



Die Bedeutung von BRCA1-assoziiertem Protein in der Entwicklung der last- induzierten Myokardhypertrophie

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Cornelia Grebe
aus Bad Hersfeld

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. T. Pieler

Korreferent: Prof. Dr. U. Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

VIII

1	Einleitung	1
----------	-------------------	----------

1.1	Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz	1
1.2	Molekulare Mechanismen der Herzinsuffizienz	2
1.3	Die Bedeutung der MAPK-Signalwege in der Herzinsuffizienz	4
1.4	BRAP - ein Regulator des MAPK-Signalweges	7
1.5	Zielsetzungen der Arbeit	10

2	Material und Methoden	12
----------	------------------------------	-----------

2.1	Chemikalien und Reagenzien	12
2.2	Enzyme	15
2.3	Gebrauchswaren	15
2.4	Sterilisationsverfahren	16
2.5	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	16
2.6	Lösungen	17
2.7	Medien, Antibiotika, Agarplatten	24
2.7.1	Medien für Bakterien	24
2.7.2	Medien für eukaryontische Zellkulturen	25
2.8	Biologisches Material	26
2.8.1	Bakterienstämme	26
2.8.2	Eukaryontische Zelllinien	26
2.8.3	Adenoviren	26
2.8.4	Mausstämme	27
2.8.5	Herkunft des Patientenmaterials	27
2.8.6	Antikörper	27
2.8.7	DNA-Plasmide	29
2.8.8	DNA-Konstrukte	30

2.8.9	Synthetische Oligonukleotide	31
2.8.10	Längenstandards	32
2.9	Datenbanken und Analysesoftware	32
2.10	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	34
2.10.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	34
2.10.2	Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks	34
2.10.3	Midipräparation von Plasmid-DNA	34
2.10.4	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	35
2.10.5	Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren	35
2.10.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	35
2.10.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe	36
2.10.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.11	Klonierungstechniken	37
2.11.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.11.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.11.3	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	37
2.11.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.11.5	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	38
2.12	Gelelektrophorese von DNA	39
2.13	Southern Blot	39
2.13.1	Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung	40
2.13.1.1	<i>Random Prime</i> -Markierung	40
2.13.1.2	Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	40
2.14	DNA-Amplifikation über die Polymerase-Kettenreaktion	41
2.14.1	Reverse Transkription	43
2.14.2	Quantitative <i>Real-time</i> PCR	43
2.15	Zellbiologische Methoden	46
2.15.1	Zellkultur eukaryontischer Zellen	46
2.15.2	Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryontischer Zellen	46
2.15.3	Zellkultur primärer Zellen	47
2.15.3.1	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten	47

2.15.3.2	Kultivierung von Kardiomyozyten adulter Ratten	48
2.15.3.3	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten	48
2.15.3.4	Kultur von Kardiomyozyten neonataler Ratten	50
2.15.3.5	Planimetrie von Kardiomyozyten neonataler Ratten	50
2.15.3.6	Isolation und Kultivierung embryonaler Maus-Fibroblasten	51
2.15.4	Adenoviral vermittelter Gentransfer	51
2.15.4.1	Herstellung eines modifizierten Adenovirus	51
2.15.4.2	Adenovirale Transfektion isolierter Kardiomyozyten	53
2.16	Proteinbiochemische Methoden	54
2.16.1	Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen	54
2.16.2	Herstellung von Protein-Lysaten aus tierischen Geweben	54
2.16.3	Herstellung von Mitochondrien- und Zytosolfractionen	55
2.16.4	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	55
2.16.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.16.6	2D-Gelelektrophorese	56
2.16.6.1	Isoelektrische Fokussierung	57
2.16.6.2	Äquibrierung der IPG-Streifen und SDS-PAGE	58
2.16.7	Western Blot	59
2.16.7.1	Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern	59
2.16.8	Kolloidale Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	61
2.16.9	Expression und Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	61
2.16.10	Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese/Elektroelution	62
2.16.11	Immunpräzipitation/Ko-Immunpräzipitation	62
2.17	Massenspektrometrie	63
2.18	Ras-Aktivierungs-Assay	63
2.19	<i>yeast-two-hybrid</i> -Screening	64
2.20	Proteinbiochemische Methoden	65
2.20.1	Immunfluoreszenz-Färbung eukaryontischer Zellen	65
2.20.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen	66
2.21	Transgene Mäuse	66
2.21.1	Vorbereitung und Injektion des transgen Konstruktes	66
2.21.2	Genotypisierung transgener Mäuse	67
2.21.3	Echokardiographische Untersuchung transgener Mäuse	67

2.21.4	Operative Modelle der Myokardhypertrophie bei Mäusen	67
2.21.5	Induzierbare BRAP-transgen überexprimierende Mäuse	68
2.22	Präparation und X-Gal Färbung von Maus-Embryonen	68
2.23	Histologische Techniken	69
2.23.1	Gewebefixierung und -einbettung	69
2.23.2	Herstellung von Paraffinschnitten	70
2.23.3	Entparaffinierung und HE-Färbung von Gewebeschnitten	70
2.23.4	Masson-Trichrom Färbung von Paraffinschnitten	71
2.24	Ethik	72
2.23	Statistische Auswertung	72

3 Ergebnisse

73

3.1	Untersuchung auf eine differentielle Regulation von BRAP in der Myokardhypertrophie	73
3.1.1	Herstellung eines BRAP-spezifischen Antikörpers	73
3.1.2	Untersuchung der BRAP-Expression in Hypertrophie-Modellen	75
3.1.3	Untersuchung der BRAP-Expression in humanen Myokard-Biopsien von Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie	77
3.1.4	Unterliegt BRAP einer stimulations-abhängigen Degradation oder posttranslationalen Modifikation?	78
3.2	Einfluss von BRAP auf pro- und antihypertrophe Signaltransduktionswege	78
3.2.1	Untersuchung der BRAP-Überexpression in isolierten Kardiomyozyten	78
3.2.1.1	Aktivierung der MAPK-Signalwege in BRAP überexprimierenden Kardiomyozyten	79
3.2.1.2	In Kardiomyozyten neonataler Ratten wird die Hypertrophie durch BRAP inhibiert	82
3.3	Murine Modelle zur herzspezifischen Überexpression von BRAP	83
3.3.1	Das Konstrukt zur Generierung von BRAP-transgenen Mäusen	83
3.3.2	Generierung und Charakterisierung BRAP-transgener Mäuse	83
3.3.3	Phänotypisierung BRAP-transgener Mäuse	86
3.3.3.1	Morphologische Untersuchung der transgenen Mäuse und Kaplan-Meier Überlebenskurve	86
3.3.3.2	Echokardiographische Untersuchung der transgenen Mäuse	87

3.3.3.3	Histologische Untersuchung der Herzen BRAP-transgener Mäuse	88
3.3.3.4	Analyse zur Expression des Hypertrophie-Markers BNP	89
3.3.3.5	Analysen zur Aktivität von Proteinen des MAPK-Signalweges in den Herzen der BRAP-transgenen Mäuse	90
3.3.3.6	Untersuchung der Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs	94
3.3.3.7	Analyse der Apoptose in Herzen BRAP-transgener Mäuse	96
3.3.4	Generierung und Charakterisierung einer induzierbaren herzspezifischen BRAP-transgenen Mauslinie	99
3.3.4.1	Generierung eines murinen Modells zur induzierbaren herzspezifischen BRAP-Überexpression	99
3.3.4.2	Analyse der Maus-Linien auf Funktionalität	101
3.3.4.3	Präliminäre Phänotypisierung der induzierbaren BRAP überexprimierenden Mäuse	102
3.4	BRAP-genetrap-Mausmodell	103
3.4.1	Generierung der BRAP- <i>genetrap</i> Mauslinie	103
3.4.2	Charakterisierung der BRAP- <i>genetrap</i> Mauslinie	104
3.4.2.1	Lokalisation der <i>genetrap</i> -Kassette	104
3.4.2.2	Homozygote BRAP- <i>genetrap</i> -Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung	106
3.4.2.3	Analyse der BRAP-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene	107
3.4.2.4	Untersuchung der Expression von Acad10	108
3.4.2.5	Untersuchung der BRAP-Expression in Embryonen mittels X-Gal Färbung	110
3.4.2.6	Isolation von embryonalen Maus-Fibroblasten	111
3.4.3	Phänotypisierung der heterozygoten BRAP- <i>genetrap</i> Mäuse	112
3.4.3.1	Morphologische Untersuchung und Analyse der Organgewichte	112
3.4.3.2	Echokardiographische Untersuchung der heterozygoten BRAP- <i>genetrap</i> Mäuse	113
3.4.3.3	Induktion einer Myokard-Hypertrophie durch Infarkt-Operation	113
3.5	Suche nach Interaktionspartnern von BRAP	114
3.5.1	<i>yeast-two-hybrid</i> -Screening	114

3.5.1.1	Herstellung eines <i>bait</i> -Konstruktes für die <i>Y2H</i> -Analyse von BRAP	114
3.5.1.2	Ergebnisse der <i>Y2H</i> -Analyse	115
3.5.1.3	Überprüfung der Interaktion von BRAP mit CHCHD3 mittels Ko-Immunpräzipitation	115
3.5.2	Immunpräzipitation von BRAP-Protein und massenspektrometrische Analyse zur Identifikation von Interaktionspartnern	116
3.6	Analyse posttranslationaler Modifikationen von BRAP	118
3.6.1	Nachweis komplexer posttranslationaler Modifikationen von BRAP durch 2D-Gelelektrophorese	118
3.6.2	Identifikation phosphorylierter Aminosäuren in BRAP durch massenspektrometrische Analyse	119
3.7	Analyse der Lokalisation von BRAP	121
3.7.1	BRAP-Expression in Organen und während der Embryonalentwicklung	121
3.7.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BRAP	122
3.7.2.1	Lokalisation von CyPet-BRAP-YPet-Fusionsprotein in Kardiomyozyten	122
3.7.2.2	Immunfluoreszenz-Färbung von endogenem BRAP in Kardiomyozyten	123
3.7.2.3	Ko-Lokalisation von BRAP mit dem Zentrosomen-Protein gamma-Tubulin	124

4 Diskussion

126

4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	126
4.2	Differentielle Regulation von BRAP in der Herzinsuffizienz	129
4.3	BRAP und die MAPK-Signalkaskade in primären Kardiomyozyten	130
4.4	B-Raf und C-Raf besitzen nicht-redundante Funktionen	131
4.5	Wie beeinflusst BRAP die Signaltransduktion <i>in vivo</i> ?	133
4.6	Die Bedeutung von Apoptose, Autophagie und Nekrose bei der Herzinsuffizienz	136
4.7	Zur Bedeutung von Mitochondrien in Kardiomyozyten	138
4.8	Wie bewirkt BRAP-Überexpression die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie?	139

4.9	Hypothesen zur Funktion von BRAP während der Embryonalentwicklung	141
4.10	Wie wird BRAP posttranslational reguliert	144
4.11	Interaktionen und Lokalisation von BRAP	147
4.12	Perspektiven	150

5	Zusammenfassung	152
----------	------------------------	------------

6	Literaturverzeichnis	155
----------	-----------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
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
SSC	„standard saline citrat“ (-Puffer)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit = definierte Enzymeinheit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz

In den Industrienationen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes verstarb 2006 nahezu jeder Zweite durch ihre Folgen. Weltweit steigt der Anteil der Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache an. Die World Health Organization (WHO) rechnet für 2015 mit nahezu 20 Millionen Menschen die durch ihre Folgen sterben werden. Neben den sozialen Folgen sind auch die wirtschaftlichen Auswirkungen enorm. Im Jahr 2002 entstanden in Deutschland durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen Kosten von 35 Milliarden Euro, was einem Sechstel der gesamten Krankheitskosten entspricht (Statistisches Bundesamt, 2004). Die Herzinsuffizienz, an der in Deutschland etwa 2-3 Millionen Menschen erkrankt sind, wird als die häufigste Herz-Kreislauf-Erkrankung des 21. Jahrhunderts angesehen. Von Herzinsuffizienz spricht man, wenn das Herz keinen adäquaten Blutfluss gewährleisten kann, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus zu erreichen. Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind sehr variabel: langfristiger Bluthochdruck, koronare Herzerkrankungen, Herzklappendefekte, Myokarditis und Kardiomyopathien sind die häufigsten Auslöser. Die Herzinsuffizienz verläuft in der Regel über einen kompensierten Zustand, bei dem durch physiologische Kompensationsprozesse, wie unter anderem eine Hypertrophie des Myokards, die verminderte Pumpleistung ausgeglichen werden kann und der Patient kaum Symptome zeigt. Längerfristig kommt es jedoch zu einem dekompensierten Stadium, bei dem der Patient häufig unter Symptomen wie Dyspnoe, schneller Ermüdbarkeit, Ödemen und Herzrhythmusstörungen leidet, was die Lebensqualität erheblich einschränken kann. Die jährliche Letalität bei Patienten mit leichter Symptomatik beträgt 5-10% und sogar 30-40% bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz [Packer, 1999].

In den letzten 15 Jahren wurden im Verständnis der Herzinsuffizienz enorme Fortschritte erzielt. Die molekularen Mechanismen, die bei der Regulation der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse eine Rolle spielen sind jedoch noch immer unzureichend verstanden. Um gezielt neue therapeutische Strategien gegen die Herzinsuffizienz zu entwickeln, müssen diese Prozesse weiter erforscht werden.

1.2 Molekulare Mechanismen der Herzinsuffizienz

Ebenso variabel wie die Auslöser einer Herzinsuffizienz sind auch die molekularen Veränderungen, die zu einer Myokardhypertrophie führen können. Dennoch gibt es einige gemeinsame Merkmale der Hypertrophieantwort auf die unterschiedlichen biomechanischen und neurohumoralen Stimuli. Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Die kompensatorische Zunahme der Myokardmasse während der Herzinsuffizienz ist auf eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zurückzuführen. Die Vergrößerung der Zellen geht mit einer Steigerung der RNA- und Proteinsynthese einher [Sudgen und Clerk, 1998; Yamazaki *et al.*, 1998]. Zudem kommt es zu einer qualitativen Veränderung der Genexpression, die durch eine charakteristische Steigerung der Expression von Genen, die während der Embryonalentwicklung im Herzen exprimiert werden, gekennzeichnet ist. Die Sekretion des Peptid-Hormons *brain natriuretic peptide* (BNP) und des *atrial natriuretic peptide* (ANF) stellen diagnostisch verwendete Marker der Herzinsuffizienz dar [Dao *et al.*, 2001]. Die Expressionsänderungen sind Surrogatmarker pathophysiologisch veränderter Signaltransduktion insuffizienter Herzmuskelzellen. Sie haben ihren Ursprung in dauerhafter mechanischer und neurohumoraler Stimulation und können durch eine Vielzahl an Signalwegen induziert werden.

Die Entwicklung einer pathologischen Herzinsuffizienz ist häufig mit einem progressiven Verlust an Kardiomyozyten verbunden. Teilweise werden diese durch Bindegewebe ersetzt, was zu einer verminderten Pumpfunktion infolge einer Versteifung des Myokards führt. Daher kommt der Erforschung der Mechanismen des Zelltods während der Herzinsuffizienzentstehung eine hohe Bedeutung zu. Allgemein werden drei verschiedene Wege des Zelltods unterschieden: Apoptose, Autophagie und Nekrose. Die Apoptose ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus und wird über zwei zentrale Signalwege vermittelt: den extrinsischen Rezeptor-abhängigen und den intrinsischen Mitochondrien-abhängigen Signalweg. Der extrinsische Weg wird über eine Liganden-Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor (zum Beispiel den Fas-Rezeptor) initiiert. Dies stimuliert die Bildung eines Multiprotein-Komplexes (DISC: *death-inducing signaling complex*), was zu einer Aktivierung der Procaspase-8 führt.

Aktivierte Caspase-8 induziert die proteolytische Spaltung der Procaspase-3, welche dann als aktive Caspase-3 durch proteolytische Spaltung zahlreicher Substrate den Zelltod einleitet. Der intrinsische Signalweg wird durch extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli initiiert, die über Proteine der Bcl-2-Familie zu den Mitochondrien transmittiert werden. Dazu gehört unter anderem das proapoptotische Protein Bax, welches nach Stimulation zu Mitochondrien transloziert und dort durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran zu einem Ausstrom von Cytochrom C und weiteren pro-apoptotischen Proteinen führt. Dies initiiert im Cytoplasma die Bildung eines Apoptosoms unter Beteiligung von APAF-1, Cytochrom C und Procaspase-9 und schließlich die Aktivierung der Caspase-3. [Crow *et al.*, 2004].

Die Autophagie ist primär ein Lysosomen-abhängiger Prozess zur Degradation langlebiger Proteine und Organellen. Autophagie bewirkt durch Proteinabbau eine erhöhte Verfügbarkeit freier Aminosäuren und Fettsäuren, die für die Energieproduktion nötig sind, eine Zerstörung beschädigter Organellen und beugt einer Anhäufung von Protein-Aggregaten vor. Sie wird initiiert durch die Bildung einer Isolationsmembran oder Phagophore, die wahrscheinlich dem Endoplasmatischen-Retikulum entstammt [Dunn, 1990], und die Anlagerung von Beclin 1 sowie weiterer Atg-Proteine. Anschließend werden Proteinaggregate oder Organellen umschlossen und das dadurch entstandene Autophagosom fusioniert mit einem Lysosom zum sogenannten Autophagolysosom. Zuletzt wird der Inhalt des Autophagolysosoms degradiert [Gustafsson und Gottlieb, 2008]. Viele Untersuchungen konnten zeigen, dass Autophagie im Herzen durch Ischämie/Reperfusion sowie bei zahlreichen anderen kardiovaskulären Erkrankungen vermehrt auftritt [Decker und Wildenthal, 1980; Shimomura *et al.*, 2001]. Es wird zur Zeit kontrovers diskutiert, ob die Autophagie direkt zum Zelltod führt oder ob sie eher protektive Wirkung besitzt [Zhu *et al.*, 2007; Hamacher-Brady *et al.*, 2006].

Die Nekrose wird im Allgemeinen als ein irreversibler Prozess hin zum Zelltod angesehen. Oxidativer Stress und toxische Substanzen können Nekrose auslösen, wobei eine charakteristische Schwellung der Zelle auftritt. Insgesamt ist der Vorgang der Nekrose weniger intensiv erforscht als die Mechanismen der Apoptose. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass der Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran eine wichtige Rolle bei der Initiation des nekrotischen Zelltods zu spielen scheint [Nakagawa *et al.*, 2005].

1.3 Die Bedeutung der MAPK-Signalwege in der Herzinsuffizienz

Die GTP-bindenden Proteine besetzen eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion und steuern zelluläre Prozesse wie Wachstum und Zellteilung. Ras (*Rat sarcoma*) ist ein kleines Guanin-Nukleotid-bindendes Protein. Ras und andere GTP-bindenden Proteine wechseln stimulationsabhängig zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand [Downward, 1996]. Die Ras-Familie von Säugetieren umfasst die vier Proteine H-Ras, N-Ras und die alternativ prozessierten K-Ras Spezies: K(A)-Ras und K(B)-Ras [Barbacid, 1987]. Die Expressionsmuster der drei Ras-Gene in Organen und während der Entwicklung zeigen deutliche Unterschiede. H-Ras wird am höchsten exprimiert in Gehirn, Muskel und Haut, die höchste Expression von K-Ras liegt im Darm, in der Lunge und im Thymus vor. N-Ras wird hauptsächlich in Testis und Thymus exprimiert [Leon *et al.*, 1987]. Dies weist auf eine spezifische Rolle der verschiedenen Ras-Proteine hin. Auch die publizierten *knockout*-Studien stützen diese Hypothese. Während K-Ras defiziente Mäuse am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung sterben [Johnson *et al.*, 1997; Koera *et al.*, 1997], ist weder H-Ras noch N-Ras für die Embryonalentwicklung essentiell [Esteban *et al.*, 2001]. Auch ein gleichzeitiges Fehlen von H-Ras und N-Ras bewirkt keinen Entwicklungsdefekt oder postnatalen Phänotyp [Esteban *et al.*, 2001]. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien konnten die Bedeutung von Ras für die Regulation der kardialen Hypertrophie belegen. Mikroinjektion von aktiviertem Ras-Protein in kultivierte Kardiomyozyten bewirkte eine zelluläre Hypertrophie und eine gesteigerte ANF-Expression [Thorburn *et al.*, 1993]. Darüber hinaus kam es durch Ras-Überexpression zu Änderungen der Struktur der Myofibrillen, wie es charakteristisch für eine Hypertrophie ist [Thorburn *et al.*, 1993]. Am deutlichsten belegen die Daten von Hunter *et al.* [1995] die Rolle von Ras bei der Hypertrophieentstehung. Eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von konstitutiv aktivem Ras in transgenen Mäusen führte zu kardialer Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion [Hunter *et al.*, 1995].

Zu den Effektoren von Ras zählen vor allem die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) [Vanhaesebroeck und Alessi, 2000], Ral-GDS/Rac [Takai *et al.*, 2001] und die Protein-Kinase Raf [Avruch *et al.*, 2001]. Die Raf- (*rapidly growing fibrosarcoma*)-Kinase Familie von Säugetieren besteht aus den drei Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1). Die Raf-Isoformen übertragen Signale von Ras zum Mek/Erk-Zweig der MAPK-Signalkaskade. Aktiviertes Ras bindet Raf und bewirkt eine Translokation von Raf an die Plasmamembran.

Dort wird Raf in einem Komplex, durch bisher nicht genau verstandene Mechanismen, welche Phosphorylierungen beinhalten, aktiviert [Avruch *et al.*, 2001]. Die drei Raf-Isoformen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Fähigkeit, Mek zu aktivieren [Marais *et al.*, 1997]. B-Raf besitzt die höchste Mek-Kinase-Aktivität, gefolgt von C-Raf und A-Raf [Pritchard *et al.*, 1995]. Es wurden A-Raf-, B-Raf- und C-Raf defiziente Mäuse generiert. A-Raf-*knockout* Mäuse werden lebend geboren und zeigen neuronale und intestinale Defekte [Pritchard *et al.*, 1996]. Dagegen sterben B-Raf und C-Raf defiziente Mäuse während der Embryonalentwicklung [Wojnowski *et al.*, 1997; Mikula *et al.*, 2001]. Dies zeigt, dass die Raf-Isoformen spezifische essentielle Funktionen besitzen und nicht oder nur teilweise redundant sind. Ein konditioneller herzspezifischer *knockout* von C-Raf führt zu kardialer Dysfunktion und Herzinsuffizienz durch Apoptose [Yamaguchi *et al.*, 2004]. Diese und weitere *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen eine MAPK-unabhängige, anti-apoptotische Funktion für C-Raf [Mikula *et al.*, 2001; Hüser *et al.*, 2001].

Die MAPK-Signalwege bestehen aus kaskadenartig funktionierenden Kinasen, deren Aktivierung letztendlich zu der Phosphorylierung und Aktivierung von Erk (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) und p38-MAPK führt (Abb. 1.1). p38, JNK und Erk besitzen zahlreiche Zielproteine, darunter einige Transkriptionsfaktoren, die eine Modulation der Genexpression bewirken. So führt eine Aktivierung von Raf zu einer Phosphorylierung von Mek, welches direkt Erk aktiviert. Die Interaktion von Raf und Mek ist zumindest teilweise abhängig von der Anwesenheit des "Ankerproteins" KSR (*kinase suppressor of ras*) [Therrien *et al.*, 1996]. KSR1 kann alle Kinasen des Mek/Erk-Signalwegs binden, aber während die Interaktion zu Mek konstitutiv ist, scheint die Interaktion zu C-Raf und Erk stimulationsabhängig zu sein [Morrison, 2001]. Eine Überexpression von KSR in KSR^{-/-}-Fibroblasten auf das 14-fache Niveau von Wildtyp-Fibroblasten bewirkte eine maximale Assoziation des C-Raf-Mek-Erk-Komplexes und gesteigerte Erk-Aktivierung [Kortum und Lewis, 2004]. In *Caenorhabditis elegans* führte eine Defizienz beider KSR-Isoformen, KSR1 und KSR2, zu embryonaler Letalität [Ohmachi *et al.*, 2002]. In Mäusen bewirkte eine Defizienz von KSR1 eine verminderte Erk-Kinase Aktivität, was die T-Zell Aktivierung verhinderte und Tumorwachstum inhibierte [Nguyen *et al.*, 2002].

Die bisher erhobenen Daten weisen darauf hin, dass KSR über eine Regulation des Erk-Signalwegs die Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu beeinflussen vermag [Kolch, 2005]. Die Bedeutung des Mek/Erk-Signalweges für das Herz ist vielfach belegt. Beispielsweise bewirkte eine herzspezifische Überexpression von Mek1 in transgenen Mäusen eine kompensierte konzentrische Hypertrophie, ohne zu einer Herzinsuffizienz zu führen [Bueno *et al.*, 2000]. Da die Herzen keine verminderte Funktion aufwiesen, handelte es sich bei dem Phänotyp um einen kompensierten Zustand der Hypertrophie. Mechanistisch scheint der Mek/Erk-Signalweg die Hypertrophie zumindest teilweise über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT zu induzieren [Sanna *et al.*, 2005]. Die zwei Isoformen Erk1 und Erk2 stehen am Ende der Raf/Mek/Erk-Signalkaskade und die Aktivierung von Erk1/2 kann zahlreiche Vorgänge auslösen, insbesondere solche, die Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose betreffen [Reddy *et al.*, 2003]. Die Funktion von Erk wird unter anderem durch dessen intrazelluläre Lokalisation bestimmt. In Abwesenheit eines Stimulus wechselt die Lokalisation von Erk konstant zwischen Zellkern und Zytoplasma. Nach einer mitogenen Stimulation akkumuliert aktiviertes Erk rasch für einige Minuten im Zellkern [Pouyssegur *et al.*, 2002] und führt dort zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, beispielsweise Elk-1 [Sharrocks, 2001]. Weitere durch Erk aktivierte Proteine sind Proteinkinasen, wie die *90 kDa ribosomal protein S6 kinase* (p90RSK) [Frödin und Gammeltoft, 1999] und andere Signalproteine wie die Phospholipase A₂ [Gijon und Leslie, 1999]. Erk ist zu 60% homolog zu p38 und JNK, den finalen Kinasen der anderen beiden MAPK-Signalkaskadewegen.

Die p38-Kinase wird aktiviert durch die MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6, während JNK durch MKK4 und MKK7 phosphoryliert wird. Die MAPK-Kinasen werden durch ein komplexes Netzwerk aus MAPKK-Kinasen abhängig von zellulärem Stress aktiviert. Die herzspezifische Überexpression von aktiviertem MKK3 oder MKK6 in transgenen Mäusen, welche zu einer Aktivierung von p38 führt, bewirkte die Entstehung einer Herzinsuffizienz und führte zu einem vorzeitigen Tod im Alter von sieben bis acht Wochen. Die Herzen der MKK3-überexprimierenden Mäuse besaßen vergrößerte endsystolische Ventrikel-Volumina und dünnere Ventrikelwände [Liao *et al.*, 2002]. Transgene Mäuse, die eine aktive MKK7-Mutante herzspezifisch überexprimierten, zeigten eine spezifische JNK-Aktivierung. Ebenso wie MKK3/6 transgen-überexprimierende Mäuse entwickelten sie früh eine letale Kardiomyopathie, ohne dass es zu einer Hypertrophie kam [Petrich *et al.*, 2003]. Dagegen bewirkte ein Fehlen von JNK1 oder JNK2 im Herzen ein spontan, oder nach einer Aortenkonstriktion (TAC)-Operation stimuliertes, erhöhtes kardiales Wachstum [Liang *et al.*, 2003].

Auch ein Mausmodell zur herzspezifischen Überexpression von dominant-negativem p38 zeigte eine gesteigerte Hypertrophie nach TAC-Operation [Braz *et al.*, 2003]. Dagegen kam es in herzspezifischen p38 α -*knockout* Mäusen nach TAC-Operation zunächst zu einer normalen Hypertrophieantwort, später entwickelten die Mäuse dann eine kardiale Dysfunktion und Dilatation [Nishida *et al.*, 2004]. Insgesamt scheinen die stressaktivierten Proteinkinasen JNK und p38 die kardiale Hypertrophieantwort zu hemmen und einen nachteiligen Effekt, zumindest nach einer Überexpression auszuüben [Molkentin *et al.*, 2004]. Abweichend von der vereinfachten linearen Darstellung der MAPK-Signaltransduktion zeigen zahlreiche Studien, dass komplexe Wechselwirkungen zwischen den MAPK-Wegen untereinander und zu einer Vielzahl weiterer Signalwege bestehen.

1.4 BRAP – ein Regulator des MAPK-Signalweges

BRAP (*BRCA1 associated protein*) wurde 1998 durch ein *yeast-two-hybrid*-Screening als ein zytoplasmatisches Protein identifiziert, welches an das Kern-Lokalisations-Motiv (NLS, *nuclear localisation sequence*) von BRCA1 (*breast cancer 1*) bindet [Li *et al.*, 1998]. Neben der Interaktion mit BRCA1 wurde für BRAP eine Bindung an den Zellzyklus-Inhibitor p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) beschrieben, welcher ebenfalls eine NLS-Domäne besitzt [Asada *et al.*, 2004]. Die Interaktion von BRAP mit der NLS-Domäne verhindert eine Kerntranslokation von p21.

BRAP ist ein in Eukaryonten hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, welches eine Ubiquitin-Protease-ähnliche Zink-Finger-Domäne (UBP-ZnF) und eine RING-Typ Zink-Finger Domäne enthält. Zink-Finger Domänen (ZnF) sind kleine Motive, die ein oder mehrere Zink-Atome binden können. Über ZnF-Domänen können Interaktionen zu DNA, RNA, Protein- oder Lipid-Substraten stattfinden. UBP-ZnF-Motive sind häufig in Ubiquitin-Hydrolasen enthalten. RING-Domänen sind an Protein-Protein Interaktionen beteiligt und haben oft eine intrinsische E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Aktivität. In einem weiteren *yeast-two-hybrid*-Screening wurde BRAP als Interaktionspartner von Ras identifiziert und unter dem Namen *impedes mitogenic signal propagation* (IMP) funktionell untersucht [Matheny *et al.*, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass BRAP über eine Inaktivierung des "Ankerproteins" KSR (*kinase suppressor of Erk*) als Inhibitor der Raf/Mek-Signaltransduktion wirkt. Allerdings ist der genaue Mechanismus der Wirkung von BRAP auf KSR noch unbekannt. BRAP besitzt E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die durch

Ras aktiviert wird und eine auto-Polyubiquitinylierung bewirkt. Demnach besitzt Ras zweifachen Einfluss auf den Mek/Erk-Signalweg: einerseits durch die direkte Aktivierung von Raf und andererseits über die Induktion der BRAP-Ubiquitinylierung, die zu einer Degradation des Mek-Inhibitors BRAP führt. Es wurde gefolgert, dass BRAP als eine Art Schwellenwert-Modulator des Signalwegs fungiert und so die Sensitivität der Kaskade gegenüber Stimuli adaptiert.

