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen und anschließend in 1 ml DBPS mit einem Zellschaber abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Je nach Größe des Pellets wurden 100-300 µl NP-40 Puffer verwendet. Die Lyse erfolgte durch mechanische Homogenisation mit einer 40G-Kanüle und anschließender Inkubation für 15 min auf Eis.

2.17.7 Ras-Aktivierungs-Assay

Zur Untersuchung des Aktivierungszustands von Ras transfizierten Zellen wurde das Ras Activation Assay Kit der Firma Upstate (Lake Placid, USA) verwendet. Aktiviertes Ras (Ras-GTP) interagiert mit der Ras-bindenden-Domäne (RBD) von C-Raf. In einem Pulldown-Experiment wurde ein C-Raf-RBD-Agarose-Konjugat verwendet, um aktives Ras zu präzipitieren. In einer Western-Blot Analyse wurde dann die Menge an Ras im Präzipitat bestimmt.

Die Lysate wurden nach einer Inkubation von 15 min auf Eis für 5 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den Assay wurden 500 µg Gesamtprotein eingesetzt. Als positiv- und negativ-Kontrollen wurden 5 mg Protein in 500

µl Lysepuffer mit 10 mM EDTA und 100 µM GTPγS (positiv Kontrolle) oder 1 mM GDP (negativ Kontrolle) versetzt und für 30 min bei 30°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Kontrollen wurden anschließend auf Eis abgekühlt und mit 65 mM MgCl₂ versetzt. Für den Pulldown Assay wurde den Lysaten 10 µl C-Raf-RBD-Agarose zugesetzt und die Proben für 45 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Agarose wurde durch Zentrifugation bei 14000 x g für 10 s pelletiert und durch Resuspendieren in 0,5 ml Lysepuffer 3mal gewaschen. Nach dem Waschen wurde die C-Raf-RBD-Agarose in 40 µl 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Western-Blot. Durch Inkubation der Western-Blot-Membran in einer 1:20000 Verdünnung des im Kit enthaltenen Ras-spezifischen Antikörpers in 0,5% (w/v) Milchpulver in TBS-Tween-Lösung ü. N. bei 4°C erfolgte die Detektion des präzipitierten aktiven Ras.

2.18 cDNA Library Screen

2.18.1 Luciferase Reporterassay

Der Screen der Maus cDNA Library basiert auf dem Prinzip des Two-Hybrid Systems. Dieses wurde ursprünglich für Hefen entwickelt (Sadowski et al., 1988; Fields und Song 1989) und ist nun auch für Säugerzellen zugänglich. Mit dem CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System (Promega, Mannheim) können Protein-Protein Interaktionen in einer *in vivo* ähnlichen Umgebung studiert werden.

Das System besteht aus den beiden Vektoren pBIND und pACT und dem Reporter pG5luc. Der pBIND Vektor enthält die GAL4 DNA-bindende Domäne aus Hefe oberhalb einer *multiple cloning* Region. Zusätzlich exprimiert der p-BIND Vektor *Renilla reniformis* Luciferase unter der Kontrolle eines SV40 Promotors, wodurch eine Normalisierung auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen ermöglicht wird. Der pACT Vektor enthält die aus dem *Herpes simplex* Virus bekannte transkriptionsaktivierende VP16 Domäne oberhalb einer *multiple cloning* Region. Zur Untersuchung zweier Gene, die für potentiell interagierende Proteine (X, Y) kodieren, kloniert man jeweils die cDNA eines Gens in den pACT und die des anderen Gens in den pBIND Vektor. Somit entstehen zwei Fusionsproteine: Protein X wird mit der GAL4 DNA-bindenden Domäne fusioniert und Protein Y mit der VP16 transkriptionsaktivierenden Domäne. Der pG5luc Reporter enthält fünf GAL4 Bindungsdomänen oberhalb eines minimalen Promotors (TATA-Box), der die Expression der *firefly* Luciferase steuert. Die Fusionsproteine GAL4-X und VP16-Y wurden zusammen mit dem Reporter pG5luc in Säugerzellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24-72 h wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporterassay Systems (Promega,

Mannheim) die *Renilla reniformis* und die *firefly* Luciferase Expression gemessen. Das Fusionsprotein GAL4-X bindet an die GAL4 bindenden Domänen des pG5luc Reporters. Interagiert Protein Y mit Protein X gelangt die stark transkriptionsaktivierende VP16 Domäne in die Nähe des minimalen Promotors und führt zu einer deutlich verstärkten *firefly* Luciferase Expression (Abb. 2.18.1).

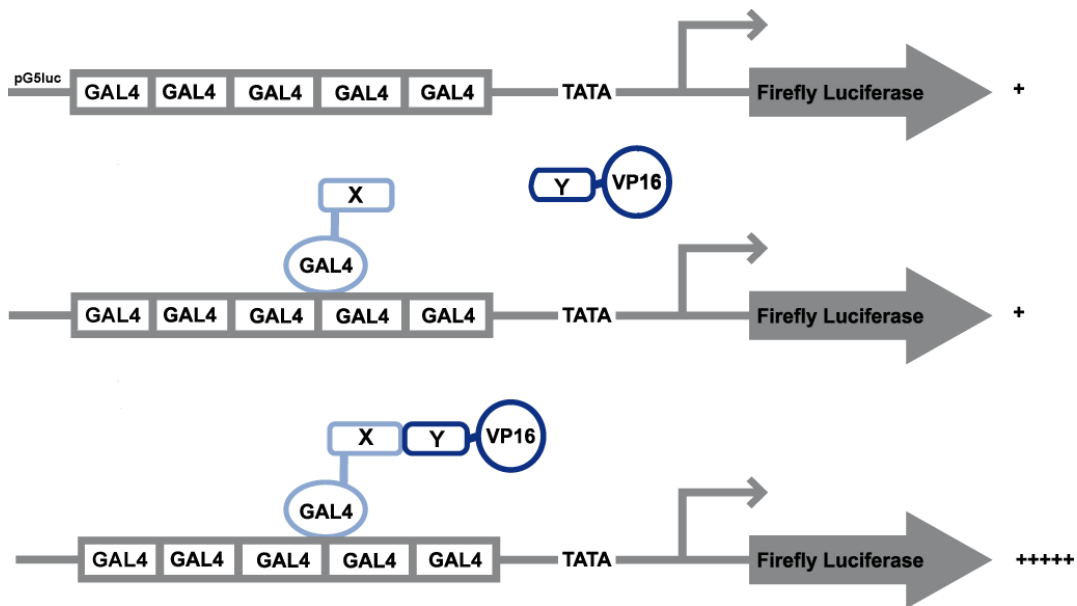


Abbildung 2.18.1 Schematische Darstellung des Mammalian Two-Hybrid Systems. Der pG5luc Vektor enthält 5 GAL4 binde Domänen oberhalb eines minimalen Promotors (TATA-Box). Dieser steuert die Expression des *firefly* Luciferase Reporter-Gens. Protein X wird mit der GAL4 DNA-bindenden Domäne fusioniert und Protein Y mit der VP16 transkriptionsaktivierenden Domäne. Interagieren beide Fusionsproteine miteinander, gelangt die stark transkriptionsaktivierende VP16 Domäne in proximale Nähe des minimalen Promotors und resultiert in einer erhöhten *firefly* Luciferase Expression.

2.18.2 Screen der Maus cDNA Library

Für den Screen der Maus cDNA Library nach Modulatoren der RAF/MEK Interaktion wurden zunächst verschiedene Fusionsproteine hergestellt. Dazu wurde der offene Leserahmen von Mek1 mit den Primern Mek1-BamHI-f und Mek1-KpnI-r aus der cDNA der Maus amplifiziert. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI wurde das PCR-Produkt in pBIND Vektor kloniert. Der offene Leserahmen von humanem B-RAF wurde mit den Primern BRAF-BamHI-f und BRAF-EcoRV-r2 aus dem Vektor pEF-mBRAF (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chris Marshall, The Institute of Cancer Research, London, UK) amplifiziert. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRV wurde das PCR-Produkt in den pACT Vektor kloniert. Der offene Leserahmen von C-Raf wurde mit den Primern CRaf-EcoRV-f und CRaf-KpnI-r aus der cDNA der Maus amplifiziert. Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoRV und KpnI wurde das PCR-Produkt in den pACT Vektor kloniert.

In einer 96 deepwell Platte wurde LB-Medium der entsprechenden Resistenz so angeimpft, dass sich in jedem well annähernd 100 Klone der cDNA Library befanden. Diese wurden bei 37°C ü. N. schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mit Hilfe des EpMotion 5075 Pipettierroboters und des Perfectprep BAC 96 Kits (5Prime, Hamburg). Um einen hohen Transfektionsdurchsatz zu erreichen, erfolgte die Transfektion der COS-7 Zellen im 24 well Format. Zusätzlich erfolgte jede Transfektion eines cDNA Pools im Triplikat. In einem Versuchsdurchlauf wurden annähernd 300 Transfektionen in COS-7 Zellen durchgeführt. Dafür wurden 5×10^4 COS-7 Zellen pro well ausplattiert, die am folgenden Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% erreichten. Die Transfektion der COS-7 Zellen wurde mit FuGENE®6 (Roche, Mannheim) durchgeführt (2.11.3). Der Transfektionsansatz wurde mit dem EP-Motion 5075 Pipettierroboter in 96 well Platten pipettiert. Zunächst wurden 100 µl serumfreies DMEM vorgelegt und mit 1,2 µl FuGENE®6 versetzt. Anschließend folgten jeweils 50 ng der Plasmide kodierend für GAL4-Mek1- und VP16-RAF-Fusionsproteine zusammen mit 50 ng des pG5luc Reporters. Dazu kamen 250 ng DNA des Pools aus etwa 100 cDNA Klonen der Maus cDNA Library. Nach Zugabe der DNA wurde der Transfektionsansatz 2 h bei RT inkubiert und anschließend zu dem normalen Wachstumsmedium der Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen in 100 µl 1x PLB lysiert, 15 min schüttelnd bei RT inkubiert und für eine bessere Lyse bei -20°C eingefroren. Die Messung der Luciferase Expression erfolgte an einem Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad) mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporterassay Systems. Gemessen wurden die *Renilla Reniformis* und *firefly*

Luciferase Expressionen. RLU (*Relative Light Units*) ist eine einheitslose Größe und definiert als der Quotient aus *firefly* und *Renilla Reniformis* Luciferase Expression.

Zusätzlich wurden zwei Kontrollen verwendet: Zum Einen wurde die Luciferase Expression der basalen Interaktion von B-RAF/Mek1 und zum Anderen die angeregte Interaktion von B-RAF/Mek1 durch eine konstitutiv aktive RasV12 Mutante gemessen. Pools die eine starke positive oder negative Abweichung von der basalen B-RAF/Mek1 Interaktion zeigten mussten in einem anschließenden Schritt vereinzelt werden. Dabei wurde als threshold die 1,5 fache RLU für die Aktivierung bzw. die 0,5 fache RLU für die Inhibition bezogen auf den basalen RLU Wert der B-RAF/Mek1 Interaktion gesetzt.

2.18.3 Subselektion interessanter Maus cDNA Pools

Die cDNAs eines etwa 100 cDNA Klone enthaltenen Pools mussten im nachfolgenden Schritt vereinzelt werden. Um einzelne cDNAs zu identifizieren, die für eine Inhibition oder eine Aktivierung der B-RAF/Mek1 Interaktion verantwortlich waren, wurde der betreffende cDNA Pool in *E. coli* retransformiert. Anschließend wurde der Retransformationsansatz auf LB-Platten entsprechender Resistenz ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 96 einzelne Kolonien in LB-Medium in einer 96 deepwell Platte angeimpft und ü. N. bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte im EpMotion 5075 Pipettierroboter mit dem Perfectprep BAC 96 Kit. Anschließend wurden 12 einzelne cDNA Klone gepooled, so dass aus einer 96 well Platte acht Subpools entstanden. Diese wurden erneut im Triplikat in COS-7 Zellen transfiziert (2.18.2). Nach der Auswertung der Ergebnisse wurden positive Subpools aufgelöst und die cDNAs einzeln in COS-7 Zellen transfiziert. cDNAs, die in der Lage waren die basale Aktivität der B-RAF/Mek1 Interaktion um den 1,5 fachen RLU-Faktor zu steigern, oder um den 0,5 fachen RLU-Faktor zu senken wurden anschließend zum Sequenzieren geschickt.

2.19 Knockdown der Expression von Genen mit miR RNAi

RNAi (RNA Interference) bietet die Möglichkeit, die Expression von Genen in Säugerzellen posttranskriptional zu inhibieren. Um zusätzlich zu den Auswirkungen einer Überexpression von Proteinen in Kardiomyocyten auch den Fall reduzierter Expression zu untersuchen, wurde ein *Knockdown*-Experiment durchgeführt. Dafür wurden zunächst vier miRNAs (microRNAs) mit dem Programm BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, Karlsruhe) entworfen. Diese Software erkennt effiziente Zielsequenzen innerhalb eines Gens, um einen *Knockdown* durch eine miRNA zu

induzieren. Die gelieferten Oligonukleotide wurden zunächst mit Hilfe des BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits hybridisiert und in den pcDNA™6.2-GW/miR Expressionsvektor kloniert. MiRNAs, die vom pcDNA™6.2-GW/miR Vektor exprimiert werden, werden durch die RNA Polymerase II transkribiert. Diese Vorläufer miRNA wird dann durch Xpo-5 (Exportin-5) aktiv aus dem Zellkern exportiert. Einmal im Zytoplasma angelangt, spaltet sie die Helikase Dicer in kurze doppelsträngige Fragmente, was sie zu den eigentlichen miRNAs konvertiert. Schließlich bildet sich der Komplex RISC (RNA Induced Silencing Complex) der an die entsprechende mRNA bindet und durch die Aktivierung von RNasen spaltet.

Zum Test der *Knockdown*-Effizienz wurden die vier miRNAs zunächst mit FuGENE®6 in NIH3T3 Zellen transfiziert. Die NIH3T3-Zellen wurden so ausplattiert, dass sie nach 24 h eine Konfluenz von 60-80% aufwiesen. 72 h nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Auswertung der *Knockdown*-Effizienz mittels Western-Blot. Vielversprechende miRNAs wurden anschließend mit Hilfe des Gateway Systems zur Herstellung eines Adenovirus in den *shuttle*-Vektor kloniert. Die Kardiomyocyten neonataler Ratten wurden 18 h nach Isolation wiederholt in DMEM gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit frischem DMEM/M199-Medium 4:1 überschichtet und adenoviral transfiziert. Nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen lysiert und die *Knockdown*-Effizienz mittels Western-Blot analysiert.

2.20 Ethik

Untersuchungen an lebenden Tieren wurden durch die örtliche Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und bewilligt. Darüber hinaus erfolgte die Prüfung und Genehmigung durch das "Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit". Aktenzeichen: AZ: 33.42502-006/06; AZ: 509.42502/01-38.04 (Ä1).

2.21 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der erhobenen Daten erfolgten unter Verwendung des Programms GraphPad-Prism (Version 5.0). Für die Berechnung von statistischen Signifikanzen wurde, wenn nicht anders angegeben der *Bonferroni Multiple Comparison Test* angewandt. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der *Students t-Test* angewandt. Die Fehlerbalken in den Graphiken entsprechen, sofern nicht anders vermerkt, dem Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Die Inhibition von B-Raf verhindert die Phenylephrin induzierte Hypertrophie

Um zu untersuchen, ob die B-Raf Kinaseaktivität eine Rolle bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie spielt, wurde im Modell kultivierter neonataler Kardiomyocyten der Ratte die Zellgröße planimetrisch untersucht. Dies erfolgte in mittels Phenylephrin zur Hypertrophie angeregten Kardiomyocyten sowie in nicht stimulierten Kontrollmyocyten. Die B-Raf Aktivität wurde durch den kommerziell erhältlichen Inhibitor SB590885 inhibiert.

Dem Wachstumsmedium neonatalen Kardiomyocyten der Ratte wurde einen Tag nach Isolation 5 μM des Inhibitors SB590885, oder für die negativ Kontrolle, die entsprechende Menge Vehikel zugegeben. Zur Induktion eines hypertrophen Wachstums wurde dem Medium der Zellen zusätzlich 5 μM Phenylephrin zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen fixiert und die Kardiomyocyten mit Hilfe eines α -Actinin Antikörpers angefärbt. Die so behandelten Zellen wurden mit einer 40fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Anschließend folgte die verblindete Analyse und die Bestimmung der relativen Zelloberfläche mit dem Programm ImageJ. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Zelloberfläche der mit Vehikel behandelten Zellen ermittelt. Es wurden drei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe etwa 300 Zellen ausgezählt wurden.

Die Untersuchung ergab, dass es durch die Inhibition von B-Raf zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zelloberfläche kommt (Vehikel $1,00 \pm 0,025$, $n=298$; Inhibitor $0,76 \pm 0,018$, $n=335$). Die Behandlung mit Phenylephrin erhöhte die relative Zelloberfläche signifikant (Vehikel+PE $1,23 \pm 0,022$, $n=292$). Zellen, die simultan mit Phenylephrin und dem Inhibitor SB590885 behandelt wurden, entwickelten keine zelluläre Hypertrophie der neonatalen Kardiomyocyten (Inhibitor+PE $0,74 \pm 0,017$, $n=323$, $p < 0,0001$), (Abb. 3.1).

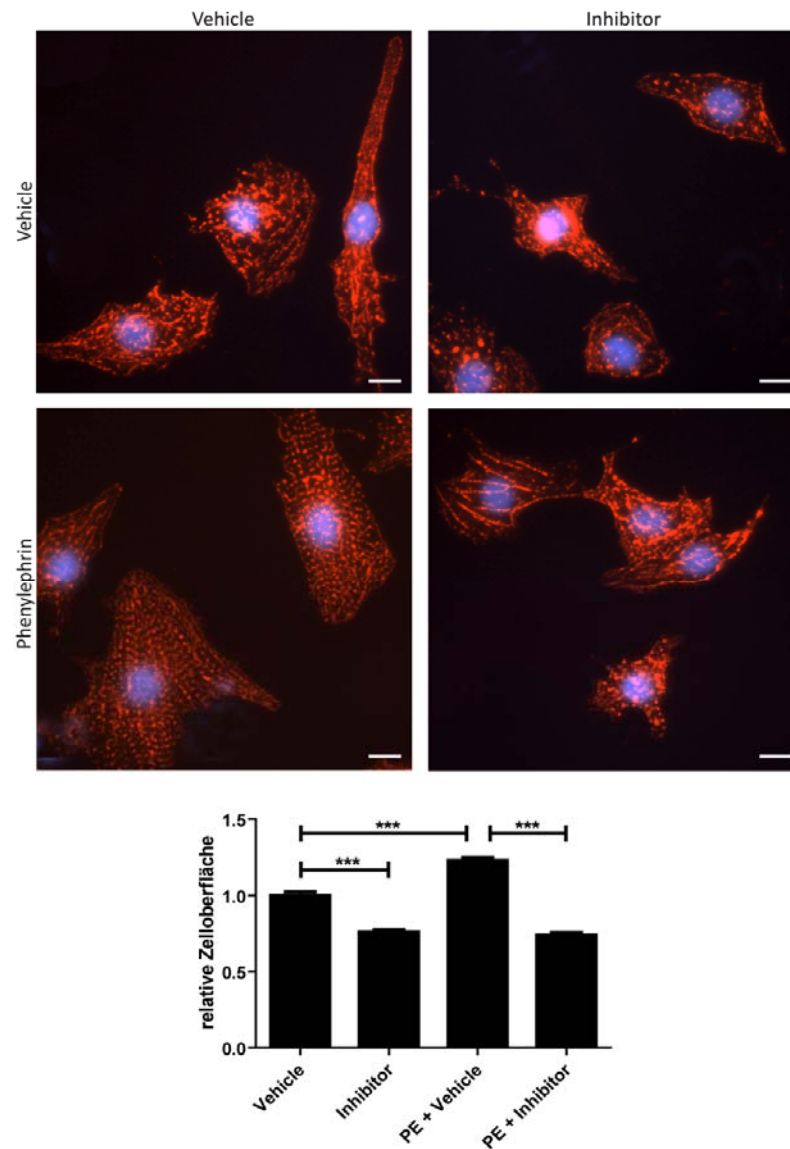


Abbildung 3.1 Die Inhibition von B-Raf verhindert die Phenylephrin induzierte kardiale Hypertrophie. 24 h nach Isolation wurde dem Wachstumsmedium der Kardiomyocyten 5 μ M des B-Raf Inhibitors SB590885 oder VentrikelLösung zugegeben. Um die Zellen zu hypertrophem Wachstum anzuregen, erfolgte simultan die Stimulation mit 5 μ M Phenylephrin. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol:Aceton fixiert und die Kardiomyocyten mit einem α -Actinin Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Zellen wurden mit einer 40fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Zelloberfläche mit der Software ImageJ bestimmt. Pro Gruppe wurden etwa 300 Zellen ausgemessen. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Oberfläche der mit Vehikel behandelten Zellen berechnet. Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, sowie repräsentative Bilder der Kardiomyocyten neonataler Ratten. Der Maßbalken entspricht 10 μ m. Durch die Inhibition von B-Raf kam es zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zelloberfläche. Die Behandlung mit Phenylephrin erhöhte die Zelloberfläche signifikant. Eine simultane Zugabe des Inhibitors SB590885 verhindert eine zelluläre Hypertrophie der neonatalen Kardiomyocyten der Ratte vollständig. (***)(<0,0001).

3.2 Die Inhibition von B-Raf führt zu verminderter Mek1/2 Phosphorylierung

Das Ausbleiben einer durch Phenylephrin induzierten Hypertrophie in den B-Raf inhibierten neonatalen Kardiomyocyten der Ratte lässt am ehesten auf eine verminderte Aktivierung und Phosphorylierung von Mek schließen. Um zu untersuchen, ob die B-Raf Kinaseaktivität essentiell für die Aktivierung des B-RAF Effektors Mek ist, wurde der Phosphorylierungsstatus von Mek mittels Western-Blot analysiert.

Zu diesem Zweck wurde dem Wachstumsmedium der Zellen 5 μ M des B-Raf Inhibitors SB590885 zugegeben und die Zellen für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Stimulation des Signalweges wurde den so vorbereiteten Zellen 5 min vor Ablauf der Inkubationszeit 5 μ M Phenylephrin zugesetzt. Nach exakt 5 min wurden die Zellen geerntet und in NP-40 Puffer lysiert. Mittels Western-Blot Analyse wurde der Phosphorylierungsstatus von Mek1/2 mit einem phosphospezifischen Antikörper überprüft. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysat vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von B-Raf in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte zu einer signifikanten Reduktion der Mek1/2 Phosphorylierung führt. Dies wurde sowohl in den unstimulierten Kardiomyocyten (pMek/tMek: Vehikel $1,13 \pm 0,05$; Inhibitor $0,16 \pm 0,01$, $p < 0,05$, $n=3$) als auch in den durch Phenylephrin stimulierten Kardiomyocyten sichtbar (pMek/tMek: Vehikel+PE $2,64 \pm 0,15$; Inhibitor+PE $1,01 \pm 0,06$, $p < 0,001$, $n=3$), (Abb. 3.2).

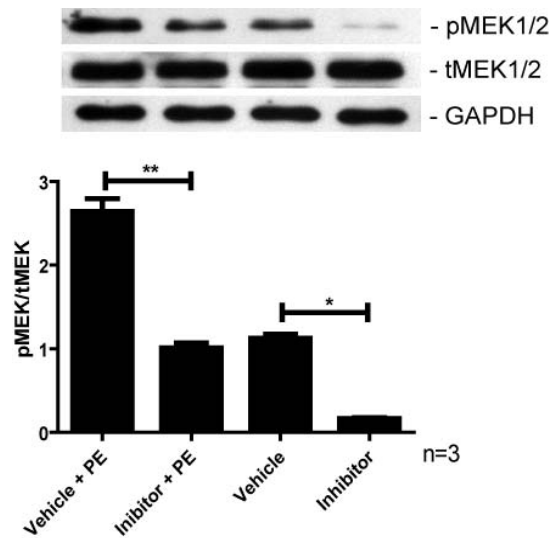


Abbildung 3.2 Die Inhibition von B-Raf führt zu verminderter Mek1/2 Phosphorylierung in neonatalen Kardiomyocyten der Ratte. 5 μ M des B-RAF Inhibitors SB590885 wurde dem Medium der Kardiomyocyten zugesetzt und für 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 5 min vor Ablauf der Inkubation wurde dem Medium 5 μ M Phenylephrin zugesetzt. Nach exakt 5 min wurden die Zellen lysiert. Für die Analyse mittels Western-Blot wurde ein phosphospezifischer Mek1/2 Antikörper verwendet. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysat vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert. Sowohl in den durch Phenylephrin zur Hypertrophie stimulierten Kardiomyocyten als auch in den unstimulierten Kardiomyocyten kam es zu einer signifikanten Inhibition der Mek1/2 Phosphorylierung (* $<0,05$, ** $<0,005$).

3.3 Optimierung der Transfektion von COS-7 Zellen

Für den Screen der Maus cDNA Library (siehe 3.5) sollte eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der COS-7 Zellen erreicht werden. Daher wurden die Zellen wie vom Hersteller empfohlen mit einer Konfluenz von 60-80% mit verschiedenen Verhältnissen von FuGENE®6 Transfektionsreagenz [μ l] zu DNA [μ g] transfiziert (3:1, 3:2, 6:1). Für die Transfektion wurde das fluoreszierende Plasmid pEGFP-N1 verwendet. Anschließend erfolgte die verblindete Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 20facher Vergrößerung. Es wurden fünf biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe mehr als 300 Zellen ausgezählt wurden. Die Untersuchung ergab, dass das Verhältnis 3:1 von FuGENE®6 zu DNA mit 60% die beste Transfektionseffizienz lieferte (3:1 60,2 \pm 1,35%; 3:2 39,5 \pm 1,49%; 6:1 16,7 \pm 1,34% n=5; p<0,0001).