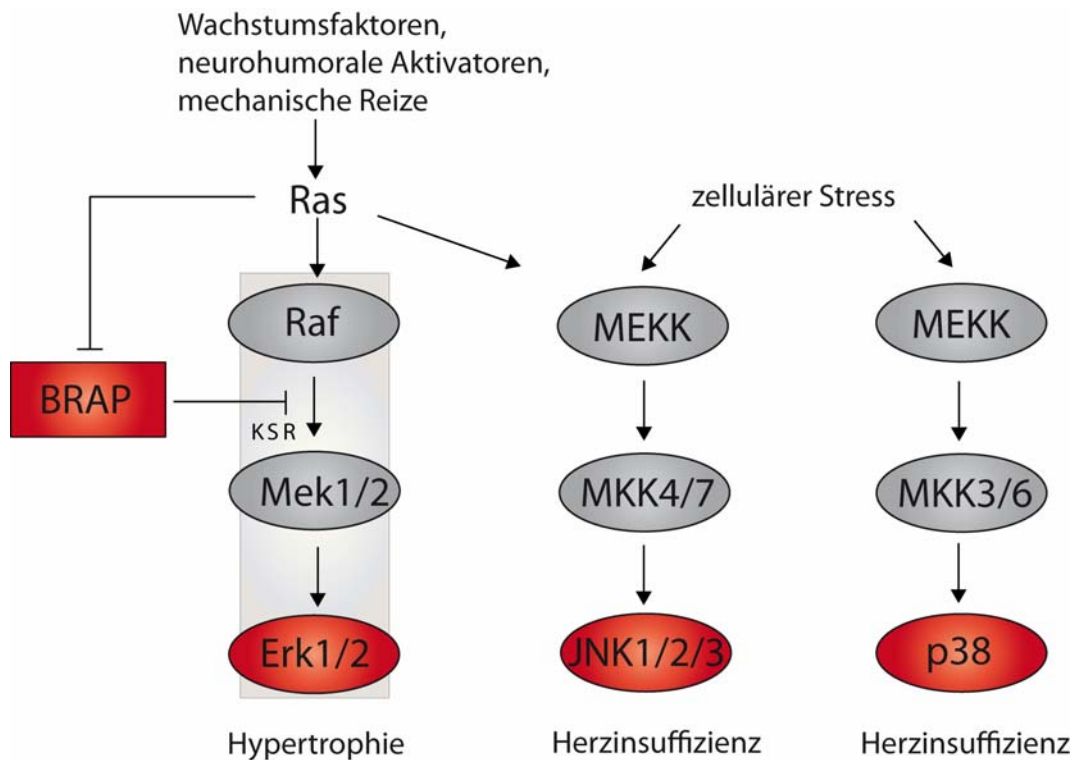


Abb. 1.1: Stark vereinfachte Darstellung der MAPK-Signalkaskade. Wachstumsfaktoren und mechanische Reize aktivieren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren Ras, welches unter anderem Raf aktiviert. Das "Ankerprotein" KSR vermittelt die Interaktion zwischen aktiviertem Raf und Mek1/2. Die Aktivierung von Mek1/2 bewirkt eine Phosphorylierung von Erk1/2. Eine Aktivierung des Mek/Erk-Signalweges wird in den meisten Studien mit einer Induktion oder Verstärkung der Hypertrophieantwort in Zusammenhang gebracht. BRAP inhibiert die Signalübertragung von Raf zu Mek1/2 über eine Hemmung von KSR. Aktiviertes Ras inhibiert BRAP durch Induktion einer Ubiquitinylierung, was zu einem Abbau von BRAP führt [Matheny *et al.*, 2004]. Zellulärer Stress aktiviert MAPKK-Kinasen (MEKK), welche ihrerseits MKK4/7 und MKK3/6 aktivieren. Während MKK4/7 die MAP-Kinase JNK aktiviert, phosphoryliert MKK3/6 die MAP-Kinase p38. Eine übermäßige Aktivierung von JNK und p38 scheint die Hypertrophieantwort eher negativ zu beeinflussen und zu der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beizutragen.

Eine aktuelle Publikation zeigte, dass die Fähigkeit von BRAP, die Raf/Mek-Signaltransduktion zu inhibieren, eine Folge der Hemmung der KSR1-Homooligomerisierung und C-Raf/B-Raf-Heterooligomerisierung ist [Chen *et al.*, 2008]. Die Bildung von KSR1-Homooligomeren scheint nötig zu sein, um KSR/Mek und KSR/B-Raf Komplexe miteinander zu verbinden, was zu einer Mek-Aktivierung führt. BRAP hemmt zudem die Heterooligomerisierung von C-Raf und B-Raf. Die Heterooligomerisierung von C-Raf und B-Raf bewirkt eine Ras-unabhängige Aktivierung von C-Raf [Garnett *et al.*, 2005]. Da nur die Mek-Aktivierung über C-Raf und nicht über B-Raf abhängig von KSR ist, scheint BRAP nur die C-Raf vermittelte Mek-Aktivierung zu inhibieren [Chen *et al.*, 2008].

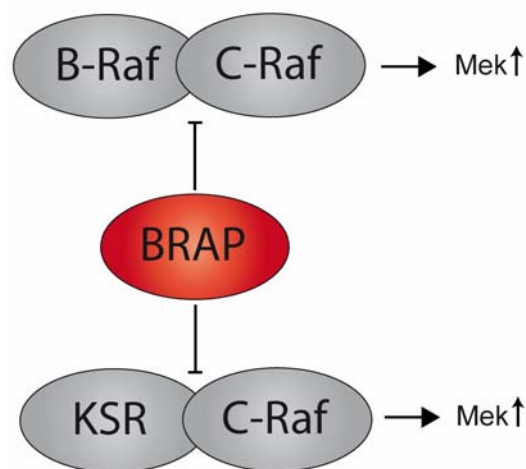


Abb. 1.2: BRAP hemmt die Heterodimerisierung von C-Raf und B-Raf und die Heterodimerisierung von KSR und C-Raf.

Vorarbeiten von Dr. Peter Schott (Abteilung Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) beinhalten die Suche nach neuen Modulatoren der Hypertrophie. Im Rahmen einer Proteomanalyse wurden, mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektroskopie, Proteine gesucht, die durch mechanische Last reguliert werden. Hierfür wurde das Modell der Monocrotaline-induzierten Rechtsherzbelastung verwendet. Nach Behandlung der Ratten mit Monocrotaline kommt es zu einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes, wodurch eine Rechtsherzbelastung entsteht. Da durch die Druckerhöhung im Lungenkreislauf lediglich der rechte Ventrikel der erhöhten mechanischen Last exponiert wird, jedoch beide Ventrikel gleichermaßen der systemischen neurohumoralen Sekretion unterliegen, sind selektiv rechtsventrikuläre Änderungen des Proteoms im Idealfall spezifisch lastabhängig. Dabei konnte BRAP als spezifisch rechtsventrikulär, und damit durch mechanische Last reguliertes Protein identifiziert werden [Schott *et al.*, 2005].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorhergehenden Abschnitten erläutert, spielen die MAPK-Signalwege eine entscheidende Rolle bei der Herzinsuffizienz- und der Hypertrophie-Entwicklung. In immortalisierten Zelllinien wurde gezeigt, dass BRAP den Mek/Erk-Signalweg der MAPK zu beeinflussen vermag. Es existieren bisher keine veröffentlichten Arbeiten, die die Bedeutung von BRAP in Kardiomyozyten beschreiben. Auch die Rolle von BRAP *in vivo* wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Dissertation sollte daher der Einfluss von BRAP auf die kardiale Signaltransduktion *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Die folgenden zentralen Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Wie beeinflusst BRAP pro- und antihypertrophe Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten?

In diesem Zusammenhang sollte zunächst untersucht werden, ob eine differentielle Regulation von BRAP während der Entstehung einer Myokardhypertrophie erfolgt, indem das BRAP-Niveau in Myokardproben hypertrophierter und dilatierter Herzen bestimmt werden sollte. Anhand einer Überexpression von BRAP in primären Kardiomyozyten sollte die Wirkung von BRAP auf die MAPK-Signaltransduktion untersucht werden und ob BRAP auf die zelluläre Hypertrophie Einfluß nimmt.

2. Bewirkt BRAP Überexpression *in vivo* eine maladaptive Hypertrophie und kann eine Verringerung von BRAP eine lastabhängige Hypertrophie vermindern?

Die im Vorfeld diese Arbeit generierten BRAP Kardiomyozyten-spezifisch überexprimierenden Mäuse sollten phänotypisiert werden und in diesem Rahmen insbesondere die Signaltransduktion der MAP-Kinasen und anderer für die Herzinsuffizienz-Entstehung relevanter Wege untersucht werden. Um weitere Fragestellungen hinsichtlich der Wirkung von BRAP *in vivo* zu beantworten, sollte ein Mausmodell zur induzierbaren Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression von BRAP generiert werden. Dies soll ermöglichen den Effekt einer akuten, reversiblen und möglicherweise geringeren Überexpression von BRAP in adulten Mäusen zu untersuchen. Für die Untersuchung der Folgen eines Fehlens oder einer Verringerung von BRAP *in vivo* sollten homozygote und heterozygote BRAP-*genetrap* Mäuse generiert und phänotypisiert werden.

3. Existieren bisher unbekannte BRAP-Interaktoren, die sich als potentielle pharmakologische Ziele eignen?

Um neue Proteine zu identifizieren, die mit BRAP interagieren, sollte in Kooperation mit dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung ein *yeast-two-hybrid*-Screening durchgeführt werden. In einem alternativen Ansatz sollte immunpräzipitiertes BRAP mittels Massenspektrometrie analysiert werden, um so weitere Bindungspartner zu identifizieren.

4. Wird BRAP durch posttranslationale Modifikation reguliert?

Für diese Fragestellung sollte die massenspektrometrische Analyse von immunpräzipitiertem BRAP zur Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen eingesetzt werden. Die identifizierten posttranslationalen Modifikationen von BRAP sollen in Zukunft auf ihre Relevanz hinsichtlich der Funktion von BRAP untersucht werden.

5. In welchen Organen wird BRAP exprimiert und wie ist BRAP subzellulär lokalisiert?

Durch *Real-time* PCR sollte die BRAP-Expression in verschiedenen Organen der Maus und während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Die subzelluläre Lokalisation von BRAP sollte anhand eines in Kardiomyozyten überexprimierten GFP-BRAP-Fusionsproteins und durch Immunfluoreszenzfärbung von endogenem BRAP untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

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
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Anilinblau	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic/Mycotic-Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bacto-Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Calyculin	Sigma-Aldrich, München
Carbenicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carnitin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
CHAPS	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Creatin	Sigma-Aldrich, München
Cytosin- β -D-arabinofuranosid Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Doxicyclin	Sigma-Aldrich, München
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
Eisen(III)-chlorid, wasserfrei	Sigma-Aldrich, München
Endothelin 1	Sigma-Aldrich, München

Chemikalie	Bezugsquelle
EosinY-disodium	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
E-64	Sigma-Aldrich, München
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich, München
Formalin	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fuchsin Acid	Sigma-Aldrich, München
Glukose (Dextrose)	AppliChem, Darmstadt
Glutaminsäure, D-,L-	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isoprenaline hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	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
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptavidin	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Biomol, Hamburg
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Phosphomolybdänsäure	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Rapid-Hyb-Puffer	GE-Healthcare, München
RNasin RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Röntgen Superfix	Tetenal AG, Norderstedt
Roti®-Blue	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
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, München
Urea	Sigma-Aldrich, München
Vecta Shield ohne DAPI	VectorLab, Burlingame (USA)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl a-D-Galactopyranosid)	Biomol, Hamburg
XRay-Developer LX24	Kodak, Darmstadt
Xylenyanol FF	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München
ZVAD-FMK	Sigma-Aldrich, München

2.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	NEB, Bad Schwalbach
Collagenase Typ II	Worthington, Lakewood NJ (USA)
DNase, RNase-free	Qiagen, Hilden
Fast-Link™ DNA-Ligase	Biozym Scientific, Oldendorf
Mango <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
<i>Pfu</i> -Ultra-HF-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla (USA)
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	NEB, Promega
RNase A	Roche, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega, Mannheim

2.3 Gebrauchswaren

Gebrauchsware	Bezugsquelle
6-Well cell culture cluster	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well-Real-time-PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories, München
96-Well-PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well Microtiterplatten, klar	Nunc, Wiesbaden
Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Elektroporationsküvetten	Biozym Scientific, Oldendorf
Falcon Culture-slides	Becton Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm MP	GE-Healthcare, München
Immobiline Dry strips	GE-Healthcare, München
MicroSpin S-200HR Säule	GE-Healthcare, München
Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel
Objektträger, superfrost	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten, UVette	Eppendorf, Hamburg

Gebrauchsware	Bezugsquelle
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Super RX	Fujifilm GmbH, Düsseldorf
Sepharose Säulen	GE-Healthcare, München
Sterilfilter	Millipore, Bad Schwalbach
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Sterilisationsverfahren

Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden bei 121°C und 1,5 Bar autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert. Wässrige Lösungen für RNA-Präparationen und RNA-Analysen wurden mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, für 12 bis 24 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert.

2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
DirectPCR tail reagent	Peqlab, Erlangen
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
iQ™ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAexpress® Type IV Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder™	Qiagen, Hilden
Quick change® II XL Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)

Reaktionssystem	Bezugsquelle
Ras Activation Assay Kit	Upstate, Lake Placid (USA)
Rediprime™ Random labelling Kit II	GE-Healthcare, München
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)

2.6 Lösungen

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Carbenicillin-Stammlösung	100 mg Carbenicillin/ml in H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat Inkubation für 24 Stunden unter Rühren und anschließend Dampfdrucksterilisation
Eisenhämatoxylin nach Weigert	1:1 Mischung aus den folgenden Lösungen A und B: Lösung A: 1% (v/v) Hämatoxylin in Ethanol Lösung B: 80 mM Eisen(III)-chlorid 0,37% (v/v) Salzsäure Filtration
His-Puffer B (Lyse)	100 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea pH 8,0

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
His-Puffer C (Waschpuffer)	100 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea pH 6,3
His-Puffer D (Elution)	100 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea pH 5,9
His-Puffer E (Elution)	100 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea pH 4,5
Kanamycin-Stammlösung	50 mg Kanamycin/ml fertige Stammlösung (in H ₂ O)
Kollagenaselösung	60 mM Taurin 8 mM D,L-Glutaminsäure 2 mM D,L-Carnitin 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

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
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 μ g/ml Aprotinin 4 μ g/ml Leupeptin 4 μ g/ml Pepstatin A 1 mM PMSF
Lysepuffer nach Regitz	9 M Urea 25 mM Tris 50 mM KCl 3 mM EDTA 70 mM DTT 2,9 μ M Benzamidin 2,1 μ M Leupeptin

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
HEPES-Lysepuffer (Mitochondrien-Isolation)	20 mM HEPES 10 mM KCl 250 mM Sucrose 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 0,1 mM PMSF
IP-Lysepuffer	25 mM Tris 100 mM NaCl 0,5 % (v/v) NP-40 30 mM Pervanadat 10 µM CalyculinA 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 mg/ml E-64
MT-Lösung A	1% (w/v) Ponceau 2R 1% (v/v) Essigsäure
MT-Lösung B	1% (w/v) Phosphomolybdänsäure
MT-Lösung C	2,5 % (v/v) Essigsäure Anilinblau bis zur Sättigung
MT-Lösung D	99% (v/v) Ethanol 1% (v/v) Essigsäure
5x PAGE-Laufpuffer	125 mM Tris Base 96 mM Glycin 0,5 % (w/v) SDS

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Pervanadat (30 mM)	30 mM Natrium-Orthovanadat 0,2% Wasserstoffperoxyd 15 min RT, dunkel
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 µg/ml Aprotinin 4 µg/ml Leupeptin 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat
Rehydratationspuffer (IEF)	8 M Urea 2% (w/v) CHAPS 2,8 mg/ml DTT Bromphenolblau vor Gebrauch +0,2% (v/v) Ampholine
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Äquilibriumspuffer (IEF)	50 mM Tris/HCl pH 8,8 6 M Urea 30% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0 mit NaOH

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Sucrosepuffer (Virus-Herstellung)	10 mM Tris 2 mM MgCl ₂ 4% (w/v) Sucrose
5x TBE-Puffer	445 mM Tris/HCl (pH 8,0) 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
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
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
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
X-Gal-Färbelösung	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 1 mg/ml X-Gal 0,01% Deoxycholat 0,02% NP-40
X-Gal-Fixierungspuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 5 mM EGTA pH 7,3 2 mM $MgCl_2$ 0,2% Glutaraldehyd
X-Gal-Phosphatpuffer (0,1 M)	0,1 M NaH_2PO_4 0,1 M Na_2HPO_4
X-Gal-Waschpuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 2 mM $MgCl_2$ 0,01% Deoxycholat 0,02% NP-40
X-Gal-Stammlösung	50 mg X-Gal/ml N.N.-Dimethyl-formamid

2.7 Medien, Antibiotika, Agarplatten

2.7.1 Medien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar (bei festem Nährmedium)
S.O.C.-Medium	2% 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 Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Für die Selektion wurden der jeweiligen Resistenz entsprechend Carbenicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) bzw. Kanamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) zugegeben.

2.7.2 Medien für eukaryontische Zellkulturen

Die zur Kultur eukaryontischer Zellen verwendeten Medien wurden als sterile Lösung oder als Pulver bezogen und vor Gebrauch mit folgenden Komponenten versetzt:

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 neonatale Kardiomyozyten	4 Teile DMEM, Sigma-Aldrich (D1152) 1 Teil M199, Sigma-Aldrich 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1% (v/v) L-Glutamin
Medium für adulte Kardiomyozyten	M199, Sigma-Aldrich (M7528) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung 1% (v/v) L-Glutamin 5 mM Taurin 5 mM D-,L-Carnitin 5 mM Creatin
Medium für embryonale Mausfibroblasten	DMEM Basal Medium (Invitrogen/Gibco) 15% FKS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung

2.8 Biologisches Material

2.8.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α [Hanahan, 1983]	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4]	Qiagen, Hilden
<i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold	Stratagene, La Jolla (USA)

2.8.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	
HeLa [Scherer <i>et al.</i> , 1953]	DSMZ, Braunschweig
QBI-HEK-293A [Graham <i>et al.</i> , 1977]	Microbix, Toronto (Canada)

2.8.3 Adenoviren

Adenovirus	biologische Aktivität
Ad-Balt-CMV β gal (lacZ)	5,4x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-BRAP-Flag	1,41x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-CFP/YFP-BRAP	1,43x10 ¹⁰ Pfu/ml
Ad-Raf-BXB (von Dr. Luis Parada; [Klesse <i>et al.</i> , 1999])	2,07x10 ¹⁰ Pfu/ml

2.8.4 Mausstämme

Die verwendeten Mäuse der Stämme FVB/N und C57B6/J stammten aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Göttingen) oder wurden von der Firma Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55 ± 5% relativer Luftfeuchtigkeit. Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.8.5 Herkunft des Patientenmaterials

Im Rahmen dieser Arbeit fanden molekularbiologische Untersuchungen an der RNA aus Myokardbiopsien von Patienten mit der klinischen Diagnose einer dilatativen oder ischämischen Kardiomyopathie statt. Die Gewebe-Proben der Patienten wurden zum Zwecke der Grundlagenforschung aus der Abteilung Herz-Thorax-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Göttingen und aus dem Herzzentrum Bad Oeyenhausen bezogen. Die Verwendung ist durch die Ethikkommission der Universität Göttingen genehmigt und die Patienten haben schriftlich ihre Zustimmung erklärt.

2.8.6 Antikörper

Primärantikörper	Bezugsquelle
anti-phospho-ASK1, monoklonaler Antikörper (ab45178), Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-phospho-Bad (Ser112), monoklonaler Antikörper (#9296), Maus	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-Bax, polyklonaler Antikörper (sc-493), Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bcl2, monoklonaler Antikörper (sc23960), Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-BRAP, polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen
anti-Caspase 9, polyklonaler Antikörper (#9504), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach

Primärantikörper	Bezugsquelle
anti-CHCHD3, polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Eurogentec, Köln
anti-Cytochrom C, polyklonaler Antikörper (#4272), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-Cytochrom C-Oxidase, polyklonaler Antikörper (#4844), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-Erk, polyklonaler Antikörper (#9102), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-phospho-Erk, monoklonaler Antikörper (#9106), Maus	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-Flag M2-Agarosekonjugat, monoklonaler Antikörper, Maus	Sigma Aldrich, München
anti-Flag M2, monoklonaler Antikörper, Maus	Sigma Aldrich, München
anti-gamma Tubulin, monoklonaler Antikörper (ab11316), Maus	Abcam, Cambridge (UK)
anti-GAPDH, monoklonaler Antikörper, Maus	Biotrend Chemikalien, Köln
anti-phospho-JNK, monoklonaler Antikörper (sc6254), Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Mek, polyklonaler Antikörper (#9122), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-phospho-Mek, polyklonaler Antikörper (#9154), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-phospho-MKK3/MKK6, polyklonaler Antikörper (#9231), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-NFATc2, monoklonaler Antikörper (sc7296), Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-phospho-p38, polyklonaler Antikörper (#9211), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-Raf1, polyklonaler Antikörper (sc-133), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-B-Raf, monoklonaler Antikörper (#9434), Maus	Abcam, Cambridge (UK)

Primärantikörper	Bezugsquelle
anti-phospho-B-Raf (S445), polyklonaler Antikörper (#26965), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach
anti-H-Ras, polyklonaler Antikörper (sc-520), Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-phospho-SEK1/MKK4, polyklonaler Antikörper (#9156), Kaninchen	New England Biolabs GmbH, Bad Schwalbach

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Anti-mouse IgG, <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (from sheep)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-mouse IgG FITC-linked Antibody, Alexa 488 (A21202), (from donkey)	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-rabbit IgG Cy3-linked Antibody (from goat)	Dianova, Hamburg
Anti-rabbit IgG <i>Horseradish peroxidase</i> -linked whole Antibody (from donkey)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.8.7 DNA-Plasmide

Plasmid/Vektor	Bezugsquelle
p α MHC [Guilick <i>et al.</i> , 1991]	J. Gulick/ J. Robbins, Cincinnati (USA)
p α MHC-tet	J. Gulick/ J. Robbins, Cincinnati (USA)
pBHGfrt Δ E1,3FLP	Microbix, Toronto (Canada)
pCEP4CyPet-MAMM	Addgene, Cambridge (USA)
pCEP4YPet-MAMM	Addgene, Cambridge (USA)
pCR259	MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)
pDC511	Microbix, Toronto (Canada)
pGBKT7	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pQE-31	Qiagen, Hilden

2.8.8 DNA-Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Insert	Beschreibung	
		Nucleotidpos./ Datenbank Nr.	Amplifikation: Primer/Template	Restriktionsenzyme
p α MHC - BRAP-Flag	p α MHC	186-2272/ NM_006768.3	cDNA BRAP (human)	
			-	<i>HindIII</i> (aus pCR259- BRAP-Flag)
p α MHC-tet- BRAP-Flag	p α MHC- tet	186-2272/ NM_006768.3	cDNA BRAP (human)	
			-	<i>HindIII</i> (aus pCR259- BRAP-Flag)
pCR259- BRAP-Flag	pCR259	186-2272/ NM_006768.3	cDNA BRAP (human)	
			BRAP-restr-f/r cDNA human	<i>EcoRI/KpnI</i>
pDC516- CyBrpY	pDC516	(BRAP186-2272/ NM_006768.3), YPet, CyPet [Nguyen und Daugherty, 2005],	YPet, CyPet, cDNA BRAP (human)	
			CyPetEcoRI-f/r/pCEP4CyPet- Mamm; YPet- <i>BamHI</i> - f/EcoRV-r/ pCEP4YPet- Mamm	<i>EcoRI</i> und <i>BamHI/EcoRV</i>
pDC516- BRAP-Flag	pDC516	186-2272/ NM_006768.3	cDNA BRAP (human)	
			-	<i>HindIII</i> (aus pCR259- BRAP-Flag)
pQE31- BRAP-His	pQE31	173-1974 NM_028227	cDNA BRAP (Maus)	
			BRAP2-m- <i>BamHI</i> -f, BRAP2- m- <i>HindIII</i> -r/ Maus-cDNA	<i>BamHI/HindIII</i>
pGBKT7- BRAP	PGBKT7	186-2272/ NM_006768.3	cDNA BRAP (human)	
			BRAP259-f/r pCR259-BRAP-Flag	<i>BamHI/EcoRI</i>

2.8.9 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon bezogen, mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt und als Stocklösung bei -20°C gelagert.

Name	Sequenz
Acad10-f	5'-CGG TGA AGT ACG GTT CAA GGA-3'
Acad10-r	5'-GGG ACA TCA CCC GTG TCT TC-3'
aMHC-P1-f	5'-GGT GGT GTA GGA AAG TCA GG-3'
BRAP259-f	5'-GGC TAG CCT CGA GAA TTC AAG C-3'
BRAP259-r	5'-CCT GGG ATC CAT GGT GGA TCA CTT GC-3'
BRAP-int-f	5'-CAA GCT AAA AGA GGA GGA GAG G-3'
BRAP-restr-f	5'-ACA GGA ATT CAA GCT TGC CTG CCC TAT GAG TGT GTC ACT-3'
BRAP-restr-r	5'-ATA TGG TAC CTA TTG GAT CCC TTG CCC CTC TTG CT-3'
BRAP-RT-Maus-f	5'-ACA AAA TCG TGC GCA TAG AGA-3'
BRAP-RT-Maus-r	5'-ACT TGT TCA GCT CCT GCT CCT-3'
BRAP-RT-human-f	5'-CGG ATA GAG AAG GAC ACA GCA-3'
BRAP-RT-human-r	5'-CTC CTC TTT GAG CTC GTT GGT-3'
BRAP2-m-BamHI-f	5'-GCG GAT CCT ATG AGT GTG TCA CTG G-3'
BRAP2-m-HindIII-r	5'-GGA CAA GCT TCT GAT GGT CAC TTG C-3'
CyPet-EcoRI-f	5'-GGA ATT CCC GGT CGC CAC CAT G-3'
CyPet-EcoRI-r	5'-TTG TAG AAT TCG TCC ATG CCG TG-3'
Flag-r	5'-TCG TCG TCA TCC TTG TAA TCC-3'
Hgh-P1-r	5'-TTT ATT AGG ACA AGG CTG GTG-3'
BRAP-I4a-f	5'-CAT TGT TCC TCT TGC CTG CAC-3'
BRAP-I4b-f	5'-CCC ACC ACT ACA GAG GCA GAG-3'
BRAP-I4c-f	5'-CAG CCT TCT GAC GTG GGA TTA-3'
BRAP-I4d-f	5'-GGA CCT CCC TCG TGT GCT TAT-3'
BRAP-I4e-f	5'-AGC CAG TGC CTT GTG CTG TAG-3'
BRAP-I4f-f	5'-TGA GCT GGC TTT TCA TCC GTA-3'
BRAP-I4a-r	5'-ACG CTA TGT GGG TGG GAG AC-3'
BRAP-I4b-r	5'-AGT CAC TTG CCC CAA GCC TA-3'
BRAP-I4c-r	5'-TAC ACC CGC TTT CCC CTC TA-3'
BRAP-I4d-r	5'-ACC TGC AGG CAA AAC ACT CA-3'
BRAP-I4e-r	5'-CAG AAG AGG GCG TCT GAT CC-3'
BRAP-I4f-r	5'-TTC AAT TCC CAG CAA CCA CA-3'
BRAP-GT-f	5'-CAT ACA GGC AAA ACA CCC TCA-3'
BRAP-GT-r	5'-TCT AGG ACA AGA GGG CGA GAC-3'

Name	Sequenz
BRAP-WT-r	5'-CTG CTC TTT CAT GGT GGC ATA-3'
mMCHIP1ex4-5-f	5'-TCC AGC TTG GGC TTG ACT GAG-3'
mMCHIP1ex4-5-r	5'-ACT GGA AGG TGG TGT CCT TGT-3'
pGTlox-r	5'-GCG GGC CTC TTC GCT ATT AC-3'
pQE-Seq-f	5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'
18S-RT-f	5'-CGA AAG CAT TTG CCA AGA AT-3'
18S-RT-r	5'-GAG GTT TCC CGT GTT GAG TC-3'
Ypet-BamHI-f	5'-CGG TCG GAT CCA TGG TGA GCA AAG-3'
Ypet-EcoRV-r	5'-TCC GAT ATC CGC TTT ACT TAT AGA-3'

2.8.10 Längenstandards

Um die Größe von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen zu bestimmen, wurden folgende Längenstandards parallel mitgeführt:

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

2.9 Datenbanken und Analyse-Software

Folgende Programme wurden zur Bearbeitung und Auswertung von Daten verwendet:

Programm	Verwendung
Alpha Ease FC Version 4.1.0 (Alpha Innotech)	Densitometrische Auswertungen
Axio-Vision 4.0 (Zeiss)	Fluoreszenzmikroskop
BLAST-Programm [Altschul <i>et al.</i> , 1990] http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Analyse von DNA-Sequenzen

Programm	Verwendung
BLAT-Search [Kent, 2002] http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat	Überprüfung der Spezifität von Primern
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 Real-time PCR Daten
Mascot http://www.matrixscience.com/	Auswertung von Massenspektrometrie-Daten
NEB Cutter 2.0 http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Restriktions-Schnittstellen Kartierung
NetPhosK 1.0 http://www.cbs.dtu.dk/services/NekPhosK	Phosphorylierungs- und Kinase-Vorhersage
Phosida http://www.phosida.de	Phosphorylierungs- und Kinase-Vorhersage
Primer3 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi	Auswahl von Oligonukleotiden für PCR

2.10 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.10.1 Minipräparation von Plasmid DNA

Zur schnellen Isolierung rekombinanter Plasmide im analytischen Maßstab wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Hierzu wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei $16000 \times g$ zentrifugiert und das Pellet in 250 μ l RNase enthaltener P1-Lösung resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 250 μ l der alkalischen P2-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die DNA wird unter diesen Bedingungen denaturiert. Durch rasche Zugabe der P3-Lösung erfolgt eine schlagartige Neutralisation, wodurch die genomische DNA ausfällt, während die Plasmid DNA renaturiert und gelöst bleibt. Nach Abzentrifugation der denaturierten Proteine und genomischer DNA wurde der Überstand auf Silika-Säulen gegeben. Die Plasmid DNA bindet bei hoher Salzkonzentration und geringem pH Wert an der Silika-Membran. Die Elution erfolgt unter geringer Salzkonzentration und einem pH Wert über 7 in Wasser.