Das Verhältnis 3:1 von FuGENE®6 zu DNA wurde daher in allen nachfolgenden Versuchen verwendet (Abb. 3.3).

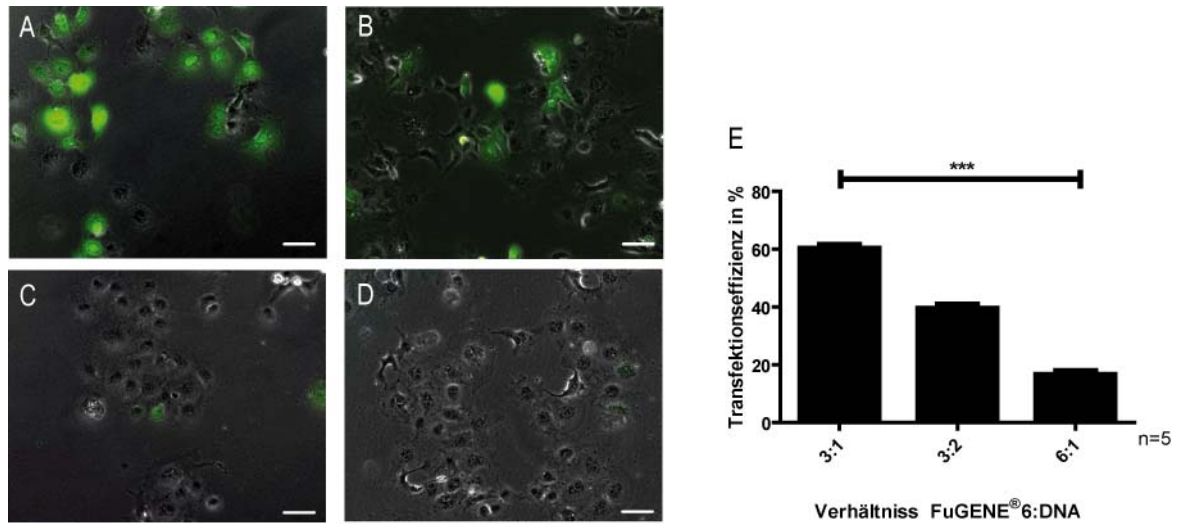


Abbildung 3.3 Optimierung der Transfektion von COS-7 Zellen. Um die besten Transfektionsbedingungen der COS-7 Zellen zu ermitteln, wurden verschiedene Verhältnissen von FuGENE®6 Transfektionsreagenz zu DNA getestet. Die Zellen wurden einen Tag nach dem Ausplattieren bei einer Konfluenz von 50-80 % mit pEGFP-N1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop mit 20facher Vergrößerung fotografiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder der COS-7 Zellen transfiziert mit verschiedenen Verhältnissen von FuGENE6 zu DNA: **(A)** 3:1, **(B)** 3:2 und **(C)** 6:1. **(D)** zeigt die mit einem leeren Kontrollvektor transfizierte Zellen. **(E)** Die Auswertung erfolgte mit den Ergebnissen aus fünf unabhängigen Versuchen wobei jede Gruppe mehr als 300 Zellen enthielt. Die Untersuchung ergab, dass das Verhältnis 3:1 von FuGENE®6 zu DNA mit 60% die beste Transfektionseffizienz lieferte (***<0,0001).

3.4 Validitätsprüfung der Fusionsproteine für den Luciferase Reporterassay

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von B-RAF in der Phenylephrin-vermittelten Hypertrophie in Kardiomyocyten hin. Die Signalübertragung von B-RAF zu MEK stellt eine wichtige Schlüsselstelle der MAPK Signalkaskade dar. Daher wurde nach bisher unbekanntem Proteinen gesucht, die Modulatoren der Signalübertragung von B-RAF zu MEK sind. Hierzu wurde unter Verwendung einer cDNA Library in einem genomweiten Ansatz ein Luciferase Reporterassay etabliert. Der Luciferase Reporterassay basiert auf dem Prinzip des CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid Systems der Firma Promega. Hierzu wurden zunächst die benötigten Fusionsproteine hergestellt: Mek1 wurde mit der im pBIND Vektor enthaltenen GAL4 DNA-bindenden Domäne aus Hefe fusioniert. B-RAF wurde in den pACT Vektor kloniert und so mit der VP16 transkriptions-aktivierenden Domäne aus dem *Herpes simplex* Virus fusioniert. Die abschließende Sequenzierung der beiden Inserts zeigte mutationsfreie Sequenzen.

Der pACT Vektor exprimiert außer BRAF-VP16 auch *Renilla reniformis* Luciferase unter der Kontrolle eines SV40 Promotors. Das ermöglicht eine Normalisierung hinsichtlich der jeweiligen Transfektionseffizienz. Der pG5luc Luciferase-Reporter dieses Systems enthält fünf GAL4 Bindungsstellen vor einem minimalen Promotor (TATA-Box). Dieser steuert die Expression eines *firefly* Luciferase Gens. Assoziieren die RAF Proteine an das durch die GAL4 DNA-bindende Domäne an den Reporter gebundene Mek1 kommt die transkriptionsaktivierende VP16 Domäne in räumliche Nähe des minimalen Promotors. Dies resultiert in einer stark erhöhten Expression des *firefly* Luciferase Gens.

B-RAF besitzt aufgrund einer konstitutiven Phosphorylierung an S445 seiner N-Region eine starke basale Aktivität. Dadurch ist B-RAF im Gegensatz zu A-RAF und C-RAF ohne weitere Phosphorylierungen in der Lage an MEK zu binden. Zudem kann die basale Aktivität von B-RAF durch weitere Phosphorylierungen des Aktivierungssegments an T598 und S601 zusätzlich gesteigert werden. B-RAF bindet die dual-spezifische Kinase MEK je nach Aktivierungsstatus mit unterschiedlicher Affinität (Abb. 3.4).

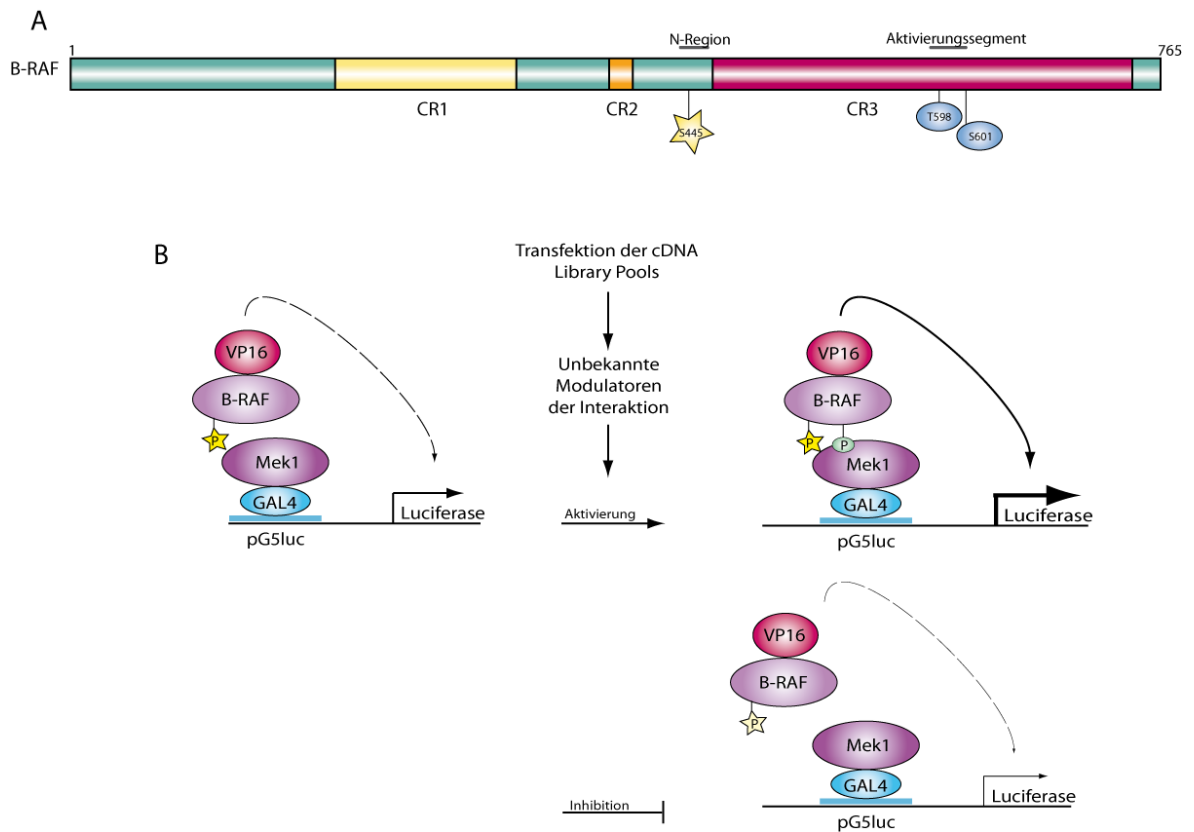


Abbildung 3.4 Prinzip des Luciferase Reporterassays. (A) Die Struktur des B-RAF Proteins zeigt eine konstitutive Phosphorylierung an S445 der N-Region. Diese Phosphorylierung verleiht B-RAF eine starke basale Aktivität, die durch Phosphorylierung des Aktivierungssegmentes an T598 und S601 gesteigert werden kann. **(B)** Der Luciferase Reporterassay: Mek1 wurde mit einer GAL4 DNA-bindenden Domäne und B-RAF mit einer VP16 transkriptionsaktivierenden Domäne fusioniert. Der Luciferase-Reporter (pG5luc) dieses Systems enthält fünf GAL4 Bindungsstellen vor einem minimalen Promotor (TATA-Box). Dieser steuert die Expression eines *firefly* Luciferase Gens. Assoziiert B-RAF an das durch die GAL4 DNA-bindende Domäne an das an den Reporter gebundene Mek1, kommt die transkriptionsaktivierende VP16 Domäne in räumliche Nähe des minimalen Promotors. Dies resultiert in einer stark erhöhten Expression der *firefly* Luciferase. Transfiziert man nun COS-7 Zellen zusätzlich mit Pools einer cDNAs Library oder bekannten Modulatoren des Signalwegs kann die basale Aktivität von B-RAF stimuliert oder inhibiert werden.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die basale Aktivität von B-RAF ein messbares Luciferasesignal erzeugen kann. Zudem wurde überprüft, ob sich dieses Signal durch Aktivatoren verstärken und durch Inhibitoren vermindern lässt. Die Transfektion der oben beschriebenen Konstrukte erfolgte in COS-7 Zellen. Dazu wurden jeweils 50 ng der GAL4-Mek1 und VP16-BRAF Fusionsproteine sowie des pG5luc Reporters transfiziert. Zur Bestätigung der Funktionalität und Sensitivität dieses Interaktionsassays wurden zwei Kontrollen getestet. Zum Einen wurde der bekannte Inhibitor IMP (*Impedes Mitogenic Signal Propagation*) verwendet. IMP ist ein negativer Regulator der MAPK Signalkaskade, da es in der Lage ist die Formation eines RAF/MEK Komplexes durch die Inaktivierung des Scaffold Proteins KSR1 (*Kinase suppressor of Ras 1*) zu verhindern. Zum Anderen wurde als Aktivator konstitutiv aktive H-RasV12 Mutante verwendet. Es wurden jeweils 250 ng des Aktivators sowie Inhibitors verwendet. Nach 24 h erfolgte die Lyse der Zellen und die Auswertung mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems. Für die Auswertung wurden vier biologische Replikate ausgewertet. Mit Hilfe der *Renilla Reniformis* Expression des pACT Vektors wurde anschließend auf die Transfektionseffizienz normalisiert. Bei der angegebenen RLU (*Relative Light Unit*) handelt es sich um eine einheitslose Größe des Quotienten von *firefly* und *Renilla Reniformis* Luciferase Aktivität. Die RLU wurde relativ zum Mittelwert der basalen Luciferase Expression der B-RAF/MEK1 Interaktion dargestellt.

Wurde nur eines der beiden Fusionsproteine GAL4-Mek1 oder VP16-BRAF in Kombination mit dem jeweiligen Leervektor sowie dem pG5luc Reporter transfiziert, erhielt man kein Luciferase Signal. Dadurch ließ sich ausschließen, dass nur eines der beiden Fusionsproteine alleine in der Lage ist ein basales Luciferase Signal zu generieren (VP16-BRAF $0,006 \pm 0,001$; GAL4-Mek1 $0,013 \pm 0,003$). Die Anwesenheit beider Fusionskonstrukte lieferte dagegen ein deutlich messbares Signal. Auch konnte gezeigt werden, dass sich die B-RAF-spezifische Luciferase Aktivität bei Ko-Expression von IMP signifikant inhibieren und mit Hilfe der konstitutiv aktiven H-RasV12 Mutante signifikant aktivieren ließ (basal $0,969 \pm 0,059$; +IMP $0,441 \pm 0,026$; +RasV12 $1,523 \pm 0,028$; $n=4$; $p < 0,0001$), (Abb. 3.4).

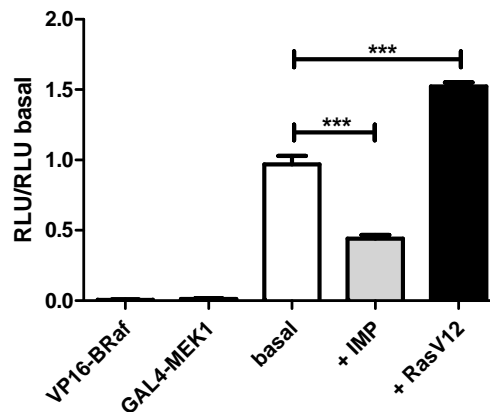


Abbildung 3.4 Validitätsprüfung der GAL4-Mek1 und VP16-BRAF Fusionsproteine für den Luciferase Reporterassay. Um die Spezifität der Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-BRAF zu überprüfen, wurden COS-7 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems. Es wurden vier biologische Replikate ausgewertet. Die RLU (*Relative Light Unit*) wurde relativ zum Mittelwert der basalen Luciferase Expression der B-RAF/Mek1 Interaktion berechnet. Jeweils eines der Fusionsproteine in Kombination mit dem jeweiligen, leeren Vektor und dem Reporter liefert kein Luciferase Signal. Die basale Interaktion von BRAF/Mek1 ließ sich mit Hilfe von IMP signifikant inhibieren und mit Hilfe einer konstitutiv aktiven H-RasV12 Mutante signifikant aktivieren ($*** < 0,0001$).

3.5 Screen der Maus cDNA-Library nach neuen Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion

Für den Screen der Maus cDNA-Library wurden die im Vorversuch untersuchten Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-BRAF gemeinsam mit dem pG5luc Reporter in COS-7 Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde jedem Transfektionsansatz ein Pool aus etwa 100 Klonen der cDNA Library zugegeben. Enthalten diese cDNA-Pools Proteine, die die Interaktion von B-RAF mit Mek1 erhöhen und damit Mek1 potentiell aktivieren, führt dies zu einer vermehrten Rekrutierung von VP16-BRAF an GAL4-Mek1. Dies resultiert in einer erhöhten *firefly* Luciferase Expression. Inhibitoren der B-RAF/Mek1 Interaktion führen zu einer verminderten Bindung von VP16-BRAF an GAL4-Mek1 und somit zur Reprimierung der *firefly* Luciferase Expression.

Jede der 96 Säulen (grau) steht für eine Bestimmung der Interaktions-spezifischen Luciferase Aktivität nach Transfektion eines etwa 100 Klone enthaltenden cDNA Pools (Abb. 3.5.1). Als Kontrollen fungierten die basale Aktivität der B-RAF/Mek1 Interaktion (rot) und die mit Hilfe der konstitutiv aktiven RasV12 Mutante aktivierte Interaktion (blau). Lysate die eine starke positive

oder negative Abweichung von der basalen Luciferase Expression zeigten, mussten in dem folgenden Schritt vereinzelt werden. Dabei wurde der Grenzwert auf die 1,5 fache RLU für die Aktivierung bzw. die 0,5 fache RLU für die Inhibition bezogen auf den basalen RLU Wert gesetzt. Insgesamt wurden 10 Platten mit je 96 Pools auf ihre Beeinflussung der B-RAF/Mek1 Interaktion getestet. Davon wurden 14 Lysate anschließend genauer untersucht.

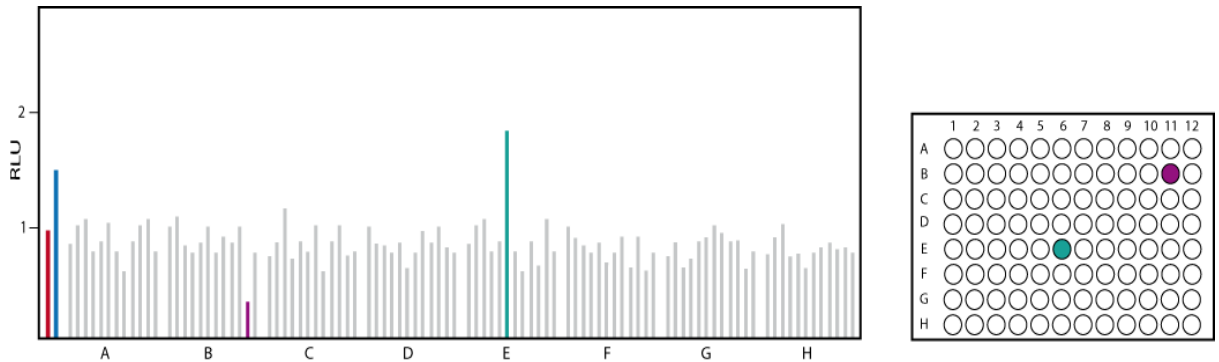


Abbildung 3.5.1 Exemplarischer Readout einer 96 well Platte des Library Screens. Ergebnis einer Transfektion einer repräsentativen 96 well Platte. Je 50 ng der Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-BRAF sowie des pG5luc Reporters wurden gemeinsam mit 250 ng cDNA versetzt. Jeder dieser 96 Pools enthielt annähernd 100 Klone der cDNA-Library. Die Transfektion erfolgte im Triplikat in COS-7 Zellen. Jede der 96 Säulen (grau) steht für einen cDNA Pool. Als Kontrollen fungierte einerseits die basale B-RAF/Mek1 Luciferaseaktivität (rot) und andererseits die aktivierte B-RAF/MEK1 Interaktion durch H-RasV12 (blau). In diesem beispielhaften Readout kam es zu einer Inhibition der B-RAF/MEK1 Interaktion in well B11 und zu einer erhöhten Aktivierung in well E6. Diese positiven Pools wurden im folgenden Schritt vereinzelt.

Der jeweilige cDNA Klon, der für eine veränderte B-RAF/Mek1 Interaktion verantwortlich war musste zunächst aus dem Pool von etwa 100 cDNA Klonen isoliert werden. Es wurden annähernd 1000 cDNA Pools untersucht, die 10000 individuelle cDNA Klone repräsentieren. Davon wurden 14 cDNA Pools ausgewählt, aus denen im nachfolgenden Schritt die einzelnen cDNAs isoliert wurden. Diese wurden erneut dem Reporterassay zugeführt und lieferten 19 einzelne cDNAs, die in der Lage waren die Interaktion von B-RAF mit Mek1 zu modulieren. Durch die Vereinzlung der cDNAs im Luciferase Reporterassay konnten mehrere modulierende cDNA Klone identifiziert werden. Alle so identifizierten Klone sind in Abbildung 3.5.2 und Tabelle 3.5 zusammengefasst. Es wurden sowohl bekannte als auch unbekannte Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion identifiziert. Die Ergebnisse der unabhängig voneinander untersuchten cDNA Klone wurden in einem Graphen veranschaulicht. Daher wurde die RLU jeweils auf den Mittelwert der mitlaufenden Kontrolle der B-RAF/Mek1 Interaktion stimuliert durch RasV12 normalisiert.

Erwartungsgemäß ließ sich die basale Interaktion von B-RAF/Mek1 durch RasV12 signifikant stimulieren (basal $0,598 \pm 0,049$; +RasV12 $0,989 \pm 0,023$).

Die folgenden cDNAs waren in der Lage die Interaktion von B-RAF/Mek1 deutlich zu steigern: Prkaca $2,251 \pm 0,132$; Ubb $1,939 \pm 0,315$; Pfn2 $0,862 \pm 0,030$; Pp2r1a $1,311 \pm 0,048$; Pkm2 $1,272 \pm 0,106$; Hsp90ab $1,369 \pm 0,129$; Ankrd13a $1,078 \pm 0,036$; G3BP1 $1,033 \pm 0,082$; Dbn1 $1,073 \pm 0,029$; Ddx46 $1,112 \pm 0,059$; Wdr92 $1,355 \pm 0,124$; Ube2h $1,192 \pm 0,136$. Die folgenden cDNAs inhibierten die B-RAF/Mek1 Interaktion: Pja1 $0,079 \pm 0,012$; Rcn1 $0,265 \pm 0,085$; Zfand2 $0,351 \pm 0,059$; Nxph4 $0,325 \pm 0,042$; Det1 $0,322 \pm 0,007$; Pig11 $0,269 \pm 0,015$.

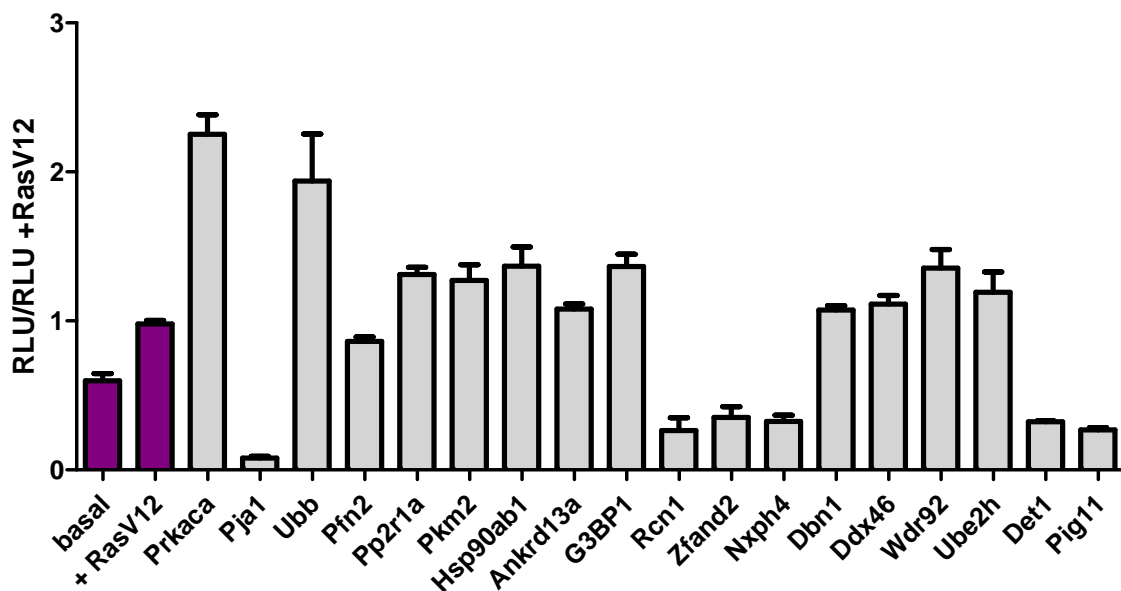


Abbildung 3.5.2 Identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion. Die basale Luciferase Expression der B-RAF/Mek1 Interaktion wurde durch die Zugabe von RasV12 zuverlässig stimuliert. Die hier gezeigten Beeinflusser der B-RAF/Mek1 Interaktion wiesen eine signifikante Stimulation oder Hemmung der interaktionsspezifischen Luciferase Expression auf. Die Ergebnisse der unabhängig voneinander untersuchten cDNA Klone wurden in einem Graphen veranschaulicht. Daher wurde die RLU jeweils auf den Mittelwert der mitlaufenden Kontrolle der B-RAF/Mek1 Interaktion stimuliert durch RasV12 normalisiert.

Tabelle 3.5 Übersicht über die im cDNA Library Screen identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion. Auflistung der mittels cDNA Library Screen identifizierten cDNAs, die Einfluss auf die Assoziation von GAL4-Mek1 mit VP16-B-RAF zeigten. Ausgenommen wurden zwei cDNA Klone die aus technischen Gründen nicht sequenziert werden konnten. Die Liste unterscheidet zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der B-RAF/Mek1 Interaktion. Die angegebene Datenbank-Nr. entspricht der „Accession No.“ der GenBank = (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Luciferase Expression wurde jeweils auf den Mittelwert der mitlaufenden Kontrolle normalisiert. Dabei handelte es sich um die der stimulierte B-RAF/Mek1 Interaktion durch H-RasV12.