Die Qualität dieser DNA ist hinreichend gut, um sie in Restriktionsanalysen und für die Isolierung von DNA-Fragmenten einzusetzen.

2.10.2 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks

500 μ l einer Bakteriensuspension wurden mit 500 μ l sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.10.3 Midipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das HiSpeed® Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse isoliert und über Anionen-Austausch Säulen aufgereinigt. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der alkalischen Lyse folgte die Bindung der Plasmid-DNA an das Anionen-Austausch Säulenmaterial bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH Wert. RNA und Proteine wurden durch Waschen mit Pufferlösungen mittlerer Salzkonzentration eluiert und verworfen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in Puffer mit hoher Salzkonzentration. Zuletzt wurde die DNA mittels Isopropanol gefällt.

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

2.10.4 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

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%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H_2O aufgenommen.

2.10.5 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Reinigung der DNA von Proteinen und Membranbestandteilen [Kirby, 1956; Marmur, 1960]. Die zu extrahierenden DNA-Proben wurden mit gleichen Volumina Phenol versetzt und intensiv gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei $16000 \times g$ für 2-5 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Extraktion nun mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. Die sich in der wässrigen Phase befindende DNA wurde anschließend einer Ethanolfällung (2.10.4) unterzogen.

2.10.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurde das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die RNA wird durch eine Kombination von Guanidinsalzen, Phenol und 1-Bromo-3-chloropropan extrahiert. Die kultivierten adhärennten Zellen wurden mit DPBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und anschließend bei 4°C und $500 \times g$ für 5 min zentrifugiert, so dass die pelletierten Zellen weiter verarbeitet werden konnten. Die Zellen wurden mittels QiaShredder®-Säulen homogenisiert und die RNA-Isolation erfolgte durch eine Silikamembran-basierte Säulenaufreinigung. Zum Schutz vor RNasen wurden RNase-freie Kunststoff-Einweggefäße und Filterspitzen verwendet.

2.10.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe

Herzgewebe unterscheidet sich von anderen Organgeweben durch seinen hohen Anteil an kontraktilen Proteinen und Bindegewebe, die den Zellaufschluss und die RNA-Isolierung erschweren. Zur RNA-Isolierung aus Herzgewebe wurde daher das RNeasy® fibrous tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Der RNA-Isolierung geht hierbei eine Inkubation mit Proteinase K voraus. Etwa 30 mg Herzgewebe wurde in gefrorenem Zustand in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl RLT-Puffer (inklusive beta-Mercaptoethanol) überführt und umgehend mittels eines Rotor-Stator Homogenisators der Firma ART Labortechnik (Mühlheim) homogenisiert. Das weitere Vorgehen entsprach der RNA-Isolierung aus Zellen.

2.10.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Nach Abgleichen des Nullwertes konnte die Absorption der gemessenen Nukleinsäurelösung (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 320 nm) festgelegt werden. 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 µg/µl

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

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA und sollte $\geq 1,8$ betragen. 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.

Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die zu bestimmenden Banden wurden mit Banden des Standards ähnlicher Größe verglichen und so die DNA-Konzentration in der Probe abgeschätzt.

2.11 Klonierungstechniken

2.11.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

2.11.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden), basierend auf der Methode von Vogelstein und Gillespie [1979]. Die gewünschte Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht (354 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA den Herstellerangaben folgend extrahiert. Nach dem Lösen der Agarose wurde die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze selektiv an eine Silika-Membran gebunden und anschließend mit Wasser eluiert.

2.11.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation linearisierter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde falls nötig, eine Dephosphorylierung durchgeführt. Die endständigen 5'-Phosphatgruppen des DNA-Plasmids wurden mithilfe des Enzyms *Shrimp Alkaline Phosphatase* entfernt. Dazu wurde die DNA mit einer Unit *Shrimp Alkaline Phosphatase* pro µg DNA für 1 h bei 37°C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte für 15 min bei 65°C.

2.11.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung von linearisierten DNA-Fragmenten. Das Enzym Fast-Link™ DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der linearisierten DNA, so dass rekombinante DNA-Moleküle entstehen. In der Regel wurden folgende Mengen 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
ad 15 µl	H ₂ O

Bei einer Ligation cohesiver Enden wurde ein Insert zu Vektor Verhältnis von 2:1 (Mol DNA) gewählt. Bei *Blunt End* Ligationen wurde das Verhältnis auf 5:1 erhöht und die ATP Konzentration auf 0,5 mM verringert.

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

2.11.5 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation eelektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde nach Dower et al. [1988] durchgeführt. Für die Transformation wurde zunächst ein 50 µl-Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 1-2 µl des Ligationsansatzes hinzugefügt und unverzüglich in eine auf -20°C gekühlte *E.coli* Pulser® Cuvette (Bio-Rad Laboratories, München) überführt. Die Bakterien wurden dann einem elektrischen Impuls von 2,5 kV, 25 µF (EasyjecT basic Elektroporationssystem, Equi Bio, Kent (UK)) ausgesetzt. Anschließend wurden umgehend 500 µl SOC-Medium zugegeben, die Bakterien darin vorsichtig resuspendiert und in ein Kulturröhrchen überführt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln. Zuletzt wurden 50-500 µl der transformierten Zellen auf Agarplatten ausgestrichen, die der Resistenz des transformierten Plasmids entsprechende Antibiotika enthielten. Einzelkolonien zeigten sich nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C.

2.12 Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Eine Gelmatrix bewirkt, dass die Laufgeschwindigkeit der Moleküle im elektrischen Feld mit steigender Molekülgröße abnimmt, wodurch eine Größentrennung der DNA-Fragmente erfolgt.

Agarose, die durch Aufkochen in 1× TBE-Puffer gelöst wird, bildet nach dem Abkühlen ein Netzwerk aus Zuckerketten, wodurch eine Gelmatrix entsteht. Ihre Porengröße kann durch die Agarose-Konzentration (0,5% bis 2% (w/v)) variiert werden. Nach kurzem Abkühlen der aufgekochten Agarose wurde diese mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt und in den Gelträger überführt, der einen Kamm zur Ausbildung von Geltaschen enthielt. Ethidiumbromid interkaliert in dsDNA und lässt diese unter UV-Licht fluoreszieren. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die Gelkammer mit 1× TBE-Puffer gefüllt und die mit Ladepuffer beschwerten Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde ein geeigneter Längenstandard neben die Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei konstanter Spannung von 50-120 V.

2.13 Southern Blot

Für den Southern Blot [Southern, 1975] wurden je 15-20 µg genomische DNA einer Restriktionsspaltung unterzogen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde im Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, fotografiert und anschließend bei RT unter Schütteln für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dadurch kommt es zur partiellen Depurinierung und infolgedessen zur Fragmentierung der DNA, wodurch der spätere Transfer großer Fragmente verbessert wird. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation in Denaturierungslösung und eine 45 minütige Inkubation in Neutralisierungslösung. Die so behandelte einzelsträngige DNA wurde durch ein modifiziertes Kapillarblotting-Verfahren mit einem Turbo-Blotter™ der Firma Schleicher & Schüll (Dassel) auf eine Hybond XL-Nylonmembran mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften übertragen und durch Quervernetzung mit UV-Licht (UV Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg, 254 nm, 120 mJ) fixiert. Der Southern Blot wurde den Herstellerangaben folgend mit 20× SSC als Transferpuffer durchgeführt und erfolgte für 6-16 h bei RT.

2.13.1 Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung

2.13.1.1 *Random prime*-Markierung

Für die Markierung von DNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-Isotopen wurde das Rediprime™ Random labelling Kit II (GE-Healthcare, München) verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip des *random priming*, welches von Feinberg und Vogelstein [1983] entwickelt wurde. Der Reaktionsmix enthält dATP, dGTP, dTTP, Klenow Fragment (4-8 U) und zufällige Oligodesoxyribonukleotide, hauptsächlich Nonamere. 25-50 ng der DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 45 μl bei 100°C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde dann in das Rediprime-Reaktionsgefäß überführt, 4 μl [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (40 μCi) zugegeben und gut gemischt. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37°C für 30-60 min. Anschließend wurde die markierte DNA mit Hilfe einer MicroSpin S-200HR Säule (GE-Healthcare, München), den Herstellerangaben folgend, von nicht eingebautem [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP befreit.

2.13.1.2 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Verminderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit der fixierten DNA für mindestens 2 h bei 65°C in mit denaturierter Lachsspermien-DNA versetztem Rapid-Hyb-Puffer (GE-Healthcare, München) im Rollofen (Bachofer, Reutlingen) prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie die Prähybridisierung. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschrte: zunächst 15 min in 2 \times SSC, dann 10 min in 2 \times SSC mit 0,1% SDS und zuletzt solange in 0,2 \times SSC bei 65°C bis die Hintergrundaktivität deutlich abgesunken war. Die Membran wurde getrocknet, eingeschweißt und mit einem Autoradiographiefilm in eine Kassette eingelegt. Der Film wurde dann bei -70°C je nach Aktivität einen Tag bis eine Woche exponiert und anschließend entwickelt.

2.14 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Saiki *et al.*, 1985] ist es möglich, *in vitro* kleinste Mengen von Nukleinsäuren zu amplifizieren und damit weiteren Experimenten zugänglich zu machen. Die Spezifität der Amplifikation wird durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) gewährleistet, die einen definierten DNA-Abschnitt flankieren. Von ihnen ausgehend synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase zu den Einzelsträngen komplementäre DNA-Fragmente, so dass der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern in einem Zyklus verdoppelt wird. Die neu entstehenden DNA-Stränge stehen wieder als Matrize für die Synthese weiterer Stränge in den folgenden Zyklen zur Verfügung.

Ein Zyklus der DNA-Amplifikation besteht aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstrangs (*Annealing*) und die Synthese der DNA durch die Polymerase in 5'→3'-Richtung (*Elongation*). Durch Wiederholung dieses Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz. Durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-Polymerase des Archaeabakteriums *Thermus aquaticus* [Chien *et al.*, 1976] wurde die Automatisierung der PCR in programmierbaren Thermocyclern ermöglicht.

Zur Durchführung einer PCR wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß vereinigt:

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

Die DNA-Amplifikation erfolgte in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research (Watertown, USA). Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße und den Primer-Eigenschaften wurden die Zeit für die Elongation und die Temperatur der Primer-Anlagerung 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>

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

2.14.1 Reverse Transkription

Bei der Erststrang-Synthese dient die mRNA als Matrize für das Enzym Reverse Transkriptase, welches eine zur mRNA komplementäre cDNA synthetisiert. Hierfür wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet und das Protokoll entsprechend den Angaben des Herstellers bearbeitet [Loh *et al.*, 1989]. Als Primer wurden Zufalls-Hexamere verwendet. Diese hybridisieren an unterschiedlichen Stellen der mRNA und gewährleisten, dass letztlich alle Bereiche der mRNA in der cDNA vertreten sind. Auf diese Weise können auch mRNAs mit einer Länge größer als 1-2 kb nachgewiesen werden. Die verwendete SuperScript™ II RT ist eine modifizierte Reverse-Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT). Es handelt sich hierbei um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die über keine intrinsische RNaseH-Aktivität verfügt und sich durch eine erhöhte Temperaturtoleranz auszeichnet. Diese Fähigkeiten ermöglichen ebenfalls die Synthese längerer Transkripte. Die synthetisierte cDNA diente anschließend als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion.

2.14.2 Quantitative *Real-time* PCR

Real-time PCR bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Die Messung der Produktzunahme geschieht anhand von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit der Produktmenge emittiert wird. Eine Möglichkeit zur Generierung produktabhängiger Fluoreszenz bieten dsDNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Hier wurde der Cyaninfarbstoff SYBR-Green I [Jin *et al.*, 1994; Singer *et al.*, 1994], bezogen als iQ™ SYBR Green Supermix (Bio Rad Laboratories, München), verwendet. Der Farbstoff bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, mit einer etwa 100 Mal höheren Affinität als Ethidiumbromid. Das derart gebundene SYBR-Green fluoresziert nach Anregung etwa 1000 Mal stärker als der freie Farbstoff, weshalb SYBR-Green sehr gut geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen [Morrison *et al.*, 1998]. SYBR-Green ist in Gegenwart von doppelsträngiger DNA mit Blaulicht (480 nm) anzuregen und zeigt ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 520 nm.

Die Analyse wurde im 96-Well Maßstab mit dem iQ5™ Multicolor *Real-Time* PCR Detection System der Firma Bio Rad (München) durchgeführt. Dieses System arbeitet mit einem Temperatur-Cycler, einer Wolfram-Halogen Lampe und entsprechenden Filtern zur Anregung des SYBR-Green Farbstoffs. Ein CCD (*Charge-coupled Device*)-Detektor erfasst ein simultanes Bild aller 96 Wells. Die Daten wurden mithilfe der iQ5™ Optical System Software (Version 2.0) bearbeitet, exportiert und in Excel (Microsoft) ausgewertet. Die Reaktions-Ansätze enthielten je 0,5 µM der Oligonukleotide und 10 µl 2× iQ5™ 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 zugefügt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde das für die PCR-Reaktion spezifische Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt, die DNA Konzentration photometrisch bestimmt und eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die DNA wurde zur Erhöhung der Stabilität in mit Hefe-t-RNA versetztem sterilem Wasser (für Injektionszwecke) auf Konzentrationen zwischen 1 ng/µl bis 0,5 fg/µl gebracht. Der Bereich der Standardkurve musste für jedes Gen abhängig von seiner Expression angepasst werden. Um das Auftreten von unspezifischen Produkten auszuschließen, wurde nach Abschluss der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz (F) bei steigender Temperatur (T) gemessen und die Steigung dF/dT (1. Ableitung) errechnet. Diese wurde gegen die Temperatur aufgetragen und damit die Maxima bei den Primer-spezifischen Schmelztemperaturen aufgezeigt. Zusätzliche Maxima 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 absolute Quantifizierung der Expression erfolgt bei der *Real-time* PCR anhand des Verhältnisses der initialen Template-Menge des zu untersuchenden Zielamplikons und eines Referenzamplikons, das unter identischen Bedingungen amplifiziert wird. Durch die Verwendung eines sogenannten *housekeeping* Gens wie zum Beispiel der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder der 18S-rRNA als Referenzamplikon kann auf die eingesetzte cDNA-Menge normalisiert werden. Bei der Auswertung wird ein Signal-Schwellenwert definiert, bei welchem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befinden sollte. Der Zeitpunkt (in Zyklen), zu dem das Signal diesen Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus oder C_T -Wert (*threshold cycle*). Dieser C_T -Wert korreliert mit der Template-Menge, die für die Reaktion eingesetzt wurden. Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, resultiert eine höhere oder niedrigere Template-Menge in einem signifikant früheren oder späteren Anstieg der Fluoreszenz-Emission.

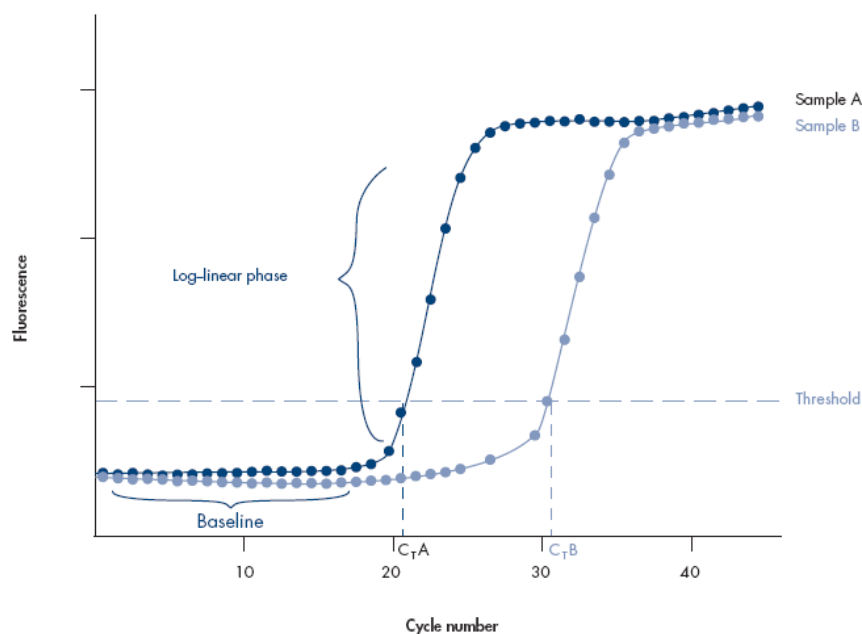


Abb. 2.2: Zunahme der Fluoreszenz zweier Proben (A und B) in Abhängigkeit der PCR-Zyklus-Anzahl. Probe A enthält eine größere Menge an Template als Probe B und überschreitet den Schwellenwert daher bei einem früheren Zyklus als Probe A. C_T : Schwellenwertzyklus. Quelle: QuantiTect SYBR-Green PCR Handbook, Qiagen (2003).

Aus den Daten der Standardkurven für jedes Amplikon interpoliert das Programm iQ™5 die theoretisch eingesetzte cDNA-Menge für Referenzamplikon und Testamplikon jeder Probe. Die Berechnung wurde zur Auswertung der Ergebnisse in Excel durchgeführt.

2.15 Zellbiologische Methoden

2.15.1 Zellkultur eukaryontischer Zelllinien

Die adhärent wachsenden QBI-HEK-293A- und HeLa-Zellen wurden in basal Iscove-Medium (Biochrom AG, Berlin) unter Zusatz von 1% Antibiotic/Antimycotic-Solution und 8% FKS in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen 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 geteilt. 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 ablösten. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Medium gestoppt und 5-10% dieser Zellsuspension zur weiteren Kultur verwendet.

2.15.2 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryontischer Zellen

Die bis zu einer Konfluenz von 80-90% gewachsenen Zellen wurden mit DPBS gewaschen, mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in einer entsprechenden Menge FKS (fötales Kälberserum) mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden schonend in einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox eingefroren. In dieser findet eine langsame Abnahme der Temperatur mit einem Grad Celsius pro Minute statt. Nach einer Woche Aufbewahrung bei -70°C wurden sie in flüssigem Stickstoff konserviert. Zur Revitalisierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium zur vollständigen Entfernung des DMSO gewechselt.

2.15.3 Zellkultur primärer Zellen

2.15.3.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten

Die Gewinnung isolierter Rattenkardiomyozyten erfolgte an der modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage. Hierzu wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200-250 Gramm aus der Tierzucht der Universitätsmedizin Göttingen verwendet. 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 mittels Isofluraninhalation anästhesiert. Nach dem Eintritt der Anästhesie wurde schnellstmöglich der Thorax der Tiere eröffnet, das Herz freigelegt und 625 Injektionseinheiten (I.E.) Heparin in das linke Atrium injiziert. Anschließend wurde das Herz mit einem langen Aortenstumpf entnommen. Das im Herzen verbleibende Blut wurde in einem Becherglas mit eiskühler Tyrodelösung (inklusive 1,25 mM Kalziumchlorid) behutsam ausgespült. Durch Einführen einer Kanüle in den Aortenstumpf erfolgte die Aufhängung des Herzens an der Langendorff-Apparatur zur Perfusion. Mittels einer Pumpe wurde das Herz mit einer Flussrate von 8-10 ml/min retrograd perfundiert (Langendorff-Perfusion) [Marsh, 1979]. Die für die Perfusion verwendeten Lösungen wurden während des Isolationsprozesses mit 100% Sauerstoff begast und auf 37°C vorgewärmt. Die erstmals 1895 von Oscar Langendorff beschriebene Apparatur beruht auf dem Prinzip der Aufrechterhaltung der Herzfunktion durch die Zufuhr einer oxigenierten, alle notwendigen Nährstoffe enthaltenden Flüssigkeit über die Aorta ascendens. Die retrograde Applikation der Nährlösung über die Aorta ascendens bewirkt einen Verschluss der Aortenklappe und konsekutiv eine Perfusion der Koronargefäße [Langendorff, 1895]. Zunächst erfolgte die Perfusion mit einer kalziumchloridhaltigen Tyrodelösung, bis das Herz kräftig und regelmäßig zu schlagen begann. Im Anschluss folgte eine circa fünfminütige Perfusion mit 400 ml einer kalziumfreien Tyrodelösung bis zum vollständigen Sistieren der Perfusion. Nun wurde das Herz circa 15-20 min mit einer kollagenasehaltigen Enzymlösung perfundiert, was dem Organ eine weiche Konsistenz verlieh. Jetzt konnten die Ventrikel vom Herz abgetrennt und in einem Erlenmeyerkolben mit der aufgefangenen Kollagenaselösung vorsichtig zerteilt werden.

Während der nun folgenden 20minütigen schüttelnden Inkubation bei 200 U/min und 37°C wurde der Gewebeaufschluss fortgesetzt. Behutsames Auf- und Abpipettieren des verbleibenden Gewebes bewirkte, dass möglichst viele Zellen aus dem Zellverband gelöst werden konnten. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz gefiltert. Die Kollagenaselösung wurde in einer 1:1-Verdünnung mit Tyrodelösung mit 0,125 mM Kalzium verdünnt und eine Sedimentation der Zellen abgewartet. Nun wurde die Kollagenaselösung abgenommen und es folgten mehrfache Waschkvorgänge der Zellen mit Tyrodelösungen mit ansteigenden 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. Es folgte die Zellzählung nach Tryptan-Blau-Färbung. Dafür wurden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl Tryptan-Blau-Lösung vermischt, um nicht-vitale Zellen kenntlich zu machen und die Morphologie der Zellen beurteilen zu können. Durchschnittlich betrug die Gesamtzahl an vitalen Zellen circa vier Millionen bei einem Verhältnis von intakten Zellen zu der Gesamtzahl der mittels eines Mikroskops sichtbaren Zellen von etwa 70%.

2.15.3.2 Kultivierung von Kardiomyozyten adulter Ratten

Die isolierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden in 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 für den jeweiligen Versuch angemessene Zellzahl in M199-Medium verdünnt und ausplattiert. Unmittelbar im Anschluss erfolgte gegebenenfalls die adenovirale Transfektion der Zellen (2.15.4.2). Nach maximal vierstündiger Inkubationszeit wurde das M199-Medium gewechselt. So konnten einerseits nicht adhärenente Zellen wieder abgesaugt sowie andererseits die Virustransfektion terminiert werden. Nach Hinzufügen von frischem M199-Medium wurden die Kardiomyozyten über 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.15.3.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die Isolation neonataler Kardiomyozyten der Ratte erfolgte aus maximal zwei Tage alten Wistar-Ratten eines Wurfes (meistens 10-14 Tiere) 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 Tiere wurden durch Dekapitation getötet, auf einer Styroporunterlage fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, das Herz freigelegt und die Ventrikel abgetrennt. Die Ventrikel wurden in einem Becherglas mit 1x PBS-Lösung gesammelt. Von nun an erfolgte die Isolation unter sterilen Bedingungen. Zu Beginn wurden die Herzen, die in eine 10 cm Zellkulturschale mit 3 ml einer Enzymlösung, bestehend aus 0,2% Trypsin und 0,1% Collagenase in 1x PBS überführt wurden, mechanisch mit einer Schere zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde dann in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Es folgten vier Inkubationsschritte, während denen das in der Enzymlösung befindliche Herzgewebe jeweils 14 min lang auf einer magnetischen Heizplatte bei 37°C inkubierte und dabei mittels eines Rührmagneten mit einer Geschwindigkeit von 180 rpm gerührt wurde. Während dieser Phase der Isolation wurden die Zellen durch die Enzymaktivität aus dem Zellverband gelöst. Nach jedem abgeschlossenen 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 überführt, welches dann im Zellkulturinkubator bei ebenfalls 37°C gelagert wurde. Zu der, im Erlenmeyerkolben verbleibenden Gewebesuspension wurden vor jedem Inkubationszyklus erneut 10 ml vorgewärmte Enzymlösung hinzugefügt. Die vier 50 ml Falcon-Röhrchen mit der Zellsuspension wurden nun bei 400 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in insgesamt 20 ml DMEM:F12-Medium resuspendiert und in einem der Röhrchen gesammelt. Um die Kardiomyozyten von anderen, im Herzgewebe befindlichen Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten zu separieren, wurde die Zellsuspension für 45 Minuten bei 37°C in zwei 10 cm Zellkulturschalen inkubiert. Bei diesem so genannten Präplattieren adhären Fibroblasten im Gegensatz zu Kardiomyozyten rasch an unbeschichteten Zellkulturschalen. Die im Medium-Überstand enthaltenen Kardiomyozyten wurden von den Platten abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Um verbleibende Fibroblasten im Folgenden am Wachstum zu hindern, wurde dem Kulturmedium ein 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.

2.15.3.4 Kultur von Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die isolierten Rattenkardiomyozyten wurden auf Zellkulturschalen ausplattiert, die vorher mit einer Gelatinelösung, bestehend aus 2% Gelatine gelöst in 0,1 N HCl, beschichtet worden waren. Die frisch isolierten Zellen wurden in 4:1-DMEM/M199-Medium ausplattiert. Nach 18 Stunden wurden die toten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit DMEM-Medium entfernt und die adhären Zellen mit frischem 4:1-DMEM/M199-Medium versorgt. Im Anschluss daran erfolgte gegebenenfalls die adenovirale Transfektion der Zellen (2.15.4.2). Die Zellen wurden dann 24-48 h lang in einem Inkubationsschank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und im Anschluss im Rahmen des jeweiligen Versuches weiterbearbeitet.

2.15.3.5 Planimetrie von Kardiomyozyten neonataler Ratten

Neonatale Rattenkardiomyozyten können durch α - und β -adrenerge Stimulation zu hypertrophem Wachstum angeregt werden. Für die Analyse der zellulären Hypertrophie wurden die Kardiomyozyten so ausplattiert, dass kaum Kontakte zwischen den Zellen bestanden. Auf eine 35 mm Kulturschale wurden 100.000 Zellen ausplattiert. 18 h nach der Zellisolation wurden die Zellen mehrfach gewaschen, um tote Zellen zu entfernen und anschließend adenoviral transfiziert. Zur Induktion eines hypertrophen Wachstums wurde dem Medium Phenylephrin (10 mM), Isoprenalin (1 mM) und Endothelin (10 μ M) zugesetzt. Eine Hemmung des programmierten Zelltod wurde durch Zugabe von 50 μ M des Apoptose-Inhibitors ZVAD-FMK erreicht. 48 h nach der Stimulation wurden die Zellen erneut mit Medium gewaschen und mit einer 400fachen Vergrößerung fotografiert. Vor dem Fotografieren wurden die Zellkulturschalen zur verblindeten Auswertung kodiert. Das Ausmessen der Kardiomyozyten erfolgte mit dem Programm ImageJ Version 1.38. Es wurden etwa 100 Zellen pro Schale vermessen. Der Versuch wurde stets in Doppelbestimmung durchgeführt, jeweils zwei Zellkulturschalen wurden gleich behandelt.

2.15.3.6 Isolation und Kultivierung embryonaler Maus-Fibroblasten

Maus-Embryonen vom Tag 9,5 dpc wurden abweichend von 2.23 unter sterilen Bedingungen in Kulturmedium für Fibroblasten präpariert und anschließend mechanisch zerkleinert. Durch fünfminütige Inkubation in einer 0,2%igen Trypsin-Lösung wurde das Gewebe aufgeschlossen und anschließend bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in DMEM-Basal-Medium mit 15% FKS resuspendiert und auf Zellkulturschalen aufgebracht. Die Kultur erfolgte in ebenfalls in DMEM-Basal-Medium mit 15% FKS bei 37°C und 5% CO₂.

2.15.4 Adenoviral vermittelter Gentransfer

2.15.4.1 Herstellung eines modifizierten Adenovirus

Um Proteine in Kardiomyozyten überexprimieren zu können, wurden modifizierte Typ-5-Adenoviren als Gentransfervektoren hergestellt. Hierzu wurde die für das Protein kodierende cDNA in einen Plasmidvektor (*shuttle*-Vektor) kloniert. Dieser Vektor enthält neben der kodierenden DNA unter der Kontrolle eines *Zytomegalie-Virus* (CMV)-Promoters nur kurze Bereiche des viralen Genoms. Vervollständigt wird das virale Genom durch die Sequenz-spezifische Rekombination des *shuttle*-Vektors mit einem größeren Vektor (pBHGfrtΔE1,3FLP) nach simultaner Lipofektion in QBI-HEK-293A-Zellen. Die Rekombination wird durch das Enzym FLP-Rekombinase katalysiert. QBI-HEK-293A-Zellen komplementieren das für die Virus-Replikation essentielle E1-Gen, welches aus dem Virus-Vektor deletiert wurde. Daher können sich die modifizierten Sicherheitsviren nur in diesen Zellen vermehren.

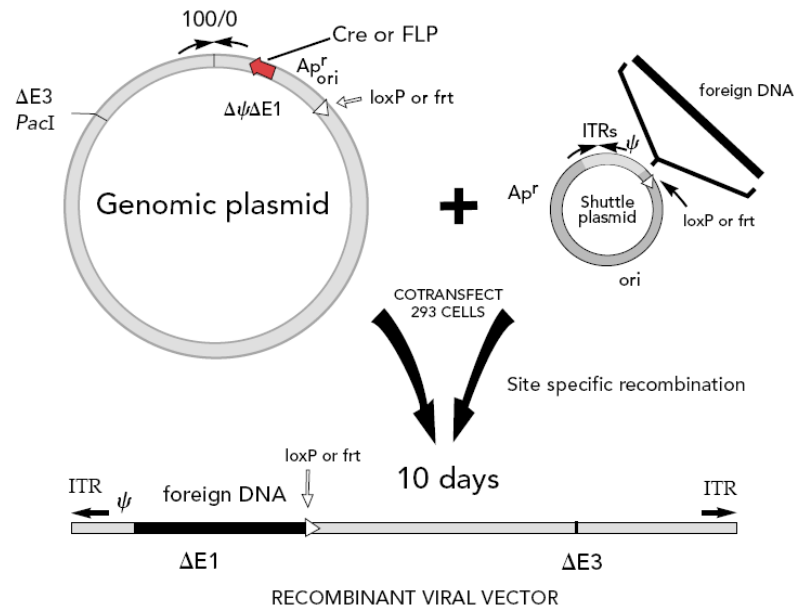


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Prinzips zur Herstellung rekombinanter Adenoviren. QBI-HEK-293A Zellen werden simultan mit dem 40 kb großen Virus-Genom-Vektor und dem kleineren Shuttle-Vektor transfiziert. Durch sequenz-spezifische Rekombination entsteht der rekombinante Virus-Vektor.

Die Transfektion der beiden Virus-Vektoren wurde basierend auf der Lipofektations-Methode durchgeführt. Hierzu wurden in 6-Well Schalen zu 80% konfluent gewachsene 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 ddH₂O, Severn Biotech Ltd.) und einem Teil zweifach konzentriertem basal Iscove-Medium. Nach circa 10-14 Tagen wurden Stellen lokaler Zellyse im vorher konfluenten QBI-HEK-293A-Zellrasen (Plaques) mit einer Luer-Einwegspritze aus der Agarose einzeln ausgestanzt. Diese Plaques entsprechen jeweils einem Bereich, an dem es durch FLP-Rekombinase-vermittelte Rekombination beider Plasmide zu einer klonalen Vermehrung von Virus in den Zellen gekommen ist. Das Virus eines solchen Plaques wurde nun sukzessive vermehrt. Dafür wurden zuerst QBI-HEK-293A-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit dem Virus infiziert und nach deren vollständiger Lyse der Überstand entnommen und damit eine größere Menge QBI-HEK-293A-Zellen in einer 175 cm Flasche infiziert. So entstand eine ausreichende Menge an virushaltigem Überstand für die Infektion von 35 15 cm Zellkulturschalen. Die Kultur der infizierten HEK-Zellen erfolgte stets in basal Iscove-Medium mit 5% FKS bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Lyse wurden die Zellen in dem Medium-Überstand gerntet und zur

vollständigen Lyse der Zellen mit 0,1% NP-40 versetzt und unter konstanter Bewegung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 25minütige Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C zur Pelletierung des Zelldetritus. Zum Überstand wurde anschließend ein halbes Volumen 20% Polyethylenglykol 8000/2,5 M NaCl zugegeben und die Suspension wurde für 4 Stunden in einem 4°C kalten Eiswasserbad inkubiert, damit die Viruspartikel präzipitieren konnten. Die Viren wurden danach durch eine erneute 25minütige Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C pelletiert und anschließend unter kontinuierlicher Rotation in 11 ml PBS, pH 8,0 über Nacht gelöst. Die nachfolgende Zentrifugation bei 800 x g für 2 min diente der Eliminierung von ungelösten Aggregaten. Durch Ultrazentrifugation bei 137000 x g und 16°C in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten über 12 Stunden wurden reine Viruspartikel von beschädigten Viren und dem übrigen Zelldetritus getrennt. Das zelltoxische Cäsiumchlorid wurde durch zweifache Dialyse gegen je fünf Liter Sucrosepuffer [Nyberg-Hoffmann und Aguilar-Cordova, 1999] entfernt. Die Konzentrationsbestimmung des Virus erfolgte zunächst photometrisch bei 260 nm und diente als grober Anhaltspunkt für die Erstellung einer Verdünnungsreihe der Viruslösung. Diese 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 bestimmt.

2.15.4.2 Adenovirale Transfektion isolierter Kardiomyozyten

Bei dem adenoviralen Gentransfer handelt es sich um eine Methode der transienten Transfektion, bei der die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Die Virusmenge für eine Transfektion 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 gemessen in pfu/ml. Verschiedene MOI wurden zur Transfektion verwendet, um bestimmte Niveaus der genetischen Überexpression zu erreichen. Abhängig von der zu transfizierenden Zellzahl und der biologischen Virusaktivität wurde die benötigte Virusmenge für die gewünschte MOI berechnet und dem Kulturmedium der Zellen zugesetzt. Bei sich nicht mehr teilenden adulten Primärzellen wurde nach vierstündiger Inkubation durch Mediumwechsel die Virusinfektion abgestoppt. Teilungsfähige neonatale Kardiomyozyten wurden einen Tag nach der Isolation nach dem Abwaschen toter Zellen transfiziert und das Virus für 24-48 h auf den Zellen belassen.

2.16 Proteinbiochemische Methoden

2.16.1 Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen

Die adhärennten Zellen einer 10 cm-Kulturschale wurden nach vorsichtigem Waschen mit DPBS 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 in 150 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 somit lysiert. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min entfernt. Der die Zellproteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt (2.16.4) und das Lysat bei -80°C aufbewahrt.

2.16.2 Herstellung von Protein-Lysaten aus tierischen Geweben

Die direkt nach dem Abtöten der Mäuse entnommenen Organe wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Herzen wurden zuvor mit kaltem PBS perfundiert, um Blut aus den Ventrikeln und Gefäßen zu spülen. Zur Isolierung der Proteine wurde zu 100-200 mg gefrorenem Gewebe 300-500 µl frisch angesetzter Lysepuffer gegeben und das Material umgehend mittels eines Rotor-Stator Homogenisators der Firma ART Labortechnik (Mühlheim) auf höchster Stufe homogenisiert. Die nichtlöslichen Bestandteile wurden 10 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.16.3 Herstellung von Mitochondrien- und Zytosol-Fractionen

Für die Fraktionierung von Zellen in Mitochondrien und Zytosol wurden etwa 80 mg Herzgewebe in 500 µl HEPES-Lysepuffer homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 500 µl Lysepuffer wurde zweimal für 10 min bei 750 x g und 4°C zentrifugiert und die Pellets verworfen. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 15 min und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Lysepuffer gewaschen und die Mitochondrien zuletzt in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 1 h wurden jegliche Reste von Mitochondrien aus der Zytosol-Fraktion entfernt. Beide Fraktionen wurden gegebenenfalls aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.16.4 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Proteinkonzentration eines Protein-Lysates wurde nach der BCA-Methode [Smith, 1985] mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford (USA)) bestimmt. Die Methode basiert darauf, dass Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung an Proteine binden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbstoffkomplex bilden. Die Komplexe besitzen ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Durch Verwendung einer BSA-Eichreihe (0-2000 µg/ml BSA) als interner Standard konnte die Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden extrapoliert werden. Je 200 µl einer 50:1 Mischung der Lösungen A und B wurden zu 25 µl einer 1:10 - 1:20 Verdünnung der zu messenden Protein Lösung gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der Extinktion in flachbödigen 96well-Mikrotiterplatten bei 562 nm mit Hilfe eines µQuant Universal Microplate-Spektralphotometers (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

2.16.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach dem von Lämmli beschriebenen diskontinuierlichen System mit Tris-Glycinpuffern durchgeführt [Lämmli, 1970]. Es wurde das SDS-PAGE Mini-System PROTEAN 2 bzw. 3 der Firma Bio-Rad Laboratories (München) verwendet. Für Trenn- bzw. Sammelgel wurden folgende Komponenten gemischt und die Gele nach Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N' -

Tetramethylethyldiamin) zügig gegossen:

	10% Trenngel	12,5% Trenngel
Acrylamid-Biscrylamid	3,33 ml	4,17 ml
4x Tris/SDS, pH8,8	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	4,16 ml	3,33 ml
APS	33 µl	33 µl
TEMED	7 µl	7 µl
	10 ml	10 ml

	4% Sammelgel
Acrylamid-Biscrylamid	3,33 ml
4x Tris/SDS, pH6,8	2,5 ml
H ₂ O	4,16 ml
APS	33 µl
TEMED	7 µl
	10 ml

Die Proteinproben wurden mit Lysepuffer auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt, mit 0,4 Volumeneinheiten 4xLämmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Für die Analyse von phosphorylierten Proteinen wurden die Proben dagegen bei 37°C für 10 min inkubiert. 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 (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen.

2.16.6 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese ist eine Methode der Proteinanalyse, bei der die Proteine nach ihrer Molekulargröße und ihrem Ladungszustand aufgetrennt werden. In der ersten Dimension werden die Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Eine anschließende SDS-PAGE trennt die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht auf.

Die Fokussierung wurde in einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) auf IEF-Streifen der Firma GE-Healthcare (München) durchgeführt. Der Gradient wird durch Ko-Polymerisation von *Immobiliner*[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Carboxyl- oder Aminogruppen) mit Acrylamid-Monomeren erzeugt. Im Gegensatz zu früher verwendeten Ampholyten sind *Immobiline*[®] keine amphoteren Substanzen, sondern in Abhängigkeit der puffernden Gruppe schwache Säuren oder Basen mit definiertem pKs-Wert. Der pH-Gradient entsteht durch eine kontinuierliche Veränderung des *Immobiline*[®]-Mischungsverhältnisses während des Gelgießens. Je nach Anwendung sind IPG-Streifen mit verschiedenen pH-Bereichen erhältlich. Im elektrischen Feld bewegt sich jedes geladene Protein in Richtung der Elektrode mit der komplementären Ladung, bis zu dem Bereich der dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins entspricht. Bei diesem pH-Bereich liegt das Protein ungeladen vor und bewegt sich nicht mehr im elektrischen Feld.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden eukaryontische Zellen verwendet, die nach adenoviral-vermittelter Transfektion BRAP-Flag Protein überexprimierten. Da die nachfolgende isoelektrische Fokussierung extrem empfindlich auf Salze reagiert, wurde vermieden, die Zellen vor dem Ablösen von den Zellkulturschalen mit PBS zu waschen. Stattdessen wurden sie zweimalig mit kalter 5%igen Glucose-Lösung gewaschen und anschließend mit dem Zellschaber in 1 ml Glucose-Lösung von den Platten gelöst. Nach einer Zentrifugation für 4 min bei 900 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 120 µl Lysepuffer nach Regitz resuspendiert und mit Hilfe einer 40G-Kanüle homogenisiert. Zuletzt wurde das Lysat für 5 min bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand für die isoelektrische Fokussierung verwendet.

2.16.6.1 Isoelektrische Fokussierung

Das Aufbringen der Probe erfolgte nach dem Verfahren der passiven Rehydrierung. Die IPG-Streifen wurden vor Beginn der Fokussierung 12-16 Stunden rehydratisiert. Die Menge der Rehydratisierungslösung war von der Streifenlänge abhängig und betrug 350 µl für 18 cm lange Streifen (*Immobiline Dry-stripes*, ph 4-7, GE-Healthcare). Es wurden 100 µg Protein pro Streifen eingesetzt. Der Rehydratisierungspuffer wurde mit 2% Pharmalyten (GE-Healthcare, München) und Proteinase-Inhibitoren versetzt. Die Rehydratisierungslösung wurde in den Einsatz der PROTEAN[®] IEF-Cell pipettiert und ein Streifen wurde nach dem Abziehen der Schutzfolie luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten auf die Rehydratisierungslösung gelegt.

Sowohl während der Rehydratisierung als auch während der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen mit 2-3 ml Mineralöl (GE-Healthcare, München) bedeckt. Dies sollte die Austrocknung der Streifen und die Auskristallisation des in den Puffern enthaltenen Harnstoffs verhindern.

Die Fokussierung verlief in der Bio-Rad PROTEAN® IEF-Cell™ unter den folgenden Bedingungen:

Spannung [V]	Volt-Stunden [Vh]
500	25
1000	125
8000	85000
600	hold

Nach der Fokussierung wurden die Streifen sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.16.6.2 Äquilibration der IPG-Streifen und SDS-PAGE

Um einen Proteintransfer aus dem IPG-Streifen in das SDS-PAGE-Gel zu ermöglichen, wurden die Streifen mit SDS äquilibriert. Dies erfolgte durch zweimalige Inkubation in Äquilibrationpuffer für 15 min auf einem Wipp-Schüttler. Um den reduzierten Zustand der denaturierten, unalkylierten Proteine zu bewahren, wurde dem Äquilibrationpuffer während der ersten Inkubation 10 mg/ml DTT zugesetzt. Der Äquilibrationpuffer wurde bei der zweiten Inkubation mit 25 mg/ml Iodacetamid versetzt. Iodacetamid alkyliert die Thiol-Gruppen von Proteinen, wodurch eine Reoxidation während der Elektrophorese verhindert wird. Zudem alkyliert Iodacetamid restliches DTT, so dass Artefakte bei der Färbung des Gels vermindert werden. Für die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde der IPG-Streifen horizontal auf ein SDS-PAGE-Gel gelegt und mit flüssiger 1%-iger Agarose (in PAGE-Laufpuffer) überschichtet. Die SDS-PAGE wurde wie unter 2.16.5 beschrieben durchgeführt.

2.16.7 Western Blot

Um die Proteine immunologisch nachweisen zu können, erfolgte zunächst ein elektrophoretischer Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman®, Dassel). Der Transfer wurde nach dem Tank-Blot-System der Firma Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Zwei Schwämme, vier Whatman GB003 Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) und eine Nitrocellulose-Membran wurden kurz in Transferpuffer getränkt. Nach dem Prinzip des *sandwich*-Modells wurde auf einen Schwamm zwei Filterpapiere, die Membran und das PAGE-Gel luftblasenfrei in die Kassette gestapelt. Zwei weitere Filterpapiere und ein Schwamm wurden aufgelegt und die geschlossene Kassette in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingehängt. Die SDS-Protein-Komplexe wurden aus dem Gel auf die Membran in Richtung Anode bei 500 mA für zwei Stunden transferiert. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran im Anschluss mittels Ponceau-Rot reversibel gefärbt, während die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixierte.

2.16.7.1 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde die Membran zunächst in 1x TBS-Tween (TBST) mit 5% Magermilchpulver für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach kurzem Waschen in 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Verdünnung in 1x TBST/ 0,5% Magermilchpulver oder in 1x TBST/ 5% BSA bei 4°C über Nacht oder für 1-2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 3x 5 min in 1x TBST gewaschen und mit einem entsprechenden *HRP* (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in 1x TBST/ 0,5% Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3x 5 min in 1x TBST gewaschen. Währenddessen wurden pro Membran 4 ml ECL-Arbeitslösung (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 Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz-Reaktion aus. Zuletzt wurde die abgetropfte Membran in Klarsichtfolie eingelegt und in eine Röntgenkassette gelegt.

Ein Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) wurde in der Dunkelkammer aufgelegt und nach 1 min entwickelt. Je nach Intensität der Banden konnte die Belichtungszeit verlängert oder verkürzt werden.

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sowie deren Inkubationszeiten

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubation
anti-Phospho-ASK1	1:2000	ü.N., 4°C
anti-Phospho-Bad	1:1000	ü.N., 4°C
anti-Bax	1:1000	ü.N., 4°C
anti-Bcl2	1:1000	ü.N., 4°C
anti-BRAP	1:2000	2 h, RT
anti-Caspase 9	1:1000	ü.N., 4°C
anti-CHCHD3	1:250	2 h, RT
anti-Cytochrom C	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Cytochrom C-Oxidase	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Erk	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Phospho-Erk	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Flag	1:10000	2 h, RT
anti-GAPDH	1:50000	1 h, RT
anti-JNK	1:500	ü.N., 4°C
anti-Mek	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Phospho-Mek	1:3000	ü.N., 4°C
anti-Phospho-MKK3/6	1:1000	ü.N., 4°C
anti-Phospho-MKK4	1:1000	ü.N., 4°C
anti-NFATc2	1:500	ü.N., 4°C
anti-Phospho-p38	1:4000	ü.N., 4°C
anti-H-Ras	1:2000	ü.N., 4°C
anti-B-Raf	1:1000	ü.N., 4°C
anti-C-Raf	1:2000	ü.N., 4°C

2.16.8 Kolloidale Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

SDS-Polyacrylamidgele wurden zu unterschiedlichen Zwecken mittels Roti[®]-Blue Lösung gefärbt. Die kolloidale Coomassie-Färbung ist eine schnelle Färbetechnik, die annähernd an die Sensitivität einer Silberfärbung heranreicht. Die Gele wurden direkt in der nach Herstellerprotokoll angesetzten Färbelösung für mehrere Stunden gefärbt und im Anschluss kurz in 25%iger Methanollösung gewaschen.

2.16.9 Expression und Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von rekombinant hergestellten His-Fusionsproteinen wurde das Prinzip der immobilisierten-Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) angewendet [Porath *et al.*, 1975]. Bei der Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriaceticacid)-Affinitätschromatografie (Qiagen, Hilden) können His-Fusionsproteine durch an Agarose gebundene Ni-NTA aufgereinigt werden. Für die Expressionskultur wurde der *E. coli* Stamm M15 [pREP4] verwendet, der ein Plasmid enthält, welches zur konstitutiven Expression des lac-Repressor Proteins führt. Isopropyl- β -D-thiogalaktosidase (IPTG) bindet und inaktiviert den lac-Repressor, wodurch es zur Induktion der Expression des rekombinanten Proteins kommt. Der M15-Stamm wurde mit dem His-Fusionsprotein-Konstrukt transfiziert und ein positiver Klon identifiziert und durch Sequenzierung bestätigt. Für eine präparative Aufreinigung wurden 800 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin) mit 16 ml einer nicht-induzierten Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert und weitere 4-5 h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000 x g für 20 min geerntet und die Pellets bei -20°C gelagert. Bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurden die Bakterien-Pellets in insgesamt 20 ml His-Puffer B resuspendiert und die Zellen für 30 min bei RT lysiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit 5 ml 50% Ni-NTA-Agarose versetzt. Unter leichtem Schwenken wurde die Lysat-Matrix-Mischung für 1 h bei RT inkubiert und anschließend in eine Säule gefüllt. Nach dem Durchfluss des Lysats wurde zweimal mit 20 ml His-Puffer C gewaschen. Die Elution des His-Fusionsproteins erfolgte durch jeweils viermalige Zugabe von 2,5 ml der His-Puffer D und E. Von den gesammelten Fraktionen wurden Aliquots mittels PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung die Fraktion bestimmt, die den höchsten Anteil des aufzureinigenden Proteins enthielt.

2.16.10 Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese/Elektroelution

Für die Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen wurde die aus dem Gel ausgeschnittene Bande sorgfältig zerkleinert. Das Elektroelutionsgerät wurde mit neuen Dialysemembranen versehen und das Gel in das Proben-Behältnis gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in PAGE-Laufpuffer über Nacht bei 4°C und 200 V. Das eluierte Protein wurde in Fraktionen abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.16.11 Immunpräzipitation/Ko-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation lassen sich Proteine gezielt aus einem Zelllysat isolieren. Hierzu werden spezifische Antikörper benutzt, die an eine Matrix gebunden sind. Die Proteine werden somit über den Antikörper an die Matrix gebunden und können durch Zentrifugation von den übrigen Proteinen getrennt werden. Durch nachfolgende SDS-PAGE und Western Blot-Analysen lassen sich unter anderem Protein-Proteininteraktionen nachweisen (Koimmunopräzipitation).

Für die Immunpräzipitation von mit einem Flag-Tag versehenen BRAP-Protein aus Herzgewebe transgener Mäuse wurde 50-80 mg Gewebe in 400 µl IP-Lysepuffer mittels Rotor-Stator Homogenisator homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Präzipitation wurden gleiche Mengen Protein (mindestens 1 mg) eingesetzt. Dem Lysat wurden 30 µl Maus-IgG-Agarose (Sigma-Aldrich, München) zugefügt und für 3 h bei 4°C, rotierend inkubiert. Dieser *preclearing*-Schritt sollte Proteine, die unspezifisch an Maus-IgG-Agarose binden, vor der Immunpräzipitation entfernen. 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 über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Agarose durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 60 µl Anti-Flag-Agarose Konjugat (Sigma-Aldrich, München) versetzt. Es folgte eine vier- bis sechsstündige Inkubation bei 4°C, rotierend. Durch eine erneute Zentrifugation für 30 s bei 6000 x g wurden die Agarose-Protein-Komplexe sedimentiert und anschließend dreimal mit 25 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl gewaschen. Die Elution der BRAP-Protein-Komplexe erfolgte kompetitiv mittels 100 µl Elutionspuffer (25 mM Tris, pH 7,4; 0,2 mg/ml Flag-Peptid) für 20 Minuten bei 4°C.

Für die Immunpräzipitation von Flag-BRAP aus adenoviral transfizierten Zellen wurden jeweils 2 Mio. HeLa-Zellen auf zwei 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 30 mM Pervanadat und 10 μ M Calyculin für 15 min bei 37°C behandelt, um die Phosphatasen der Zellen zu inhibieren. Nach vorsichtigem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen in je 200 μ l IP-Lysepuffer pro Schale abgelöst und lysiert. Die Lyse erfolgte durch mechanische Homogenisation durch eine 40G-Kanüle und Inkubation für 15 min auf Eis. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll der Immunpräzipitation aus Gewebe.

2.17 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrische Analyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Urlaub (MPI für biophysikalische Chemie) durchgeführt. Das Eluat der Präzipitation der BRAP-transfizierten Zellen und der Kontrollzellen wurde mittels NuPAGE-Gelen aufgetrennt und die komplette Spur jeweils aus dem Gel ausgeschnitten. Diese wurde in vier Teilstücke unterteilt, die einzeln analysiert wurden. Nach der Spaltung der Proteine durch das Enzym Trypsin wurde das resultierende Peptidgemisch der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Die Ergebnisse wurden anhand von Datenbanken abgeglichen und die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Mascot.

2.18 Ras-Aktivierungs-Assay

Zur Untersuchung des Aktivierungszustands von Ras in Myokardproben der transgenen BRAP-überexprimierenden Mäuse wurde das Ras Activation Assay Kit der Firma Upstate (Lake Placid, USA) verwendet. Der Assay beruht darauf, dass aktiviertes Ras (Ras-GTP) mit der Ras-bindenden-Domäne (RBD) von Raf-1 interagiert. Es handelt sich um ein Pull-down Experiment, bei dem ein Raf1-RBD-Agarose-Konjugat verwendet wird, um aktives Ras zu präzipitieren. In einer nachfolgenden Western Blot-Analyse wurde dann die Menge an Ras im Präzipitat bestimmt. Von frisch präparierten, mit PBS perfundierten Herzen wurden der linke Ventrikel direkt in 1 ml Ras-Assay-Lysepuffer mittels Glas/Glas-Homogenisator auf Eis homogenisiert.

Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Lysate für 5 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den Assay wurden 5 mg Gesamtprotein in einem Volumen von 500 µl Lysepuffer eingesetzt. Als positiv- und negativ-Kontrollen wurden 5 mg Protein in 500 µl Lysepuffer mit 10 mM EDTA und 100 µM GTP γ S (positiv Kontrolle) oder 1 mM GDP versetzt und für 30 min bei 30°C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 65 mM MgCl₂ versetzt. Für den Pull down-Assay wurden die Lysate mit 10 µl Raf-RBD-Agarose versetzt und für 45 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Agarose wurde dann durch Zentrifugation bei 14000 x g für 10 s sedimentiert und anschließend durch dreimaliges Resuspendieren in 0,5 ml Lysepuffer gewaschen. Zuletzt wurde die Raf-RBD-Agarose in 40 µl 2xLämmli-puffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C inkubiert und der Western Blot-Analyse zugeführt. Die Detektion des präzipitierten aktiven Ras erfolgte 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 über Nacht bei 4°C.

2.19 *yeast-two-hybrid*-Screening

Das *yeast-two-hybrid*-System (Y2H) nutzt aus, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen. So enthält der GAL4-Transkriptionsaktivator der Hefe eine DNA-Bindungsdomäne und eine transkriptions-aktivierende Domäne. Die DNA-Bindungsdomäne bindet an eine als UAS (*upstream activating sequence*) bezeichnete Sequenz, während die transkriptions-aktivierende Domäne mit anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind. Beide Domänen sind normalerweise Teile eines einzigen Proteins und werden gleichermaßen zur Aktivierung eines Gens benötigt. Die Aktivierung der Transkription ist jedoch auch dann möglich, wenn die Domänen jeweils mit unabhängigen Proteinen fusioniert sind und über deren Interaktion in räumlicher Nähe stehen. In diesem Fall kommt es zu einer funktionellen Rekonstitution des Transkriptionsaktivators und zur Transkription von Reportergenen die 3'-wärts der GAL4-Bindungsstellen lokalisiert sind. Dabei handelt es sich im *yeast-two-hybrid*-System um Gene, die für Stoffwechsellenzyme kodieren und so eine Selektion der Hefeklone auf Mangelmedien erlauben, sofern miteinander interagierende Fusionsproteine exprimiert werden.

Die *yeast-two-hybrid*-Analyse wurde in Kooperation mit dem RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) durchgeführt. Der Hefestamm CG1945 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde mit dem BRAP-GAI4-BD-Konstrukt transformiert und eine cDNA-Bibliothek, die cDNAs fusioniert mit der GAL4-Transaktivator-Domäne enthielt wurde in den Stamm Y187 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) transformiert. Getestet wurde eine DNA-Bibliothek, die cDNAs von im Myokard exprimierten Proteinen enthielt (Clontec Matchmaker Library: Human Heart, #638833) sowie zusätzlich eine DNA-Bibliothek, bestehend aus etwa 5000 einzeln klonierten cDNAs. Durch Selektion auf Mangel-Medium konnten Hefe-Klone isoliert werden, die mit cDNAs transformiert wurden, die für BRAP-bindende Proteine kodieren.

2.20 Methoden zur subzellulären Lokalisation von Proteinen

2.20.1 Immunfluoreszenz-Färbung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden auf speziellen Kultur-Objektträgern (FALCON culture-slides) in entsprechendem Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in einer eiskalten Methanol/Aceton-Mischung im Verhältnis 7:3 für 10 min bei -20°C fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellmembran für 10 min in 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und 40 min bei RT mit 4% (w/v) BSA in PBS zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration in 1% (w/v) BSA in PBS für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung 1 h bei 37°C dunkel inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellkerne durch Inkubation mit DAPI (1:5000 in PBS) für 10 min gefärbt und die Präparate anschließend mit Vectashield-Mounting-Medium eingedeckt.

2.20.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BRAP wurde die codierende Sequenz von BRAP am Amino-terminalen Ende mit CyPet und am Carboxy-terminalen Ende mit YPet fusioniert [Nguyen und Daugherty, 2005]. CyPet und YPet sind für FRET optimierte Analoga zu CFP und YFP. CyPet und YPet wurden mittels PCR anhand der Vektoren pCEP4CyPet-Mamm und pCEP4YPet-Mamm amplifiziert. Das Fusionskonstrukt wurde in den Virus-Vektor pDC515 kloniert und wie unter 2.15.4.1 beschrieben ein Adenovirus hergestellt. Die Zellen wurden auf Zellkultur-geeigneten Objektträgern (Falcon culture slides, Becton Dickinson GmbH) kultiviert und gemäß 2.15.4.2 adenoviral transfiziert. Nach einer 24- bis 36-stündigen Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Vectashield eingedeckt. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Carl Zeiss, Hamburg) wurden die Zellen ausgewertet und fotografiert.

2.21 Transgene Mäuse

2.21.1 Vorbereitung und Injektion des transgen Konstruktes

Zur Herstellung von transgenen Mausmodellen zur herzspezifischen BRAP-Überexpression wurden die Konstrukte α MHC-Flag-BRAP und tet- α MHC-Flag-BRAP verwendet. Die Generierung der α MHC-Flag-BRAP transgenen Mäuse erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit. Das Transgen-Konstrukt (tet- α MHC-Flag-BRAP) wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Vektor isoliert und über ein Ethidiumbromid-freies Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Fragment wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert und die DNA in Mikroinjektionspuffer (5 mM Tris pH 7,4/ 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde auf 30 ng/ μ l eingestellt. In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Göttingen) wurde die DNA in den Pronukleus von befruchteten Maus-Oozyten mikroinjiziert. Die intakten Zygoten wurden dann in die Ovidukte scheinchwangerer Mäuse (0,5 dpc) der Linie FVB/N reimplantiert.

2.21.2 Genotypisierung transgener Mäuse

Zur schnellen Aufarbeitung genomischer DNA aus der Schwanzspitze transgener Mäuse wurde das DirectPCR-tail-Reagent (PEQlab, Erlangen) verwendet. Zu den Schwanzspitzen wurde jeweils 200 µl Lysepuffer mit Proteinase K gegeben. Nach einer Inkubation bei 55°C über Nacht wurde die Proteinase K bei 85°C für 45 min inaktiviert. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR mit Transgenspezifischen Primern.

2.21.3 Echokardiographische Untersuchungen transgener Mäuse

Die zu untersuchenden Mäuse wurden im Thoraxbereich rasiert und mittels eines 1% Isofluran-haltigen Gasmisches leicht sediert. Die Narkose während des Ultraschalls wurde ebenfalls durch Isofluran aufrechterhalten, welches den Tieren über Maskenbeatmung verabreicht wurde. Die Echokardiografie selbst erfolgte im M-Mode in der longitudinalen Achse. Dabei wurden die Septumdicke, die Dicke der Hinterwand, der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD), der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVESD) und die Herzfrequenz gemessen. So konnten im Folgenden die Parameter Ejektionsfraktion und Herzhypertrophie beurteilt werden. Die Verkürzungsfraction (*fractional shortening* (FS)) ist ein Maß für die Pumpfunktion des linken Ventrikels. Dieser Parameter wird durch folgende Gleichung definiert: $FS = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] * 100\%$.