	Aktivatoren	Datenbank-Nr.	RLU	Funktion
Prkaca	PKA C-alpha	NM_008854.3	2,251±0,132	cAMP abhängige Serin/Threonin Kinase
Ubb	Ubiquitin B	NM_011664.3	1,1,939±0,315	ATP-abhängige Protein Degradierung
Pfn2	Profilin 2	NM_019410.2	0,862±0,030	Reguliert die Actin Polymerisation
Pp2r1a	Protein-Phosphatase 2	NM_016891.3	1,311±0,048	Serine/Threonine Phosphatase
Pkm2	Pyruvat Kinase, muscle2	NM_011099.2	1,272±0,106	beteiligt an der Glycolyse bildet ATP in der Zelle
Hsp90ab	Heat shock protein 90kDa alpha	NM_008302.3	1,369±0,129	Chaperon
Ankrd13a	ankyrin repeat domain 13	NM_026718.2	1,078±0,036	unbekannt
G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding	NM_013716.2	1,033±0,082	bindet den Ras Inhibitor Ras-GAP
Dbn1	Drebrin 1	NM-019813.3	1,073±0,029	Actin bindendes Protein Zellmigration
Ddx46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	NM_145975.3	1,112±0,059	putative RNA helicases
Wdr92	WD repeat domain 92	NM_178909.4	1,355±0,124	Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle und Transcription
Ube2h	ubiquitin-conjugating enzyme E2H	NM_001169576.1	1,192±0,136	ATP-abhängige Protein Degradierung

	Inhibitor	Datenbank-Nr.	RLU	Funktion
Pja1	praja ring finger 1	NM_001083110.1	0,079±0,012	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
Rcn1	Reticulocalbin	NM_009037.2	0,265±0,085	Kalzium-bindendes Protein lokalisiert im ER Lumen
Zfand2a	zinc finger, AN1-type domain 2A	NM_133349.2	0,351±0,059	unbekannt
Nxph4	Neurexophilin 4	NM_183297.2	0,325±0,042	mögliches Signalmolekül
Det1	de-etiolated homolog 1	NM_029585.3	0,322±0,007	Komponent der E3 Ubiquitin Ligase
Pig11	p53-induced gene 11	NM_001025246.1	0,269±0,015	direktes p53 Target Gen

3.6 Untersuchung identifizierter cDNA Klone auf Regulation im hypertrophen Myokard mittels *Real-Time* PCR

Um zu ermitteln, ob einige der identifizierten cDNA Klone in der Hypertrophieentstehung eine Rolle spielen, wurde die Genexpression im hypertrophen Myokard untersucht. Dies erfolgte in Proben von Mäusen. Durch einen operativen Eingriff wurde die Aorta der Mäuse permanent verengt, was zu einer erhöhten linksventrikulären Nachlast führt. Bei der sogenannten Aortenkonstriktion (transaortic constriction TAC) entwickeln die operierten Tiere anschließend eine konzentrische Hypertrophie mit nachfolgender Herzinsuffizienz. Für dieses Modell wurden Tiere mit einem FVBL Hintergrund verwendet. Den ausschließlich weiblichen Tieren wurden die Aorten im Durchmesser einer 27G Nadel verengt. Als Kontrolle fungierten nach gleichem Prinzip operierte Mäuse (Sham), deren Brustkorb ebenfalls geöffnet wurde, allerdings keine Intervention der Aorta erfolgte. Vier bis acht Wochen nach Intervention wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Alle hier verwendeten Tiere wurden von Dr. Karl Toischer operiert und für dieses Experiment freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden die vorliegenden Proben mittels *Real-Time* PCR auf bekannte Genexpressionsmarker der Hypertrophie untersucht. Daher wurde zunächst die Expression des *brain natriuretic peptid* (BNP) bestimmt. Dabei handelt es sich um einen diagnostisch verwendeten Marker der Herzinsuffizienz. Zudem wurde die mRNA Expression von Myh6 und Myh7 gemessen. Das Myh7 Gen kodiert die *myosin heavy chain beta* (MHC-β). Das Myh6 Gen

kodiert die *myosin heavy chain alpha* (MHC- α). Veränderungen der relativen Expressionsmenge von MHC- α und MHC- β korrelieren mit der kontraktile Geschwindigkeit des Herzmuskels. Im gesunden adulten Myokard wird hauptsächlich MHC- α exprimiert, während in der hypertrophen Kardiomyopathie vermehrt MHC- β exprimiert wird. Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe verwendet. Die mRNA Expression von MYH6 war in den TAC-operierten Tieren signifikant verringert (MYH6/18S: $1,14E-2 \pm 1,29E-3$ (Sham); $8,18E-3 \pm 8,18E-2$ (TAC); $n=18$; $p<0,05$), während die mRNA Expression von MYH7 signifikant erhöht war (MYH7/18S: $7,14E-4 \pm 1,31E-4$ (Sham); $3,03E-3 \pm 3,69E-4$ (TAC); MYH6/MYH7 $26,88 \pm 5,18$ (Sham); $3,96 \pm 1,14$ (TAC); $n=18$; $p<0,0001$). BNP, das bei der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird, war in den TAC-operierten Tieren ebenfalls deutlich erhöht exprimiert (BNP/18S: $2,95E-6 \pm 5,12E-5$ (Sham); $1,69E-5 \pm 3,31E-6$ (TAC); $n=12$; $p<0,0001$). Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Proben der TAC-operierten Tiere eine deutliche Hypertrophie aufwiesen und daher für den nachfolgenden Versuch verwendet werden konnten (Abb.3.6.1).

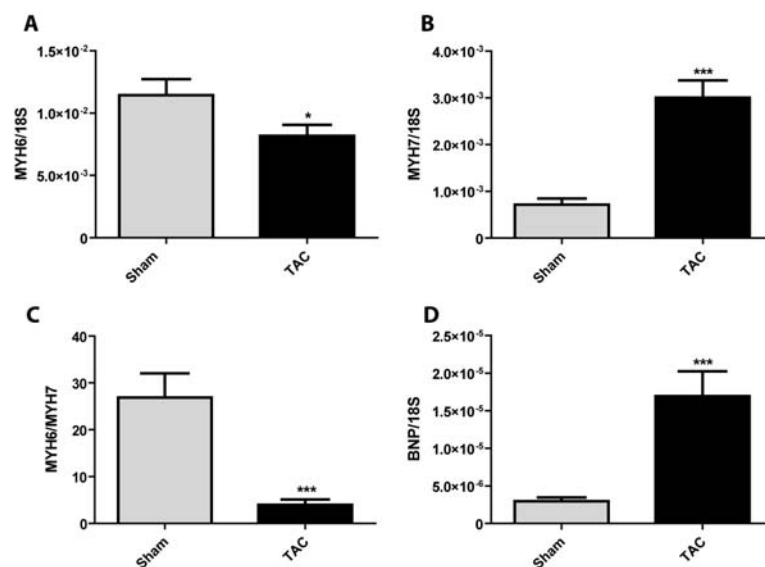


Abbildung 3.6.1 Untersuchung von Sham und TAC operierten Mäusen auf Hypertrophiemarker mittels Real Time PCR. (A) MYH6 kodiert für die *myosin heavy chain alpha* (MHC- α), die im gesunden Myokard exprimiert wird. Die mRNA Expression von MYH6 war signifikant vermindert in den TAC-operierten Tieren **(B)** MYH7 kodiert für die *myosin heavy chain beta* (MHC- β), die in der hypertrophen Kardiomyopathie hauptsächlich exprimiert wird. **(C)** Der Quotient der MYH6 und MYH7 Expression zeigte eine deutliche Verschiebung von MYH6 hin zu MYH7, was typischerweise mit kardialer Hypertrophie assoziiert ist. **(D)** BNP das bei der Herzinsuffizienz vermehrt im rechten Ventrikel sezerniert wird zeigte ebenfalls eine deutlich verstärkte Expression der mRNA in den TAC-operierten Tieren (* $<0,05$, *** $<0,0001$).

Nach Bestätigung der Validität der Proben durch die Untersuchung von Hypertrophiemarkern wurden einige der Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion auf eine veränderte Expression im hypertrophen Myokard untersucht. Für die Auswertung wurde eine Versuchsreihe mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe verwendet. Diese Tiere wurden vier Wochen nach Intervention getötet und die Herzen entnommen.

Die mRNA Expression von Ankr13a und Wdr92 war signifikant reduziert im Myokard von TAC operierten Tieren im Vergleich zur sham Gruppe (Ankr13a/18S: $2,61E-5 \pm 3,050E-6$ (Sham); $1,53 \pm 2,200$ | Wdr92/18S: $1,547E-5 \pm 1,627E-6$ (Sham); $1,070E-5 \pm 6,617E-7$; n=6; p<0,05). Die mRNA Expression von Ddx46 und Zfand2a zeigte keine signifikante Regulation (Ddx46/18S: $3,12E-5 \pm 1,959E-6$ (Sham); $3,21E-5 \pm 1,692E-6$ (TAC); n=12; p=0,543 | Zfand2a/18S: $7,01E-6 \pm 7,328E-7$ (Sham); $1,01E-5 \pm 1,793E-6$ (TAC); n=6; p=0,139). G3BP1, Pkm2 und Rcn1 zeigten eine signifikante Steigerung der mRNA Expression in den TAC-operierten Tieren (G3BP1/18S: $6,85E-5 \pm 3,74E-6$ (Sham); $9,08E-5 \pm 8,576E-6$ (TAC) | Pkm2/18S: $8,27E-4 \pm 1,80E-4$ (Sham); $1,50E-3 \pm 1,30E-4$ (TAC); n=6; p<0,05 | Rcn1/18S: $1,77E-5 \pm 1,938E-6$ (Sham); $2,47E-5 \pm 2,956E-6$ (TAC); n=12; p<0,05), (Abb. 3.6.2).

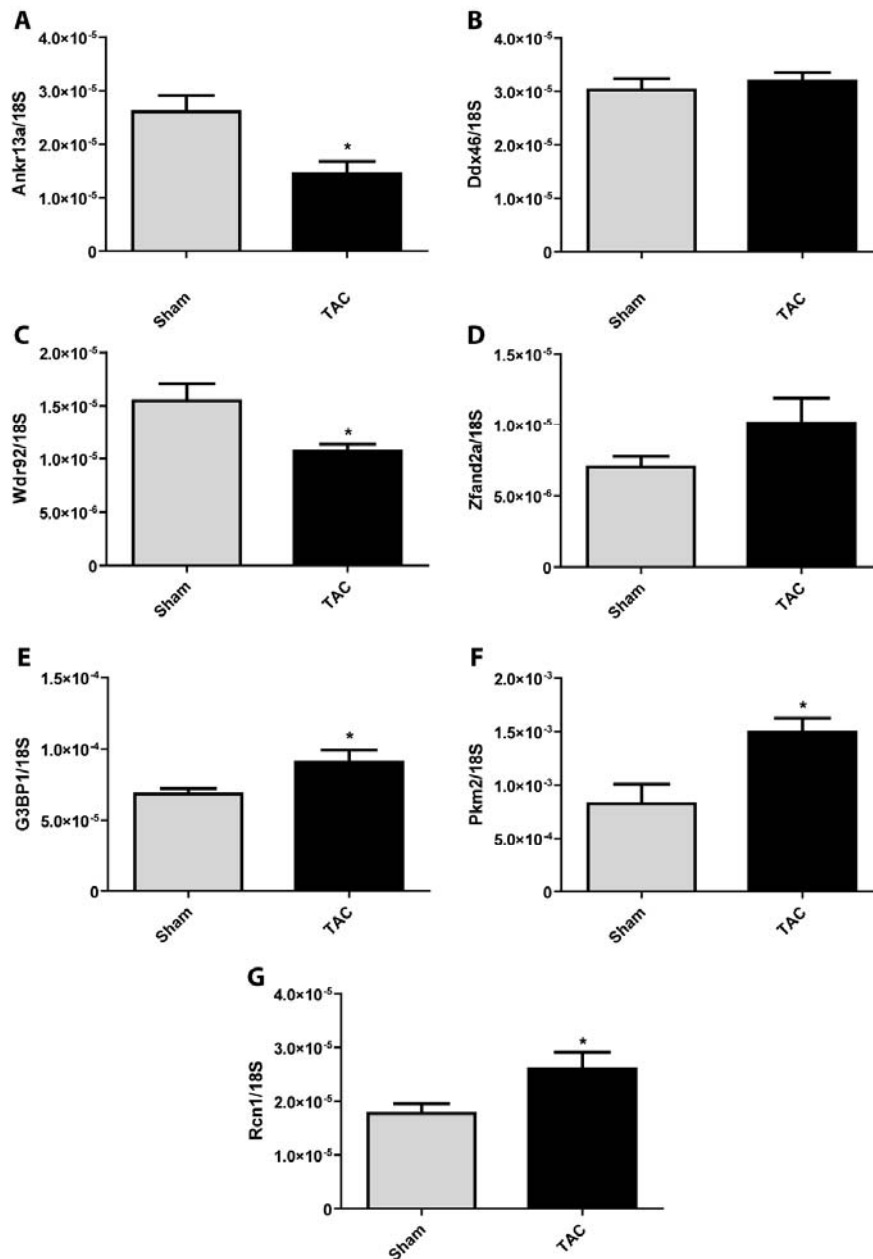


Abbildung 3.6.2 Untersuchung der identifizierten cDNA Klone auf Regulation im hypertrophen Myokard.

Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion wurden mittels *Real-Time* PCR hinsichtlich ihrer Regulation im hypertrophen Myokard untersucht. Die mRNA Expression von (A) Ankr13a und (C) Wdr92 war in den TAC operierten Tieren im Vergleich zur Sham Gruppe signifikant reduziert. Die mRNA Expression von (B) Ddx46 und (D) Zfand2a zeigte keine signifikante Regulation. (E) G3BP1, (F) Pkm2 und (G) Rcn1 zeigte eine signifikante Steigerung der mRNA Expression in den TAC-operierten Tieren (*<0,05).

3.7 Rcn1 wird signifikant reguliert im hypertrophen Myokard

Bei Reticulocalbin 1 (Rcn1) handelt es sich um ein 45 kDA großes Protein, das im Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Daher wurde die *Real-Time* PCR statt auf das zuvor verwendete 18S *housekeeping* Gen auch auf Calsequestrin normalisiert. Calsequestrin (CS) ist ebenfalls im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe untersucht. Bei der ersten Versuchsreihe handelte es sich um Tiere, die vier Wochen nach TAC-Intervention getötet wurden. Die anderen beiden Versuchsreihen wurden acht Wochen nach Intervention beendet. Die Analyse der unterschiedlichen Interventionszeitpunkte führte zum gleichen Ergebnis. Die mRNA Expression von Rcn1 war im Vergleich zur Sham-Gruppe in den TAC-operierten Tieren signifikant erhöht (Rcn1/CS: $5,12E-3 \pm 3,14E-4$ (Sham); $7,2E-3 \pm 5,82E-4$ (TAC); $n=18$; $p < 0,0005$), (Abb. 3.7).

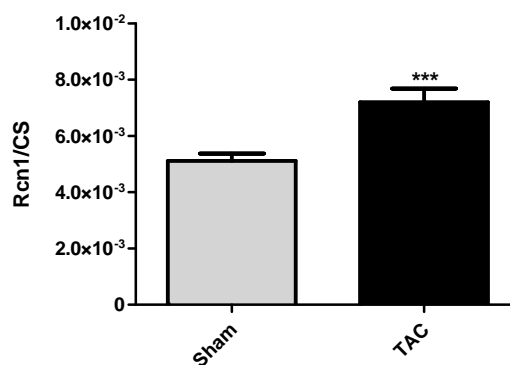


Abbildung 3.7 Rcn1 zeigt eine signifikante Expressionssteigerung im hypertrophen Myokard. Da es sich bei Rcn1 wahrscheinlich um ein Protein des SR handelt, wurde die *Real-Time* PCR auf Calsequestrin normalisiert. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Zeitpunkte von vier oder acht Wochen nach TAC-Intervention untersucht. Die Rcn1 mRNA Expression war im hypertrophen Myokard signifikant erhöht (***) ($p < 0,0005$).

3.8 Expression der Rcn1 mRNA in verschiedenen Organen der Maus

Die exprimierte mRNA Menge von Rcn1 wurde mittels *Real-Time* PCR in verschiedenen Organen adulter Mäuse quantifiziert. Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurde eine cDNA-Kollektion der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet.

Die mRNA Expression von Rcn1 war in allen untersuchten Organen nachweisbar, allerdings wies die Leber ein sehr niedriges Expressionsniveau auf. Besonders hoch war die mRNA Expression im Skelettmuskel. Lunge, Milz und Herz zeigten ebenfalls eine überdurchschnittliche Expression der Rcn1 mRNA (Gehirn $0,244\pm 0,035$; Herz $0,521\pm 0,024$; Niere $0,247\pm 0,025$; Leber $0,044\pm 0,005$; Lunge $0,544\pm 0,042$; sk. Muskel $0,988\pm 0,072$; Milz $0,614\pm 0,049$; Testis $0,283\pm 0,011$; n=2), (Abb. 3.8).

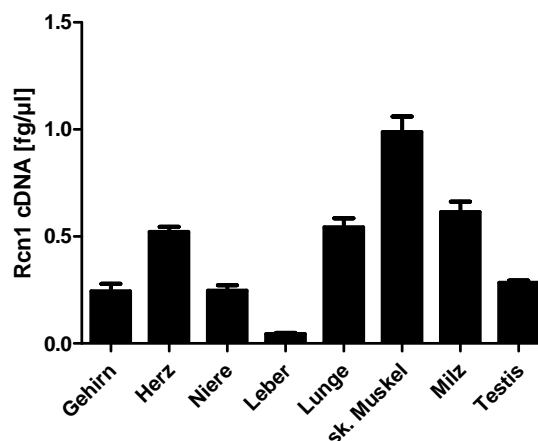


Abbildung 3.8 mRNA Expression von Rcn1 in verschiedenen Organen adulter Mäuse. Mittels *Real-Time* PCR wurde die Expression von Rcn1 mit Rcn1-spezifischen Primern in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskel, Milz und Testis adulter Mäuse bestimmt. Die höchste mRNA Expression zeigte sich im Skelettmuskel. Darauf folgten Milz, Lunge und Herz. Am geringsten wurde die Rcn1 mRNA in der Leber exprimiert.

3.9 Die Überexpression von Rcn1 führt zu verminderter MEK1/2 Phosphorylierung

Da primäre Kardiomyocyten neonataler Ratten nicht durch Transfektionsmethoden wie Lipofektation oder Elektroporation effizient transfizierbar sind, wurde stattdessen der adenovirale Gentransfer verwendet. Um die Funktion von Rcn1 in Kardiomyocyten zu untersuchen, wurde ein Adenovirus zur Überexpression von Rcn1 unter Kontrolle eines CMV-Promotors hergestellt (Ad-Rcn1). Die eingesetzte Virusmenge wird angegeben in MOI (*multiplicity of infection*), und beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis der eingesetzten Viruspartikel zur Anzahl der Zielzellen. Um eine gleiche Viruslast pro Zelle zu garantieren, wurde ein Kontrollvirus, der β -Galaktosidase (Ad- β Gal) unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert, transfiziert.

Eine Analyse mittels Western Blot zeigte eine dosisabhängige Expression von Rcn1 durch Ad-Rcn1 (Abb. 3.9). Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde bei weiteren Versuchen, sofern nicht anders angegeben, eine Überexpression von Rcn1 durch adenovirale Transfektion mit MOI 10 (10 aktive Viruspartikel pro Zelle) hervorgerufen. Um zu ermitteln, ob die Überexpression von Rcn1 in Kardiomyocyten einen inhibierenden Einfluss auf Mek1/2 Phosphorylierung ausübt, wurde ein phosphospezifischer-Mek1/2 Antikörper verwendet. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysates vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert.

Die Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der Mek1/2 Phosphorylierung (pMek/tMek: 1,85 \pm 0,09 MOI0; 1,64 \pm 0,08 MOI1; 1,56 \pm 0,02 MOI5; 1,13 \pm 0,07 MOI10; n=3; p<0,0005).

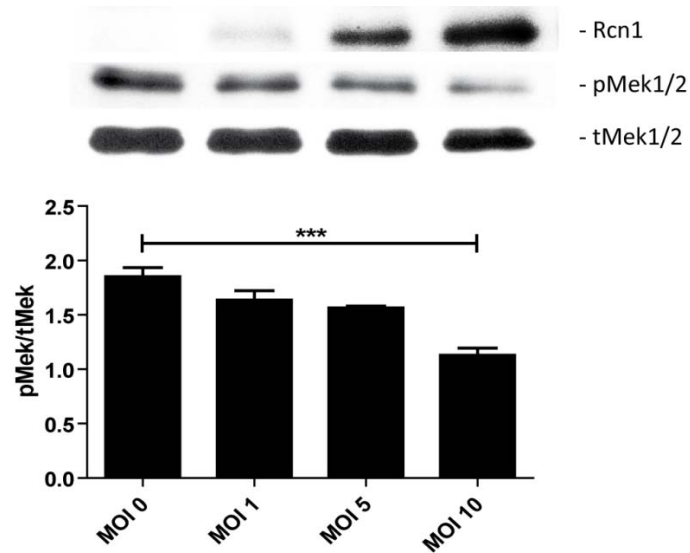


Abbildung 3.9 Die Überexpression von Rcn1 führt zu einer Reduzierten MEK1/2 Phosphorylierung. In neonatalen Kardiomyocyten der Ratte wurde Rcn1 mit Hilfe eines Adenovirus (Ad-Rcn1) überexprimiert. Ein Adenovirus zur Überexpression von β -Galaktosidase (Ad- β Gal) diente dazu alle Gruppen mit der gleichen Anzahl adenoviraler Partikel zu exponieren. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und einer Western-Blot Analyse unterzogen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Expression von Rcn1 durch Ad-Rcn1. Mit Hilfe eines phosphospezifischen MEK1/2 Antikörpers wurde der Phosphorylierungsgrad von MEK1/2 gemessen. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysates vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert. Die Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der Mek1/2 Phosphorylierung (***) ($p < 0,0005$).

3.10 Die Überexpression von Rcn1 verhindert die Phenylephrin induzierte Hypertrophie

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von B-RAF die Phenylephrin induzierte Hypertrophie der Kardiomyocyten verhindert (siehe 3.9). Rcn1 wurde bereits im Screen der Mouse cDNA Library (3.5) als potentieller Inhibitor der B-RAF/Mek1 Interaktion identifiziert. Zudem war die mRNA Expression von Rcn1 im hypertrophen Myokard signifikant erhöht. Daher wurden im nachfolgenden Versuch die Auswirkungen der Überexpression von Rcn1 in Kardiomyocyten untersucht. Dazu wurde die Rcn1 cDNA mit Hilfe der Gateway Cloning Technologie in den *shuttle*-Vektor zur Herstellung eines Adenovirus kloniert (Ad-Rcn1). Jeder Versuchsansatz wurde mit gleichen Mengen Virus infiziert. Um eine gleiche Viruslast pro Zelle zu garantieren, wurde ein Kontrollvirus, der β -Galaktosidase (Ad- β Gal) unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert, transfiziert.

Zur Induktion des hypertrophen Wachstums wurde dem Medium der Kardiomyocyten 5 μ M Phenylephrin zugesetzt. Darauf wurden neonatale Kardiomyocyten mit Ad-Rcn1 und einem Ad- β Gal (MOI 10) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen fixiert und die Kardiomyocyten mit Hilfe eines α -Actinin Antikörpers angefärbt. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer 40fachen Vergrößerung fotografiert. Anschließend erfolgte die verblindete Analyse mit dem Programm ImageJ. Die Zelloberfläche wurde relativ zum Mittelwert der Oberfläche der mit Ad- β Gal infizierten sowie mit Vehikel behandelten Zellen ermittelt. Es wurden drei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe etwa 600 Zellen untersucht wurden.

Innerhalb dieses Versuchs zeigte sich, dass die Stimulation durch Phenylephrin zu einer deutlichen Vergrößerung der relativen Zelloberfläche führt. Dagegen entzogen sich die Ad-Rcn1 exprimierenden Kardiomyocyten dem hypertrophen Wachstum vollständig (Vehikel: Ad- β Gal $1,001 \pm 0,0147$; Ad-Rcn1 $0,760 \pm 0,011$ | PE: Ad- β Gal $1,308 \pm 0,019$; Ad-Rcn1 $0,745 \pm 0,013$; n=3; $p < 0,0001$), (Abb. 3.10).

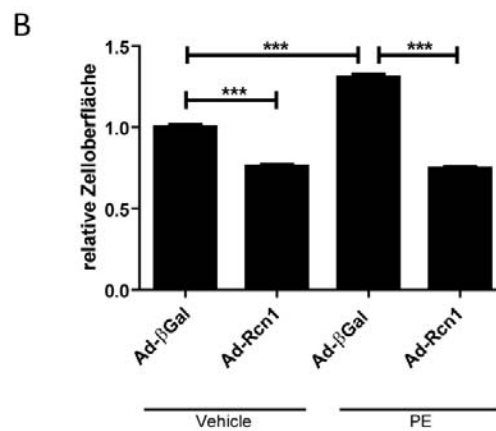
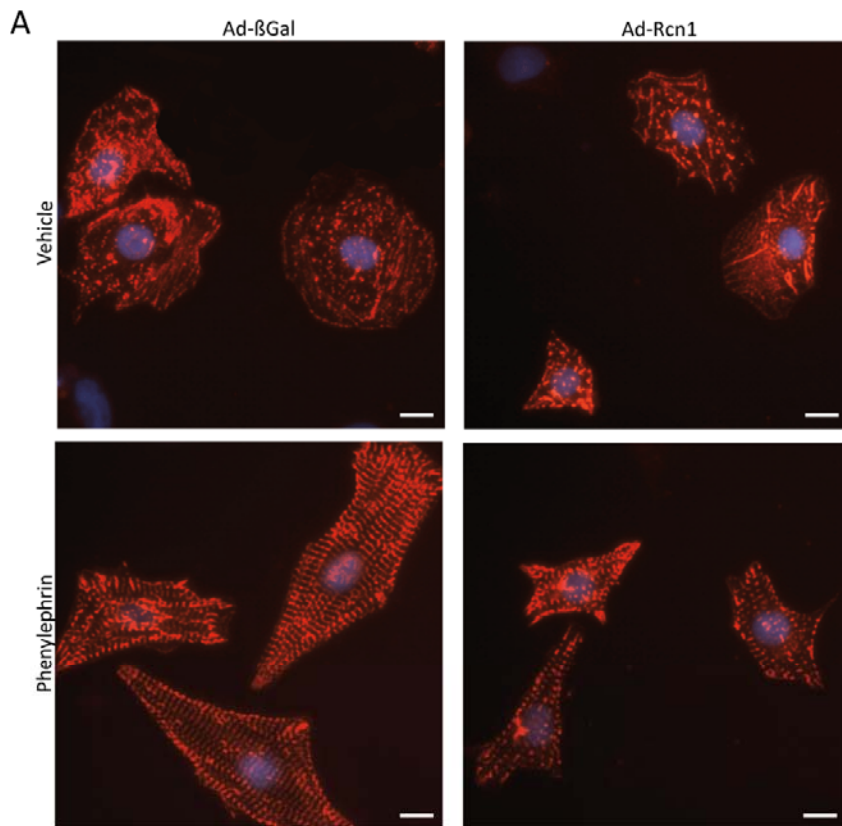


Abbildung 3.10 Die Überexpression von Rcn1 inhibiert die Phenylephrin induzierte kardiale Hypertrophie.