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Jessica Spitalieri (Abteilung Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

2.21.4 Operative Modelle der Myokardhypertrophie bei Mäusen

Das Modell der Aortenkonstriktion (*transaortic constriction* - TAC) der Maus wird erzeugt durch eine permanente Verengung der Aorta, wodurch es zu einer erhöhten linksventrikulären Nachlast kommt. Dies führt zu einer konzentrischen Hypertrophie und nachfolgend zu Herzinsuffizienz. Bei dem Modell des Myokardinfarkt der Maus wird ein Koronargefäß durch Ligation permanent verschlossen. Die Unterversorgung des betreffenden Myokardareals mit Blut bewirkt infolge Hypoxie und Nährstoffmangel eine

Nekrose und Vernarbung des Infarktgebietes. Die dadurch resultierende Verringerung der Pumpfunktion bewirkt die Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie übriger Myokardanteile. Als Kontrolltiere wurden stets "scheinoperierte" Tiere (sham) verwendet, die ebenfalls operiert wurden, nicht aber die eigentliche Intervention erhielten. Die Operationen wurden in Kooperation mit Dr. Bernhard Unsöld und Dr. Karl Toischer (Abteilung Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

2.21.5 Induzierbare BRAP-transgen überexprimierende Mäuse

Um eine zeitlich induzierbare, herzspezifische Überexpression von BRAP zu erreichen, wurde ein modifizierter α MHC-Promotor verwendet [Sanbe *et al.*, 2003]. Mäuse der induzierbaren BRAP-transgen überexprimierenden Linie wurden mit transgenen Mäusen verkreuzt, die den Tet-Aktivator herzspezifisch überexprimieren. Der Tet-Aktivator ist nötig, um den modifizierten α MHC-Promotor zu aktivieren und damit die Überexpression von BRAP zu induzieren. In Anwesenheit von Doxycyclin wird jedoch die Bindung des Tet-Aktivators an die Operator-Sequenz des Promotors und somit auch die Überexpression von BRAP gehemmt (Tet-off-System). Um die Überexpression von BRAP während der Herzentwicklung zu unterbinden wurde den trächtigen Weibchen und anschließend den jungen Mäusen 0,2 g/l Doxycyclin und 1% (w/v) Sucrose ins Trinkwasser gegeben. Zur Induktion der BRAP-Überexpression wurde die Doxycyclin-Gabe beendet und nach 4-8 Wochen wurden die Mäuse durch Echokardiographie oder Western Blot-Analyse phänotypisiert.

2.22 Präparation und X-Gal Färbung von Maus-Embryonen

Die *genetrap*-Kassette der BRAP-*genetrap*-Mäuse enthält ein lacZ-Gen, welches als Reporter genutzt werden kann, um das Expressionsmuster von BRAP im Embryo zu analysieren. Um Embryonen eines definierten Entwicklungsstadiums zu präparieren wurde nach dem Verpaaren der Mäuse durch das Tierpflegepersonal täglich morgens die Vagina der weiblichen Maus auf die Anwesenheit eines mucoiden Plugs überprüft. Der Tag an dem der Plug festgestellt wurde, wird als Entwicklungstag 0,5 dpc (*days post coitus*) bezeichnet. Zu einem dadurch definierten Zeitpunkt wurde das trächtige Weibchen durch cervicale Dislokation getötet und die Embryonen nach den Protokollen von A. Nagy ("Manipulating the Mouse Embryo") präpariert. Zur späteren Genotypisierung der

Embryonen wurde der Dottersack jedes Embryos separiert. Die Embryonen wurden direkt in X-Gal-Fixierungspuffer transferiert. Die Dauer der Fixierung von 9,5 dpc Embryonen betrug 30 min. Anschließend wurden die Embryonen dreimal für 15 min in X-Gal-Waschpuffer gewaschen. Die Färbung in X-Gal-Färbelösung erfolgte für 5h bis über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken im Dunkeln. Anschließend wurden die Embryonen nochmals in PBS gewaschen, und durch eine weitere 20minütige Inkubation in Fixierungspuffer fixiert. Die Lagerung der Embryonen erfolgte in PBS bei 4°C

2.23 Histologische Techniken

2.23.1 Gewebefixierung und –einbettung

Das frisch präparierte Material wurde direkt in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS gegeben und je nach Größe des Präparates für eine Stunde bis über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem folgenden Protokoll in einem Einbettautomat (Leica):

H ₂ O		> 3 h
70% EtOH		1 h
80% EtOH		1 h
96% EtOH		1 h
100% EtOH	3x	1 h
Chloroform	2x	1 h
Paraffin	3x	1 h

Im Anschluss daran wurde eine auf 65°C temperierte Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe in der Form positioniert und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung über Nacht wurde der Paraffinblock aus der Form entnommen und bei 4°C gelagert.

2.23.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden zu Quadern geeigneter Größe zugeschnitten und in das Mikrotom (JUNG RM 2035, Leica) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 6 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf 37°C warmes Wasser gelegt und mit einem Objektträger aufgenommen. Durch eine Inkubation bei 55°C für 1 h wurden die Schnitte auf dem Objektträger getrocknet und fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

2.23.3 Entparaffinierung und HE-Färbung von Gewebeschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung stellt eine Standard-Färbetechnik zur histologischen Begutachtung dar. Hämatoxylin färbt saure Strukturen blau, wodurch unter anderem der Zellkern angefärbt wird. Nach der Hämatoxylin-Färbung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Lösung. Nach einer Erhöhung des pH-Wertes durch Spülen in Leitungswasser ("Bläuen") schlägt der Farbton in blau-violett um. Eosin färbt basische Strukturen rot, was vor allem das Cytoplasma betrifft.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert, damit die anschließende Färbung in wässrigen Lösungen möglich ist. Bei der Entparaffinierung durchlaufen die Präparate nach einer zweimaligen Inkubation in Xylol für 10 min eine Ethanol-Reihe mit absteigender Konzentration. Im Folgenden sind die Schritte zur Entparaffinierung tabellarisch zusammengefasst:

Xylol	2x	10 min
100% EtOH	2x	10 min
90% EtOH		5 min
80% EtOH		5 min
65% EtOH		5 min
50% EtOH		5 min
25% EtOH		5 min
dH ₂ O		5 min

Im Anschluss wurden die entparaffinierten Präparate direkt durch Inkubation in Meyers Hämatoxylin-Lösung und nach kurzem Spülen in Wasser durch Eosin-Lösung gefärbt. Zuletzt erfolgte ein Inkubationsschritt in 95%igem und 100%igem Ethanol und eine zweimalige Inkubation in Xylol. Die so gefärbten Präparate wurden mit Entellan, einem wasserbasierten Eindeck-Medium eingedeckt.

dH ₂ O		5 min
Meyers Hämatoxylin Lsg.		5 min
dH ₂ O		kurz
H ₂ O (fließend)		1-5 min
Eosin		30 s
95% EtOH		5 min
100% EtOH		5 min
Xylol	2x	5 min

2.23.4 Masson-Trichrom-Färbung von Paraffinschnitten

Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht die histologische Färbung von Bindegewebe. Im gefärbten Präparat erscheint Muskelgewebe rot, Bindegewebe blau-violett und Zellkerne braun-schwarz. Nach der Entparaffinierung der Präparate (2.23.3) wurde die folgende Färbereihe durchlaufen:

Eisenhämatoxylin-Lsg. nach Weigert		8 s	Progressive Kernfärbung
ddH ₂ O		kurz	
ddH ₂ O (fließend)		5 min	
1% Essigsäure		kurz	
ddH ₂ O			
MT-Lösung A		30-35 s	Färbung der Muskulatur
ddH ₂ O	3x	kurz	
1% Essigsäure		kurz	
MT-Lösung B		5-7 min	Beize
ddH ₂ O		kurz	
1% Essigsäure		kurz	

MT-Lösung C		1 min	Färbung des Bindegewebes
ddH ₂ O		kurz	
1% Essigsäure		2 min	
MT-Lösung D		3 min	
96% Ethanol		1 min	Entwässerung
100% Ethanol		2 min	
Xylol	2x	5 min	

2.24 Ethik

Sämtliche Untersuchungen an lebenden Tieren wurden durch die örtliche Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und bewilligt. Darüberhinaus 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).

2.25 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 Student's t-Test angewandt. Die Fehlerbalken in den Graphiken entsprechen, sofern nicht anders vermerkt, der Standardabweichung (SD).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung auf eine differentielle Regulation von BRAP in der Myokardhypertrophie

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Schott (Abteilung Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) konnte im Rahmen einer Proteomstudie BRAP als differentiell-reguliertes Protein in einem Tiermodell der rechtsventrikulären Myokardhypertrophie identifiziert werden [Schott *et al.*, 2005]. Die Auswertung der 2D-Gele zeigte eine geringere BRAP-Proteinmenge in den Proben der rechten Ventrikel Monokrotaline-behandelter Ratten. Die Untersuchung der BRAP-Expression auf RNA-Ebene in Modellen der Monokrotaline-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie und der Aortenkonstriktion zeigte dagegen eine signifikant, allerdings absolut betrachtet, gering erhöhte BRAP-Expression in den hypertrophierten Herzen. In der vorliegenden Arbeit sollte die BRAP-Expression in weiteren Tiermodellen der Herzinsuffizienz auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden. Für die Western Blot-Analyse wurden alle drei kommerziell erhältlichen anti-BRAP Antikörper getestet, keiner stellte sich jedoch als sensitiv genug heraus, um endogenes BRAP im Myokard zu detektieren. Auch ein durch die Firma Eurogentech für uns hergestellter Antikörper gegen zwei verschiedene Peptid-Sequenzen von BRAP erbrachten nicht das gewünschte Ergebnis. Daraufhin wurde ein Ansatz gewählt, bei dem ein polyklonaler Antikörper gegen das gesamte BRAP-Protein generiert wurde.

3.1.1 Herstellung eines BRAP-spezifischen Antikörpers

Für die Herstellung von rekombinantem BRAP wurde die gesamte codierende cDNA-Sequenz des murinen BRAP in den Expressionsvektor pQE31 inkloniert und dadurch am 5'-Ende mit einer His-Tag-Sequenz fusioniert. Die Produktion von rekombinantem Protein erfolgte in *E. coli* und die Aufreinigung durch Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (2.16.9). Die Ni-Affinitätschromatographie führte zu einer guten Anreicherung von BRAP, für die Immunisierung war die Reinheit jedoch noch unzureichend. Daher wurde durch eine präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese BRAP weiter aufgereinigt. Zuletzt wurde BRAP durch Elektroelution aus dem Gel eluiert und das Ergebnis erneut mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 3.1).

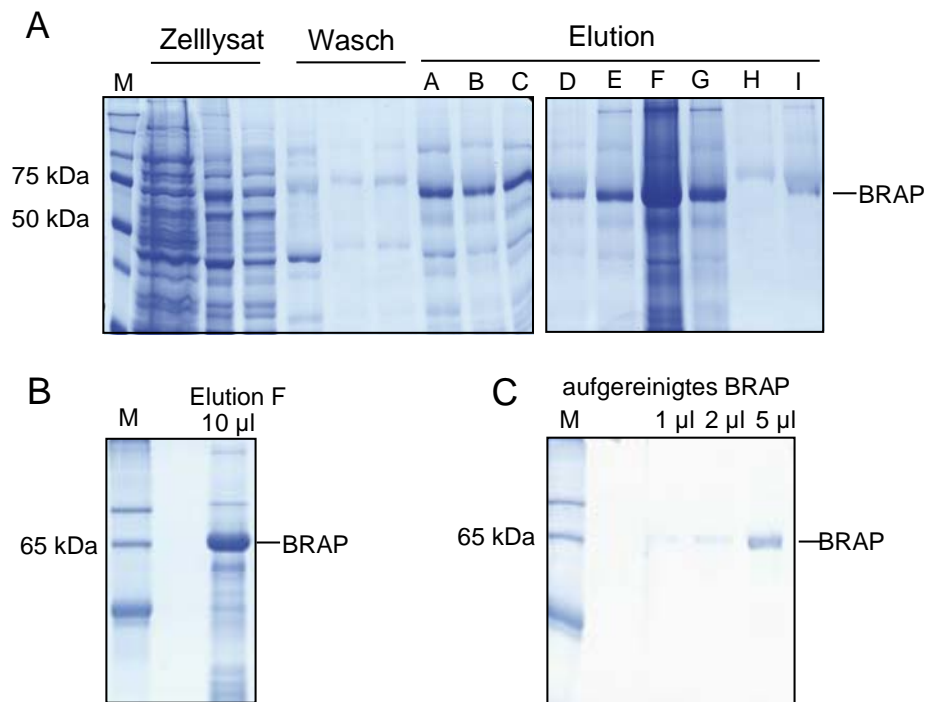


Abb. 3.1: Aufreinigung von rekombinantem BRAP-Protein. **A.** Rekombinantes BRAP wurde in *E. coli* exprimiert und durch Ni-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Aliquots von Zelllysaten, Waschfraktionen ("Wasch") und der Elutionsfraktionen A-I wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie-Blue gefärbt. **B.** SDS-PAGE und Coomassie-Färbung eines 10 µl-Aliquots der Elutionsfraktion F zeigte, dass noch eine weitere Aufreinigung des BRAP-Proteins nötig war. **C.** Elutionsfraktion F wurde mittels präparativer SDS-PAGE und Gelelution aufgereinigt. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von Aliquots des so aufgereinigten BRAP-Proteins. M: nicht-vorgefärbter Protein-Standard.

Die Firma Synaptic Systems führte die Immunisierung der Kaninchen durch und stellte die Seren zur weiteren Untersuchung zur Verfügung. Nach der Untersuchung der Immunoreaktivität mittels Western Blot-Analyse wurde eines der Kaninchenserum ausgewählt und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die resultierende Antikörperpräparation war sensitiv genug, um endogenes BRAP im Myokard zu detektieren (Abb. 3.22) und konnte daher für die nachfolgenden Versuche eingesetzt werden.

3.1.2 Untersuchung der BRAP-Expression in Hypertrophie-Modellen

Für die Untersuchung der BRAP-Expression wurden zwei operative Tiermodelle gewählt, die zu Myokardhypertrophie beziehungsweise zum Herzversagen führen. Das Modell der Aortenkonstriktion (*transaortic constriction* - TAC) der Maus wird erzeugt durch eine permanente Verengung der Aorta, wodurch es zu einer erhöhten linksventrikulären Nachlast kommt. Dies führt zu einer konzentrischen Hypertrophie und nachfolgend zu Herzinsuffizienz. Bei dem Modell des Myokardinfarkt der Maus wird ein Koronargefäß durch Ligation permanent verschlossen. Die Unterversorgung des betreffenden Myokardareals mit Blut bewirkt infolge Hypoxie und Nährstoffmangel eine Nekrose und Vernarbung des Infarktgebietes. Die dadurch resultierende Verringerung der Pumpfunktion bewirkt die Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie übriger Myokardanteile. Als Kontrolltiere wurden stets "scheinoperierte" Tiere (sham) verwendet, die ebenfalls operiert wurden, nicht aber die eigentliche Intervention erhielten. Die Operationen wurden in Kooperation mit Dr. Bernhard Unsöld und Dr. Karl Toischer durchgeführt.

Die Untersuchung der isolierten RNA mittels *Real-time* PCR zeigte, dass die Expression von BRAP auf RNA-Ebene in diesen Modellen nicht verändert war (MI: BRAP/GAPDH: $2,15E-3 \pm 0,14E-3$ (sham); $2,26E-3 \pm 0,19E-3$ (MI), $n=8$, $p=0,66$; TAC: BRAP/GAPDH: $5,43E-3 \pm 0,44E-3$ (sham), $5,80E-3 \pm 0,64E-3$ (TAC), $n=8$, $p=0,58$). Als Kontrolle, ob die Operationen zu der für eine Hypertrophie-Entwicklung typischen Veränderung des Expressionsmusters hin zum fötalen Genprogramm führten, wurde die Expression des *brain natriuretic peptid* (BNP) bestimmt. Im Modell des Myokardinfarkts war BNP auf das Zweifache erhöht (BNP/GAPDH: $0,318 \pm 0,162$ (sham), $0,637 \pm 0,311$ (MI), $n=9$, $p<0,05$) während es in den TAC-Proben zu einer Vervierfachung der BNP-Expression im Vergleich zu scheinoperierten Tieren kam (BNP/GAPDH: $0,035 \pm 0,006$ (sham), $n=8$, $0,140 \pm 0,014$ (TAC), $n=10$, $p<0,0005$). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass auch auf Protein-Ebene BRAP in beiden Modellen unveränderte Mengen aufwies (BRAP/GAPDH: $1,00 \pm 0,08$ (sham), $n=8$, $1,04 \pm 0,06$ (TAC), $n=8$, $p=0,70$; $1,00 \pm 0,21$, $n=9$ (sham), $0,98 \pm 0,17$ (MI), $n=9$, $p=0,87$), (Abb. 3.2).

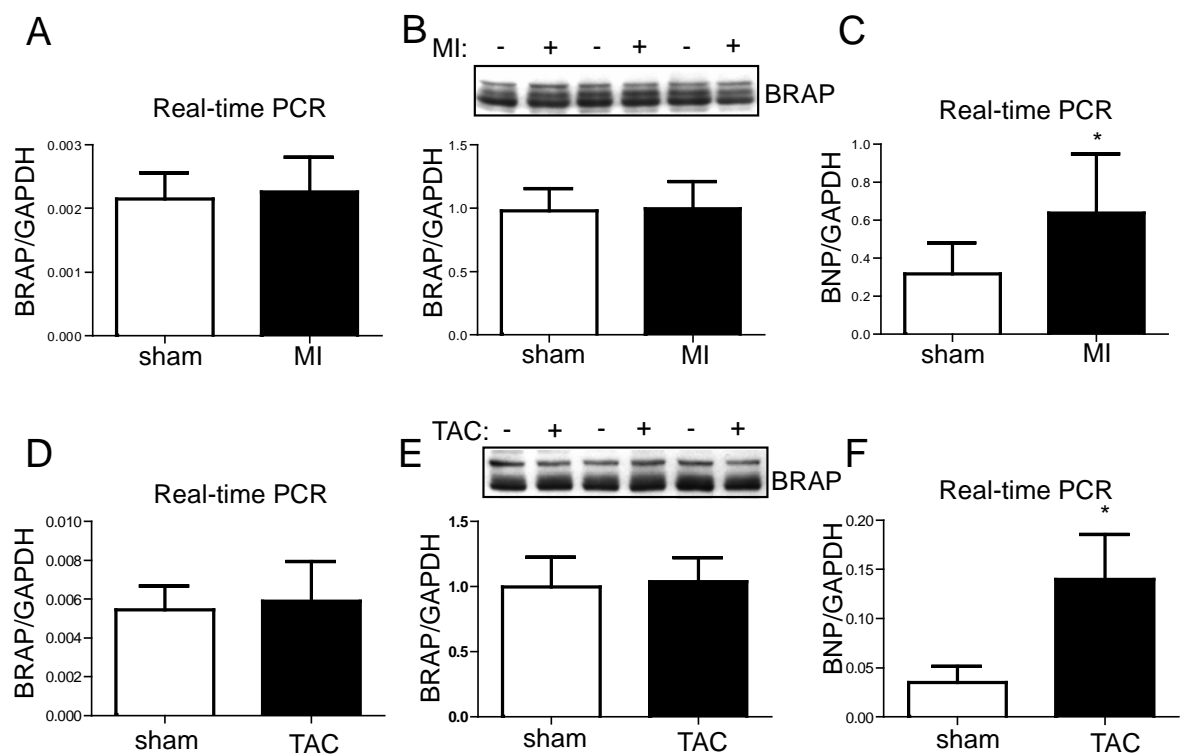


Abb. 3.2: Endogene BRAP-Expression in Tiermodellen der Hypertrophie. FVB-Mäuse wurden einer Myokardinfarkt-Operation (MI) beziehungsweise Aortenkonstriktion-Operation (TAC) oder einer Scheinoperation (sham) unterzogen. Nach einer Woche wurden die Mäuse getötet, die Herzen entnommen und aus den Myokardproben RNA isoliert und Proteinlysate hergestellt. Die RNA wurde in cDNA revers transkribiert und die *Real-time* PCR mit BRAP-spezifischen (A+D) beziehungsweise BNP-spezifischen Primern (C+F) durchgeführt. Die Proteinlysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse mit BRAP-spezifischem Antikörper BRAP detektiert (B+E). Eine Normalisierung hinsichtlich der eingesetzten Proteinmenge erfolgte anhand des Referenzproteins GAPDH. Weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene kam es bei MI- oder TAC-operierten Mäusen zu einer Veränderung der BRAP-Expression. Die BNP-Expression war dagegen signifikant auf das Vierfache (TAC) beziehungsweise das Zweifache (MI) erhöht. Die Operationen wurden von Dr. Bernhard Unsöld und Dr. Karl Toischer durchgeführt.

3.1.3 Untersuchung der BRAP-Expression in humanen Myokard-Biopsien von Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie

Auch wenn Tiermodelle helfen, wichtige Fragen in Bezug auf Krankheitsmechanismen und grundlegende Abläufe der Zellen zu beantworten, stellt der menschliche Patient ein sehr viel variables und komplexeres System dar, so dass Erkenntnisse nicht ohne Weiteres übertragbar sind.

Daher wurde die BRAP-Expression mittels *Real-time* PCR in humanen Myokard-Biopsien von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) untersucht. Als Kontrollen wurden Biopsien aus für die Transplantation abgelehnten Donor-Herzen verwendet, die keine pathologische Veränderungen aufwiesen (sogenannte *nonfailing* Herzen). Die Auswertung zeigte, dass die BRAP-Expression in den Biopsien der Patienten mit DCM und der Patienten mit ICM signifikant von $0,43 \pm 0,10$ auf $0,63 \pm 0,23$ ($n=10$, $p<0,05$) (DCM) bzw. $0,61 \pm 0,12$ (ICM) ($n=11$, $p<0,005$) erhöht war (Abb. 3.3).

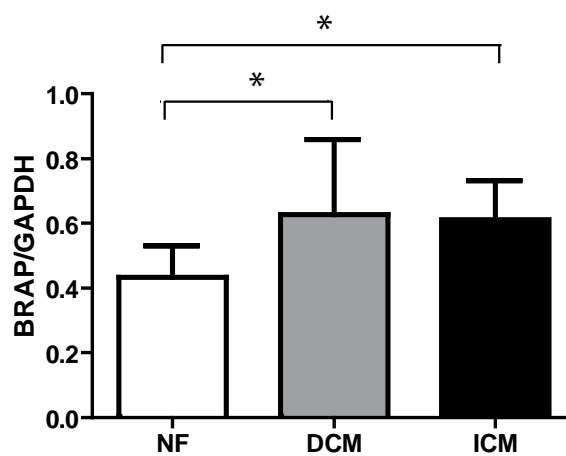


Abb. 3.3: Endogene BRAP-Expression in humanen Myokard-Biopsien von Patienten mit DCM und ICM. Aus den Myokard-Biopsien wurde RNA isoliert, anschließend cDNA revers transkribiert und *Real-time* PCR mit BRAP-spezifischen Primern durchgeführt. Als Kontrollen wurden Biopsien aus *nonfailing* Herzen (NF) verwendet. Eine Normalisierung der Proben erfolgte anhand der Referenz-cDNA von GAPDH. Sowohl in den Proben der Patienten mit DCM als auch mit ICM war die BRAP-Expression signifikant erhöht im Vergleich zu den Proben aus *nonfailing* Herzen ($p<0,05$).

3.1.4 Unterliegt BRAP einer stimulations-abhängigen Degradation oder posttranslationalen Modifikation?

Für immortalisierte Zelllinien wurde beschrieben, dass BRAP durch aktiviertes Ras ubiquitinyliert und degradiert wird [Matheny *et al.*, 2004]. Um zu untersuchen, ob dies auch für primäre Kardiomyozyten gilt, wurden Kardiomyozyten adulter Ratten 24 h nach der Isolation für 15 min oder 1 h mit 1 μ M PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) behandelt. PMA bewirkt neben einer Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) auch eine starke Aktivierung von Ras [Verin *et al.*, 2000]. Eine Western Blot-Analyse mit anti-BRAP Antikörper zeigte geringere BRAP-Protein Mengen in den für 1 h mit PMA behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die nicht mit PMA behandelt wurden. Bei den für 15 min mit PMA behandelten Zellen waren die Ergebnisse der Versuche nicht einheitlich.

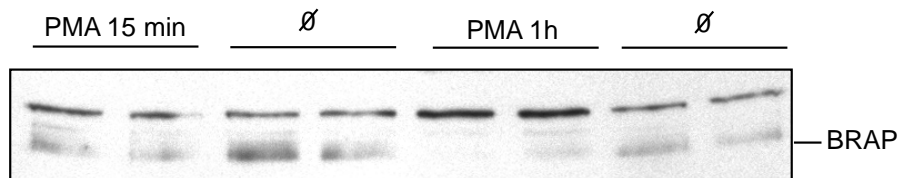


Abb. 3.4: Untersuchung der BRAP-Protein Menge in Kardiomyozyten, die durch PMA stimuliert wurden. Die Kardiomyozyten wurden 24 h nach der Isolation für 15 min oder 1 h mit PMA [1 μ M] behandelt beziehungsweise ohne PMA inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate der Zellen hergestellt und diese mittels Western Blot-Analyse mit BRAP-spezifischem Antikörper untersucht. Nach einer Inkubation für 1 h mit PMA war die BRAP-Protein Menge in Kardiomyozyten reduziert.

3.2 Einfluss von BRAP auf pro- und antihypertrophe Signaltransduktionswege

3.2.1 Untersuchung der BRAP-Überexpression in isolierten Kardiomyozyten

Da primäre Kardiomyozyten adulter Ratten nicht durch Transfektionsmethoden wie Lipofektion oder Elektroporation effizient transfizierbar sind, wurde stattdessen der adenovirale Gentransfer angewandt um eine Überexpression von Proteinen zu erreichen. Um die Funktion von BRAP in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein Adenovirus zur Überexpression von BRAP hergestellt.

Das Konstrukt für die Herstellung des Adenovirus enthielt die humane BRAP-cDNA unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur Erleichterung der Nachweisbarkeit des überexprimierten BRAP wurde an das den Carboxyterminus codierende Ende der cDNA eine Flag-Tag-Sequenz fusioniert.

3.2.1.1 Aktivierung der MAPK-Signalwege in BRAP überexprimierenden Kardiomyozyten

Da zuvor in HEK293-Zellen ein inhibitorischer Effekt von BRAP auf den Mek/Erk-Zweig der MAPK-Signalkaskade gezeigt wurde [Matheny *et al.*, 2004], sollte hier die Funktion von BRAP in Kardiomyozyten untersucht werden.

Der Mek/Erk-Signalweg war unter den Kulturbedingungen in Kardiomyozyten wenig aktiv, da keine nennenswerte Mek/Erk-Phosphorylierung nachweisbar war. Er wurde daher mittels Adenoviral-vermittelter Überexpression einer konstitutiv aktiven C-Raf-Isoform (C-Raf-BXB) stimuliert. Aktives Ras (Ras-GTP) bindet den Aminoterminus (AS 50-135) von C-Raf und rekrutiert C-Raf an die Plasmamembran. Die Deletion dieser Domäne (C-Raf-BXB Mutante) bewirkt eine konstitutive Aktivierung von C-Raf [Bruder *et al.*, 1992], was nach dessen Überexpression zu einer Phosphorylierung von Mek führte. Durch simultane Überexpression von Raf-BXB und BRAP konnte gezeigt werden, dass BRAP die Phosphorylierung von Mek und Erk in Kardiomyozyten inhibierte (pMek/GAPDH: BXB: $2,88 \pm 0,33$, BXB+BRAP: $1,05 \pm 0,15$, $n=3$, $p=0,007$). Ansteigende BRAP-Überexpressionsmengen konnten durch steigende Virus-MOI (*multiplicity of infection*) erreicht werden. Eine Analyse mittels Western Blot und phosphorylierungsspezifischem Mek-Antikörper zeigte eine dosisabhängige Inhibierung der Mek-Phosphorylierung durch BRAP (Abb. 3.5). Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde, sofern nicht anders angegeben, bei den weiteren Versuchen eine Überexpression von BRAP durch adenovirale Transfektion mit MOI 25 (25 aktive Viruspartikel pro Zelle) erzielt.

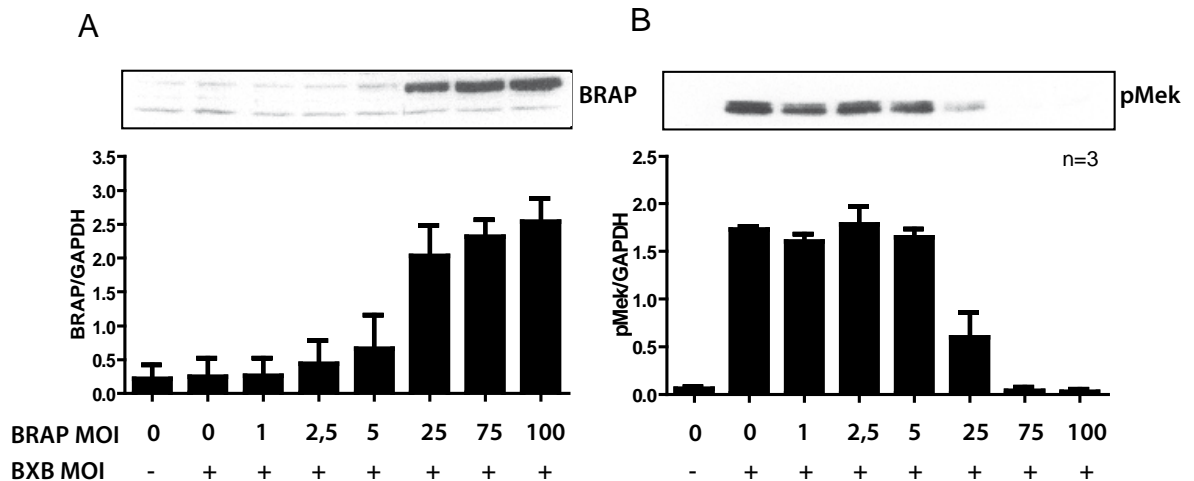


Abb. 3.5: Adenovirale Überexpression von BRAP in Kardiomyozyten adulter Ratten. Der Effekt ansteigender BRAP-Überexpression auf die MAPK-Aktivierung wurde mittels Western Blot-Analyse mit phosphorylierungsspezifischem anti-Mek Antikörper untersucht. Die Kardiomyozyten wurden mit der angegebenen Menge adenoviraler Partikel pro Zelle (*multiplicity of infection, MOI*) transfiziert. Ein Adenovirus zur Überexpression der beta-Galaktosidase (Ad-lacZ) diente als Kontrolle, um alle Gruppen einer gleichen Zahl adenoviraler Partikel zu exponieren. Der Mek/Erk-Weg wurde durch Überexpression einer konstitutiv-aktiven C-Raf-Mutante (BXB: MOI 5) aktiviert. Abbildung **A**. zeigt die BRAP-Expression bei Transfektion mit ansteigenden MOI in der Western Blot-Analyse. **B**. Die Western Blot-Analyse mit phospho-Mek-spezifischem Antikörper zeigte eine dosisabhängige Inhibition der Mek-Phosphorylierung durch BRAP nach BXB-Stimulation.

Die durch C-Raf-BXB induzierte Phosphorylierung des Mek-Zielproteins Erk wurde ebenfalls durch Überexpression von BRAP gehemmt (pErk/GAPDH: BXB: $2,49 \pm 0,37$, BXB+BRAP: $1,16 \pm 0,10$, $n=3$, $p < 0,05$) (Abb. 3.6). Dagegen konnte gezeigt werden, dass BRAP-Überexpression in Kardiomyozyten die Phosphorylierung von JNK steigerte (pJNK/GAPDH: BXB: $2,83 \pm 1,8$, BXB+BRAP: $28,20 \pm 6,00$, $n=6$, $p < 0,005$). Neben einer Aktivierung des Mek/Erk-Signalwegs kam es durch die Raf-BXB-Überexpression auch zu einer geringfügigen Aktivierung des p38-Signalwegs. Diese gesteigerte Phosphorylierung der p38-Kinase wurde durch Überexpression von BRAP inhibiert (pp38/GAPDH: BXB: $1,22 \pm 0,03$, BXB+BRAP: $0,98 \pm 0,02$, $n=3$, $p < 0,005$). Eine Hemmung der basalen p38-Phosphorylierung fand dagegen nicht statt (Abb. 3.6). Die Phosphorylierung der p70S6-Kinase blieb unverändert. Eine simultane Überexpression von Raf-BXB und BRAP führte zu einer verminderten Phosphorylierung von Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) (pBad/GAPDH: BXB: $1,07 \pm 0,05$; BRAP+BXB: $0,81 \pm 0,08$, $n=7$, $p < 0,05$).

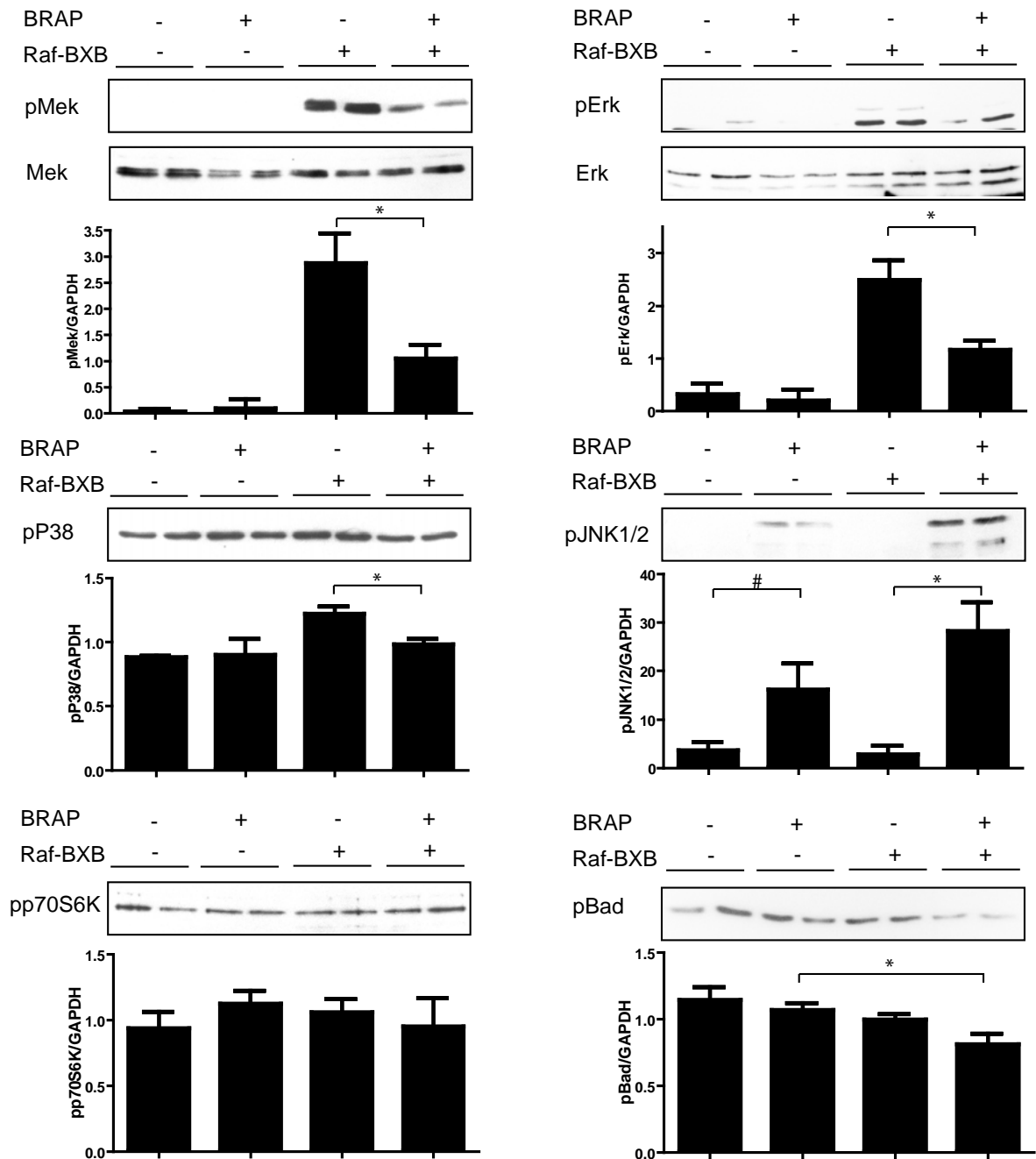


Abb. 3.6: Western Blot-Analyse der Aktivierung der MAP-Kinasen, der p70S6-Kinase und Bad mit phospho-spezifischen Antikörpern, sowie Antikörpern gegen gesamt-Mek und gesamt-Erk. Kardiomyozyten adulter Ratten wurden mit den angegebenen Adenoviren transfiziert und nach 24 h zu Proteinlysaten verarbeitet (2.16.1). Das Adenovirus zur Überexpression von BRAP wurde mit MOI 25 verwendet, das Adenovirus zur Überexpression von Raf-BXB mit MOI 5. Für die Western Blot-Analysen wurden Antikörper verwendet, die spezifisch für Mek1/2, phospho-Mek1/2, p44/42 (Erk), phospho-p44/42 (Erk), phospho-p38, phospho-JNK, phospho-p70S6-Kinase und phospho-Bad sind. Die Western Blot Filme wurden fotografiert und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt ist das Verhältnis der Bandenintensität des jeweiligen Proteins im Verhältnis zur Bandenintensität von GAPDH als Mittelwert von mindestens drei Versuchen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

3.2.1.2 In Kardiomyozyten neonataler Ratten wird die Hypertrophie durch BRAP inhibiert

Da den MAPK-Signalwegen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Hypertrophie zukommt, wurde der Effekt einer BRAP-Überexpression auf die zelluläre Hypertrophie untersucht. Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten können unter anderem durch Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren zu hypertrophem Wachstum angeregt werden. Zur Induktion eines hypertrophen Wachstums wurde dem Medium Phenylephrin (10 mM), Isoprenalin (1 mM) und Endothelin (10 mM) zugesetzt. Nach 48 h wurden die Zellen bei 400facher Vergrößerung fotografiert. Die Oberfläche der stimulierten Zellen war im Mittel um 23% vergrößert. Durch eine gleichzeitige Überexpression von BRAP konnte die zelluläre Hypertrophie signifikant inhibiert werden (relative Zelloberfläche: PE/ISO/ET: 17540 ± 374 , $n=559$; PE+BRAP: 14030 ± 374 , $n=564$, $p < 0,0001$), (Abb. 3.7).

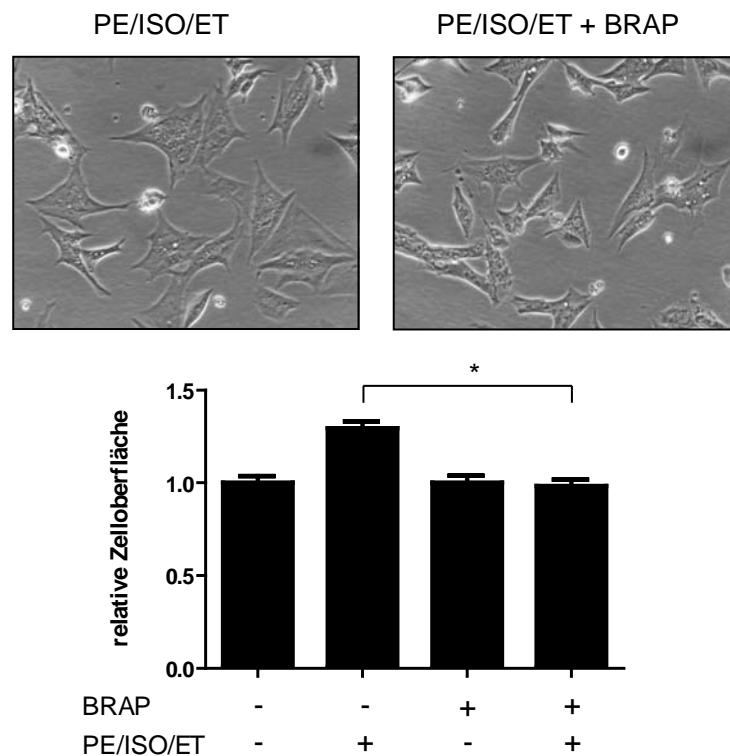


Abb. 3.7: Effekt von BRAP-Überexpression auf die Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten. 24 Stunden nach der Isolation der Kardiomyozyten wurden die Zellen mit BRAP-Adenovirus oder als Kontrolle mit lacZ-Adenovirus (MOI 25) infiziert. Zur Stimulation wurde dem Medium Phenylephrin (10 mM), Isoprenalin (1 mM) und Endothelin (10 mM) zugesetzt. Nach 48 h wurden die Zellen bei einer 400fachen Vergrößerung fotografiert. Pro Behandlung und Versuchstag wurden etwa 200 Zellen ausgemessen und die Zelloberfläche relativ zum Mittelwert der Oberflächen unbehandelter Zellen berechnet. Dargestellt ist das Gesamtergebnis von drei unabhängigen Versuchen, sowie repräsentative Bilder von Kardiomyozyten neonataler Ratten.

3.3 Murine Modelle zur herzspezifischen Überexpression von BRAP

3.3.1 Das Konstrukt zur Generierung von BRAP-transgenen Mäusen

Um den Einfluss von BRAP auf die Entstehung einer Hypertrophie und der Herzinsuffizienz *in vivo* zu untersuchen, wurden im Vorfeld der Arbeit durch Dr. Tim Seidler transgene Mäuse generiert, die ein BRAP-Flag Fusionsprotein herzspezifisch überexprimieren. Die herzspezifische Expression des humanen BRAP-Proteins wurde durch Verwendung des etablierten α MHC-Promotors der Maus erreicht. Dieser beinhaltet die komplette intergene Sequenz zwischen den β - und α Myosin heavy chain Genen [Guilick *et al.*, 1991]. Bei dem hier generierten Mausmodell ist eine Überexpression von BRAP in den Ventrikeln bereits am Tag E18,5 der Embryonalentwicklung nachweisbar. Zur besseren Detektion und Unterscheidung des transgenen BRAP vom endogenen Protein wurde an die den Carboxyterminus codierende Sequenz eine Flag-Tag Sequenz fusioniert.

3.3.2 Generierung und Charakterisierung BRAP-transgener Mäuse

Durch Mikroinjektionen des DNA-Konstruktes in Oozyten von FVB-Mäusen und C57B6-Mäusen konnten insgesamt sieben Founder-Tiere generiert werden, die das Transgen-Konstrukt enthielten. Zwei Founder-Mäuse mit FVB-Hintergrund und ein Founder mit C57B6-Hintergrund wurden mit Wildtyp-Mäusen des jeweiligen Stammes verpaart und die Nachkommen auf das Vorhandensein des Transgens getestet. Ausgehend von den drei Founder-Mäusen #311 (FVB), #314 (FVB) und #317 (C57B6) konnte jeweils eine Mauslinie etabliert werden. Zur Bestätigung der Genotypisierungs-PCR wurden für einige Tiere jeder Linie Southern Blot-Analysen durchgeführt. Die aus den Mausschwanz-Biopsien isolierte genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (2.13).

Als Sonde wurde die 600 bp lange *Human growth hormon* (Hgh)-Sequenz verwendet, welche mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RI aus dem transgenen DNA-Konstrukt isoliert wurde. *Bgl*II schneidet in der BRAP-cDNA Sequenz genau einmal an der Position 1762 (NM_006768.3). Des Weiteren gibt es eine *Bgl*II-Schnittstelle bei Position 147 des α -MHC-Promotors (Abb. 3.8). Die radioaktive Markierung und anschließende Hybridisierung mit der auf der Membran fixierten DNA erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben. Die Integration des transgenen DNA-Konstruktes in das Genom erfolgt meist nicht in Form von einer Kopie sondern als viele hintereinanderliegende Kopien in einer so genannten *head-to-tail*-Orientierung [Folger *et al.*, 1982]. Aufgrund des unbekanntenen Integrationsortes des transgenen DNA-Konstruktes konnte das genaue Bandenmuster nicht vorhergesagt werden. Bei den transgenen Mäusen wurde mindestens eine 900 bp große Bande erwartet, die durch die *head-to-tail*-Orientierung der Transgen-Kopien resultiert (Abb. 3.8). Je nach Entfernung der nächsten 3'-gelegenen *Bgl*II-Schnittstelle zum integrierten DNA-Konstrukt kann eine weitere, eventuell schwächere Nebenbande erwartet werden. Bei den transgenen Mäusen aller Linien konnte jedoch nur das 900 bp große DNA-Fragment detektiert werden, bei Wildtyp-Mäusen wurde erwartungsgemäß keine Bande detektiert.

Die Untersuchung des Expressionsniveaus wurde sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene durchgeführt. Es wurden Herzen von transgenen und Wildtyp-Mäusen präpariert und zum Entfernen von Blut aus den Ventrikeln und Gefäßen diese mit kaltem PBS kurz perfundiert. Die Isolation von RNA aus Herzgewebe erfolgte wie unter 2.10.7 beschrieben. Die *Real-time* PCR wurde unter Verwendung von human-BRAP-spezifischen Primern durchgeführt. Es konnte daher lediglich die Expression der unterschiedlichen Linien zueinander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass die drei Linien auf RNA-Ebene ähnlich viel BRAP überexprimieren. Eine Aussage über die Expressionsstärke im Verhältnis zu endogenem BRAP konnte aufgrund des Spezies-Unterschieds nicht gemacht werden. Die Western Blot-Analyse mit gegen den Flag-Tag gerichteten anti-Flag Antikörper zeigte eine deutliche Überexpression der Linien #314 und #317. Linie #311 zeigt eine geringere Überexpression von BRAP auf Proteinebene (nicht gezeigt).

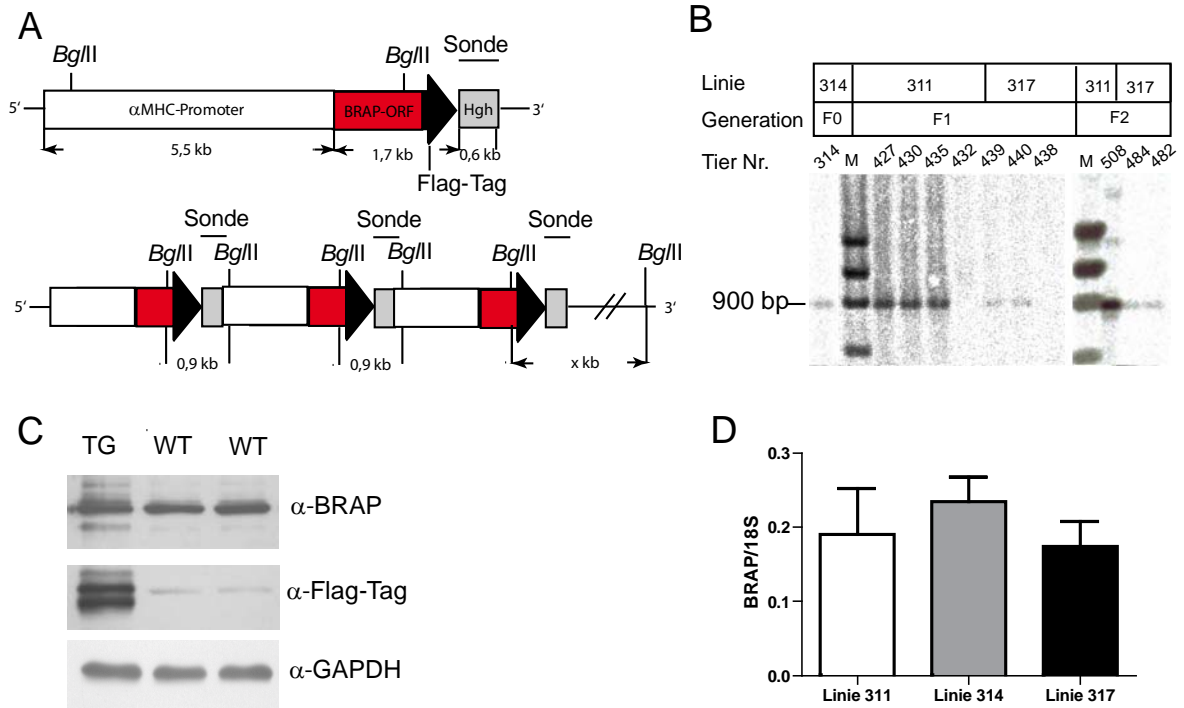


Abb. 3.8: Charakterisierung der BRAP-transgenen Mäuse. **A.** Das DNA-Konstrukt zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde im Vorfeld der Arbeit durch Dr. Tim Seidler generiert. Es bestand aus dem α MHC-Promoter, der humanen BRAP-cDNA, am 3'-terminalen Ende fusioniert mit einer Flag-Tag Sequenz und der Hgh-PolyA Sequenz. Angegeben sind die Schnittstellen des für die Southern Blot-Analyse verwendeten Restriktionsenzym *Bgl*II und die Lage der verwendeten Southern Blot-Sonde. Das Konstrukt wurde im Vorfeld der Arbeit durch Dr. Tim Seidler generiert. Schematische Darstellung der hypothetischen Integration des Transgen-Konstruktes in der sogenannten *head-to-tail*-Orientierung. **B.** Exemplarisches Ergebnis von Southern Blot-Analysen transgener und Wildtyp-Mäuse der drei Linien #311, #314, #317 verschiedener Generationen. Die genomische DNA aus Mausschwanz-Biopsien wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II geschnitten und eine Southern Blot-Analyse mit einer Hgh-PolyA-Sonde durchgeführt. Anhand des mitaufgetragenen Längenstandards (M) konnte die Größe des detektierten DNA-Fragmentes bestimmt werden. In den Proben der transgenen Mäuse konnte ein DNA-Fragment von etwa 900 bp detektiert werden, Proben der Wildtyp-Mäuse zeigten erwartungsgemäß keine Bande. **C.** Exemplarische Western Blot-Analyse von Herzgewebe aus BRAP-transgenen Mäusen (Linie #314). In Proteinlysaten aus Myokard transgener Mäuse wurde mittels Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen BRAP und Flag-Tag überexprimiertes BRAP detektiert. Zur Normalisierung der Proteinmenge wurde ein anti-GAPDH Antikörper verwendet. **D.** Vergleich der BRAP-Überexpression der drei Mauslinien mittels *Real-time* PCR. Nach der Isolation von RNA aus Myokardgewebe und cDNA-Synthese wurde eine *Real-time* PCR mit human-BRAP-spezifischen Primern durchgeführt. Die Auswertung zeigt ähnliche Expressionsniveaus der drei Linien.

3.3.3 Phänotypisierung BRAP-transgener Mäuse

Durch die Phänotypisierung der Linien #314 und #317 konnte der Effekt der myokardspezifischen BRAP-Überexpression im Kontext des FVB- und des C57B6-Hintergrundes untersucht werden. Beide Linien zeigten einen sehr vergleichbaren Phänotyp. Im Folgenden wird daher nur auf die Phänotypisierung der Linie #314 (FVB-Hintergrund) eingegangen. Linie #311 wurde aufgrund der sehr geringen BRAP-Überexpression auf Protein-Ebene nicht weiter phänotypisiert.

3.3.3.1 Morphologische Untersuchungen der transgenen Mäuse und Kaplan-Meier Überlebenskurve

Für eine gründliche morphologische Untersuchung wurden Organgewichte von transgenen und Wildtyp-Geschwistermäusen zu mehreren Alterszeitpunkten verglichen. Nach der Präparation der Organe wurde das exakte Gewicht von Leber, Lunge und des perfundierten Herzens erfasst. Die Daten wurden ins Verhältnis zum Körpergewicht der Maus gesetzt und erlaubten einen ersten Rückschluss auf den Zustand des Herzens. Bis zu einem Alter von zwei Wochen gab es keinen Unterschied des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses zwischen transgenen und Wildtyp-Geschwistermäusen. Ab einem Alter von vier Wochen war das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis bei den transgenen Mäusen von $5,67 \pm 0,12$ mg/g auf $6,25 \pm 0,20$ mg/g signifikant erhöht (Abb. 3.9). Diese mit dem Alter der Tiere dramatisch zunehmende Entwicklung war mit einer erhöhten Sterblichkeit der Mäuse assoziiert (Abb. 3.9). Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigt den Anteil der überlebenden Mäuse in Abhängigkeit des Alters an. Während Wildtyp-Mäuse keine Sterblichkeit bis zu einem Alter von 30 Wochen zeigten, war der Anteil der überlebenden transgenen Mäuse nach zehn Wochen auf 68% gesunken. Nach 30 Wochen lebten nur noch 14% der transgenen Mäuse. Die mittlere Lebensdauer der BRAP-transgenen Mäuse betrug 23 Wochen. Die Kaplan-Meier-Kurve basiert auf einer Zahl von 19 transgenen und 25 Wildtyp-Mäusen.

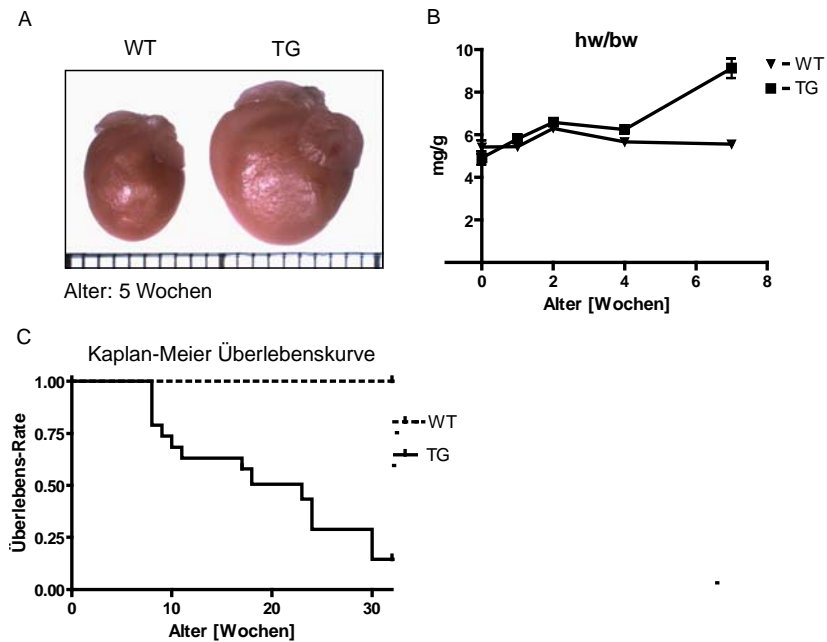


Abb. 3.9: Morphologische Untersuchung BRAP-transgener Herzen und Kaplan-Meier Überlebenskurve. **A.** Größenvergleich der Herzen von fünf Wochen alten BRAP-transgenen und Wildtyp-Mäusen (mm-Skala). **B.** Entwicklung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis der transgenen Mäuse bis zu einem Alter von sieben Wochen. **C.** Die Kaplan-Meier Überlebenskurve zeigt ein deutlich reduziertes Überleben der BRAP-transgenen Mäuse (TG: n=19, WT: n=25).

3.3.3.2 Echokardiographische Untersuchung der transgenen Mäuse

Für eine detailliertere Analyse der Herzmorphologie und -Kontraktilität wurden echokardiographische Untersuchungen BRAP-transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistermäusen durchgeführt. Untersucht wurden Mäuse zu mehreren Alterszeitpunkten. Die nachfolgend aufgeführten Daten beziehen sich auf fünf Wochen alte Mäuse. Die Auswertung der Daten ergab, dass der linksventrikuläre, enddiastolische Durchmesser (LVEDD), der bei Wildtyp-Mäusen $3,26 \pm 0,04$ mm (n=12) betrug, bei den transgenen Mäusen auf $4,61 \pm 0,17$ mm (n=11), ($p < 0,0001$) vergrößert war (Abb. 3.10). Der linksventrikuläre, endsystolische Durchmesser (LVESD) der transgenen Mäuse war ebenfalls stark vergrößert. Die Hinterwand und das Septum waren signifikant dünner als bei den Wildtyp-Mäusen (Septum: WT: $0,78 \pm 0,03$ mm, n=11; TG: $0,70 \pm 0,02$ mm, n=12). Die Verkürzungsfraction war von einem Wert von $54,94 \pm 1,24\%$ (n=13) bei den Wildtyp-Mäusen auf $21,45 \pm 2,76\%$ (n=12) bei den transgenen Mäusen verringert ($p < 0,0001$). Insgesamt zeigten die Herzen der transgenen Mäuse damit eine erhebliche Dilatation und funktionelle Einschränkung.

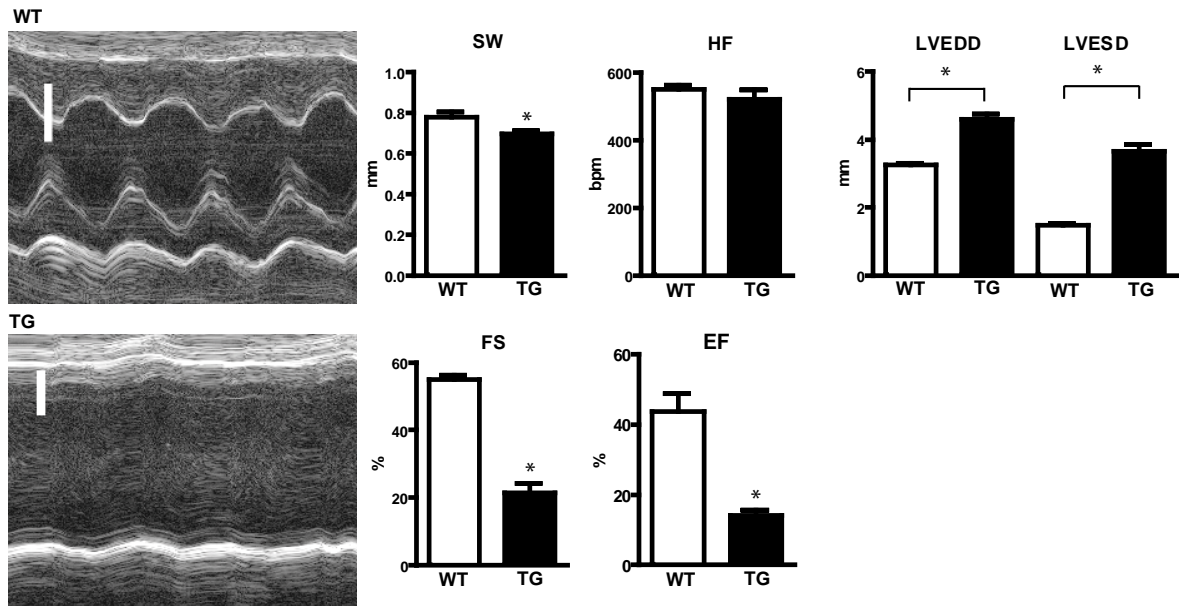


Abb. 3.10: Echokardiographische Untersuchung der Herzen BRAP-transgener Mäuse. Die Echokardiographie fünf Wochen alter transgener Mäuse (n=12) und Wildtyp-Geschwistermäuse (n=11) erfolgte im M-Mode in der longitudinalen Achse. Die BRAP-transgenen Mäuse wiesen ein signifikant dünneres Septum (SW), vergrößerte linksventrikuläre endsystolische und diastolische Durchmesser (LVESD, LVEDD), eine verringerte Verkürzungsfraction (FS) und eine geringere Ejektionsfraction (EF) bei gleicher Herzfrequenz (HF) auf. Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Frau Jessica Spitalieri durchgeführt. Eichbalken: 1,5 mm, bmp: Herzschläge pro Minute. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

3.3.3.3 Histologische Untersuchung der Herzen BRAP-transgener Mäuse

Zur weiteren Phänotypisierung der BRAP-transgenen Mäuse wurden die Herzen histologisch untersucht. Die frisch präparierten Herzen wurden mit PBS perfundiert und wie unter 2.23 beschrieben behandelt. Paraffin-Gewebeschnitte wurden nach der Masson-Trichrom-Methode angefärbt, was eine Beurteilung der Bildung einer interstitiellen Myokardfibrose ermöglichte. Nach Masson-Trichrom-Färbung erscheint Muskelgewebe rot, Bindegewebe blau-violett und Zellkerne braun-schwarz. Bei dilatativen Kardiomyopathien wird häufig eine Zunahme des Bindegewebes im Myokard beobachtet, was zu einer erhöhten Steifheit der Herzwände und letztendlich zu systolischer sowie diastolischer Dysfunktion führen kann. Die Masson-Trichrom-Färbung von Gewebeschnitten der BRAP-transgenen Herzen zeigten dagegen, dass der Anteil des Bindegewebes nicht erhöht war (Abb. 3.11).