(A) Repräsentative Bilder der mit Ad-Rcn1 und Ad-β-Gal (MOI 10) infizierten Kardiomyocyten neonataler Ratten. Die Zellen wurden fixiert und mit einem α-Actinin Primärantikörper sowie einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Der Maßbalken entspricht 10 µm. Die Zellkerne wurde mit DAPI angefärbt. (B) Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. Während die Stimulation durch Phenylephrin zu einer deutlichen Vergrößerung der relativen Zelloberfläche führte, weisen die mit Ad-Rcn1 infizierten Kardiomyocyten kein hypertrophes Wachstum auf (***)(<math>***<0,0001</math>).

3.11 Knockdown von Rcn1 in NIH3T3-Zellen

Nach der zuvor beschriebenen Studie der Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte wurde auch die Wirkung eines *Knockdowns* von Rcn1 untersucht. Dazu wurden synthetische microRNAs (miRNA) verwendet. Hierbei handelt es sich um kurze, nicht kodierende RNAs, die in der Lage sind die Genexpression hochspezifisch und posttranskriptional zu regulieren. Dabei bindet die miRNA an die untranslatierte 3' Region (3'-UTR) der mRNA von Zielgenen. Das führt bei partieller Komplementarität zu einer Hemmung der Translation. Bei einer perfekten Basenpaarung hingegen degradiert die Ziel-mRNA (He und Hannon, 2004). Mit Hilfe des BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen, Karlsruhe) wurden vier für Maus Rcn1 spezifische miRNAs entworfen. Als negative Kontrolle wurde eine miRNA verwendet, die zwar in der Lage ist eine *Hairpin* Struktur zu formen und daher in eine reife miRNA prozessiert wird, aber kein bekanntes murines Gen als Zielgen erkennt.

Zunächst wurde die Fähigkeit dieser miRNAs basales Rcn1 in NIH3T3 Zellen der Maus zu hemmen untersucht. Dazu wurden die vier miRNAs zusammen mit der Kontroll-miR mittels FuGENE®6 in NIH3T3 Zellen transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert. Anschließend folgte eine Western-Blot Analyse mit einem Rcn1 spezifischen Antikörper. Da die gewählte Transfektionsmethode unter optimalen Bedingungen eine Transfektionseffizienz von etwa 60% aufwies (siehe 3.3), wurde kein vollständiger *Knockdown* erwartet.

In diesem Vorversuch zeigten miR1 und miR4 die vergleichsweise geringsten Fähigkeiten, die endogene Expression von Rcn1 in Mauszellen zu inhibieren. Daher wurden für alle folgenden Versuche miR2 und miR3 verwendet (Abb. 3.11).

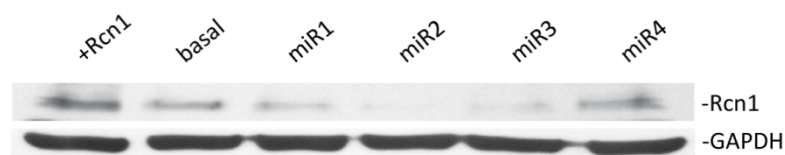


Abbildung 3.11 Knockdown von Rcn1 in NIH3T3-Zellen. Die vier miRNAs wurden zusammen mit der Kontroll-miR mittels FuGENE®6 in NIH3T3 Zellen transfiziert. Drei Tage später wurden die Zellen lysiert. Anschließend folgte eine Western-Blot Analyse mit einem Rcn1 spezifischen Antikörper. Die miRNAs miR2 und miR3 waren in der Lage die Expression von endogenem Rcn1 deutlich zu inhibieren und wurden somit für alle nachfolgenden Versuche verwendet.

3.12 Der *Knockdown* von Rcn1 führt zu einer Verstärkten B-RAF/Mek1 Interaktion in NIH3T3-Zellen

Mit Hilfe des Luciferase Reporterassays wurde untersucht, ob der *Knockdown* von Rcn1 in den NIH3T3-Zellen zu einer Veränderung in der B-RAF/Mek1 Interaktion führt. Dazu wurden die Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-BRAF gemeinsam mit dem Luciferase Reporter in NIH3T3-Zellen transient transfiziert. Zusätzlich wurde den Transfektionsansätzen entweder 250 ng Rcn1, miR2, miR3 oder Kontroll-miR zugegeben. Die Transfektion der NIH3T3-Zellen erfolgte im Triplikat. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die RLU wurde dabei relativ zum Mittelwert der basalen Interaktion von B-RAF/Mek1 ermittelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen ausgewertet.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die basale Interaktion von B-RAF/Mek1 sich auch in den NIH3T3-Zellen durch Zugabe von Rcn1 signifikant inhibieren lässt (RLU: basal $1,00 \pm 0,07$; +Rcn1 $0,50 \pm 0,05$; $n=3$; $p < 0,0005$). Der *Knockdown* von Rcn1 mit Hilfe von miR2 und miR3 führt zu einer Steigerung der B-RAF/Mek1 Interaktion. Dieser Effekt war allerdings nur in den mit miR3 transfizierten Zellen signifikant (RLU: basal $1,00 \pm 0,07$; +miR2 $1,19 \pm 0,08$; +miR3 $1,36 \pm 0,09$; $n=3$; $p < 0,05$), (Abb. 3.12).

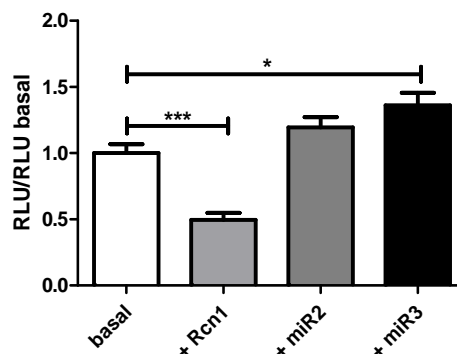


Abbildung 3.12 Der *Knockdown* von Rcn1 führt zu einer Verstärkten B-RAF/Mek1 Interaktion in NIH3T3-Zellen. Um die Auswirkung des *Knockdowns* von Rcn1 auf die B-RAF/Mek1 Interaktion zu testen, wurden NIH3T3-Zellen mit den Fusionsproteinen GAL4-Mek1 und VP16-BRAF sowie dem Luciferase Reporter transfiziert. Die Analyse erfolgte durch Messung der *firefly* und *Renilla Reniformis* Luciferase Expression. Die RLU wurde dabei relativ zum Mittelwert der basalen Interaktion von B-RAF/Mek1 ermittelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen ausgewertet. Die basale Interaktion von B-RAF/Mek1 lässt sich auch in den NIH3T3-Zellen durch Zugabe von Rcn1 signifikant inhibieren. Der *Knockdown* von Rcn1 mit Hilfe von miR2 und miR3 führte zu einer Steigerung der B-RAF/Mek1 Interaktion. Dieser Effekt war allerdings nur in den mit miR3 transfizierten Zellen signifikant (* $< 0,05$; *** $< 0,0005$).

3.13 Der *Knockdown* von Rcn1 führt zu einer erhöhten Mek1/2 Phosphorylierung in Kardiomyocyten

Um eine ausreichende Expression der miRNAs in Kardiomyocyten zu erreichen wurden Adenoviren generiert (Ad-miR2, Ad-miR3, Ad-Kontroll-miR). So konnte die Wirkung eines Verlustes von Rcn1 direkt in neonatalen Kardiomyocyten der Ratte untersucht werden.

24 h nach Isolation wurden die neonatalen Kardiomyocyten mit Ad-miR2, Ad-miR3 und Ad-Kontroll-miR (MOI 25) infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und einer Western-Blot Analyse auf Rcn1 Expression unterzogen.

Wie im Vorversuch zeigte sich, dass Ad-miR3 zu einer deutlicher reduzierten Rcn1 Expression führt. Die mit Ad-miR3 infizierten Kardiomyocyten zeigten einen um 73% reduzierten Rcn1-Proteingehalt. Die mit Ad-miR2 infizierten Kardiomyocyten zeigten einen um 51% reduzierten Rcn1-Proteingehalt. Anschließend wurde die MEK1/2 Phosphorylierung mit Hilfe des phosphospezifischen Mek1/2 Antikörpers untersucht. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysates vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert. Der *Knockdown* von Rcn1 führt in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte zu einer erhöhten Mek1/2 Phosphorylierung (pMek/tMek: Kontroll-miR $2,25 \pm 0,15$; Ad-miR2 $3,16 \pm 0,59$; Ad-miR3 $4,02 \pm 0,16$, $p < 0,05$; $n = 3$), (Abb. 3.13).

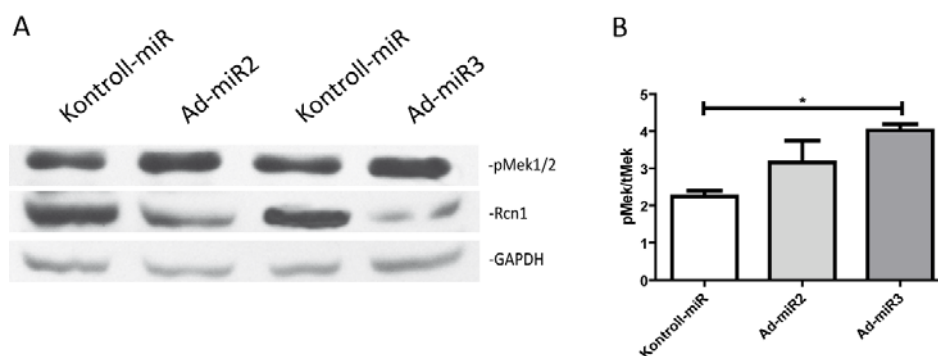


Abbildung 3.13 Der Knockdown von Rcn1 führt in Kardiomyocyten zu einer erhöhten Mek1/2 Phosphorylierung. Neonatale Kardiomyocyten der Ratte wurden mit den Adenoviren Ad-miR2, Ad-miR3 und Ad-Kontroll-miR (MOI 25) infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und einer Western-Blot Analyse unterzogen. Ad-miR3 war in der Lage die Rcn1 Proteinexpression um 73% zu reduzieren. Die Analyse der Mek1/2 Phosphorylierung mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers, zeigt eine signifikant verstärkte Mek1/2 Phosphorylierung in den mit Ad-miR3 infizierten Zellen ($* < 0,05$).

3.14 Der *Knockdown* von Rcn1 führt zu kardialer Hypertrophie

Um zu ermitteln, ob eine verminderte Rcn1 mRNA Expression zu einer kardialen Hypertrophie führt, wurden neonatale Kardiomyocyten der Ratte verwendet. Diese wurden 24 h nach Isolation mit Ad-miR2, Ad-miR3 und der Ad-Kontroll-miR (MOI 25) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Zellen fixiert und hinsichtlich der Zelloberfläche untersucht. Anschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop mit einer 40fachen Vergrößerung fotografiert. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Oberfläche der mit Ad-Kontroll-miR behandelten Zellen ermittelt. Es wurden zwei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe mehr als 300 Zellen ausgezählt wurden.

Die Untersuchung ergab, dass der *Knockdown* von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte zu einem hypertrophen Wachstum der Kardiomyocyten führte. Dies konnte sowohl für die mit Ad-miR2, als auch die mit Ad-miR3 infizierten Kardiomyocyten festgestellt werden. Beide entwickeln eine signifikante Hypertrophie im Vergleich zu den mit Ad-Kontroll-miR infizierten Zellen (Ad-Kontroll-miR $0,98 \pm 0,02$; Ad-miR2 $1,19 \pm 0,03$; Ad-miR3 $1,38 \pm 0,03$; $n=2$; $p < 0,0005$). Die Expression von Rcn1 scheint in den neonatalen Kardiomyocyten notwendig zu sein, um das hypertrophe Wachstum der Zellen zu inhibieren (Abb.3.14).

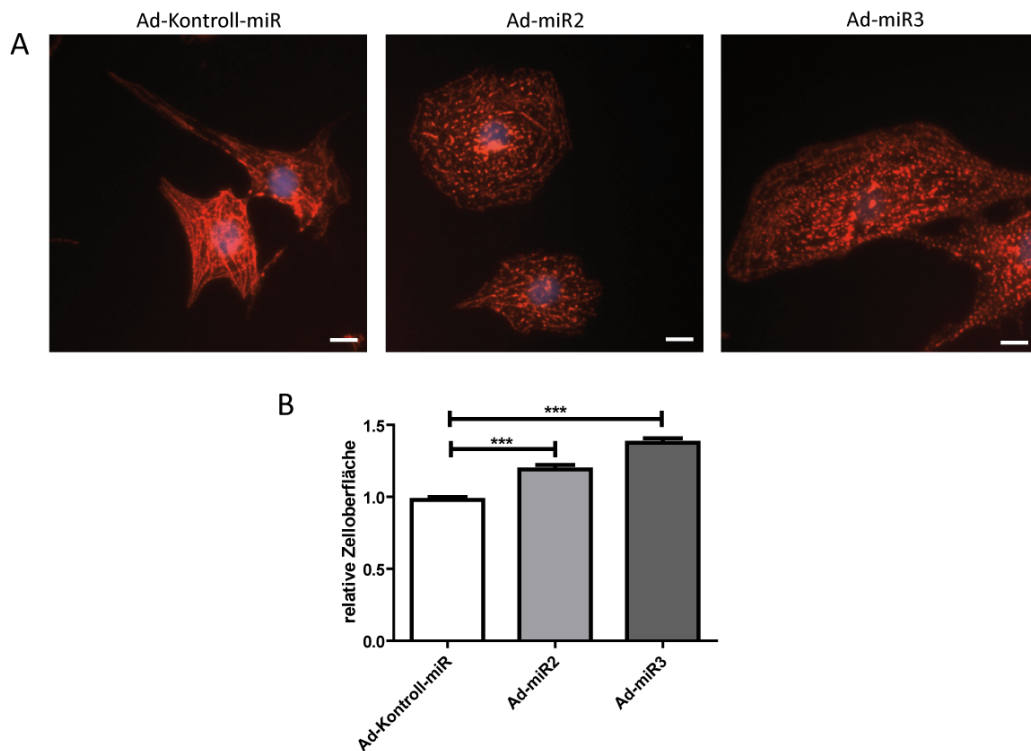


Abbildung 3.14 Der Knockdown von Rcn1 führt zu kardialer Hypertrophie. (A) Repräsentative Bilder der mit Ad-miR2, Ad-miR3 und der Ad-Kontroll-miR (MOI 25) infizierten neonatalen Kardiomyocyten der Ratte. 72 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und die Kardiomyocyten mit Hilfe eines α -Actinin Primäntikörpers und eines Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpers angefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI. Der Maßbalken entspricht 10 μ m. **(B)** Es wurden zwei biologische Replikate ausgewertet, wobei pro Gruppe mehr als 300 Zellen ausgezählt wurden. Die Zelloberfläche wurde dabei relativ zum Mittelwert der Oberfläche der mit Ad-Kontroll-miR behandelten Zellen ermittelt. Der *Knockdown* von Rcn1 führt in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte zu einem hypertrophen Wachstum der Zellen (***) ($*** < 0,0005$).

3.15 Rcn1 wirkt unterhalb von Ras

Um zu ermitteln wo Rcn1 inhibierend in die MAPK Signalkaskade eingreift, wurde ein Ras Aktivierungs-Assay durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Pulldown-Experiment bei dem ein C-RAF-RDB-Agarose-Konjugat eingesetzt wird. Aktiviertes Ras (Ras-GTP) interagiert mit der Ras-bindenden Domäne (RDB) von C-RAF und wird so präzipitiert.

Adulte Kardiomyocyten der Ratte wurden direkt nach der Isolation mit ansteigenden Ad-Rcn1 Virusmengen infiziert. Um eine gleichbleibende Viruslast pro Zelle zu garantieren, wurden die Zellen zusätzlich mit der entsprechenden Menge Ad-βGal infiziert. Nach 4 h wurde die Infektion durch Waschen der Zellen und Zugabe des normalen Wachstumsmediums zu den Zellen abgestoppt. Nach weiteren 24 h folgte die Lyse der Zellen in einem für den Ras-Assay spezifischen Puffer. Für den Pulldown wurden 500 µg Gesamtlisat eingesetzt. Anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Ras mittels Western-Blot Analyse mit einem Ras-spezifischen Antikörper untersucht.

Dieses Experiment zeigte, dass die Rcn1 Überexpression keinen Einfluss auf die Ras-Aktivität der Kardiomyocyten besaß, da die Ras-Aktivität in allen Proben annähernd gleich war (Abb. 3.15).

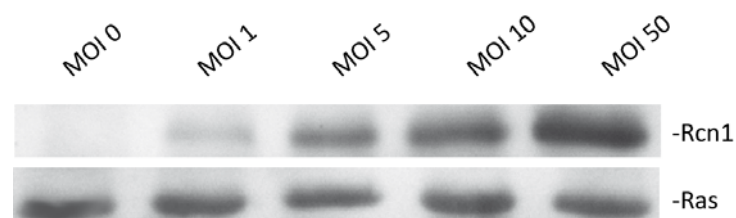


Abbildung 3.15 Rcn1 wirkt unterhalb von Ras. Um zu ermitteln wo Rcn1 in die MAPK Signalkaskade eingreift, wurde ein Ras Aktivierungs-Assay durchgeführt. Dabei wurde in einem Pulldown-Experiment aktives Ras (Ras-GTP) präzipitiert. Die Western-Blot Analyse mit einem Ras-spezifischen Antikörper zeigte keinen Einfluss einer Rcn1 Überexpression auf den Aktivierungsstatus von Ras. Rcn1 muss also unterhalb von Ras ansetzen um die MAPK Signalkaskade zu inhibieren.

3.16 Rcn1 inhibiert die C-RAF Kinaseaktivität in Kardiomyocyten

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob es sich bei Rcn1 um einen spezifischen Inhibitor von B-RAF handelt. Da C-RAF basal über keine Kinaseaktivität verfügt, kann eine Inhibition nur mit Hilfe einer konstitutiv aktiven C-RAF-Mutante getestet werden. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Shpsky und Weber (Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das sogenannte CRAF-BXB enthält eine in frame Deletion der Aminosäuren (AS 1-24|303-648), die der Kinase Domäne von C-RAF entspricht. An diese Domäne bindet aktives Ras-GTP und rekrutiert C-RAF zur Plasmamembran. Eine Deletion dieser Domäne führt zu einer konstitutiven Aktivierung von C-RAF (Bruder et al., 1992). 24 h nach Isolation wurden die neonatalen Kardiomyocyten der Ratte mit den Adenoviren Ad-CRAF-BXB (MOI 5) und Ad-Rcn1 infiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen lysiert. Mit einem phosphospezifischen Antikörper (pMek1/2) wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus von Mek1/2 überprüft. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysates vorhandenen Mek1/2 Proteins (tMek1/2) normalisiert.

In diesem Versuch wurde festgestellt, dass es sich bei Rcn1 nicht um einen B-RAF spezifischen Inhibitor handelt. Rcn1 war ebenfalls in der Lage die konstitutiv aktive CRAF-BXB Mutante dosisabhängig zu inhibieren (pMek/tMek: MOI 0 $0,98 \pm 0,02$; MOI 5 $0,77 \pm 0,04$; MOI 10 $0,59 \pm 0,05$, $p < 0,005$; $n=3$), (Abb. 3.16).

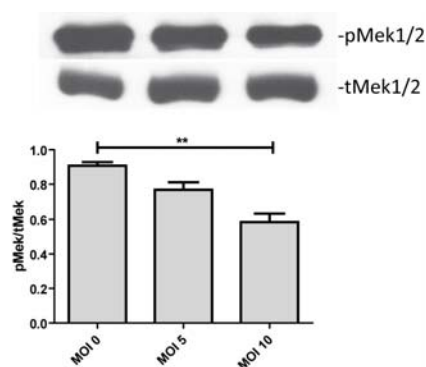


Abbildung 3.16 Rcn1 inhibiert die C-RAF Kinaseaktivität in Kardiomyocyten. Die neonatalen Kardiomyocyten der Ratte wurden 24 h nach Isolation mit dem konstitutiv aktiven Ad-CRAF-BXB und aufsteigender Mengen Ad-Rcn1 infiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und einer Western-Blot Analyse unterzogen. Mit einem phosphospezifischen Antikörper (pMek1/2) wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus von Mek1/2 überprüft. Für die Auswertung wurde die Menge an phosphoryliertem-Mek1/2 Protein (pMek1/2) auf die Gesamtmenge des im Lysates vorhandenen Mek1/2

Proteins (tMek1/2) normalisiert. In diesem Versuch wurde festgestellt, das Rcn1 in der Lage ist das konstitutiv aktive CRAF-BXB dosisabhängig zu inhibieren (**<0,005).

3.17 Die Expression von RCN1 in humanem Myokard

Mit der Hilfe von Tiermodellen können wichtige Fragen in Bezug auf die Entstehung und den Ablauf kardialer Hypertrophie beantwortet werden. Allerdings stellt der menschliche Patient ein sehr viel komplexeres System dar. Einige Ergebnisse sind nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar. Daher wurde die Expression von RCN1 mit Hilfe der Western-Blot Analyse im humanen Myokard untersucht. Bei den Proben handelt es sich um Biopsien von Patienten mit einer Aortenklappeninsuffizienz. Diesen Patienten wurde ein Aortenklappen-Ersatz (AKE) eingesetzt. Als Kontrollen wurden Biopsien aus für die Transplantation ungeeigneten Spender- Herzen verwendet. Da diese Herzen keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, handelt es sich um sogenannte *nonfailing* (NF) Herzen. Die Western-Blot Analyse wurde mit einem RCN1 spezifischen Antikörper durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Expression von RCN1 auf die Expression von GAPDH normalisiert. Es standen fünf AKE-Proben und vier NF-Proben zur Verfügung.

Das Ergebnis der Untersuchung zeigte, dass in der Mehrzahl der NF Proben RCN1 kaum nachweisbar war. Die AKE Proben zeigen eine signifikant verstärkte RCN1 Proteinexpression (RCN1/GAPDH: AKE $1,11 \pm 0,10$; NF $0,75 \pm 0,11$; $p < 0,05$), (Abb. 3.17).

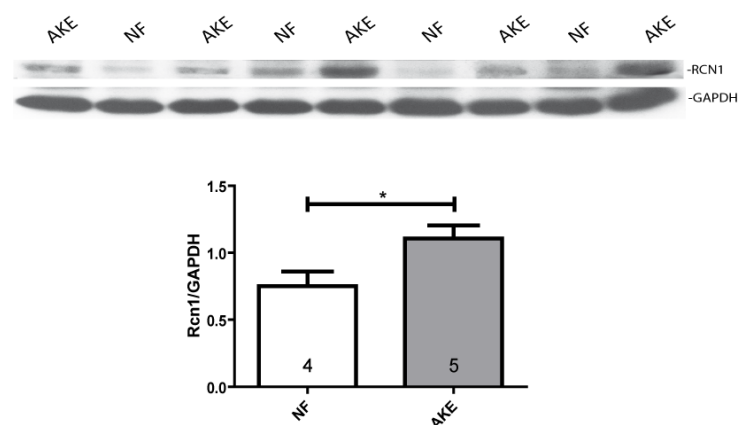


Abbildung 3.17 Endogene Expression von RCN1 in humanen Myokard-Biopsien von Patienten mit Aortenklappeninsuffizienz (AKE). Aus den Myokard-Biopsien wurde Protein isoliert und anschließend die Western-Blot Analyse mit einem RCN1-spezifischem Antikörper durchgeführt. Als Kontrollen wurden Biopsien aus *nonfailing* Herzen (NF) verwendet. Eine Normalisierung der Proben erfolgte anhand des

Referenz-Proteins GAPDH. In den Proben der Patienten mit AKE war die RCN1 Protein-Expression signifikant erhöht (* $<0,05$).

3.18 Test der im cDNA Library Screen identifizierten Modulatoren auf C-RAF/B-RAF Spezifität

Um zu ermitteln ob die identifizierten Modulatoren der RAF/MEK Interaktion spezifisch für B-RAF sind, wurde der Luciferase Reporterassay erneut durchgeführt. Dazu wurde der offene Leserahmen von C-RAF in den pACT Vektor ligiert. Da die basale Aktivität von C-RAF kaum messbar ist, musste für die Inhibitoren der Interaktion eine andere Lösung gefunden werden. In diesem Fall wurde die C-RAF Aktivität mit der konstitutiv aktiven H-RasV12 Mutante stimuliert. Für die Überprüfung des VP16-CRAF Fusionsprotein auf Validität wurden zunächst je 50 μg der Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-CRAF sowie des pG5luc Reporters in COS-7 Zellen transfiziert. Die Transfektionen erfolgten im Triplikate. Für die Auswertung wurden drei biologische Replikate ausgewertet.

Wurde nur eines der beiden Fusionsproteine GAL4-Mek1 oder VP16-CRAF in Kombination mit dem jeweiligen Leervektor sowie dem pG5luc Reporter transfiziert, erhielt man kein *firefly* Luciferase Signal. Dadurch ließ sich ausschließen, dass nur eines der beiden Fusionsproteine alleine in der Lage ist ein basales Luciferase Signal zu generieren (VP16-CRAF $0,137\pm 0,088$; GAL4-Mek1 $0,075\pm 0,030$). Die Versuchsergebnisse zeigten desweiteren, dass die basale Interaktion von C-RAF/Mek1 im Gegensatz zu B-RAF ein kaum messbares Signal lieferte. Allerdings ließ sich die C-RAF/Mek1 Interaktion mit Hilfe der konstitutiv aktiven H-RasV12 Mutante signifikant aktivieren (basal $0,426\pm 0,088$; +RasV12 $3,310\pm 0,282$; $n=3$; $p<0,0005$), (Abb. 3.18.1).

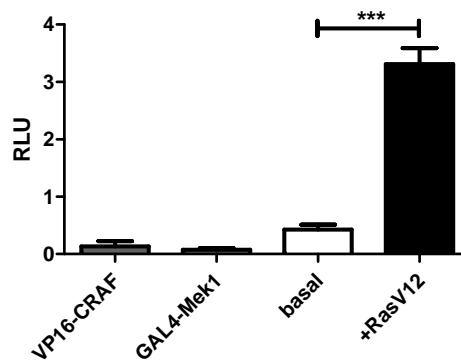


Abbildung 3.18.1 Test des VP16-CRAF Fusionsproteins. Um zu ermitteln ob die gefundenen Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion auch auf C-RAF wirken, wurde der Luciferase Reporterassay mit VP16-CRAF durchgeführt. Je 50 µg der Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-CRAF sowie des pG5luc Reporters wurden in COS-7 Zellen transfiziert. Für die Auswertung wurden drei biologische Replikate analysiert. Die RLU wurde dabei relativ zum Mittelwert der basalen Luciferase Expression der C-RAF/MEK1 Interaktion berechnet. Nur eines der beiden Fusionsproteine alleine war nicht in der Lage ein Luciferase Signal zu generieren. Im Gegensatz zu B-RAF lieferte die basale Interaktion von C-RAF/Mek1 ein kaum messbares Luciferase Signal. Die C-RAF/Mek1 Interaktion sich mit Hilfe der konstitutiv aktiven H-RasV12 Mutante signifikant aktivieren (***) ($*** < 0,0005$).

Anschließend wurden die zuvor identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion auf ihre Wirkung auf C-RAF getestet. Je 50 µg der Plasmid-DNA kodierend für die GAL4-Mek1 und VP16-CRAF Fusionsproteine sowie des pG5luc Reporters wurden gemeinsam mit 250 µg Modulator in COS-7 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase Expressionen gemessen.

Das Ergebnis ist in Kapitel 3.18.2 dargestellt und zeigte, dass nur ein kleiner Anteil der identifizierten Modulatoren eine ähnliche Wirkung auf C-RAF besaß. Die meisten der identifizierten B-RAF Aktivatoren hatten keine Wirkung auf C-RAF. Nur drei der insgesamt zwölf identifizierten Aktivatoren (Dbn1, Wdr91 und Ube2h) führten zu einer signifikanten Steigerung der CRAF/Mek1 Interaktion. Der Test der Inhibitoren zeigte, dass zwei der fünf identifizierten Inhibitoren (Pja1 und Nxph4) in der Lage waren die durch H-RasV12 stimulierte Aktivierung von C-RAF zu inhibieren.

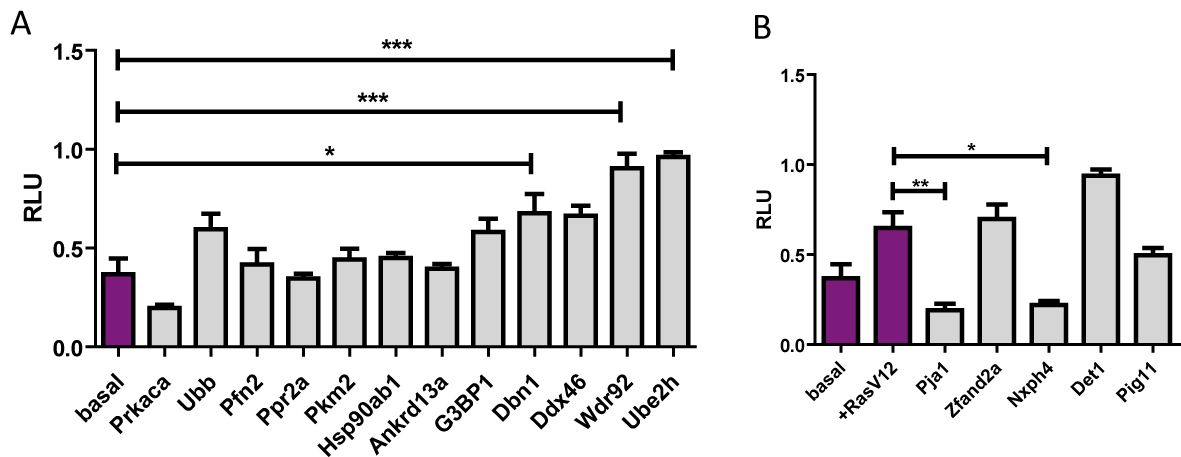


Abbildung 3.18.2 Test der identifizierten Modulatoren auf ihre Wirkung auf die C-RAF/Mek1 Interaktion.

Je 50 µg der Fusionsproteine GAL4-Mek1 und VP16-CRAF sowie des pG5luc Reporters wurden gemeinsam mit 250 µg eines Modulators in COS-7 Zellen transfiziert. Das Ergebnis zeigte, dass nur einige der identifizierten Modulatoren eine ähnliche Wirkung auf C-RAF hatten. **(A)** Die meisten der identifizierten B-RAF Aktivatoren hatten keine Wirkung auf C-RAF. Nur drei der insgesamt zwölf identifizierten Aktivatoren (Dbn1, Wdr91 und Ube2h) führten zu einer signifikanten Steigerung der CRAF/Mek1 Interaktion. **(B)** Der Test der Inhibitoren zeigte, dass zwei der fünf identifizierten Inhibitoren (Pja1 und Nxph4) in der Lage sind die durch H-RasV12 stimulierte Aktivierung von C-RAF zu inhibieren (*<0,05, **<0,005, ***<0,0005).

3.19 Luciferase Reporterassay in Kardiomyocyten

Da sich Kardiomyocyten der Ratte nicht effektiv durch Transfektionsmethoden wie Lipofektion und Elektroporation transfizieren lassen, wurde ausschließlich der adenovirale Gentransfer verwendet, um Proteine in Kardiomyocyten überzuexprimieren. Um den Luciferase Reporterassay auch direkt in Kardiomyocyten nutzen zu können, mussten die in Kapitel 3.5 beschriebenen Fusionsproteine adenoviral vermittelt exprimiert werden. Dazu wurde dem pACT- und pBIND-Vektor durch eine zielgerichtete Mutagenese eine NheI Schnittstelle eingeführt. So war es möglich die Fusionsproteine VP16-BRAF und GAL4-Mek1, durch Verwendung dieses Restriktionsenzym aus den Vektoren zu schneiden und für die Generierung eines Adenovirus in den *shuttle*-Vektor zu klonieren. Die *firefly* Luciferase des pG5luc-Reporters wurde ebenfalls in einen *shuttle*-Vektor kloniert. Die anschließende Sequenzierung der Vektoren zeigte mutationsfreie Sequenzen.

Neonatale Kardiomyocyten der Ratte wurden 24 h nach der Isolation mit den Adoviren Ad-VP16-BRAF, Ad-GAL4-Mek1 und Ad-luc (MOI 25) infiziert. Um die Validität der Analyse zu überprüfen, wurden zusätzlich Ad-Rcn1, Ad-miR2 und Ad-miR3 (MOI 25) zugegeben. Nach 48 h

wurden die Zellen lysiert und die *firefly* Luciferase Expression gemessen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

Das Ergebnis der vorherigen Versuche ließ sich direkt in Kardiomyocyten bestätigen. Ad-Rcn1 war genauso wie Ad-IMP in der Lage die Interaktion von B-RAF/Mek1 signifikant zu inhibieren. Durch den *Knockdown* von Rcn1 durch Ad-miR3 in Kardiomyocyten kam es zu einer gesteigerten Interaktion von B-RAF/Mek1 (basal $5,18e7 \pm 1,34e6$; IMP $3,01e7 \pm 1,46e6$, $p < 0,0005$; Rcn1 $2,47e7 \pm 1,05e6$, $p < 0,0005$; miR2 $5,53e7 \pm 1,10e6$; miR3 $6,26e7 \pm 2,22e6$, $p < 0,005$; $n=3$), (Abb. 3.19).

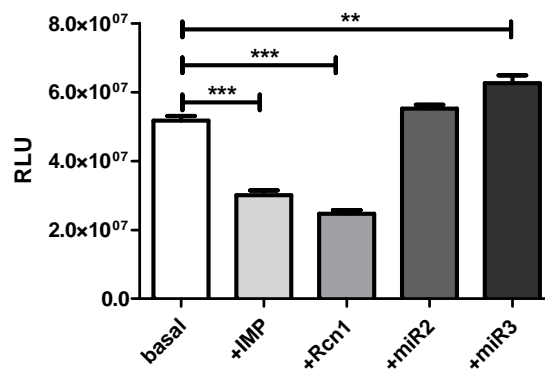


Abbildung 3.19 Luciferase Reporterassay in Kardiomyocyten. Um den Luciferase Reporterassay direkt in den Kardiomyocyten neonataler Ratten durchführen zu können, mussten die Fusionsproteine VP16-BRAF und GAL4-Mek1 sowie der Luciferase Reporter als Adoviren generiert werden. 24 h nach der Isolation wurden die Zellen mit den Adoviren Ad-VP16-BRAF, Ad-GAL4-Mek1 und Ad-luc (MOI 25) infiziert. Um die Validität der Viren zu überprüfen, wurden zusätzlich Ad-Rcn1, Ad-miR2 oder Ad-miR3 (MOI25) zugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen in lysiert und die *firefly* Luciferase Expression gemessen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Ad-Rcn1 und Ad-IMP in den neonatalen Kardiomyocyten in der Lage waren die B-RAF/Mek1 Interaktion signifikant zu inhibieren. Ein *Knockdown* von Rcn1 in Kardiomyocyten Ad-miR3 führte zu einer verstärkten B-RAF/Mek1 Interaktion (** $< 0,005$; *** $< 0,0005$).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die MAPK Signalkaskade transmittiert und reguliert die Antwort der Zelle auf extrazelluläre Signale. Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Stress-Stimuli führen zu ihrer Aktivierung. Die Signalkaskade reguliert fundamentale Funktionen der Zelle, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Überleben. Dies geschieht durch die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren oder anderer regulatorischer Proteine. Genau durch diese zentrale Rolle in der Signaltransduktion können Störungen der MAPK Signalkaskade eine verheerende Auswirkung auf die Zelle und ihren Organismus haben. Die Proteine der MAPK Signalkaskade wurden bereits mit vielen Krankheiten wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und Herzinsuffizienz in direkten Zusammenhang gebracht. Daher ist sie als direktes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapien enorm interessant.

Die konstitutive Aktivierung der MAPK Signalkaskade im Herzen führt zu kardialer Hypertrophie mit anschließender Herzinsuffizienz (Sugden und Clerk 1998; Lips et al., 2003; Bueno et al., 2000). In diesem Zusammenhang lag der Fokus der bisherigen Untersuchungen anderer Gruppen auf C-RAF. Eine Vielzahl vorangegangener Studien weist aber darauf hin, dass B-RAF ebenfalls von großer Bedeutung sein könnte und eventuell die wichtigste MEK Kinase darstellt (Jaiswal et al., 1994; Catling et al., 1994; Wojnowski et al., 2000; Pritchard et al., 2004).

Um zu ermitteln, ob es sich bei B-RAF um eine essentielle MEK Kinase in Kardiomyocyten handelt, wurde die B-RAF Aktivität durch das kommerziell erhältliche SB590885 inhibiert. Hierbei handelt es sich um einen B-RAF spezifischen Inhibitor (King et al., 2006). Durch den simultanen Einsatz von Phenylephrin wurde eine übermäßige Aktivierung der MAPK Signalkaskade und damit eine Hypertrophie induziert. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass neonatale Kardiomyocyten der Ratte, die mit dem B-RAF Inhibitor behandelt wurden, sich der Phenylephrin induzierten Hypertrophie vollständig entzogen. Zusätzlich wurde der Phosphorylierungsstatus von Mek1/2 in den so behandelten Zellen untersucht. Kardiomyocyten mit inhibierter B-RAF Aktivität verfügten über eine signifikant reduzierte Mek1/2 Phosphorylierung. Das zeigte sich sowohl für die basale Aktivität der MAPK Signalkaskade in unstimulierten Zellen, als auch in Kardiomyocyten, in denen es durch Phenylephrin zu einer verstärkten Mek1/2 Aktivität kam. Das lässt den Schluss zu, dass es sich bei B-RAF um die wesentliche MEK Kinase in Kardiomyocyten handelt. Daher wurde ein Luciferase Reporterassay entwickelt, mit dem sich die Bindungsaktivität zwischen B-RAF und

Mek1 valide untersuchen lässt. Die Assoziation von B-RAF an Mek1 ist für die Signaltransduktion essentiell. Es wurde hypothetisiert, dass weitere Proteine diese Assoziation direkt oder indirekt beeinflussen und so die Signaltransduktion regulieren. Mit dem Luciferase Reporterassay wurde ein cDNA Library Screen nach neuen Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion durchgeführt. Dabei konnten sowohl inhibierende als auch aktivierende Modulatoren der B-RAF Kinaseaktivität identifiziert werden.

Die kardiale Hypertrophie geht mit einer Reaktivierung von Genexpressionsmustern einher, von denen viele normalerweise nur in der fetalen Entwicklungsperiode des Myokards exprimiert werden (Hanford et al., 1994; Calderone et al., 1995). Daher wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit einige der identifizierten Modulatoren mittels *Real-Time* PCR auf ihre Regulation im hypertrophen Myokard untersucht. Dazu wurde bei Mäusen durch einen operativen Eingriff eine permanente Verengung der Aorta (TAC) vorgenommen. Dies löst eine konzentrische Hypertrophie mit nachfolgender Herzinsuffizienz aus. Als Kontrolle fungierten nach gleichem Prinzip operierte Mäuse (Sham) bei denen keine Intervention der Aorta erfolgte. Die Validität der Proben wurde durch die Untersuchung gängiger Marker der Hypertrophie bestätigt. BNP stellt einen diagnostisch verwendeter Marker der Herzinsuffizienz dar. Die BNP mRNA Expression war in den TAC operierten Tieren signifikant erhöht. Zudem kam es im hypertrophen Myokard zu einer deutlich vermehrten Expression der MHC- β mRNA und einer deutlich verminderten Expression der MHC- α mRNA. Somit wurde durch die *Real-Time* PCR zweifelsfrei nachgewiesen, dass die TAC operierten Mäuse die typischen Expressionsänderungen einer kardiale Hypertrophie entwickelt hatten. Anschließend wurden einige der identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion auf ihre Regulation im hypertrophen Myokard untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass einige Modulatoren (Ddx46, Zfand2a) keine signifikante Expressionsänderung zeigten. Diese Modulatoren wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Die mRNA Expression von Ankr13a und Wdr92 war in den TAC operierten Tieren signifikant reduziert. Da beide als Aktivatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion identifiziert wurden, ist es unwahrscheinlich, dass sie an der Prozessierung hypertropher Signale beteiligt sind und wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die mRNA Expression von G3BP1, Pkm2 und Rcn1 war in den TAC operierten Tieren signifikant erhöht. Es empfiehlt sich diese Modulatoren in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf Rcn1, das in den nachfolgenden Versuchen genauer analysiert wurde. Dazu wurde die Untersuchung der Regulation im hypertrophen Myokard zunächst um zwei weitere Versuchsreihen mit jeweils sechs Tieren pro Gruppe erweitert und mittels *Real-Time* PCR bestätigt. Dabei wurde festgestellt, dass die Rcn1 mRNA im hypertrophen Myokard signifikant höher exprimiert wird. Die Regulation von Rcn1 wurde auch in humanen

Proben von Patienten mit einer Aortenklappeninsuffizienz analysiert. Im Vergleich zu pathologisch unauffälligen Herzen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von RCN1 Protein in den Proben von Patienten mit einer Aortenklappeninsuffizienz.

Eine Expressionsstudie in verschiedenen Organen der Maus zeigte eine deutliche Rcn1 mRNA Expression im Herzen. Da es sich bei Rcn1 um einen innerhalb dieser Arbeit identifizierten Inhibitor der B-RAF/Mek1 Interaktion handelt, wurde anschließend die Wirkung einer Überexpression auf die neonatalen Kardiomyocyten der Ratte untersucht. Neonatale Kardiomyocyten, die Rcn1 überexprimieren, weisen wie zuvor die B-RAF inhibierten Zellen keine Phenylephrin induzierten Hypertrophie auf. Zudem führte die Rcn1 Überexpression zu einer verminderten Phosphorylierung von Mek1/2 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte. Der *Knockdown* von Rcn1 in neonatalen Kardiomyocyten zeigte ein gegenteiliges Ergebnis. Eine verminderte Expression von basalem Rcn1 führte in den Kardiomyocyten zu einem deutlich hypertrophen Wachstum der Zellen. Zudem konnte in den Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von Mek1/2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse von Überexpression und *Knockdown* ließen sich sowohl im Western-Blot als auch im Luciferase Reporterassay bestätigen. Dies impliziert, dass Rcn1 in Zellen notwendig ist, um eine verstärkte Aktivität von B-RAF zu inhibieren. Um die Wirkungsweise von Rcn1 im MAPK Signalweg genauer zu entschlüsseln, wurde ein Ras-Aktivierungs-Assay durchgeführt. Dieser zeigte, dass die Überexpression von Rcn1 nicht zu einer verminderten Aktivität von Ras führt. Rcn1 setzt also unterhalb von Ras an und ist wahrscheinlich in der Lage die B-RAF Aktivität direkt oder indirekt durch die Rekrutierung anderer Inhibitoren oder Scaffold-Moleküle zu vermindern. Es wurde zudem bestätigt, dass Rcn1 in der Lage ist eine konstitutiv aktive C-RAF-BXB Mutante zu inhibieren. Daher handelt sich bei Rcn1 wahrscheinlich um keinen B-RAF spezifischen Inhibitor.

4.2 B-RAF reguliert die kardiale Hypertrophie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass B-RAF in der Regulation kardialer Hypertrophie eine signifikante Rolle spielt.

Die MAPK Signalkaskade ist einer der am besten charakterisierten Signalwege unterhalb der RAF-Proteine. Die MEK Proteine werden an zwei Serin Resten innerhalb ihres Aktivierungssegmentes (S217 und S221) phosphoryliert. Diese wiederum phosphorylieren ihrerseits ERK an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest ebenfalls innerhalb des Aktivierungssegmentes (T202/Y204 ERK1), (Marais et al., 1995). Alle bekannten RAF Isoformen sind auf die oben genannte Weise in der Lage MEK1/2 *in vitro* zu aktivieren (Marais et al., 1997). Allerdings unterscheiden sie sich in der Fähigkeit ihrer Aktivierung. In Zellextrakten bindet und phosphoryliert B-RAF MEK1/2

effizienter als A-Raf und C-RAF (Marais et al., 1995; Papin et al., 1996). In vorangegangenen Studien von Zellfraktionen zeigte sich B-RAF und nicht C-RAF als Haupt-MEK Kinase in Zellen (Jaiswal et al., 1994, Catling et al., 1994). Es ist bekannt, dass Störungen der komplexe Abfolge und Regulation der MAPK Signalkaskade zu kardialer Hypertrophie führen. Störungen der Regulation können beispielsweise durch Mutationen hervorgerufen werden. Diese wurden sowohl im Cardio-Fazio-Cutanen-Syndrom als auch beim Noonan-Syndrom entdeckt (Pierpont et al., 2010; Niihori et al., 2006). Dabei handelt es sich um Krankheiten mit ähnlichen klinischen Symptomen, die sich unter anderem auch als Herzdefekte manifestieren. Patienten mit diesen Syndromen entwickeln nicht selten eine hypertrophe Kardiomyopathie und zeigen häufig Mutationen in C-RAF, B-RAF, MEK1/2 und K-RAS (Pierpont et al., 2010).

Um eine Hypertrophie von in Kultur befindlichen Kardiomyocyten zu erzeugen, können Agonisten wie Phenylephrin genutzt werden. Aufgrund der andauernden Stimulation des α 1-adrenergen Rezeptors unterliegen die Zellen einer Stimulation der MAPK Signalkaskade und damit hypertrophem Wachstum (Zimmer, 1997; Rockman et al., 1997). Die Zellen weisen einen erhöhten Protein- und RNA-Gehalt auf und es kommt zu einer vermehrten Zusammenlagerung von Proteinen in Untereinheiten des Sarkomers (Sarkomergnese) (Lee et al., 1988). Wird die ERK-Proteinsynthese durch synthetische Oligonukleotide blockiert, kommt es zu einer reduzierten transkriptionalen und morphologischen Antwort der Kardiomyocyten auf eine Phenylephrin induzierte Hypertrophie (Glennon et al., 1996).

Innerhalb dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass eine Inhibition von B-RAF zum selben Ergebnis führt. Die Weiterleitung der Signale von RAF an MEK wird in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte durch die Inhibition von B-RAF signifikant reduziert. Daher scheint es sich bei B-RAF um die RAF-Isoform zu handeln, die hauptsächlich für eine Weiterleitung der Signale an MEK verantwortlich ist. Die Hinweise der Literatur konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit insbesondere durch den Versuch mit dem B-RAF Inhibitor in neonatalen Kardiomyocyten der Ratte bestätigt werden. Bei B-RAF handelt es sich offenbar um den Haupt-Mek Aktivator in Kardiomyocyten. Es konnte gezeigt werden, dass die primäre Aufgabe von B-RAF darin besteht Mek zu aktivieren, entweder direkt oder durch die Rekrutierung von C-RAF. Es ist möglich, dass A-RAF und C-RAF hingegen eher für die Feinabstimmung oder die Dauer der Aktivierung von ERK verantwortlich sind. Dass C-RAF und B-RAF redundante Aufgaben erfüllen und einen Verlust einer RAF Isoform ausgleichen können, kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Setzt man den verwendeten Inhibitor SB590885 in Zelllinien ein, die onkogenes Ras exprimieren, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von C-RAF (Heidorn et al., 2010). Auf welchem Weg diese Aktivierung erfolgt könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

Da sich A-RAF und C-RAF während der Evolution divergent von B-RAF entwickelt haben, könnten A-RAF und C-RAF MEK-unabhängige Funktionen zufallen. B-RAF dagegen repräsentiert den RAF-Vorläufer, da es viele regulatorische Gemeinsamkeiten mit D-RAF aus *Drosophila melanogaster* und lin-45 aus *Caenorhabditis elegans* aufweist, während A-RAF und C-RAF divergenter zu sein scheinen (Marais und Marshall, 1996).

4.3 Die Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion

Es ist bekannt, dass die MAPK Signalkaskade in einem reichen Netzwerk von Interaktionen und einer Vielzahl von Komponenten eingebettet ist. Mit dieser Signalkaskade interagieren sowohl Membranrezeptoren als auch Scaffold-Moleküle und Transkriptionsfaktoren (Kolch, 2005).

Um weitere Modulatoren dieses Signalwegs mit besonderem Hinblick auf die Kinaseaktivität von B-RAF zu identifizieren, wurde im Rahmen der Untersuchungen ein cDNA Library Screen durchgeführt. Der innerhalb dieser Arbeit entwickelte Luciferase Reporterassay war sehr gut geeignet die basale Aktivität von B-RAF darzustellen. Daher konnten bislang unbekannte Aktivatoren und Inhibitoren der Interaktion ermittelt werden. Diese werden im Folgenden aufgeführt und diskutiert.

4.3.1 Die Aktivatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion

Innerhalb des in dieser Arbeit durchgeführten cDNA Library Screens wurde ein bekannter Stimulator der B-RAF Kinaseaktivität identifiziert. Die Proteinkinase A oder Prkaca (*protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha*) phosphoryliert B-RAF an S429 (König et al., 2001). Diese Phosphorylierungsstelle teilt B-RAF nicht mit seinen Isoformen A-RAF und C-RAF. Somit kann nur B-RAF spezifisch durch die Proteinkinase A aktiviert werden. Durch die Identifizierung dieses bekannten und bereits gut charakterisierten Aktivators der B-RAF Kinaseaktivität wurde die Wirksamkeit des Luciferase Reporterassays sowie des cDNA Library Screens bestätigt.

Die beiden innerhalb dieser Arbeit identifizierten cDNAs *protein phosphatase 2A* (PP2A oder Ppp2ra) und Profilin2 (Pfn2) wurden bereits zuvor mit der Entstehung der kardialen Hypertrophie in Verbindung gebracht. Eine herzspezifische Überexpression von PP2A führt zu kardialer Hypertrophie und dilativer Kardiomyopathie in transgenen Mäusen. Sie wurde von den Autoren aber nicht mit der MAPK Signalkaskade in Verbindung gebracht (Gergs et al., 2004). Der *Knockout* von PP2a verursacht eine frühe embryonale Letalität an Tag E6.5 der Embryonalentwicklung, da

PP2a essentiell für Gastrulationsprozesse und Mesodermformation zu sein scheint (Götz et al., 1998).