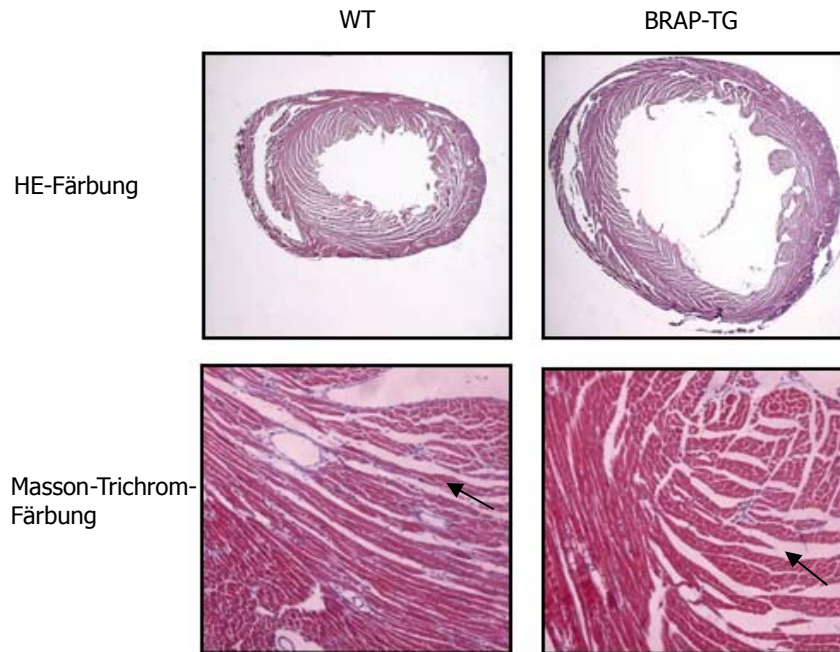


Abb. 3.11: Histologische Untersuchung der Herzen BRAP-transgener Mäuse. Die präparierten und mit PBS perfundierten Herzen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden einer Hämatoxilin-Eosin (HE)- beziehungsweise einer Masson-Trichrom-Färbung unterzogen. Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht eine Beurteilung der interstitiellen Fibrose. In den Herzen der BRAP-transgenen Mäusen war der Anteil des Bindegewebes nicht erhöht. Die repräsentativen Herz-Querschnitte zeigen eine Dilatation des linken Ventrikels ohne Zunahme der Wanddicke bei den transgenen Mäusen.

3.3.3.4 Analysen zur Expression des Hypertrophie-Markers BNP

Die Sekretion des Peptid-Hormons *brain natriuratic peptide* (BNP) ist in Abhängigkeit der myokardialen Wandspannung erhöht und stellt einen diagnostisch verwendeten Marker bei Herzerkrankungen dar [Dao *et al.*, 2001]. Während der Entstehung einer Herzinsuffizienz tritt eine charakteristische Veränderung des Expressionsmusters einiger Gene auf, das so genannte "fötale"-Genprogramm wird aktiviert. Dabei wird die Expression solcher Gene gesteigert, die bei der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind und unter normalen Bedingungen im adulten Organ reprimiert sind. Die Plasmakonzentration von BNP ist bei systolischer und diastolischer Dysfunktion erhöht.

Hier wurde die BNP mRNA-Expression im Myokard BRAP-transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mittels *Real-time* PCR bestimmt. Die BNP-Expression war in den transgenen Mäusen im Herzen auf das Vierfache erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (BNP/GAPDH: WT: $0,32 \pm 0,11$, n=5, TG: $1,28 \pm 0,20$, n=5, $p < 0,005$) (Abb. 3.12).

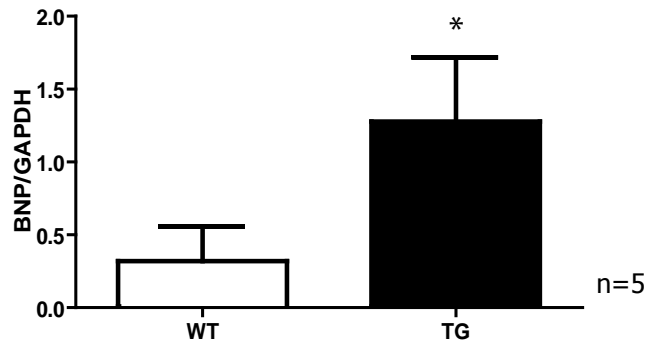


Abb. 3.12: Untersuchung der BNP-Expression in den Herzen BRAP-transgener Mäuse. Im Alter von sieben Wochen wurden die transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse getötet, die Herzen entnommen und RNA aus dem Myokard isoliert. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese und *Real-time* PCR mit BNP-spezifischen Primern durchgeführt. Dargestellt ist das Verhältnis der BNP-Expression zur Expression des Referenz-Gens GAPDH. Die Expression des Hypertrophie-Markers BNP war in den transgenen Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,005$).

3.3.3.5 Analysen zur Aktivität von Proteinen des MAPK-Signalweges in den Herzen der BRAP-transgenen Mäuse

Um den Mechanismus der Entstehung der Herzinsuffizienz bei den transgenen Mäusen und die Funktion von BRAP *in vivo* aufzuklären, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden Mäuse zu verschiedenen Alterszeitpunkten geopfert, um den Verlauf der Entstehung der Herzinsuffizienz nachzuvollziehen. Nach den Experimenten an isolierten Kardiomyozyten, bei denen ein Effekt von BRAP auf den Mek/Erk-, den p38- und den JNK-Signalweg gezeigt werden konnte, wurde zunächst die Aktivierung dieser drei Wege in den transgenen Mäusen untersucht.

Im Unterschied zu den Versuchen an isolierten Kardiomyozyten konnte zu keinem Zeitpunkt eine Inhibition der Mek-Phosphorylierung durch BRAP-Überexpression festgestellt werden. Bei drei Tage alten Mäusen war die Aktivität der MAPK-Wege der transgenen und Wildtyp-Mäuse vergleichbar (Abb. 3.13).

In Herzlysaten von drei Wochen alten und älteren transgenen Mäusen war die Phosphorylierung von Mek zum Teil sogar gesteigert. Zudem war die Menge an gesamt-Mek bei den sieben Wochen alten und älteren transgenen Mäusen erhöht. JNK war abhängig vom Alter der Mäuse teilweise nur gering phosphoryliert und in jüngeren Tieren war nur eine phosphorylierte Isoform detektierbar. Bei zwölf Wochen alten Mäusen war JNK in den transgenen Mäusen stärker phosphoryliert (nicht gezeigt). Phosphoryliertes p38 war dagegen sehr gut detektierbar. Während bei drei und sechs Tage alten Mäusen die p38-Phosphorylierung nicht verändert war, zeigte sich bei einem Alter von drei Wochen eine deutlich erhöhte p38-Phosphorylierung in den transgenen Tieren. Bei sieben Wochen alten und älteren Mäusen war p38 in den transgenen Mäusen dagegen weniger stark phosphoryliert (Abb. 3.13).

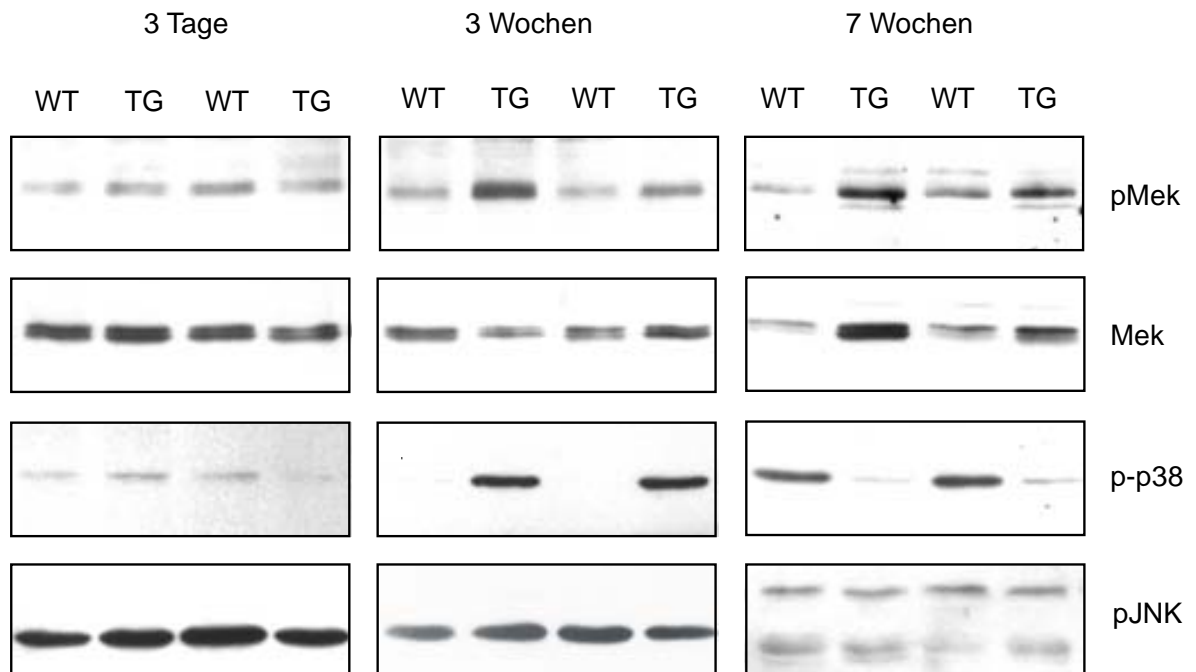


Abb. 3.13: Western Blot-Analyse der BRAP-transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Proteinlysate aus dem Myokard drei Tage, drei Wochen und sieben Wochen alter transgener (TG) und Wildtyp (WT)-Mäuse wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Western Blot-Analyse mit anti-phospho-Mek-, anti-total-Mek-, anti-phospho-p38- und anti-phospho-JNK-Antikörpern durchgeführt. Bei drei Tage alten transgenen Mäusen zeigte sich kein Unterschied zu den Wildtyp-Tieren. Im Myokard drei Wochen alter transgener Mäuse waren phospho-Mek und phospho-p38 aktiviert. Sieben Wochen alte BRAP-transgene Mäuse zeigten dagegen mehr phospho- und total-Mek und eine verminderte Phosphorylierung der p38-Kinase.

Wie von Matheny *et al.* [2004] gezeigt wurde, inhibiert BRAP die KSR-abhängige Mek-Aktivierung. Da wahrscheinlich nur die Mek-Aktivierung über C-Raf abhängig von KSR ist und dagegen B-Raf auch KSR-unabhängig Mek aktivieren kann, scheint der Effekt von BRAP spezifisch für C-Raf zu sein [Chen *et al.*, 2008]. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die gesteigerte Mek-Aktivität bei den älteren BRAP-transgenen Mäusen durch eine Aktivierung von B-Raf erfolgt. Im Alter von drei Tagen war sowohl die Menge an gesamt-B-Raf als auch der Anteil an phosphoryliertem B-Raf (Ser445) bei den transgenen Mäusen unverändert. Bei drei und sieben Wochen alten transgenen Mäusen konnte mehr phosphoryliertes und gesamt B-Raf im Myokard im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Von diesen Befunden ausgehend wurden systematisch die übergeordneten Kinasen untersucht, um weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Effekte von BRAP auf die MAPK-Signalwege zu erlangen.

Die Ras-Familie der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine stellt ein zentrales Glied bei der Kontrolle intrazellulärer Signalwege dar. Die Membran-assoziierten Ras-Isoformen leiten Signale von Transmembran-Rezeptoren zu den nachgeschalteten intrazellulären Signalproteinen weiter. Ras wechselt Stimulus-abhängig zwischen einer inaktiven GDP-bindenden- zu einer aktiven GTP-bindenden Konformation. GTP-Ras aktiviert unter anderem Raf, aber auch zahlreiche andere Proteine.

Es sollte daher untersucht werden, ob die gesteigerte Phosphorylierung von B-Raf in drei und sieben Wochen alten transgenen Mäusen durch eine erhöhte Aktivität von Ras bewirkt wird. Unter Verwendung eines Pulldown-Assays wurde die Ras-Aktivität im Myokard vier und zwölf Wochen alter Mäuse bestimmt. Dabei wurde eine Agarosegekoppelte Ras-bindende Domäne von C-Raf verwendet, die nur aktives Ras bindet, um GTP-Ras zu präzipitieren und anschließend mittels Western Blot-Analyse das präzipitierte Ras quantifiziert (2.18). Es zeigte sich weder bei vier Wochen noch bei zwölf Wochen alten BRAP-transgenen Mäusen eine veränderte Ras-Aktivität (Abb. 3.14).

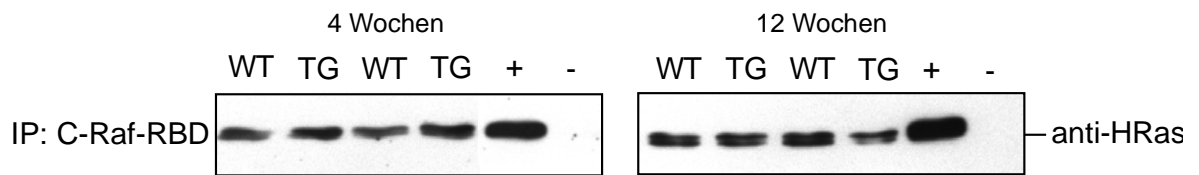


Abb. 3.14: Bestimmung der H-Ras-Aktivität im Myokard von vier und sieben Wochen alten BRAP-transgenen und Wildtyp-Mäusen. Myokard-Proben von BRAP-transgenen und Wildtyp-Mäusen wurden homogenisiert. 5 mg Gesamt-Protein wurden für die Präzipitation von aktiviertem Ras durch Agarose-gekoppelte Ras-bindende Domäne von C-Raf eingesetzt. 20 µl des Präzipitats wurde für die Western Blot-Analyse mit anti-H-Ras Antikörper verwendet. Als Kontrollen wurden jeweils 5 mg Protein mit GTP γ S (positiv Kontrolle: +) beziehungsweise GDP (negativ Kontrolle: -) für 30 min bei 30°C inkubiert.

SEK1 (SAPK/Erk-Kinase), auch bekannt als MKK4 oder Jun Kinase Kinase (JNKK), aktiviert JNK als Antwort auf zellulären Stress. SEK1 war in drei Wochen alten BRAP-transgenen Mäusen gesteigert phosphoryliert im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistermäusen. MKK3 und MKK6 sind zwei eng verwandte Kinasen, die unter anderem die p38-Kinase aktivieren. MKK3 und MKK6 werden ebenfalls durch verschiedene Formen von zellulärem Stress aktiviert. In jungen transgenen Mäusen (drei und sechs Tage alt) ist die Phosphorylierung von MKK3/6 nicht verändert. Bei drei Wochen und sieben Wochen alten transgenen Tieren ist die Phosphorylierung von MKK3/6 dagegen deutlich gesteigert (Abb. 3.15).

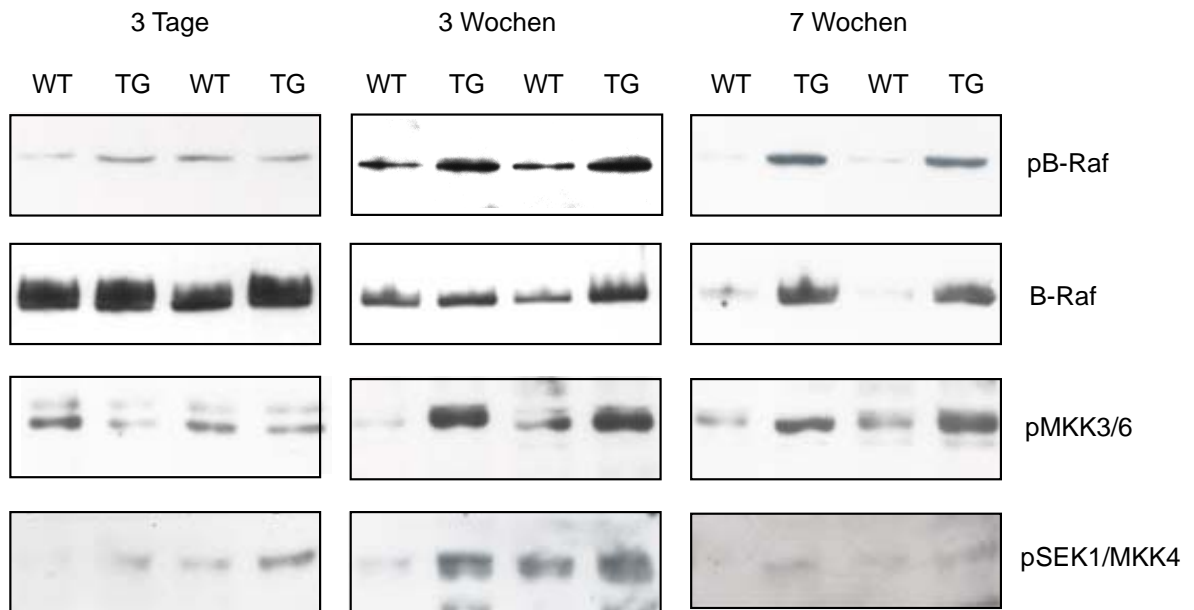


Abb. 3.15: Western Blot-Analyse der BRAP-transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Myokardproben drei Tage, drei Wochen und sieben Wochen alter transgener (TG) und Wildtyp (WT)-Mäuse wurden mittels anti-phospho-B-Raf, anti-total-B-Raf, anti-phospho-MKK3/6 und anti-phospho-SEK/MKK4 Antikörper untersucht. Proben drei Tage alter transgener Mäuse zeigten keine Unterschiede zu denen von Wildtyp-Mäusen, bei drei Wochen alten transgenen Mäusen war gesamt B-Raf und phospho-MKK3/6 erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In Proben sieben Wochen alter BRAP-transgener Mäuse war sowohl phospho- als auch gesamt-B-Raf erhöht und MKK3/6 stärker phosphoryliert als bei Wildtyp-Mäusen.

3.3.3.6 Untersuchung der Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs

Der Calcineurin-NFAT (*nuclear factor of activated T cells*)-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Hypertrophie und Herzinsuffizienz [Molkentin *et al.*, 1998]. Die Phosphatase Calcineurin wird kalziumabhängig aktiviert und dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). NFAT, welches im phosphorylierten Zustand zytosolisch vorliegt, transloziert nach Dephosphorylierung in den Zellkern. Dort agiert NFAT als Transkriptionsfaktor und aktiviert zahlreiche prohypertrophe Gene. Es wurde bereits mehrfach ein Zusammenhang des Calcineurin-NFAT-Signalweges mit den MAPK-Wegen nachgewiesen.

BRAP-transgene Mäuse wurden daher auf eine Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalweges hin untersucht. Es wurden Western Blot-Analysen mit Herzlysaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um NFATc2 nachzuweisen. Zytoplasmatisches NFATc2 ist mehrfach phosphoryliert und erscheint in der Western Blot-Analyse aufgrund des höheren Molekulargewichts im Vergleich zur nukleär lokalisierten unphosphorylierten Form als weitere Bande. Bei sieben Wochen alten transgenen Mäusen war die Expression von NFATc2 im Myokard deutlich erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.16). Rückschlüsse auf die NFAT-Aktivität erlaubte eine Messung der Expression des NFAT-abhängig transkribierten *modulatory calcineurin-interacting protein 1* (MCIP1). MCIP1 ist an einem negativen Rückkopplungsmechanismus beteiligt, da es Calcineurin inhibiert, während Calcineurin die Expression von MCIP1 induziert [Yang *et al.*, 2000]. Mittels *Real-time* PCR mit MCIP1-spezifischen Primern konnte die Expression auf mRNA-Ebene analysiert werden. Bei sieben Wochen alten transgenen Mäusen war die MCIP-mRNA trotz einer hohen Schwankung von Tier zu Tier signifikant gesteigert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (MCIP1/18S: WT: $0,010 \pm 0,012$, n=9; TG: $0,0014 \pm 0,0021$, n=12; $p < 0,05$), (Abb. 3.16).

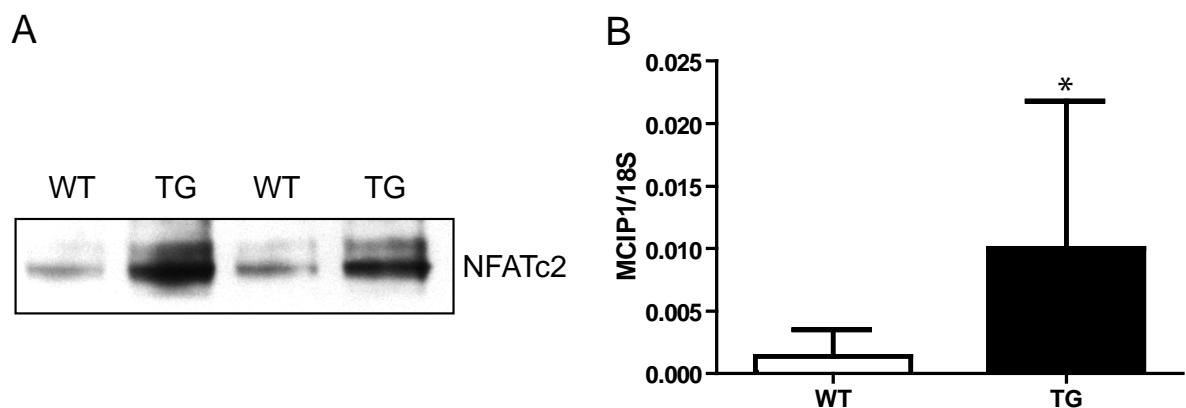


Abb. 3.16: Untersuchung der Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges bei sieben Wochen alten BRAP-transgenen Mäusen. A. Die Western Blot-Analyse von Myokardproben transgener und Wildtyp-Mäuse mit anti-NFATc2-Antikörper zeigte eine erhöhte Menge an NFATc2. B. Die Expression des Calcineurin/NFAT-abhängig transkribierten MCIP1 wurde mittels *Real-time* PCR analysiert. Die aus den Myokard-Proben isolierte RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und diese für die *Real-time* PCR mit MCIP1-spezifischen Primern eingesetzt. Für die Normalisierung der Proben auf die Ausgangsmenge an RNA wurden 18S-RNA spezifische Primer verwendet. Die Expression von MCIP1 war in den Myokard-Proben der sieben Wochen alten BRAP-transgenen Mäuse signifikant erhöht ($p < 0,05$, WT: n=9, TG: n=12).

3.3.3.7 Analyse der Apoptose in Herzen BRAP-transgener Mäuse

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Apoptose häufig mit Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz assoziiert ist. Die Apoptose wird ausgelöst durch unterschiedlichste Formen von zellulärem Stress, wodurch es zur Aktivierung von proapoptischen Proteinen kommt. Ein früher Marker für eine Mitochondrien-abhängige Apoptoseinitiation stellt das Verhältnis der Proteine Bax und Bcl-2 zueinander dar. Ein erhöhtes Bax/Bcl-2-Verhältnis weist auf Apoptose hin.

Um festzustellen, ob in den Herzen der transgenen Mäuse vermehrt Apoptose abläuft, wurden systematisch einzelne Ereignisse der Apoptosekaskade untersucht. Zunächst wurde das Bax/Bcl-2-Verhältnis mittels Western Blot-Analyse zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten untersucht. Während in drei Tage alten Mäusen kein Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen bestand, war das Bax/Bcl-2-Verhältnis der drei und sieben Wochen alten transgenen Tiere erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.17). Schon in zwei Wochen alten transgenen Mäusen konnte ein erhöhtes Bax/Bcl-2-Verhältnis detektiert werden (nicht gezeigt).

Um den nachfolgenden Schritt der Apoptosekaskade zu untersuchen, wurde der Anteil des zytosolischen Cytochrom C im Myokard drei Wochen alter transgener Mäuse untersucht. Wie unter 2.16.3 beschrieben wurden mitochondrielle und zytosolische Fraktionen aus Herzgewebe isoliert und mittels Western Blot-Analyse die Menge an Cytochrom C bestimmt. Die Menge an zytosolischem Cytochrom C war in den transgenen Mäusen deutlich erhöht (Abb. 3.17).

Im weiteren Ablauf des apoptotischen Prozesses führt die erhöhte Cytochrom C-Konzentration im Zytoplasma zu einer Aktivierung der Caspase 9, die nach autoproteolytischer Spaltung zusammen mit weiteren Proteinen das sogenannte Apoptosom bildet. Es schließt sich eine kaskadenartige Aktivierung weiterer Caspasen an, die schließlich zur Degradation der DNA und letztendlich der ganzen Zelle führt. Durch Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern sollte die Aktivierung von Caspase 9 durch Detektion des proteolytischen Spaltproduktes erfasst werden. Während es im Alter von drei Tagen und drei Wochen diesbezüglich keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen gab, war in den sieben und zwölf Wochen alten transgenen Mäusen sogar weniger Caspase-Spaltprodukt detektierbar als in Wildtyp-Mäusen. Auch Caspase 3 und PARP waren nicht stärker aktiviert in den BRAP-transgenen Tieren. Eine TUNEL-Färbung markiert freie 3'OH-Enden genomischer DNA, welche während der späten Phase der Apoptose gebildet werden. Die TUNEL-Färbung histologischer Präparate zeigte, dass im Myokard der transgenen Mäuse keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt war in den transgenen Mäusen eine Initiation der Apoptose durch das erhöhte Verhältnis der pro- und antiapoptotischen Proteine Bax und Bcl2 und eine erhöhte zytoplasmatische Cytochrom C-Konzentration nachweisbar. Die Untersuchung der Caspase-Aktivierung und der TUNEL-Assay zeigten jedoch, dass die späteren Ereignisse der Apoptose-Kaskade in den transgenen Mäusen nicht spontan erhöht waren.

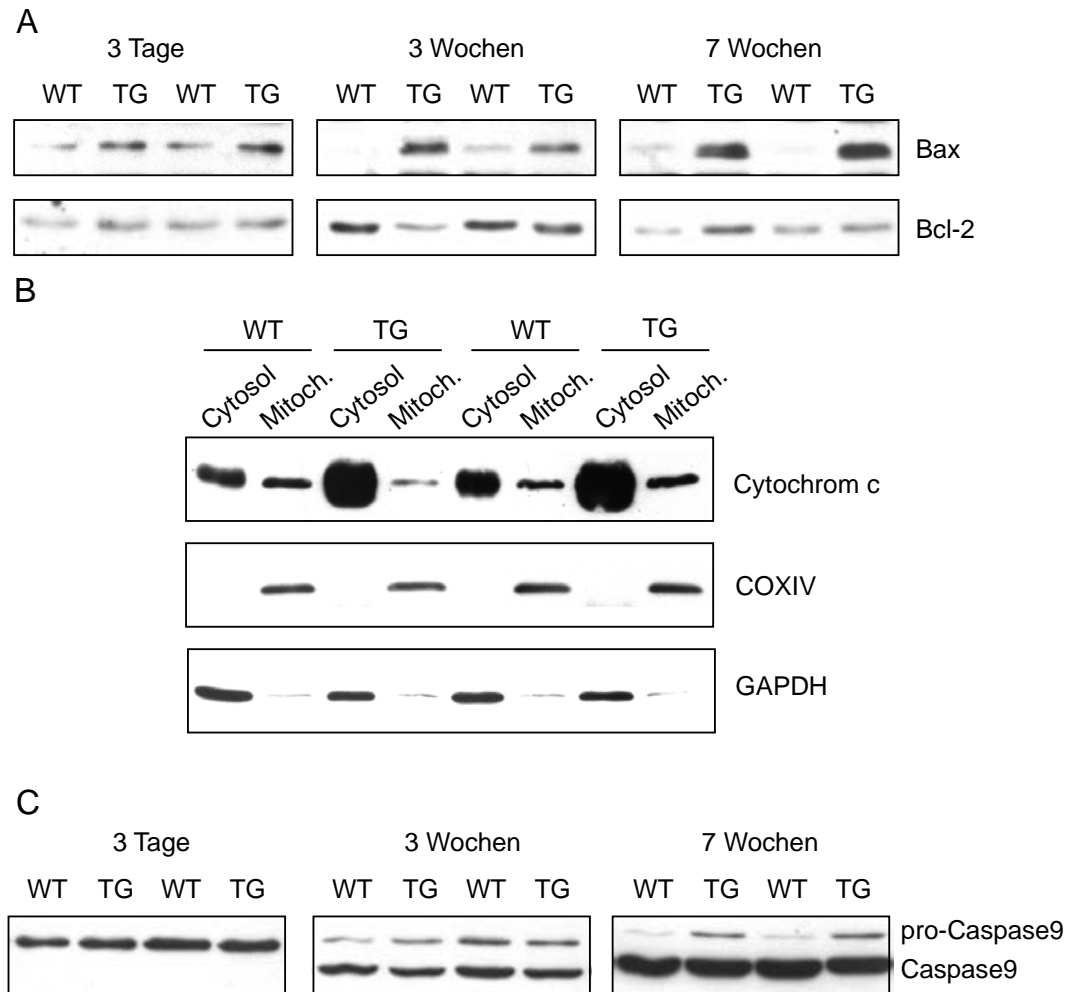


Abb. 3.17: Analyse der Apoptose in Herzen der BRAP-transgenen Mäuse. A. Western Blot-Analyse der pro- und anti-apoptotischen Proteine Bax und Bcl-2 in drei Tage, drei Wochen und sieben Wochen alten transgenen Mäusen mit anti-Bax- und anti-Bcl-2-Antikörpern. Während bei drei Tage alten transgenen Tieren das Bax/Bcl-2 Verhältnis unverändert blieb, war es bei drei und sieben Wochen alten transgenen Mäusen erhöht. **B.** Wie unter 2.16.3 beschrieben, wurden Myokardlysate in Mitochondrien- und Zytosolfractionen aufgetrennt und durch Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Cytochrom C, Cytochrom C-Oxidase IV (COXIV) und GAPDH untersucht. Der Anteil des zytosolischen Cytochrom C war in den transgenen Mäusen deutlich erhöht. Die Detektion des mitochondrialen Proteins COXIV zeigt gleiche Beladungsmengen der Mitochondrien-Fraktion und die Reinheit der Zytosolfraktion. Anti-GAPDH-Antikörper wurde verwendet, um gleiche Protein-Ladungsmengen der Zytosolfraktion zu zeigen. **C.** Western Blot-Analyse mit Caspase 9-spezifischem Antikörper. Der Antikörper detektiert sowohl pro-Caspase 9 als auch die während der Apoptose proteolytisch gesplante Caspase 9. Bei drei Tage alten Mäusen konnte nur pro-Caspase 9 detektiert werden, zwischen transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen ist kein Unterschied sichtbar. Auch bei drei Wochen alten transgenen Mäusen war kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen vorhanden. Bei sieben Wochen alten transgenen Mäusen konnte mehr pro-Caspase 9 bei den transgenen Mäusen detektiert werden.