Die Überexpression von humaner Profilin1 cDNA führt zu einer vaskulären Hypertrophie in den transgenen Tieren und einer höheren Expression von aktiviertem ERK1/2 (Moustafa-Bayoumi et al., 2007). In dem innerhalb dieser Arbeit durchgeführten cDNA Library Screen wurde die Isoform Profilin2 als Aktivator der B-RAF Kinaseaktivität identifiziert. Die Profilin-Familie besteht aus vier Isoformen (Profilin1-4), die alle in der Lage sind Aktin zu binden (Calsson et al., 1977; Honore et al., 1993; Hu et al., 2001; Obermann et al., 2005). Struktur und Funktion sind während der Evolution hoch konserviert (Rothkegel et al., 1996; Nodelman et al., 1999). Profilin2 scheint sich während der Entwicklung der Vertebraten aus Profilin1 entwickelt zu haben (Polet et al., 2007). Profiline binden nicht nur Aktin, sondern katalysieren auch einen Nukleotidaustausch (Mockrin und Korn, 1980). Diese Entdeckung führte zu der Vermutung, dass die Hauptaufgabe von Profilin darin besteht ATP-Aktin Monomere an die Enden wachsender Aktinfilamente anzubringen (Tilney et al., 1983; Pring et al., 1992; Pantaloni und Carlier, 1993). Profilin2 wurde innerhalb dieser Arbeit als Aktivator der B-RAF Aktivität identifiziert. Da Profilin2 sich während der Entwicklung aus Profilin1 entwickelt hat, ist davon auszugehen, dass beide Isoformen auf die gleiche Weise an der Entstehung kardialer Hypertrophie beteiligt sind. Die Prozessierung der MAPK Signalkaskade ist somit während der Entstehung einer Hypertrophie von Komponenten des Cytoskeletts beeinflussbar.

Zusätzlich wurde im cDNA Library Screen Drebrin1 (Dbn1) identifiziert. Dabei handelt es sich um einen Interaktionspartner von Profilin (Mammoto et al., 1998). Drebrin1 wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert (Shirao und Obata, 1985; Ishikawa et al., 1994) und bindet ebenfalls Aktin (Mammoto et al., 1998). Die Identifikation von zwei Interaktionspartnern Dbn1 und Pfn2 als Aktivatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion deutet auf eine wichtige Funktion von Aktin-bindenden Molekülen innerhalb der MAPK Signalkaskade hin und soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Vier der innerhalb dieser Arbeit identifizierten cDNAs Ubb, Ube2h, Det1 und Pja1 sind Bestandteile des Ubiquitinierungssystems der Zelle. Zwei von ihnen, Ubiquitin B (Ubb) und das E2 Ubiquitin-konjugierte Enzym Ube2h, haben eine aktivierende Wirkung auf die B-RAF/Mek1 Interaktion, während Pja1 und Det1 eine inhibierende Wirkung zeigen. Das Ubiquitin-Proteasom System wurde erstmals 1999 mit kardialen Dysfunktionen in Verbindung gebracht (Weekes et al., 1999). Mittlerweile ist bekannt, dass die Dysregulation von Ubiquitin selbst, den Ubiquitin-konjugierten Enzymen, der Ubiquitin-Ligase und Komponenten des Proteasoms zu Herzinsuffizienz führen (Williams und Patterson, 2006).

Ein Chaperon führt ebenfalls zu einer verstärkten B-RAF/Mek1 Interaktion. Hsp90ab1 wurde nicht nur innerhalb dieser Arbeit sondern auch in einem erst kürzlich durchgeführten Interaktom humaner MAP Kinasen als Modulator des Signalweges beschrieben (Bandyopadhyay et al., 2010).

4.3.2 Aktivatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion und ihre Regulation im hypertrophen Myokard

Innerhalb dieser Arbeit wurden einige der identifizierten cDNAs mit Hilfe von *Real-Time* PCRs auf eine Expressionsänderung im hypertrophen Myokard untersucht. Da sich während der Entwicklung einer Hypertrophie das Genexpressionsmuster der Kardiomyocyten ändert, sollten so Rückschlüssen auf die Beteiligung der Modulatoren an regulatorischen Genexpressionsänderungen gewonnen werden.

Die *ankyrin repeat domain 13a* (Ankrd13a) und die *WD repeat domain 92* (Wdr92) zeigten eine signifikant verminderte Expression im hypertrophen Myokard. Der Luciferase Reporterassay zeigte jedoch eine B-RAF/Mek1 interaktionsfördernde Wirkung. Damit könnten diese Proteine physiologische Gegenregulationsmechanismen vermitteln. Diese wurden hier aufgrund dieser potentiell komplexen Wirkung nicht weiter untersucht.

Die genaue Funktion der Ankrd13a ist unbekannt. Der Ankyrin Repeat gehört zu den gängigsten Protein-Protein Interaktionsmotiven in Zellen. Im Herzen wurde bis jetzt nur die *ankyrin repeat domain 1* (Ankrd1) näher untersucht. Ankrd1 wird in Kardiomyocyten durch hypertrophe Stimuli und Herzinsuffizienz induziert, weshalb vermutet wurde, dass es eine Rolle im pathologischen Remodelling des ventrikulären Myokards spielt (Aihara et al., 2000; Zolk et al., 2002; Nagueh et al., 2004). Allerdings zeigte ein *Knockout* Model von Ankrd1 keinen Phänotyp (Barash et al., 2007). Wdr92 enthält zwei sogenannte WD-40 Repeat-Domänen. Diese häufig in Eukaryoten vorkommende Struktur ist während der Evolution hoch konserviert und steuert Funktionen wie Signaltransduktion, Zellzyklusregulation, Apoptose und Transkription (Smith et al., 1999; Saeki et al., 2006).

Das *DEAD box protein 46* (Ddx46) zeigte keine signifikante Regulation im hypertrophen Myokard und wurde daher von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Ddx46 gehört zur Familie der Dead-Box Proteine. Diese Familie enthält RNA-Helikasen, die ein charakteristisches Motiv aus der konservierten Aminosäuresequenz Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) enthalten (Dalbadie-McFarland und Abelson; 1990). Ddx46 wurde mit dem Pre-spleißen der mRNA in Verbindung gebracht, die genaue Funktion ist bis jetzt unbekannt (Linder, 2006).

Die beiden Aktivatoren *RasGAP Src homology3 [SH3] binding protein* (G3BP1) und *pyruvate kinase muscle 2* (Pkm2) zeigten eine signifikant erhöhte mRNA Expression im hypertrophen Mausmyokard. Daher sind sie für eine weitere Untersuchung sehr interessant.

G3BP1 bindet an das *Ras-GTPase activating protein* (Ras-GAP). Bei Ras-GAP handelt es sich um einen sehr effizienten Ras-Effektor, der *in vitro* und *in vivo* die Ras-GTPase stimuliert und dadurch Ras inhibiert (Tocque et al., 1997). Die Überexpression von G3BP1 wurde in humanen Tumoren sowie in Zelllinien von Lungen-, Prostata- und Brustkrebs festgestellt (Liu et al., 2001; Barnes et al. 2002; French et al., 2002). Zudem ist G3BP1 während der Entwicklung essentiell, da ein *Knockout* zu früher embryonaler Letalität und massiver Apoptose in Mäusen führt (Zerki et al., 2005). Es ist zudem in der Lage die Aktivität des Tumorsuppressors p53 zu modulieren (Kim et al., 2007). G3BP1 wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit mittels eines Ras-Aktivierungs-Assays untersucht. Eine Überexpression von G3BP1 führte in COS-7 Zellen zu einer vermehrten Aktivierung von Ras (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen zu G3BP1 sind geplant.

Bei Pkm2 handelt es sich um die fetale Isoform von Pkm1, die durch alternatives Spleißen entsteht (Mazurek et al., 2005). Pkm1 wird in gesunden, adulten Zellen exprimiert und steuert den Katabolismus von Glucose durch die oxydative Phosphorylierung. Pkm2 wird während der Entwicklung exprimiert und wurde in den meisten Krebszellen identifiziert. Dort katalysiert es den Katabolismus von Glucose durch Glycolyse (Jones und Thompson 2009). Es wurde vermutet, dass dieser alternative glycolytische Signalweg hauptsächlich in schnell proliferierenden Zellen vorkommt (Vander Heiden et al, 2010). Die Expression der Pkm2 mRNA ist in den Hypertrophie induzierten Tieren deutlich erhöht. Da es sich bei Kardiomyocyten um ausdifferenzierte Zellen handelt, die ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben, könnte diese vermehrte Expression von Pkm2 zu einem hypertrophen Wachstum der Zellen führen oder metabolisch begünstigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Überexpression von Pkm2 in neonatalen Kardiomyocyten der Ratte untersucht (Daten nicht gezeigt). Eine Überexpression von Pkm2 führt zu einem verstärkten Größenwachstum der Myocyten und zu einer verstärkten Mek1/2 Phosphorylierung. Zu Pkm2 sind daher ebenfalls weitere Untersuchungen geplant.

4.3.3 Inhibitoren der B-RAF/Mek1 Interaktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Proteine des Ubiquitinierungssystems der Zelle auch als Inhibitoren der B-RAF/Mek1 Interaktion identifiziert werden. Innerhalb des cDNA Library Screens wurden die E3 Ubiquitin Ligase *praja ring finger 1* (Pja1) und der Bestandteil einer E3 Ubiquitin Ligase *de-etiolated homolog 1* (Det1) identifiziert. Es ist bekannt, dass E3 Ubiquitin-Ligasen die RAF/MEK Interaktion signifikant inhibieren können. Bei dem innerhalb dieser Arbeit verwendeten Inhibitor IMP handelt es sich ebenfalls um eine E3-Ubiquitin-Ligase. IMP wurde eingesetzt, um die Validität des Luciferase Reporterassays zu bestätigen. Ausgelöst durch den Aktivator Ras bewirkt IMP eine auto-Polyubiquitylierung, die die Interaktion von RAF/MEK verhindert (Matheny et al., 2004).

Bei Pja1 handelt es sich um ein Enzym mit einer E2-abhängigen E3 Ubiquitin Ligase Aktivität. Es gehört zu einer Klasse von Ubiquitin Ligasen, die ein RING-Finger Motiv beinhalten. Es interagiert mit dem E2 Ubiquitin-konjugierten Enzym UbcH5B (Lorick et al., 1999). Pja1 zeigte innerhalb des Luciferase Reporterassays der vorliegenden Arbeit die potenteste Inhibition der B-RAF/Mek1 Interaktion. Zudem wurde festgestellt, dass Pja1 in der Lage ist, die stimulierte C-RAF Kinaseaktivität durch die konstitutiv aktive H-RasV12 Mutante deutlich zu inhibieren. Da Pja1 hauptsächlich in Organen wie Gehirn, Leber und Niere exprimiert wird und eine Expression im Herzen nicht nachweisbar ist (Mishra et al., 1997), wurde es von weitergehenden Untersuchungen ausgeschlossen.

Über den humanen Bestandteil einer E3 Ubiquitin Ligase Det1 ist in der Literatur wenig bekannt. Allerdings ist bekannt, dass DET1 durch Interaktion mit anderen Proteinen maßgeblich an der Ubiquitinierung und dem Abbau von c-Jun beteiligt ist (Wertz et al., 2004). Bekanntlich wird der Transkriptionsfaktor c-Jun durch hypertrophe Stimulation von Kardiomyocyten verstärkt exprimiert (Izumo et al., 1988). Ein Abbau von c-Jun durch eine erhöhte Expression von Det1 kann umgekehrt zu einem Ausbleiben des hypertrophen Wachstums in Kardiomyocyten führen. Die weitere Untersuchung dieser Zusammenhänge kann daher ein interessanter Aspekt für Folgestudien sein.

Ein weiterer identifizierter Inhibitor *p53-induced gene 11* (Pig11) spielt eine Rolle in der Apoptose-Regulation. Pig11 ist ein direktes Zielgen von p53 (Polyak et al., 1997). Die biologischen Funktionen von p53 sind die Induktion des Zellzyklus-Arrest und die Induktion von Apoptose als Antwort auf zellulären Stress (May und May 1999; Oren, 1999; Vogelstein et al., 2000). Das Pig11 Protein ist in der Lage Apoptose in Hek293 Zellen zu induzieren (Liang et al., 2004). Die innerhalb

dieser Arbeit durch einen Screen der cDNA Library festgestellte verminderte B-RAF Aktivität kann eventuell auch auf einem sekundären Effekt beruhen. So kann es innerhalb der Experimente auch durch die Induktion der Apoptose oder den Zellzyklusarrest zu einer verminderten B-RAF/Mek1 Interaktion gekommen sein. Ein Verfälschen der Ergebnisse durch Apoptose sollte durch die Normalisierung der Transfektionseffizienz auf die *Renilla Reniformis* Luciferase Expression minimiert werden. Es sind weitere Studien dieses Proteins empfehlenswert, um eine klare Aussagen treffen zu können.

Über den Inhibitor *Neurexophilin* (Nxph4) ist in der Literatur kaum etwas bekannt. Nxph4 interagiert mit Neurexin und wurde daher als Signalmolekül vermutet (Missler et al., 1998). Inzwischen gibt es neue Hinweise, dass Nxph4 durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert wird (McElwee et al., 2009).

Über *AN1-type domain 2A* (Zfand2a) ist noch weniger bekannt. Es beinhaltet ein Zink-Finger Motiv und besitzt damit wahrscheinlich die Fähigkeit spezifisch an nahezu jede DNA-Sequenz zu binden. Eine Analyse im Rahmen dieser Arbeit mittels *Real-Time* PCR zeigte keine signifikante Regulation von Zfand2a im hypertrophen Myokard. Daher wurde Zfand2a zunächst von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich diverse Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion aus essentiellen Bereichen der Zellregulation identifizieren ließen. Es konnten Modulatoren identifiziert werden, die in der Proteinfaltung oder dem Proteinabbau eine Rolle spielen. Auch sind Modulatoren der Cytoskelettorganisation und der Apoptose entdeckt worden. Bei der MAPK Signalkaskade handelt sich um ein komplexes Netzwerk aus Stimulatoren und Inhibitoren. Bandyopadhyay et al., bewiesen in einem kürzlich durchgeführten Interaktom der MAP Kinasen die Komplexität dieses Signalweges. Dabei wurde ein Yeast Two-Hybrid Screen mit 86 MAPK-zugehörigen baits durchgeführt. Es wurden 2269 verschiedene Interaktionen mit 1468 unterschiedlichen Proteinen festgestellt (Bandyopadhyay et al., 2010). Dies stellt eindrucksvoll unter Beweis wie komplex die Regulationen innerhalb des MAPK Signalweges sein müssen. Alle hier identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion müssen in weiteren Studien auf ihren Einfluss auf B-RAF untersucht werden. Nur so lässt sich zweifelsfrei feststellen, dass es sich nicht um sekundäre Effekte handelt, die beispielsweise durch den Zellzyklus-Arrest oder andere Eingriffe in den Proteinhaushalt der Zelle entstanden sind.

Der innerhalb dieser Studien identifizierte Inhibitor Rcn1 der B-RAF/Mek1 Interaktion wurde nach der Identifikation in weiteren Analysen und Experimenten genauer charakterisiert und ist Gegenstand der nachfolgenden Diskussion.

4.4 Reticulocalbin ist ein Mitglied der CREC-Proteinfamilie

Reticulocalbin (Rcn) wurde erstmals 1993 von Ozawa und Maramatsu beschrieben (Ozawa und Maramatsu, 1993). Es wurde mittlerweile der CREC-Proteinfamilie zugeordnet. Alle Proteine dieser Familie sind durch mehrfach vorkommende EF-Hand Motive in der Lage Ca^{2+} zu binden (Honoré und Vorum, 2000). Neben Reticulocalbin enthält die CREC-Familie das *Ca²⁺-binding protein of 55 kDa* (ERC-55) (Weis et al., 1994), Crocalbin (Hseu et al., 1999), Cab45 (Scherer et al., 1996; Koivu et al., 1997) und Calumenin (Yabe et al., 1997; Vorum et al., 1998; Vorum et al., 1999). 1998 bildete die Gruppe um Yabe et al., aus den Anfangsbuchstaben dieser Proteine das Akronym CREC (Cab45, Reticulocalbin, ERC-55, Calumelin). Außer Rcn1 und ERC-55, auch als Rcn2 bekannt, enthält die CREC-Proteinfamilie mittlerweile auch die dritte Isoform der Reticulocalbine Rcn3 (Tsuji et al., 2006).

Einige Mitglieder der CREC-Proteinfamilie wurden auch in Invertebraten identifiziert. In *Drosophila melanogaster* wurden das *Drosophila Ca²⁺-binding Protein of 45 kDa* (DCB-45) und der *DNA supercoiling factor* (SCF) entdeckt (Kobayashi et al., 1998). In *Bombyx mori* wurde SCF (Ohta et al., 1995), das *Plasmodium falciparum 40 kDa sexual stage surface protein* (Pfs40) (Rawlings und Kaslow, 1992) und das *Plasmodium falciparum ER-located Ca²⁺-binding protein* (PFERC) (La Greca et al., 1997) identifiziert. Die hohe Konservierung der CREC-Proteine zwischen den Spezies weist auf wichtige Funktionen dieser Proteine hin.

Alle Mitglieder der CREC-Familie sind sich strukturell sehr ähnlich. Die Proteine werden als Pro-Proteine mit einer Leader-Sequenz synthetisiert. Diese Leader-Sequenz steuert die Pro-Proteine in das Lumen des ER, wo sie synthetisiert und prozessiert werden. Dabei verlieren sie ihre Leader-Sequenz wieder (von Heije 1998; Nielsen et al., 1997). Das auffälligste Motiv aller Proteine der CREC-Familie ist die EF-Hand. Dieses Motiv enthält einen aus 12 Aminosäuren bestehenden Loop, der die direkte Bindung des Ca^{2+} Ions koordiniert. Flankiert wird dieser Loop von zwei α -Helices, die aus 10-12 Aminosäuren bestehen. In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften der EF-Hand nicht besonders stark ausgeprägt sind (Vorum et al., 1998). Die schwachen Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften wurden sowohl für Calmodulin, als auch für Rcn1 und Rcn2 mittels Dialyse-Analyse festgestellt (Vorum et al., 1998; Honoré und Vorum 2000). In manchen Fällen hat sich die EF-Hand im Laufe der Evolution dupliziert oder ging verloren. In

anderen Fällen wurden nur die Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften der EF-Hand verändert (Heizman und Hunziker, 1991).

Die Rcn Sequenz hat nur in den Bereichen der EF-Hand signifikante Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen der CREC-Familie. Die Struktur ist allerdings ähnlich zu Calbindin D28 und Calretin (Rogers, 1989), da beide Proteine ebenfalls sechs EF-Hand Domänen besitzen. Calbindin D28 bindet nur vier Ca^{2+} Atome/mol Protein. Die zweite und sechste EF-Hand Domäne haben im Laufe der Evolution die Möglichkeit Ca^{2+} zu binden eingebüßt. Ursächlich liegt dies daran, dass ihnen eine Sauerstoff-enthaltende Aminosäure in der Loop-Struktur fehlt (Hunziker, 1986). Ebenso hat Reticulocalbin die Ca^{2+} -bindende Eigenschaft von Domäne zwei und sechs verloren. Eine phylogenetische Analyse der Mitglieder der CREC-Familie zeigte, dass sich die Protein-Familie aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat (Yabe et al., 1998). Ein Vergleich der Gen-Organisation von Rcn1 mit anderen EF-Hand Proteinen (Ozawa, 1995) oder ERC-55 (Weis et al., 1994) zeigte, dass die CREC-Proteine sich früh von den bekannten Unterfamilien Ca^{2+} -bindender Proteine wie Troponin C, Calmodulin oder Paralbumin abgespalten haben. Einige Proteine der CREC-Familie wurden mit der karzinogenen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht (Vorum et al., 1998; Lui et al., 1997; Nimmrich et al., 2000; Yu et al., 2000).

Trotz der bekannten funktionellen Gemeinsamkeiten der Mitglieder der CREC-Familie bleiben ihre wahren Aufgaben noch weitgehend unverstanden. Aufgrund der hohen Konservierungen zwischen den Spezies wird allerdings angenommen, dass sie wichtige Aufgaben innerhalb der Zelle erfüllen. Die starke Konservierung beschränkt sich nicht ausschließlich auf die EF-Hand Motive, daher wird angenommen, dass diese Proteine auch außerhalb der Möglichkeit Ca^{2+} zu binden weitere wichtige Aufgabe erfüllen.

4.4.1 Rcn1 – ein Überblick

Das Rcn1 Gen der Maus ist 13 kb groß (Ozawa, 1995). Es wurden zwei Transkripte von 2 und 2.3 kb durch alternatives Splicen der sechs Exons entdeckt (Strynadka und James, 1989; Ozawa, 1995). Im Menschen wurde bis heute lediglich ein Transkript gefunden (Ozawa, 1995). Die Rcn1 Region der Maus wurde in der sogenannten Small Eye Harwell (Sey^H) deletiert. Die frühe Letalität der Tiere nach E15.5 geht wahrscheinlich mit dem Verlust von Rcn1 in den homozygoten Tieren einher (Kent et al., 1997). Da die homozygote Deletion der Region, die Rcn enthält, letal ist, scheint es eine essentielle Aufgabe innezuhaben (Kent et al., 1997). In Zellen der Augenlinse kann Rcn1 durch oxidativen Stress induziert werden (Carper et al., 2001). Es gibt einige Berichte über die bedeutende Rolle von Rcn1 in physiologischen Prozessen, insbesondere der malignen Transformation von Zellen (Chen et al., 1995; Lui et al., 1997). Rcn1 wird in invasiven

Brustkrebszellen MDA-MB-435 überexprimiert, was zu der Annahme führt, dass die Expression von Rcn1 an der malignen Transformation beteiligt ist (Liu et al., 1997; Nimmricht et al., 2000).

Die Aminosäuresequenzen von Rcn1 in Mensch und Maus sind zu 95% identisch und damit hoch konserviert. Die hohe Konservierung von Rcn während der Evolution lässt auf eine wichtige Funktion schließen. Das humane Rcn1 Gen befindet sich auf dem Chromosom 11p13. Beim WAGR-Syndrom (*Wilms' tumor, aniridia, genitourinary anomalies, mental retardation syndrom*) ist dieser Bereich deletiert (Kent et al., 1997). Patienten mit dieser Krankheit zeigen Symptome, wie Aniridie, urogenitale Abnormalitäten, geistige Retardierung und Wilms-Tumore. Diese werden dem Verlust der Gene PAX6 und WT1 zugeordnet, die sich ebenfalls im deletierten Bereich auf Chromosom 11p13 befinden (Schwartz et al., 1994). Bislang wurde keine dieser Auffälligkeiten mit einem Verlust von Rcn1 in Zusammenhang gebracht.

Fast zwei Jahrzehnte lang wurde angenommen, dass Rcn1 ausschließlich im Lumen des ER lokalisiert ist (Ozawa und Muramatsu, 1993). Es enthält an seinem C-Terminus das ER-Retentionssignal HDEL (His-Asp-Glu-Leu), eine Abwandlung des ER-Retentionssignals KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu). Einige Studien zeigen, dass Proteine trotz der vorhandenen KDEL-Sequenz in der Plasmamembran lokalisiert sein können. Dazu zählen zum Beispiel die Disulfid Isomerase *glucose-regulated protein 78 kDa* (GRP78) und Calreticulin (Xiao et al., 1999; Johnson et al., 2001; Nabors et al., 2003). Calreticulin wird auf der Oberfläche von Aortenendothelzellen von Rindern exprimiert und steuert dort zusammen mit Thrombospondin den Abbau der fokalen Adhäsion (Goicoechea et al., 2000). Rcn2 besitzt ebenfalls das ER-Retentionssignal HDEL und wurde in einem Yeast Two-Hybrid Screen als valider Interaktionspartner des Vitamin D Rezeptors identifiziert (Imei et al., 1997). Es muss sich somit auch außerhalb des ER aufhalten können. Die Autoren vermuten, dass auch eine trunkierte Variante von Rcn2 ohne die Leader-Sequenz durch alternatives Spleißen des Transkripts entsteht. Dieses wurde für SCF in *Drosophila melanogaster* beobachtet, wodurch eine Lokalisation im ER Lumen verhindert wird.

2008 konnten Cooper et al. erstmals Rcn1 Protein in Membran Fraktionen von Endothelzellen des Knochenmarks nachweisen. Dabei wurde Rcn1 mittels Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche aller getesteten Endothelzelllinien gefunden. Eine immunocytochemische Färbung von Rcn1 in Endothelzelllinien zeigte ein vermehrtes Vorkommen von Rcn1 an den Zellgrenzen, womit nachgewiesen werden konnte, dass sich Rcn1 in diesen Zellen nicht nur im Lumen des ER befindet, sondern auch an der Oberfläche der Plasmamembran (Cooper et al., 2008).

4.4.2 Rcn1 inhibiert B-RAF und C-RAF

Innerhalb der vorliegenden Untersuchungen wurde Rcn1 erstmals als ein Regulator der kardialen Hypertrophie identifiziert. Rcn1 ist in der Lage die Phenylephrin induzierte Hypertrophie *in vitro* vollständig zu inhibieren und sowohl die B-RAF als auch die C-RAF Kinaseaktivität potent zu inhibieren. Die Abwesenheit von Rcn1 führt zu einer massiven Hypertrophie der Kardiomyocyten und einer verstärkten Aktivierung von MEK.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass Rcn1 sowohl B-RAF als auch C-RAF inhibiert. Der Mechanismus dieser Interaktion konnte noch nicht entschlüsselt werden. Eine Ko-Immunitätspräzipitation von Rcn1 schlug zunächst fehl. Daher konnte keine direkte Interaktion mit einem der bekannten Mitglieder der MAPK Signalkaskade hergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es empfiehlt sich diesen Aspekt in kommenden Studien genauer zu untersuchen. Wie oben beschrieben befindet sich Rcn1 in der Plasmamembran. Solche Proteine besitzen eine schlechte Löslichkeit und eine Tendenz zum Formen von Aggregaten sowie der Präzipitation in wässrigen Lösungen. Zudem kommen sie oft lediglich in geringer Kopienzahl in der Zelle vor (Corthals et al., 2000; Wilkins et al., 1998). Aufgrund der fehlenden Ergebnisse der Ko-Immunitätspräzipitation bleibt unklar, ob Rcn1 direkt mit B-RAF und C-RAF interagiert oder durch indirekte Steuerung anderer Moleküle die RAF Aktivität inhibiert. Sicher ist aber, dass Rcn1 unterhalb von Ras in die MAPK Signalkaskade eingreift. Dies zeigte der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Ras-Aktivierungs-Assay. In den Rcn1 überexprimierenden Zellen konnte kein Unterschied der Ras Aktivierung im Vergleich zu untransfizierten Zellen ermittelt werden. Weil es sich bei Rcn1 um ein membrangebundenes Protein handelt, könnte es RAF zur Plasmamembran rekrutieren und dort inhibieren. Die Aktivierung der MAPK Signalkaskade benötigt für ihre Regulation eine Vielzahl von Scaffold-Molekülen. Dazu zählen der *suppressor of Ras* (SUR-8), *kinase suppressor of Ras* (KSR) und der *connector enhancer of kinase suppressor of Ras* (CNK). Die Balance zwischen der Expression dieser Moleküle scheint äußerst wichtig für die Signalweiterleitung. Beispielsweise führt eine ektopische Expression von SUR-8 zu einer vermehrten Formation eines funktionellen Ras/RAF Komplexes (Sieburth et al., 1998). Im Gegensatz dazu verhindert IMP die Weiterleitung von Signalen an MEK durch Inaktivierung von KSR (Matheny et al., 2004). Rcn1 kann Teil eines noch unbekanntes Komplexes sein oder die Formung eines entsprechenden Komplexes verhindern und so die Weiterleitung der Signale von RAF an MEK verhindern.

4.4.3 Rcn1 Expression im hypertrophen Myokard

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Rcn1 Expression der kardialen Hypertrophie sowohl in Mensch als auch in Maus signifikant erhöht ist. Eine Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte verhindert die kardiale Hypertrophie *in vitro*. *In vivo* scheint die erhöhte Expression von Rcn1 nicht mehr in der Lage die Entstehung einer Hypertrophie durch vermehrte Expression zu verhindern.

Durch eine Sequenzanalyse wurde gezeigt, dass der Promotor von Rcn1 eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren besitzt, die durch Pro-inflammatorische Cytokine angesprochen werden kann (Cooper et al., 2008). TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) führt in Patienten mit einem fortgeschrittenen Prostatakarzinom zu einer stark erhöhten Expression von Rcn1 auf der Zelloberfläche. Cytokine sind sowohl für die Entstehung als auch für die Progression der chronischen Herzinsuffizienz verantwortlich (Seta et al., 1996). Bei der chronischen Herzinsuffizienz sind vor allem Interleukin 6 (IL-6) und TNF- α von Bedeutung (Shan et al., 1997; Niebauer et al., 1998). TNF- α wurde bereits 1975 (Carswell et al., 1975) bei Untersuchungen zur endotoxininduzierten „hämorrhagischen Nekrose“ von Tumoren entdeckt. Auch im Herzgewebe von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte Expression von TNF- α nachgewiesen (Torre-Amione et al., 1996). Durch die Abnahme der Konzentrationen von TNF- α , stellte sich bei Patienten eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion durch intensivierete Herzinsuffizienztherapie ein (Liu und Zhao, 1999). Da ein steigender TNF- α Spiegel zu einer erhöhten Expression von Rcn1 auf der Zelloberfläche von Prostatakarzinomzellen führt, kann ein ähnlicher Mechanismus für Kardiomyocyten existieren. Die in der Herzinsuffizienz gesteigerte Expression von TNF- α kann für die gesteigerte Expression von Rcn1 im hypertrophen Myokard verantwortlich sein. Dies kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

In vaskulären Zellen des Endothels kommt es durch eine Überexpression des *C-reactive protein* (CRP) zu einer verminderten Expression von Rcn1 (Wang et al., 2005). Viele weitere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Ansteigen von CRP und der Entwicklung von kardiovaskulären Krankheiten zeigen (Curb et al., 2003; Danesh et al., 2004). Ein hoher CRP-Spiegel kann ein höheres Risiko einer ischämischen kardiovaskulären Krankheit bedeuten (Curb et al., 2003; Danesh et al., 2004). Die Autoren fanden heraus, dass es durch CRP zu einer Veränderung der Genexpression kommt und darüber hinaus eine vermehrte Aktivierung der MAPK Signalkaskade erreicht wird (Wang et al., 2005). Sie führen dies auf eine erhöhte Expression von IL-8, das an der Regulation von MAPK beteiligt sein soll, zurück (Marie et al., 1999; Williams et

al., 2004). Die verminderte Expression von Rcn1 durch eine Überexpression von CRP kann ebenfalls mit einer erhöhten Aktivierung der MAPK in Zusammenhang stehen und bedarf genauerer Untersuchungen.

4.5 Die Regulation der MAPK Signalkaskade

Die genaue Regulation von ERK spielt eine wichtige Rolle in der biologischen Antwort der Zelle auf Reize ihrer Umgebung. Sie wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert.

Die Signalintensität und die Signaldauer der ERK Aktivierung sind von enormer Bedeutung. In neuronalen Zellen führt die transiente ERK Aktivierung zu Proliferation, während eine anhaltende Aktivierung zur Differenzierung der Zelle führt (Marshall, 1995). In Fibroblasten scheint der Fall komplexer, da zusätzlich die Intensität des Signals eine Rolle spielt. Die durch den *platelet-derived growth factor* (PDGF) induzierte Proliferation benötigt eine anhaltende ERK-Aktivierung in Fibroblasten (Weber et al., 1997), während durch eine RAF Mutante, die ein starkes ERK Signal induziert, ein Arrest des Zellzyklus ausgelöst wird (Woods et al., 1997). Alle drei RAF Isoformen sind in der Lage Vorgänge in der Zelle, wie Proliferation und Zellzyklus Arrest in Fibroblasten zu steuern. Dies ist von der Signalintensität abhängig (Pritchard et al., 1995).

Zudem steuert die unterschiedliche Regulation der RAF Isoformen jeweils individuelle Funktionen der RAF-Proteine. In neuronalen Zellen ist der *epidermal growth factor* (EGF) für die Aktivierung von C-RAF zuständig, während der *nerve growth factor* (NGF) hauptsächlich B-RAF aktiviert (Kao et al., 2001; Corbit et al., 2000). In ventrikulären Kardiomyocyten aktiviert der *fibroblast growth factor* (FGF) ausschließlich C-RAF, während Endothelin-1 in der Lage ist sowohl C-RAF als auch A-RAF zu aktivieren (Bogoyevitch et al., 1995). Die Stimulation ventrikulärer Myocyten durch TPA (Phorbol- 12- Myristate- 13- Acetat) erzeugt eine anhaltende A-RAF Aktivierung, während C-RAF lediglich kurzzeitig aktiviert wird. In Zellen des Endothels wird C-RAF mit durch den FGF induziert. Dies führt zu einer Aktivierung von C-RAF durch eine Phosphorylierung an S338, während der vaskuläre EGF C-RAF durch Phosphorylierung von Y341 aktiviert (Alavi et al., 2003). Interleukin-3 aktiviert A-RAF und C-RAF durch einen individuellen Mechanismus in haematopoetischen Zellen (Sutor et al., 1999).

Die Vielzahl von Phosphorylierungsstellen bietet eine weitere Möglichkeit die RAF Moleküle unterschiedlich zu aktivieren. AKT/PKB phosphoryliert S259 in C-RAF (Zimmermann und Moelling, 1999) und die korrespondierende Stelle (S364) in B-RAF (Guan et al., 2000), was impliziert, dass beide Isoformen nach einem ähnlichen Mechanismus reguliert werden. Allerdings phosphoryliert AKT/PKB zwei weitere Phosphorylierungsstellen (S428 und T439) in B-RAF, die weder in A-RAF noch in C-RAF konserviert sind (Guan et al., 2000). B-RAF könnte also sensibler auf die

Phosphorylierung durch AKT/PKB reagieren als A-RAF und C-RAF, wenn bei schwachem Signal auch die Phosphorylierung nur einer Phosphorylierungsstelle ausreicht, oder B-RAF ist weniger sensitiv auf AKT/PKB, wenn es die Phosphorylierung aller drei Phosphorylierungsstellen benötigt. Scaffold Moleküle spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation. Scaffold Moleküle stabilisieren und koordinieren die Interaktionen zwischen den individuellen Komponenten von Signalwegen (Morrison et al., 2001; Morrison und Davis, 2003; Pouyssegur et al., 2002). Die Scaffold Moleküle KSR, CNK und SUR8 regulieren die Effizienz der Signale zwischen RAF und MEK. KSR unterstützt die Bildung eines Komplexes zwischen RAF und MEK an der Membran und rekrutiert gleichzeitig ERK (Morrison, 2001; Anselmo et al., 2002; Denouel-Galy et al., 1998). CNK bindet C-RAF und kooperiert mit RAS bei der Stimulierung der C-RAF Aktivität (Anselmo et al., 2002; Lanigan et al., 2003). SUR8 scheint schließlich einen Komplex mit C-RAF und Ras zu bilden (Li et al., 2000).

Trotz der Gemeinsamkeiten der RAF Isoformen werden diese unabhängig voneinander reguliert und durch spezifische Mechanismen aktiviert und inhibiert.

Dass B-RAF und C-RAF unterschiedlich reguliert werden, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit festgestellt. Die im cDNA Library Screen identifizierten Modulatoren der B-RAF/Mek1 Interaktion wurden auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die C-RAF/Mek1 Interaktion untersucht. Nur drei (Dbn1, Wdr91, Ube2h) der insgesamt zwölf identifizierten Aktivatoren der B-RAF Kinaseaktivität waren in der Lage die C-RAF Kinaseaktivität signifikant zu steigern. Desweiteren waren nur zwei (Pja1 und Nxph4) der insgesamt fünf identifizierten Inhibitoren der B-Raf Kinaseaktivität in der Lage eine H-RasV12 stimulierte C-RAF Aktivität zu inhibieren. Hier zeigt sich deutlich, dass C-RAF und B-RAF unterschiedlichen Regulationen unterliegen. Der Unterschied, mit dem die Modulatoren spezifisch die B-RAF Aktivität regulieren, kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen können die Modulatoren unterschiedliche Phosphorylierungsstellen ansprechen, die nur für eine Isoform charakteristisch sind. Zum anderen kann auch die Intensität des Signals oder die Rekrutierung verschiedener Scaffold Moleküle eine wichtige Rolle spielen. So werden den verschiedenen RAF-Isoformen ermöglicht unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle zu steuern.

4.6 Perspektiven

Seit ihrer Entdeckung vor mehr als 25 Jahren wurden die RAF Proteine intensiv studiert. Allerdings ist die genaue Wirkungsweise der RAF Proteine nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich sind alle drei Isoformen essentielle Mediatoren der Antwort der Zelle auf extrazelluläre Signale. Die Interaktionen der RAF Proteine mit ihren Substraten und Effektoren sind komplex und auch die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen spielen eine große Rolle.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Inhibition der B-RAF/Mek1 Interaktion *in vitro* die Phenylephrin induzierte Hypertrophie in Kardiomyocyten inhibieren kann. Gleiches gilt für Rcn1, dem hier identifizierten Inhibitor der B-RAF und C-RAF Kinaseaktivität. Eine direkte Interaktion von Rcn1 mit RAF konnte nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist der Mechanismus der Rcn1 Inhibition interessant für künftige Studien. Die Ko-Immunpräzipitation von Rcn1 war nicht erfolgreich. Das Problem der Löslichkeit von Membranproteinen ließe sich dabei voraussichtlich durch die Verwendung anderer Puffer umgehen. Zudem kann mit Hilfe einer immunocytochemischen Färbung eine Ko-Lokalisation von Rcn1 und RAF untersucht werden. Mittels SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) kann in einer Massenspektrometeranalyse nach Interaktionspartnern von Rcn1 gesucht werden.

Ungeachtet der Mechanismen, mit denen Rcn1 in der Lage ist sowohl B-RAF als auch C-RAF potent zu inhibieren, stellt sich die Frage nach der Wirkungsweise von Rcn1 im Organismus. Um dies zu untersuchen, kann für kommende Studien ein Mausmodell gewählt werden. Eine herzspezifische Überexpression von Rcn1 kann zu einer verbesserten Resistenz der Herzen gegenüber hypertrophen Stimuli führen. Die Rcn1 Region der Maus wird in der sogenannten Small Eye Harwell (Sey^H) Mutante deletiert. Die frühe Letalität der Tiere nach E15.5 basiert wahrscheinlich auf dem Verlust von Rcn1 in den homozygoten Tieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein *Knockout* von Rcn1 ebenfalls letal sein wird. Daher kann ein konditioneller, herzspezifischer *Knockout* von Rcn1 zu weiteren Erkenntnissen über die Rolle von Rcn1 in der kardialen Hypertrophie führen. Da die MAPK-Signaltransduktion über die kardiale Bedeutung hinaus eine wichtige Rolle bei vielen grundlegenden zellulären Prozessen spielt, kann Rcn1 auch bei der Entstehung von Tumoren oder Erkrankungen des zentralen Nervensystems von Bedeutung sein.

Über die Identifizierung neuer Interaktionspartner können Rückschlüsse auf die Funktion und die Wirkungsweise von Proteinen geschlossen werden. Der hier entwickelte cDNA Library Screen kann verwendet werden, um weitere Modulatoren der RAF/MEK Interaktion zu identifizieren. Die

C-RAF und B-RAF Konstrukte liegen vor, es empfiehlt sich allerdings auch A-RAF zu untersuchen. Nur so kann ein genaueres Bild der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der RAF Moleküle dargestellt werden. Zusätzlich lassen sich potentielle Kinasen und Phosphatasen, die im Signalweg eine Rolle spielen, möglicherweise durch die Verwendung von Kinase- beziehungsweise Phosphatase-Inhibitoren genauer untersuchen. Es ist zudem interessant weitere der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Modulatoren genauer auf ihre Wirkungsweise in der kardialen Hypertrophie zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die MAPK Signalkaskade wird durch Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Stress-Stimuli aktiviert und reguliert anschließend die Antwort der Zelle auf diese extrazellulären Signale. So ist die Signalkaskade an fundamentalen Funktionen der Zelle, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Überleben beteiligt. Genau durch diese zentrale Rolle in der Signaltransduktion können Störungen der MAPK Signalkaskade eine verheerende Auswirkung auf die Zelle und ihren Organismus haben. Die Proteine der MAPK Signalkaskade wurden bereits mit vielen Krankheiten wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und Herzinsuffizienz in direkten Zusammenhang gebracht. Daher ist sie als direktes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapien enorm interessant.

Die konstitutive Aktivierung der MAPK Signalkaskade im Herzen führt zu kardialer Hypertrophie mit anschließender Herzinsuffizienz (Sugden und Clerk 1998; Lips et al., 2003; Bueno et al., 2000). In diesem Zusammenhang lag der Fokus der bisherigen Untersuchungen anderer Gruppen auf C-RAF. Eine Vielzahl vorangegangener Studien weist aber darauf hin, dass B-RAF ebenfalls von großer Bedeutung sein könnte und eventuell die wichtigste MEK Kinase darstellt (Jaiswal et al., 1994; Catling et al., 1994; Wojnowski et al., 2000; Pritchard et al., 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass B-RAF in der Regulation kardialer Hypertrophie eine Rolle spielt. Um dies zu ermitteln, wurde im Modell kultivierter neonataler Kardiomyocyten der Ratte, die Zellgröße planimetrisch untersucht. Die Zellen wurden dabei mittels Phenylephrin zur Hypertrophie angeregt. Die B-Raf Aktivität wurde durch den kommerziell erhältlichen Inhibitor SB590885 inhibiert. Zellen, die simultan mit Phenylephrin und dem Inhibitor SB590885 behandelt wurden, entwickelten keine zelluläre Hypertrophie der neonatalen Kardiomyocyten.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibition von B-Raf, in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte, zu einer signifikanten Reduktion der Mek1/2 Phosphorylierung führt. Dies wurde sowohl in den unstimulierten Kardiomyocyten, als auch in den durch Phenylephrin stimulierten Kardiomyocyten sichtbar. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass es sich bei B-RAF um die RAF-Isoform handelt, die für die Signalweiterleitung an MEK verantwortlich ist. Dies geschieht entweder direkt oder mittelbar durch die Rekrutierung von C-RAF. Die Signalübertragung von B-RAF zu MEK stellt eine wichtige Schlüsselstelle der MAPK Signalkaskade dar. Daher wurde innerhalb der vorliegenden Studie nach bisher unbekanntem Proteinen gesucht,

die Modulatoren der Signalübertragung von B-RAF zu MEK sind. Hierzu wurde unter Verwendung einer cDNA Library in einem genomweiten Ansatz ein Luciferase Reporterassay etabliert. Es wurden 19 einzelne cDNAs identifiziert, die in der Lage waren die Interaktion von B-RAF/Mek1 zu modulieren.

Um darüber hinaus zu ermitteln, ob einige der identifizierten cDNA Klone in der Hypertrophieentstehung eine Rolle spielen, wurde die Genexpression im hypertrophen Myokard untersucht. Dazu wurde bei Mäusen, durch einen operativen Eingriff, eine permanente Verengung der Aorta (TAC) vorgenommen. Dies löst eine konzentrische Hypertrophie mit nachfolgender Herzinsuffizienz aus. Als Kontrolle fungierten nach gleichem Prinzip operierte Mäuse (Sham), bei denen keine Intervention der Aorta erfolgte. Die Validität der Proben wurde durch die Untersuchung gängiger Marker der Hypertrophie bestätigt. Dabei stellte sich heraus, dass einige Modulatoren keine signifikante Regulation zeigten (Ddx46 und Zfand2a). Diese Modulatoren wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die mRNA Expression von Ankr13a und Wdr92 hingegen war in den TAC operierten Tieren signifikant reduziert. Damit könnten diese Proteine physiologische Gegenregulationsmechanismen steuern. Sie wurden jedoch aufgrund ihrer potentiell komplexen Wirkung nicht näher untersucht. Die mRNA Expression von G3BP1, Pkm2 und Rcn1 war den TAC operierten Tieren signifikant erhöht. Es empfiehlt sich daher diese Modulatoren in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

Der innerhalb dieser Studien identifizierte Inhibitor Rcn1, der B-RAF/Mek1 Interaktion, wurde nach der Identifikation in weiteren Analysen und Experimenten genauer charakterisiert. Bei Reticulocalbin 1 (Rcn1) handelt es sich um ein 45 kDA großes Protein, das im Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Die mRNA Expression von Rcn1 war in allen untersuchten Organen der Maus nachweisbar, allerdings wies die Leber ein sehr niedriges Expressionsniveau auf. Besonders hoch war die mRNA Expression im Skelettmuskel. Lunge, Milz und Herz zeigten ebenfalls eine überdurchschnittliche Expression der Rcn1 mRNA. Die Rcn1 Expression ist in der kardialen Hypertrophie sowohl in Mensch als auch in Maus signifikant erhöht.

Innerhalb der vorliegenden Untersuchungen konnte Rcn1 erstmals als Regulator der kardialen Hypertrophie identifiziert werden. Rcn1 ist in der Lage die Phenylephrin induzierte Hypertrophie *in vitro* vollständig zu inhibieren und sowohl die B-RAF als auch die C-RAF Kinaseaktivität potent zu inhibieren. Neonatale Kardiomyocyten, die Rcn1 überexprimieren, entzogen sich ebenso wie die B-RAF inhibierte Zellen der Phenylephrin induzierten Hypertrophie vollständig. Die Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der Mek1/2 Phosphorylierung. Nach der zuvor beschriebenen Studie der Überexpression von Rcn1 in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte, wurde die Wirkung

eines *Knockdowns* von Rcn1 untersucht. Der *Knockdown* von Rcn1 führte dabei zu einer erhöhten Mek1/2 Phosphorylierung in den neonatalen Kardiomyocyten der Ratte. Dieses Ergebnis wurde sowohl mittels Western-Blot Analyse als auch im Luciferase Reporterassay bestätigt. Die Untersuchung ergab zudem, dass der *Knockdown* von zu einem hypertrophen Wachstum der Kardiomyocyten führte. Die Expression von Rcn1 scheint in den neonatalen Kardiomyocyten notwendig zu sein, um das hypertrophe Wachstum der Zellen zu inhibieren

Um zu ermitteln an welcher Stelle Rcn1 inhibierend in die MAPK Signalkaskade eingreift, wurde ein Ras Aktivierungs-Assay durchgeführt. Adulte Kardiomyocyten der Ratte wurden dazu direkt nach der Isolation mit ansteigenden Ad-Rcn1 Virusmengen infiziert. Diese Versuchsreihe zeigte, dass die Rcn1 Überexpression keinen Einfluss auf die Ras-Aktivität der Kardiomyocyten besitzt, da die Ras-Aktivität in allen Proben annähernd gleich war.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob es sich bei Rcn1 um einen spezifischen Inhibitor von B-RAF handelt. Da C-RAF basal über keine Kinaseaktivität verfügt, konnte eine Inhibition nur mit Hilfe einer konstitutiv aktiven C-RAF-Mutante getestet werden. In diesem Experiment wurde festgestellt, dass es sich bei Rcn1 nicht um einen B-RAF spezifischen Inhibitor handelt. Vielmehr ist Rcn1 offenbar ebenfalls in der Lage die konstitutiv aktive CRAF-BXB Mutante dosisabhängig zu inhibieren.

Um zu ermitteln ob die identifizierten Modulatoren der RAF/MEK Interaktion spezifisch für B-RAF sind, wurde der Luciferase Reporterassay erneut mit C-RAF durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass nur ein kleiner Anteil der identifizierten Modulatoren eine ähnliche Wirkung auf C-RAF besitzt. Die meisten der identifizierten B-RAF Aktivatoren hatten keine Wirkung auf C-RAF. Nur drei der insgesamt zwölf identifizierten Aktivatoren (Dbn1, Wdr91 und Ube2h) führten zu einer signifikanten Steigerung der CRAF/Mek1 Interaktion. Der Test der Inhibitoren zeigte, dass zwei der fünf identifizierten Inhibitoren (Pja1 und Nxph4) in der Lage sind, die durch H-RasV12 stimulierte Aktivierung von C-RAF zu inhibieren. Trotz der vorhandenen Gemeinsamkeiten der RAF Isoformen werden diese auch unabhängig voneinander reguliert und durch spezifische Mechanismen aktiviert beziehungsweise inhibiert.

6 Literaturverzeichnis

Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R (2000). Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension*. 36(1):48-53.

Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA (2003). Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science*. 301(5629):94-6.

Anselmo AN, Bumeister R, Thomas JM, White MA (2002). Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *J Biol Chem*. 277(8):5940-3.

Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. 56:127-55.

Bandyopadhyay S, Chiang C, Srivastava J, Gersten M, White S, Bell R, Kurschner C, Martin CH, Smoot M, Sahasrabudhe S, Barber DL, Chanda SK, Ideker T (2010). A human MAP kinase interactome. *Nature Methods* 7, 801–805.

Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL (2007). Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293(1):C218-27.

Barbacid M (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem*. 56: 779-827.

Barnes CJ, Li F, Mandal M, Yang Z, Sahin AA, Kumar R (2002). Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res*. 62(5):1251-5.

Barnier JV, Papin C, Eychène A, Lecoq O, Calothy G (1995). The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem*. 270(40):23381-9.

Bogoyevitch MA, Marshall CJ, Sugden PH (1995). Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 270(44):26303-10.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkenin JD (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 19(23):6341-50.

- Bueno OF, Molkentin JD (2002).** Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 91(9):776-81.
- Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, Thaik CM, Colucci WS (1995).** Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation.* 92(9):2385-90.
- Campbell SE, Korecky B, Rakusan K (1991).** Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res.* 68(4):984-96.
- Campbell SE, Rakusan K, Gerdes AM (1989).** Change in cardiac myocyte size distribution in aortic-constricted neonatal rats. *Basic Res Cardiol.* 84:247-258.
- Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U (1977).** Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 115(3):465-83.
- Carper D, John M, Chen Z, Subramanian S, Wang R, Ma W, Spector A (2001).** Gene expression analysis of an H₂O₂-resistant lens epithelial cell line. *Free Radic Biol Med.* 31(1):90-7.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975).** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666–70.
- Catling AD, Reuter CW, Cox ME, Parsons SJ, Webers MJ. (1994).** Partial Purification of a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Activator from Bovine Brain. *J Biol Chem* 269. 30014-30021.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ (1995).** Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science.* 269(5223):529-31.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976).** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 127: 1550-1557.
- Chong H, Lee J, Guan KL. (2001).** Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J.* 20(14): 3716–3727.
- Chow YH, Pumiglia K, Jun TH, Dent P, Sturgill TW, Jove R (1995).** Functional mapping of the N-terminal regulatory domain in the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem.* 270(23):14100-6.

Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, Campbell SL (1997). 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem.* 272(34):20990-3.

Cooper CR, Graves B, Pruitt F, Chaib H, Lynch JE, Cox AK, Sequeria L, van Golen KL, Evans A, Czymmek K, Bullard RS, Donald CD, Sol-Church K, Gendernalik JD, Weksler B, Farach-Carson MC, Macoska JA, Sikes RA, Pienta KJ (2008). Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF-alpha. *J Cell Biochem.* 104(6):2298-309.

Corbit KC, Soh JW, Yoshida K, Eves EM, Weinstein IB, Rosner MR (2000). Different protein kinase C isoforms determine growth factor specificity in neuronal cells. *Mol Cell Biol.* 20(15):5392-403.

Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2000). The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, 21, 1104–1115.

Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* 95: 957-970.

Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, Sakkinen P, Popper JS, Yano K, Tracy RP (2003). C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthy men. *Circulation.* 107(15):2016-20.

Dalbadie-McFarland G, Abelson J (1990). PRP5: a helicase-like protein required for mRNA splicing in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(11):4236-40.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 350(14):1387-97.

Dao Y, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS (2001). Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol.* 37: 379-85.

Decker RS und Wildenthal K (1980). Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol.* 98: 425-444.

Denouel-Galy A, Douville EM, Warne PH, Papin C, Laugier D, Calothy G, Downward J, Eychène A (1998). Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol.* 8(1):46-55.

Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol.* 22(10):3237-46.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.

Downward J (1996). Control of Ras activation. *Cancer Surv.* 27: 87-100.

Dumaz N, Light Y, Marais R (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol.* 22(11):3717-28.

Dumaz N, Marais R (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem.* 278(32):29819-23.

Dunn Jr WA (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* 110: 1923-33.

Eichbaum FW (1975). 'Wavy' myocardial fibers in spontaneous and experimental adrenergic cardiopathies. *Cardiology.* 60(6):358-65.

Emuss V, Garnett M, Mason C, Marais R (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res.* 65(21):9719-26.

Esteban LM, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salgzero P, Fernandez-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, McKay R, Ward JM, Pellicar A, Santos E (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol.* 21: 1444-1452.

Fabian JR, Daar IO, Morrison DK (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol.* 13(11):7170-9.

Fields S, Song O (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340(6230):245-6.

French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD (2002). The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J.* 34(5):223-31.

Garnett MJ, Marais R (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 6(4):313-9.

Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R (2005). Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell*. 20(6):963-9.

Gerdes AM, Campbell SE, Hilbelink DR (1988). Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest*. 59(6):857-61.

Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004). Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem*. 279(39):40827-34.

Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 78(6):954-61.

Goicoechea S, Orr AW, Pallero MA, Eggleton P, Murphy-Ullrich JE (2000). Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem*. 275(46):36358-68.

Götz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W (1998). Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(21):12370-5.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36: 59-72.

Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, Zhu T, Taylor J, Barber TD, Vojtek AB (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem*. 275(35):27354-9.

Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 281: 29776-29787.

Hanahan D (1983). Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166: 557-580.

Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, Glembotski CC (1994). Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 269(42):26227-33.

Hannan RD, Rothblum LI (1995). Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 30(4):501-10.

He L, Hannon GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. In: *Nat. Rev. Genet.* 5(7):522-531.

Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 140(2):209-21.

Heizman C, Hunziker W (1991). Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem. Science.* 16(3):98-103.

Hekman M, Wiese S, Metz R, Albert S, Troppmair J, Nickel J, Sendtner M, Rapp UR (2004). Dynamic Changes in C-Raf Phosphorylation and 14-3-3 Protein Binding in Response to Growth Factor Stimulation. Differential Roles Of 14-3-3 Protein Binding Sites. *J Biol Chem* 279, 1407-14086.

Honoré B, Madsen P, Andersen AH, Leffers H (1993). Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett.* 330(2):151-5.

Honoré B, Vorum H (2000). The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett.* 466(1):11-8.

Hseu MJ, Yen CH, Tzeng MC (1999). Crocalbin: a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2. *FEBS Lett.* 445(2-3):440-4.

Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y (2001). Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol.* 9(4):265-74.

Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR (1995). Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem.* 270: 23173–78.

Hunziker W (1986). The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure. *Proc Natl Acad Sci.* 83(20):7578-82.

Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R, Pritchard C (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J.* 20(8):1940-51.
hypertrophy. *J Biol Chem.* 268: 2244–49.

Imai T, Matsuda K, Shimojima T, Hashimoto T, Masuhiro Y, Kitamoto T, Sugita A, Suzuki K, Matsumoto H, Masushige S, Nogi Y, Muramatsu M, Handa H, Kato S (1997). ERC-55, a binding protein for the papilloma virus E6 oncoprotein, specifically interacts with vitamin D receptor among nuclear receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 233(3):765-9.

Ishikawa R, Hayashi K, Shirao T, Xue Y, Takagi T, Sasaki Y, Kohama K (1994). Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *J Biol Chem* 269:29928 –29933.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(2):339-43.

Jaiswal RK, Moodie SA, Wolfman A, Landreth GE (1994). The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol.* 14(10): 6944-6953

Jaumot M, Hancock JF (2001). Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene.* 20(30):3949-58.

Jin X, Yue S, Wells KS, Singer VL (1994). SYBR Green I: a new fluorescent dye optimized for detection of picogram amounts of DNA in gels. *Biophys J.* 66: A159.

Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* 11: 2468-2481.

Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 11(3):122-9.

Jones RG, Thompson CB (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23(5):537-48.

Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 276(21):18169-77.

Kent J, Lee M, Schedl A, Boyle S, Fantes J, Powell M, Rushmere N, Abbott C, van Heyningen V, Bickmore WA (1997). The reticulocalbin gene maps to the WAGR region in human and to the Small eye Harwell deletion in mouse. *Genomics.* 42(2):260-7.

Kim MM, Wiederschain D, Kennedy D, Hansen E, Yuan ZM (2007). Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene*. 26(29):4209-15.

King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*. 1998 396(6707):180-3.

King AJ, Wireman RS, Hamilton M, Marshall MS. (2001). Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src. *FEBS Lett*. 497(1):6-14.

King AJ, Patrick DR, Batorsky RS, Ho ML, Do HT, Zhang SY, Kumar R, Rusnak DW, Takle AK, Wilson DM, Hugger E, Wang L, Karreth F, Loughheed JC, Lee J, Chau D, Stout TJ, May EW, Rominger CM, Schaber MD, Luo L, Lakdawala AS, Adams JL, Contractor RG, Smalley KS, Herlyn M, Morrissey MM, Tuveson DA, Huang PS (2006). Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res*. 66(23):11100-5.

Kirby KS (1956). A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem J*. 66: 495-504.

Klein RM, Schwartzkopff B, Gabbert HE, Strauer BE (2003). Diminished coronary reserve in patients with biopsy-proven inflammatory infiltrates. *Cardiology*. 100(3):120-8.

Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF (1999). Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene*. 18: 2055-2068.

Kobayashi M, Aita N, Hayashi S, Okada K, Ohta T, Hirose S (1998). DNA supercoiling factor localizes to puffs on polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 18(11):6737-44.

Koera K; Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene*. 15: 1151-1159.

Koivu T, Laitinen S, Riento K, Olkkonen VM (1997). Sequence of a human cDNA encoding Cab45, a Ca²⁺-binding protein with six EF-hand motifs. *DNA Seq*. 7(3-4):217-20.

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):827-37.

König S, Guibert B, Morice C, Vernier P, Barnier JV (2001). Phosphorylation by PKA of a site unique to B-Raf kinase. *C R Acad Sci III.* 324(8):673-81.

Kurabayashi M, Komuro I, Tsuchimochi H, Takaku F, Yazaki Y (1988). Molecular cloning and characterization of human atrial and ventricular myosin alkali light chain cDNA clones. *J Biol Chem.* 263(27):13930-6.

La Greca N, Hibbs AR, Riffkin C, Foley M, Tilley L (1997). Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 89(2):283-93.

Lämmler UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Langendorff O (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 61: 291–332.

Lanigan TM, Liu A, Huang YZ, Mei L, Margolis B, Guan KL (2003). Human homologue of *Drosophila* CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *FASEB J.* 17(14):2048-60.

Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunmon P, Yuan D, Chien KR (1988). α_1 -Adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. *J Biol Chem.* 263:7352-7358.

Leon J, Guerrero I, Pellicer A (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol.* 7: 1535-1540.

Li W, Han M, Guan KL (2000). The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes Dev.* 14(8):895-900.

Liang XQ, Cao EH, Zhang Y, Qin JF (2004). A P53 target gene, PIG11, contributes to chemosensitivity of cells to arsenic trioxide. *FEBS Lett.* 569(1-3):94-8.

Light Y, Paterson H, Marais R. (2002). 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol.* 22(14):4984-96.

Linder P (2006). Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34(15): 4168–4180.

Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J.* 24(10):883-96.

Liu L, Zhao SP (1999). The changes of circulating tumor necrosis factor levels in patients with congestive heart failure influenced by therapy. *Int J Cardiol* 69: 77–82.

Liu Y, Zheng J, Fang W, You J, Wang J, Cui X, Wu B (2001). Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic. *Chin Med J (Engl).* 114(1):35-8.

Liu Z, Brattain MG, Appert H (1997). Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(2):283-9.

Loh S, Cram D, Skurray R (1989). Nucleotide sequence of the leading region adjacent to the origin of transfer on plasmid F and its conservation among conjugative plasmids. *Mol Gen Genet.* 219(1-2):177-86.

Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ (2008). A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15, 75 – 83.

Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11364-9.

Luckett JC, Hüser MB, Giagtzoglou N, Brown JE, Pritchard CA (2000). Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 11(3):163-71.

MacNicol MC, Muslin AJ, MacNicol AM. (2000). Disruption of the 14-3-3 binding site within the B-Raf kinase domain uncouples catalytic activity from PC12 cell differentiation. *J Biol Chem.* 275(6):3803-9.

Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(1):86-9.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 14(13):3136-45.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf and B-Raf by oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *JBC.* 272: 4378-4383.

Marais R, Marshall CJ (1996). Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* 27:101-25.

Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G (1999). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins. *Infect Immun.* 67(2):688-93.

Markou T, Hadzopoulou-Cladaras M, Lazou A (2004). Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 37(5):1001-11.

Marmur J (1960). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol.* 3: 208-218.

Marsh NA (1979). Langendorff and the perfused heart. *J Physiol.* 291: 3P-4P.

Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80(2):179-85.

Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 18(8):2137-48.

Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature.* 427: 256-260.

May P, May E (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 18(53):7621-36.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol.* 15(4):300-8.

McDermott PJ, Morgan HE (1989). Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res.* 64(3):542-53.

McElwee MK, Song MO, Freedman JH (2009). Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *J Mol Biol.* 393(5):1013-21.

Mercer K, Chiloeches A, Hüser M, Kiernan M, Marais R, Pritchard C (2002). ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene.* 21(3):347-55.

- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, R uth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M (2001).** Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J.* 20(8):1952-62.
- Mischak H, Seitz T, Janosch P, Eulitz M, Steen H, Schellerer M, Philipp A, Kolch W (1996).** Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol.* 16(10):5409-18.
- Mishra L, Tully RE, Monga SP, Yu P, Cai T, Makalowski W, Mezey E, Pavan WJ, Mishra B (1997)** Praja1, a novel gene encoding a RING-H2 motif in mouse development. *Oncogene.* 15(19):2361-8.
- Missler M, Hammer RE, S udhof TC (1998).** Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *J Biol Chem.* 273(52):34716-23.
- Mockrin SC, Korn ED (1980).** Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry.* 19(23):5359-62.
- Moodie SA, Paris MJ, Kolch W, Wolfman A (1994).** Association of MEK1 with p21ras.GMPPNP is dependent on B-Raf. *Mol Cell Biol.* 14(11): 7153–7162.
- Morgan JM, Cunningham D, Rowland E (1992).** Dispersion of monophasic action potential duration: demonstrable in humans after premature ventricular extrastimulation but not in steady state. *J Am Coll Cardiol.* 19(6):1244-53.
- Morrison DK (2001).** KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci.* 114(Pt 9):1609-12.
- Morrison DK, Davis RJ (2003).** Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:91-118.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998).** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 24: 954-958, 960, 962.
- Moustafa-Bayoumi M, Alhaj MA, El-Sayed O, Wisel S, Chotani MA, Abouelnaga ZA, Hassona MD, Rigatto K, Morris M, Nuovo G, Zweier JL, Goldschmidt-Clermont P, Hassanain H (2007).** Vascular hypertrophy and hypertension caused by transgenic overexpression of profilin 1. *J Biol Chem.* 282(52):37632-9.
- Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH (2003).** Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res.* 63(14):4181-7.

Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL (2004). Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 110(2):155-62.

Niebauer J, Pflaum CD, Clark AL, Strasburger CJ, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJS, Anker SD (1998). Deficient insulin-like growth factor 1 in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol* 32: 393–7.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*. 10(1):1-6.

Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wicczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 38(3):294-6.

Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, Finke U, Hentsch S, Moyer MP, Hoffmann I, Müller O (2000). Seven genes that are differentially transcribed in colorectal tumor cell lines. *Cancer Lett*. 160(1):37-43.

Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt CE (1999). X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol*. 294(5):1271-85.

Nyberg-Hoffman C, Aguilar-Cordova E (1999). Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med*. 5: 955-957.

Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C (2005). Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol Hum Reprod*. 11(1):53-64.

Ohta T, Kobayashi M, Hirose S (1995). Cloning of a cDNA for DNA supercoiling factor reveals a distinctive Ca(2+)-binding protein. *J Biol Chem*. 270(26):15571-5.

Olson EN, Schneider MD (2003). Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev*. 17(16):1937-56.

Oren M (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 274(51):36031-4.

Ozawa M (1995). Cloning of a human homologue of mouse reticulocalbin reveals conservation of structural domains in the novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs. *J Biochem*. 117(5):1113-9.

Ozawa M (1995). Structure of the gene encoding mouse reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum-resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs. *J Biochem.* 118(1):154-60.

Ozawa M, Muramatsu T (1993). Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem.* 268(1):699-705.

Pantaloni D, Carlier MF (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75(5):1007-14.

Papin C, Denouel A, Calothy G, Eychène A. (1996). Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene.* 12(10):2213-21.

Pierpont EI, Pierpont ME, Mendelsohn NJ, Roberts AE, Tworog-Dube E, Rauén KA, Seidenberg MS (2010). Effects of germline mutations in the Ras/MAPK signaling pathway on adaptive behavior: cardiofaciocutaneous syndrome and Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 152A(3):591-600.

Polet D, Lambrechts A, Vandepoele K, Vandekerckhove J, Ampe C (2007). On the origin and evolution of vertebrate and viral profilins. *FEBS Lett.* 581(2):211-7.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 389(6648):300-5.

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 64: 755-763.

Pring M, Weber A, Bubb MR (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry.* 31(6):1827-36.

Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol.* 6(5):614-7.

Pritchard CA, Hayes L, Wojnowski L, Zimmer A, Marais RM, Norman JC. (2004). B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 24(13):5937-52.

Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 15: 6430-6442.

Rawlings DJ, Kaslow DC (1992). A novel 40-kDa membrane-associated EF-hand calcium-binding protein in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 267(6):3976-82.

Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 22: 395-403.

Robbins DJ, Zhen E, Cheng M, Xu S, Ebert D, Cobb MH (1994). MAP kinases ERK1 and ERK2: pleiotropic enzymes in a ubiquitous signaling network. *Adv Cancer Res.* 63:93-116.

Robinson MJ, Cobb MH (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):180-6.

Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1997). Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling. *Am J Physiol.* 272(4 Pt 2):H1553-9.

Rogers JH (1989). Immunoreactivity for calretinin and other calcium-binding proteins in cerebellum. *Neuroscience.* 31(3):711-21.

Rommel C, Radziwill G, Lovrić J, Noeldeke J, Heinicke T, Jones D, Aitken A, Moelling K (1996). Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene.* 12(3):609-19.

Rothkegel M, Mayboroda O, Rohde M, Wucherpennig C, Valenta R, Jockusch BM (1996). Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci.* 109 (Pt 1):83-90.

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature.* 6;335(6190):563-4.

Saeki M, Irie Y, Ni L, Yoshida M, Itsuki Y, Kamisaki Y (2006). Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun.* 342(2):568-72.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis K, Erlich HA (1985). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.

Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1996). Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol.* 133(2):257-68.

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. viral multiplication in stable strain of human malignant epithelial cells derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Ex Med.* 97: 695-710.

Schwartz F, Neve R, Eisenman R, Gessler M, Bruns G (1994). A WAGR region gene between PAX-6 and FSHB expressed in fetal brain. *Hum Genet.* 94(6):658-64.

Seidman JG, Seidman C (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell.* 104(4):557-67.

Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL (1996). Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 2: 243–9.

Shan K, Kurrelmeyer K, Seta Y, Wang F, Dibbs Z, Deswal A, Lee-Jackson D, Mann DL (1997). The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 12: 218–23.

Sharrocks AD (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 827-837.

Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitauro Y, Isomura T, Suma H (2001). Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 65: 965-968.

Shirao T, Obata K (1985) Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J Neurochem* 44:1210 –1216.

Sidovar MF, Kozlowski P, Lee JW, Collins MA, He Y, Graves LM (2000). Phosphorylation of serine 43 is not required for inhibition of c-Raf kinase by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275(37):28688-94.

Sieburth DS, Sun Q, Han M (1998). SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell.* 94(1):119-30.

Singer VL, Jin X, Ryan D, Yue S (1994). SYBR Green dyes: ultrasensitive stains for detection of DNA and RNA in electrophoretic gels. *Biomed Products.* 19: 86-72.

Smith SH, Bishop SP (1985). Regional myocyte size in compensated right ventricular hypertrophy in the ferret. *J Mol Cell Cardiol.* 17(10):1005-11.

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Science.* 24 (5): 181–5.

Song L, DePalma SR, Kharlap M, Zenovich AG, Cirino A, Mitchell R, McDonough B, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG, Ho CY (2006). Novel locus for an inherited cardiomyopathy maps to chromosome 7. *Circulation.* 113(18):2186-92.

Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*. 5(3):345-51.

Strynadka NC, James MN (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem*. 58:951-98.

Sugden PH, Clerk A (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 76(11):725-46.

Sugden PH, Fuller SJ (1991). Correlations between cardiac protein synthesis rates, intracellular pH and the concentrations of creatine metabolites. *Biochem J*. 273(Pt 2):339-46.

Sutor SL, Vroman BT, Armstrong EA, Abraham RT, Karnitz LM (1999). A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. *J Biol Chem*. 274(11):7002-10.

Thorburn A, Thorburn J, Chen SY, Powers S, Shubeita HE, Feramisco JR, Chien KR (1993). H-Ras dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 268(3):2244-9.

Tilbrook PA, Colley SM, McCarthy DJ, Marais R, Klinken SP (2001). Erythropoietin-stimulated Raf-1 tyrosine phosphorylation is associated with the tyrosine kinase Lyn in J2E erythroleukemic cells. *Arch Biochem Biophys*. 396(1):128-32.

Tilney LG, Bonder EM, Coluccio LM, Mooseker MS (1983). Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol*. 97(1):112-24.

Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F (1997). Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal*. 9(2):153-8.

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL (1996). Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93: 704-11.

Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, Koide S, Yuasa K, Nagahama M, Matsuda Y (2006). A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *Biochem J*. 396(1):51-9.

Tzivion G, Avruch J (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*. 277(5):3061-4.

Tzivion G, Luo Z, Avruch J (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*. 394(6688):88-92.

van Bilsen M, Chien KR (1993). Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res*. 27(7):1140-9.

Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, Christofk HR, Wagner G, Rabinowitz JD, Asara JM, Cantley LC (2010). Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science*. 329(5998):1492-9.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature*. 408(6810):307-10.

von Heijne G (1981). On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur J Biochem*. 116(2):419-22.

Vorum H, Hager H, Christensen BM, Nielsen S, Honoré B (1999). Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res*. 248(2):473-81.

Vorum H, Liu X, Madsen P, Rasmussen HH, Honoré B (1998). Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its Ca²⁺-binding activity. *Biochim Biophys Acta*. 1386(1):121-31.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 116(6):855-67.

Wang Q, Zhu X, Xu Q, Ding X, Chen YE, Song Q (2005). Effect of C-reactive protein on gene expression in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288(4):H1539-45.

Weber CK, Slupsky JR, Herrmann C, Schuler M, Rapp UR, Block C (2000). Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene*. 19(2):169-76.

Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ (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):61-8.

Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G, Dunn MJ (1999). Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*. 20(4-5):898-906.

- Weis K, Griffiths G, Lamond AI (1994).** The endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa is a novel EF-hand protein retained in the endoplasmic reticulum by a carboxyl-terminal His-Asp-Glu-Leu motif. *J Biol Chem.* 269(29):19142-50.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004).** The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):875-85.
- Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM (2004).** Human De-etioloated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science.* 303(5662):1371-4.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF (1998).** Multiple parameter cross-species protein identification using Multident--a world-wide web accessible tool. *Electrophoresis* 19,1501–1505.
- Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y (2003).** C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(1):61-6.
- Willis MS, Patterson C (2006).** Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system. *J Mol Cell Cardiol.* 41(4):567-79.
- Wittinghofer A, Nassar N (1996).** How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci.* 21(12):488-91.
- Wojnowski L, Stancato LF, Larner AC, Rapp UR, Zimmer A (2000).** Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* 91(1-2):97-104.
- Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A (1997).** Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet.* 16(3):293-7.
- Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M (1997).** Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol.* 17(9):5598-611.
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW (1993).** Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science.* 262, 1065-1069.
- Xiao G, Chung TF, Fine RE, Johnson RJ (1999).** Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment. *J Neurosci Res.* 58(5):652-62.

Yabe D, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K, Honjo T (1997). Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem.* 272(29):18232-9.

Yabe D, Taniwaki M, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K, Honjo T (1998). Human calumenin gene (CALU): cDNA isolation and chromosomal mapping to 7q32. *Genomics.* 49(2):331-3.

Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotsu S, Asahi M, Taniike M, Nakai A, Tsujimoto I, Matsumura Y, Miyazaki J, Chien KR, Matsuzawa A, Sadamitsu C, Ichijo H, Baccarini M, Hori M, Otsu K (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest.* 114(7):937-43.

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y (1998). Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal.* 10: 693-698.

Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J.* 351(Pt 1):151-9.

Yu LR, Zeng R, Shao XX, Wang N, Xu YH, Xia QC (2000). Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis.* 21(14):3058-68.

Zekri L, Chebli K, Tourrière H, Nielsen FC, Hansen TV, Rami A, Tazi J (2005). Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol Cell Biol.* 25(19):8703-16.

Zhang BH, Guan KL (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J.* 19(20):5429-39.

Zhong W, Mao S, Tobis S, Angelis E, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, de Alborán IM, MacLellan WR (2006). Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway. *EMBO J.* 25(16):3869-79.

Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, Le V, Levine B, Rothermel BA, Hill JA (2007). Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest.* 117: 1782-1793.

Zimmer HG (1997). Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *J Mol Med.* 75(11-12):849-59.

Zimmermann S, Moelling K (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science.* 286(5445):1741-4.

Zolk O, Frohme M, Maurer A, Kluxen FW, Hentsch B, Zubakov D, Hoheisel JD, Zucker IH, Pepe S, Eschenhagen T (2002). Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(5):1377-82.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Gerd Hasenfuss für die Möglichkeit in seiner Abteilung arbeiten zu dürfen. Seine konstruktive Kritik und die Einblicke in eine große und aufstrebende Arbeitsgruppe sind von sehr großem Wert für mich.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Brück und Herrn Professor Dr. Uwe Groß danke ich für die Betreuung meiner Promotion. Ohne ihre Bereitschaft zur Betreuung und den Mühen im Zusammenhang mit organisatorischen Fragen wäre diese Promotion nicht möglich gewesen.

Bei Dr. Tim Seidler bedanke ich mich ganz besonders für die Idee zu dieser Promotion. Sein Vertrauen in meine Arbeitsweise und die Freiheiten eigene Ideen einzubringen haben mich in meiner Arbeit bestärkt. Sein ausdauernder und ehrgeiziger Einsatz für die Forschung beeindruckt mich sehr.

Dr. Karl Toischer danke ich herzlich für die Generierung des operativen Mausmodels. Dr. Samuel Sossalla danke ich für die Überlassung der humanen Proben aus Myokardbiopsien und Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke für die Vorarbeiten mit der cDNA Library.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Kollegen aus dem Labor: Conny, Jessica, Karina, Sebastian, Simon, Theda, Gudrun, Josee und Moritz für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung. Besonders Gudrun und Karina danke ich an dieser Stelle nochmals für ihre Unterstützung mit den Kardiomyocyten und bei der Zellkulturarbeit. Auch meinen Kollegen aus dem Stammzelllabor danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit. Sandra danke ich für das ausdauernde Korrekturlesen und die Kompensation meiner Komma-Schwäche.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie. Meinem Mann Samuel danke ich für die ausdauernden Ermutigungen, sein uneingeschränktes Vertrauen in meine Arbeit und die Unterstützung besonders durch die sorgfältige Korrektur des Manuskripts. Meinen Eltern und meinen Schwestern danke ich ebenfalls für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Nadine Kramann
Geburtsdatum: 12.02.1980
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

07/1986 – 06/1990 Gemeinschaftsgrundschule, Bergisch Gladbach
08/1990 – 06/1999 Dietrich Bonhoeffer Gymnasium, Bergisch Gladbach

Studium:

10/1999 – 07/2001 Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Fachrichtung Biologie

10/2001 – 04/2007 Universität zu Köln
Fachrichtung Biologie

02/2006 – 04/2007 Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Interaktion zwischen Pelota und putativen Interaktionspartnern“ im Institut für Humangenetik, Georg-August-Universität, Göttingen

08/2007 – 12/2010 Anfertigung einer Promotionsarbeit mit dem Thema: „Genomweite Suche neuer Modulatoren der Signaltransduktion in kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz“ in der Abteilung Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen

Burnicka-Turek O, Kata A, Buyandelger B, Ebermann L, Kramann N, Burfeind P, Hoyer-Fender S, Engel W, Adham IM (2010). Pelota interacts with HAX1, EIF3G and SRPX and the resulting protein complexes are associated with the actin cytoskeleton. *BMC Cell Biol.* 20;11:28.