3.3.4 Generierung und Charakterisierung einer induzierbaren herzspezifischen BRAP-transgenen Mauslinie

Mit dem Modell der vorab beschriebenen BRAP-transgenen Maus konnten nicht alle offenen Fragen zur BRAP-Funktion *in vivo* beantwortet werden. Insbesondere die Fragen, ob ein geringeres BRAP-Überexpressionsniveau eine ebenso verheerende Wirkung auf das Herz besitzt und ob eine akute Überexpression von BRAP im adulten Herzen einen Effekt hat, blieben offen. Ein weiterer interessanter Punkt wäre, ob die durch die Überexpression entstehende Hypertrophie reversibel ist, sobald keine Überexpression mehr stattfindet. Daher sollte ein induzierbares, herzspezifisch BRAP-überexprimierendes Mausmodell generiert werden.

3.3.4.1 Generierung eines murinen Modells zur induzierbaren herzspezifischen BRAP-Überexpression

Um eine zeitlich kontrollierbare, herzspezifische Überexpression von BRAP zu erreichen, wurde ein modifizierter α MHC-Promotor verwendet [Sanbe *et al.*, 2003]. Bei diesem Promotor wurden drei GATA-Bindestellen und zwei *thyroid-like responsive elements*, die für die herzspezifische Expression nötig sind, deletiert. 5'wärts der TATA-Box wurden sieben Kopien des Tet-Operators (TetO) inseriert, wodurch der Promotor durch den Tet-Aktivator aktivierbar wird [Sanbe *et al.*, 2003]. Die kodierende Sequenz des überzuexprimierenden Proteins wurde in den diesen Promotor enthaltenden Vektor inkloniert. Zur Induktion der Überexpression musste die resultierende Maus-Linie zunächst mit einer weiteren Maus-Linie verpaart werden, die einen Tet-Aktivator (TetA) in Fusion mit dem Transaktivator VP16 unter der Kontrolle eines α MHC-Promotors überexprimiert. Dieser Tet-Aktivator kann an den Tet-Operator binden und dadurch den Promotor aktivieren. In Anwesenheit eines Tetracyklins (Doxycyclin) dimerisiert der Tet-Aktivator und kann nicht an den tet-Operator binden, wodurch der Promotor inaktiv ist. Da der Promotor unter Tetracyclin-Behandlung inaktiv ist, handelt es sich um ein sogenanntes "Tet-off-System" (Abb. 3.18).

Die kodierende Sequenz des humanen BRAP und eine 3'-terminale fusionierte Flag-Tag-Sequenz wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind*III in den α MHC-tet-Vektor einkloniert, der den tet-modifizierten α MHC-Promotor enthält. Das fertige Konstrukt wurde für die Mikroinjektion aufbereitet und in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in befruchtete Oozyten von FVB-Mäusen injiziert. Durch die erste Injektion konnte jedoch nur ein Founder-Tier generiert werden, welches keine transgenen Nachkommen hervorbrachte. Aus einer zweiten Mikroinjektion sind elf Founder hervorgegangen. Es konnten von drei verschiedenen Founder-Linien transgener Tiere erzeugt werden.

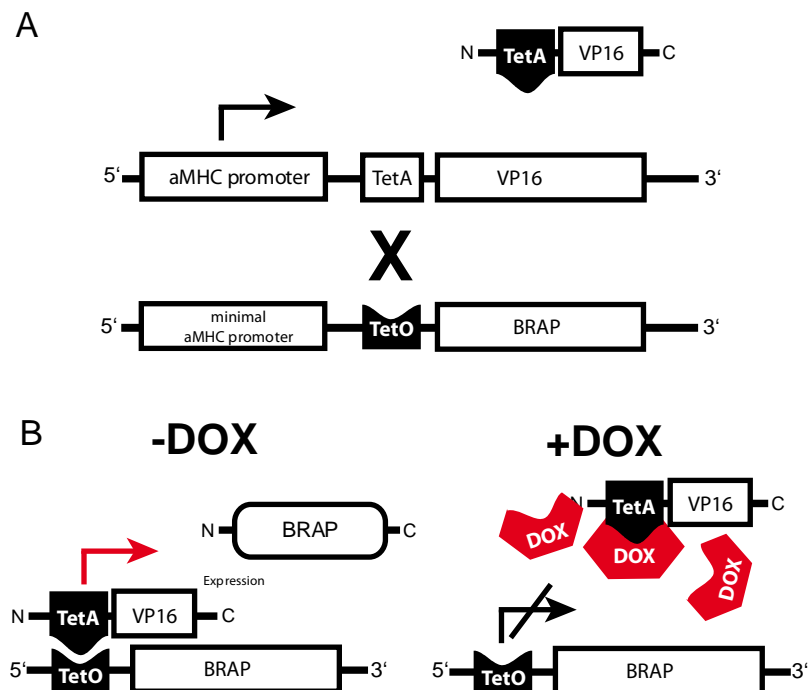


Abb. 3.18: Das Tet-off System zur Generierung induzierbarer herzspezifischer Überexpressions-Mäuse. **A.** Für die Überexpression von BRAP wurden zunächst zwei Maus-Linien verpaart: die unter der Kontrolle des α MHC-Promotor das TetA-VP16 Fusionsprotein überexprimierende Tet-Aktivator-Linie und die BRAP unter der Kontrolle des modifizierten Tet-abhängigen α MHC-Promotor überexprimierende Linie. **B.** Bei Abwesenheit von Doxycyclin bindet der Tet-Aktivator an den Tet-Operator, was zur Aktivierung des Promotors und zur Überexpression von BRAP führt. Unter Doxycyclin-Behandlung wird die Interaktion des Tet-Aktivators mit dem Tet-Operator und somit die BRAP-Expression unterbunden.

3.3.4.2 Analyse der Maus-Linien auf Funktionalität

Bei der Generierung eines induzierbaren Maus-Modells ist es notwendig, die einzelnen Linien daraufhin zu testen, ob die Expression im nichtinduzierten Zustand reprimiert ist und ob sie nach Absetzen des Doxycyclins ausreichend induzierbar ist. Dies trifft häufig nicht auf alle Linien zu, denn die Expression des transgenen Proteins ist abhängig von dem genomischen Kontext des Integrationsortes, welcher bei jeder Linie unterschiedlich ist. Zwei Linien wurden bereits daraufhin untersucht, ob die Expression im uninduzierten Zustand reprimiert ist. Es wurden Western Blot-Analysen von Herzlysaten mit BRAP-spezifischem Antikörper durchgeführt. Beide Linien zeigten im uninduzierten Zustand keine erhöhte Expression von BRAP im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Induzierbarkeit wurde bisher nur bei Linie #35 untersucht. Dazu wurden Mäuse verwendet, bei denen im Alter von etwa sechs Wochen das Doxycyclin abgesetzt wurde. Acht Wochen nach Absetzen des Doxycyclins wurden die Tiere getötet, die Herzen präpariert und Western Blot-Analysen durchgeführt. Diese Mäuse wiesen eine moderate Überexpression von BRAP auf. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Banden zeigte eine Vervierfachung der BRAP-Expression im Vergleich zu Wildtyp- beziehungsweise einfach transgenen Mäusen (Wildtyp-, einfach transgene Mäuse: BRAP/GAPDH: $0,53 \pm 0,26$; doppel-transgene Mäuse, induziert: $2,09 \pm 0,01$).

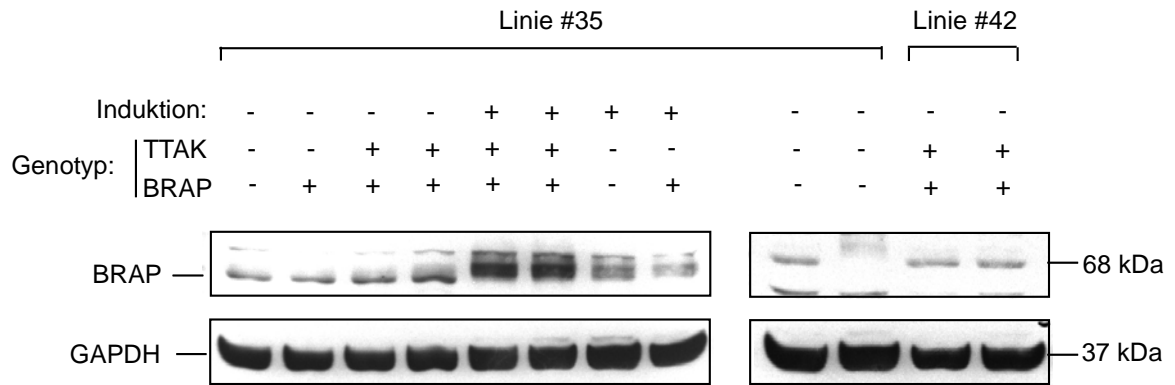


Abb. 3.19: Untersuchung von Reprimierbarkeit und Induzierbarkeit der BRAP-Überexpression im Myokard induzierbarer BRAP-transgener Mäuse. Induzierbare BRAP-transgene Mäuse der Linien #35 und #42 (BRAP) wurden mit Mäusen der Transaktivator-Linie (TTAK) verkreuzt. Doppel-transgene Mäuse, die sowohl das BRAP-Transgen-Konstrukt, als auch das TTAK-Transgen-Konstrukt besaßen, wurden zum Test auf Reprimierbarkeit der BRAP-Überexpression im nichtinduzierten Zustand geopfert und die Herzen entnommen. Zum Test auf Induzierbarkeit wurde bei doppel-transgenen Mäusen durch Doxycyclin-Gabe die BRAP-Überexpression induziert und nach acht Wochen wurden die Mäuse zur Herzentnahme getötet. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Mäuse und transgene Mäuse, die nur eines der Transgen-Konstrukte enthielten. Die Western Blot-Analyse mit BRAP-spezifischem Antikörper zeigte, dass die doppel-transgenen Mäuse im nichtinduzierten Zustand ähnlich viel BRAP exprimierten, wie Wildtyp-Mäuse. Doppel-transgene Mäuse, bei denen die Expression induziert wurde, zeigten eine gesteigerte BRAP-Expression.

3.3.4.3 Präliminäre Phänotypisierung der induzierbaren BRAP überexprimierenden Mäuse

Linie #42 wurde bereits initial durch echokardiographische Untersuchung phänotypisiert. Die Überexpression von BRAP wurde im Alter von sechs Wochen durch Absetzen des Doxycyclins im Myokard der BRAP und TTAK doppel-transgenen Mäuse induziert. Vor der Induktion und vier Wochen nach Induktion wurden die Mäuse echokardiographisch untersucht. Nach vier Wochen war die Verkürzungsfraction der doppel-transgenen Mäuse bereits verringert im Vergleich zu einfach-transgenen TTAK-Mäusen (Verkürzungsfraction: TTAK: $44,9 \pm 1,0\%$, $n=7$; BRAP/TTAK: $40,3 \pm 1,79\%$, $n=4$, $p < 0,05$).

3.4 BRAP-*genetrap*-Mausmodell

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine BRAP-Überexpression sehr schwerwiegende Folgen für das Herz hat. Nicht minder interessant ist jedoch die Frage, welchen Effekt eine verringerte BRAP-Expression beziehungsweise ein völliges Fehlen von BRAP hat. Um dies zu untersuchen, wurde ein BRAP-*genetrap*-Mausmodell generiert. Bei einem *genetrap*-Konstrukt (wörtlich übersetzt: Genfalle) handelt es sich um ein rekombinantes DNA-Konstrukt bestehend aus einer Splice-Akzeptor-Sequenz, einem Translations-Abbruch-Signal und einer Neomycin-Selektions-Kassette. Häufig enthält das Konstrukt zusätzlich ein Reportergen (z.B. lacZ). Einige Firmen stellen ES-Zell-Klone her, bei denen ungerichtet eine *genetrap*-Kassette ins Genom inseriert ist. Bei der Transkription eines solchen Gens, wird durch die in der *genetrap*-Kassette enthaltene Splice-Akzeptor-Sequenz, die das Translations-Abbruch-Signal enthaltende Sequenz an das 5'wärts gelegene Exon prozessiert und es kommt im Folgenden zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation.

3.4.1 Generierung der BRAP-*genetrap* Mauslinie

Ein ES-Zell-Klon, der eine *genetrap*-Kassette in Intron 4 des BRAP-Genes enthält, wurde vom Sanger-Institut bezogen. Die Zellen wurden expandiert, wobei darauf geachtet wurde, die Passagenanzahl niedrig zu halten und frühzeitig Zellen einer niedrigen Passagenzahl einer Kryokonservierung zu unterziehen. In Kooperation mit dem MPI für experimentelle Medizin wurden durch Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastozysten Chimere erzeugt. Da die ES-Zellen einen 129/Sv-Hintergrund besaßen, während die Blastozysten von C57B6-Mäusen entstammten, konnte anhand der Fellfarbe der Chimeren zurückgeschlossen werden, wie hoch der Anteil der Zellen war, der auf *genetrap*-ES-Zellen zurückging. Geboren wurden 21 Chimeren, deren Anteil an heller Fellfarbe zwischen 15-100% betrug. Entscheidend ist jedoch, ob Keimzellen aus den *genetrap*-ES-Zellen gebildet wurden. Es wurden acht Chimere mit C57B6-Wildtyp-Mäusen verpaart, von denen fünf Chimere für das *genetrap*-Konstrukt positiven Nachwuchs hervorbrachten. Durch Rückkreuzung einer positiven Maus mit C57B6-Wildtyp-Mäusen wurde eine Brap-*genetrap* Mauslinie generiert.

3.4.2 Charakterisierung der BRAP-*genetrap* Mauslinie

3.4.2.1 Lokalisation der *genetrap*-Kassette

Mittels 5'-RACE identifizierte das Sanger Institut das Intron des Gens, in dem sich die *genetrap*-Kassette befindet. Die genaue Position der Kassette im Intron ist jedoch unbekannt. Um eine robuste Genotypisierungsstrategie zu etablieren war es jedoch unumgänglich die genaue Position der Kassette zu bestimmen. Im vorliegenden Fall ist das Intron 4 von BRAP 6,8 kb groß. Der Bereich der Integration der Genetrap-Kassette wurde mittels PCR amplifiziert und das Produkt anschließend sequenziert. Bei PCR-Reaktionen mit einem vorwärts-Primer in Exon 4 und einem rückwärts-Primer in der *genetrap*-Kassette beziehungsweise einem vorwärts-Primer am 3'-Ende der Kassette und rückwärts-Primer in Exon 5 konnte kein Produkt amplifiziert werden. Daher wurden vorwärts-Primer über das Intron verteilt und in individuellen PCR-Ansätzen jeweils mit einem rückwärts-Primer in der *genetrap*-Kassette kombiniert. Problematisch dabei ist, dass Intron-Sequenzen häufig repetitive Elemente enthalten, die mehrfach im Genom vorkommen können. Dies kann das Auftreten von unspezifischen Produkten oder ein Fehlschlagen der PCR bewirken. Unter Verwendung der Primer-Kombination BRAP-I4e-f/pGTlox-r konnte schließlich ein PCR-Produkt amplifiziert und sequenziert werden. Anhand dieser Sequenz konnte gezeigt werden, dass die *genetrap*-Kassette an Position 5463 in Intron 4 inseriert ist. Mit diesem Wissen konnten nun Primer für die Genotypisierung der Mäuse ausgewählt werden. Um in einer PCR-Reaktion Wildtyp-, heterozygote- und homozygote Mäuse identifizieren zu können, wurde eine PCR-Strategie mit drei Primern etabliert. Der Primer BRAP-GT-f hybridisiert im Intron 5'-wärts der *genetrap*-Kassette, BRAP-GT-r im 5'-Bereich der *genetrap*-Kassette und BRAP-WT-r im Intron 3'-wärts der Kassette (Abb. 3.20). Die Amplifikation des *genetrap*-Allels führte zu einem 278 bp großen Produkt, Amplifikation des Wildtyp-Allels dagegen zu einem 389 bp großen Produkt. Bei Heterozygotie wurden beide Produkte amplifiziert.

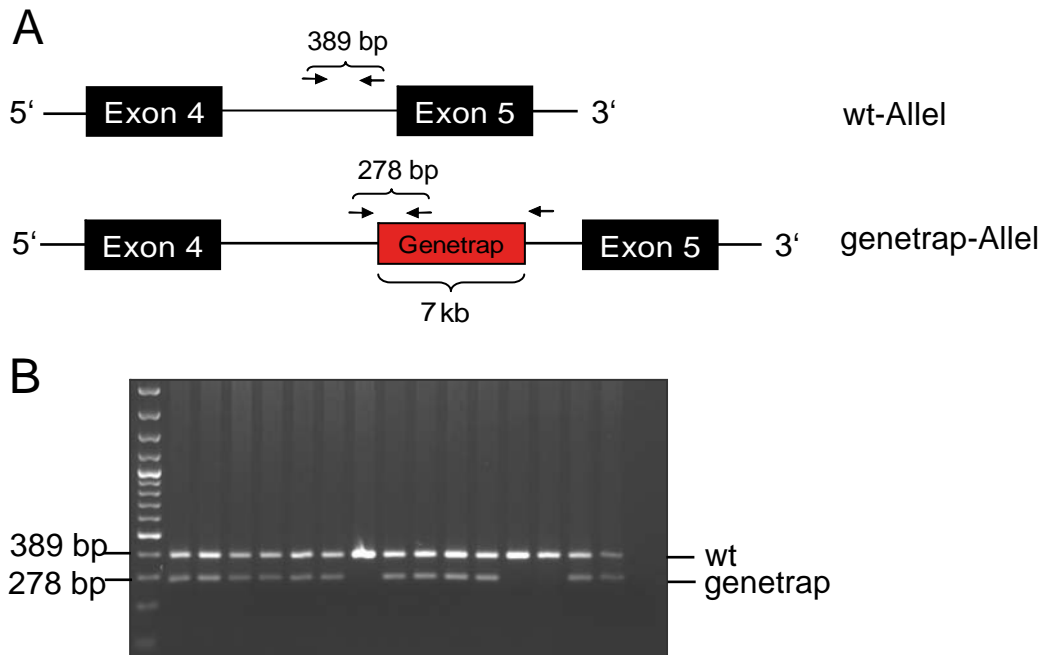


Abb. 3.20: Schematische Abbildung der Lage der *genetrapp*-Kassette im Intron 4 des BRAP-Gens und der Genotypisierungs-Strategie. A. Anhand des Wildtyp-Allels (wt) wurde mit den Primern BRAP-GT-f und BRAP-WT-r ein 389 bp großes PCR-Produkt amplifiziert. Durch die Insertion der 7 kb großen *genetrapp*-Kassette kann dieses PCR-Produkt nicht mehr amplifiziert werden. Statt dessen wird mit dem Primer BRAP-GT-f und dem für die Kassette spezifischen Primer BRAP-GT-r ein 278 bp langes PCR-Produkt amplifiziert. **B.** Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Genotypisierungs-PCR von BRAP-*genetrapp*-Mäusen. Werden beide PCR-Produkte amplifiziert, handelt es sich um ein heterozygotes Tier, wird nur das 389 bp große Produkt amplifiziert, so handelt es sich um eine Wildtyp-Maus.

3.4.2.2 Homozygote BRAP-*genetrap*-Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung

Die Genotypisierung der F2-Generation der BRAP-*genetrap*-Mäuse zeigte, dass bei der Verpaarung heterozygoter *genetrap*-Mäuse miteinander keine homozygoten Nachkommen geboren wurden. Auch im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden nie homozygote Nachkommen geboren. Um zu prüfen, in welchem Stadium der Entwicklung die homozygoten Mäuse sterben, wurden terminierte Verpaarungen angesetzt und Embryonen zum Zeitpunkt 14,5, 10,5, 9,5 und 8,5 dpc (*days post coitus*) entnommen. Den Genotypisierungen von aus Dottersäcken der Embryonen isolierter genomischer DNA konnte entnommen werden, dass die homozygoten *genetrap*-Mäuse um den Zeitpunkt 10,5 dpc absterben. Während zum Zeitpunkt E14,5 nur leere Deciduae vorhanden waren und zum Zeitpunkt E10,5 meist nur tote Embryonen isoliert werden konnten, waren zum Zeitpunkt E9,5 intakte, homozygote Embryonen präparierbar. Einige der homozygoten Embryonen waren zu diesem Zeitpunkt kleiner als Wildtyp- oder heterozygote Embryonen (Abb. 3.21).

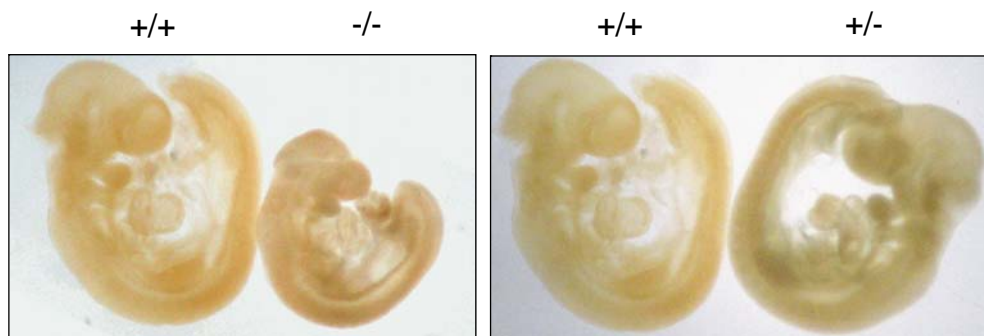


Abb. 3.21: Homozygote *genetrap*-Embryonen sterben während der Embryonalentwicklung. Größenvergleich von homozygoten und heterozygoten BRAP-*genetrap*-Embryonen mit Wildtyp-Embryonen zum Zeitpunkt E9,5. (+/+ : Wildtyp, -/- : homozygot, +/- : heterozygot)

3.4.2.3 Analyse der BRAP-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene

Zu einer sorgfältigen Charakterisierung der *genetrap*-Mäuse gehört die Untersuchung der Expressionsstärke von BRAP. Es war nötig, die Funktionalität der *genetrap*-Kassette zu prüfen, um auszuschließen, dass die Kassette nur ineffizient an das 5'-wärts gelegene Exon prozessiert wird und dadurch intakte BRAP mRNAs entstehen.

Die BRAP-Expression wurde auf mRNA-Ebene mittels *Real-time* PCR ermittelt. Bei der Verwendung von Primern, die 3'-wärts der *genetrap*-Kassette hybridisieren, konnte bei den für die *genetrap*-Kassette heterozygoten Embryonen und bei Organen adulter heterozygoter Mäuse eine Halbierung der BRAP-Expression und bei homozygoten Embryonen keine BRAP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Bei der Verwendung von 5'-wärts der Falle gelegenen Primern war die Transkriptmenge nicht verringert (nicht gezeigt), das heißt eine verkürzte mRNA ist demnach vorhanden und es konnte bis dahin nicht ausgeschlossen werden, dass die *genetrap*-Mäuse ein verkürztes BRAP-Protein exprimieren.

Entscheidend für die Aussagekraft des *genetrap*-Mausmodells ist, dass im homozygoten Zustand auf Protein-Ebene kein BRAP nachweisbar ist. Um dies festzustellen wurden Western Blot-Analysen angefertigt. Mit Hilfe des unter 3.1.1 beschriebenen Antikörpers konnte gezeigt werden, dass kein BRAP-Protein in den für die *genetrap*-Kassette homozygoten Embryonen nachweisbar ist. Da auch eine Halbierung der BRAP-Expression *in vivo* möglicherweise einen interessanten Phänotyp im adulten Tier verursachen kann, erschien es uns notwendig, auch die heterozygoten Mäuse zu untersuchen. Die Zerstörung eines Locus muss jedoch nicht unbedingt zu einer Verringerung der Protein-Menge führen, da es durch Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen zu einer Kompensation kommen kann. Daher wurde zunächst die BRAP-Expression in verschiedenen Organen der heterozygoten *genetrap*-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mittels Western Blot-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die BRAP-Expression in den heterozygoten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich verringert ist. Zusätzliche Protein-Banden, die auf ein verkürztes BRAP-Protein hinweisen würden, konnten nicht detektiert werden.

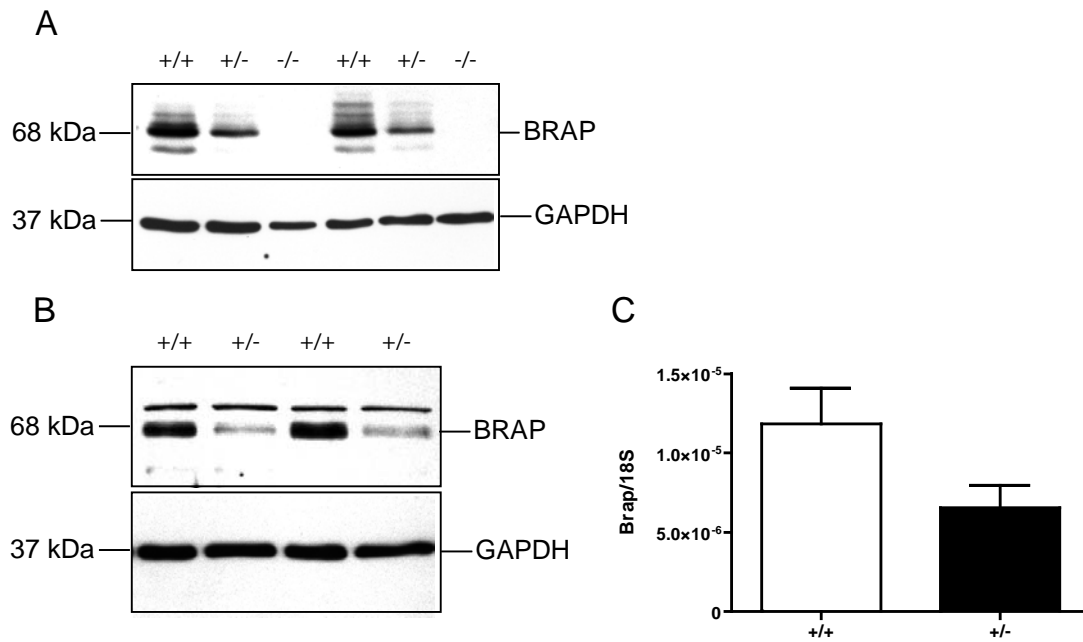


Abb. 3.22: Untersuchung der BRAP-Expression der BRAP-*gentrap*-Mäuse. **A.** Embryonen wurden zum Zeitpunkt 9,5 dpc präpariert, anhand von aus den Dottersäcken isolierten genomischen DNA genotypisiert und in Protein-Lysepuffer homogenisiert. Durch Western Blot-Analyse mit BRAP spezifischem Antikörper konnte gezeigt werden, dass in den heterozygoten Embryonen die Menge an BRAP-Protein reduziert ist und in den homozygoten Embryonen kein BRAP vorhanden ist. **B.** Western Blot-Analyse von Myokardproben heterozygoter *gentrap*-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit BRAP spezifischem Antikörper. **C.** Aus Myokardgewebe heterozygoter (n=7) und Wildtyp-Mäuse (n=5) wurde RNA isoliert, diese zu cDNA revers transkribiert und *Real-time* PCR mit BRAP spezifischen Primern durchgeführt.

3.4.2.4 Untersuchung der Expression von Acad10

Bei einem aussagekräftigen *knockout*-Modell sollte ausschließlich die Expression des Zielgens verhindert werden, während andere Gene durch den Eingriff im Genom nicht direkt beeinflusst werden sollten. Die Organisation des Genoms und insbesondere die Regulation der Transkription ist komplex. Kodierende Bereiche können auf beiden Strängen der DNA liegen oder teilweise überlappen, unterschiedliche Gene können gemeinsam reguliert sein und die Regulation kann durch Bindung von Transkriptionsfaktoren und Inhibitoren an benachbarten (*cis*) oder weit entfernten Sequenzen (*trans*) beeinflusst werden. Bei allen *knockout*-Strategien werden Veränderungen am Genom vorgenommen, die sich potentiell auch auf benachbarte Gene auswirken können.

Bei dem hier generierten Modell der BRAP *genetrap*-Mäuse ist im Intron 4 des BRAP-Gens eine 6 kb große Kassetten inseriert. Die Analyse des Sequenz-Kontext des BRAP-Lokus zeigte, dass das BRAP-Gen auf dem *sense*-Strang im Chromosom 5 codiert ist. Auf dem *antisense*-Strang in der entgegengesetzten Leserichtung ist das Acad10-Gen lokalisiert (Abb. 3.23). Exon 1 von Acad10 beginnt nur 45 bp stromaufwärts des Exons 1 von BRAP. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass der Promotor von Acad10 sich mit Bereichen des BRAP-Gens überschneidet. Um auszuschließen, dass durch die Insertion der 10,3 kb weit von Exon 1 des Acad10-Gens gelegenen *genetrap*-Kassette der zugehörige Promoter beeinflusst wird, wurde die Expression von Acad10 in den heterozygoten *genetrap*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Auswertung der *Real-time* PCR-Daten zeigte, dass die Expression von Acad10 in den heterozygoten *genetrap*-Mäusen nicht verändert war (Acad10/18S: WT: $1,26 \times 10^{-5} \pm 0,06 \times 10^{-5}$ (n=5); heterozygote *genetrap*-Mäuse: $1,19 \times 10^{-5} \pm 0,07 \times 10^{-5}$ (n=7), p=0,53) (Abb. 3.23). Es ist daher davon auszugehen, dass durch die Insertion der *genetrap*-Kassette die Promotoraktivität von Acad10 nicht wesentlich beeinflusst wird.

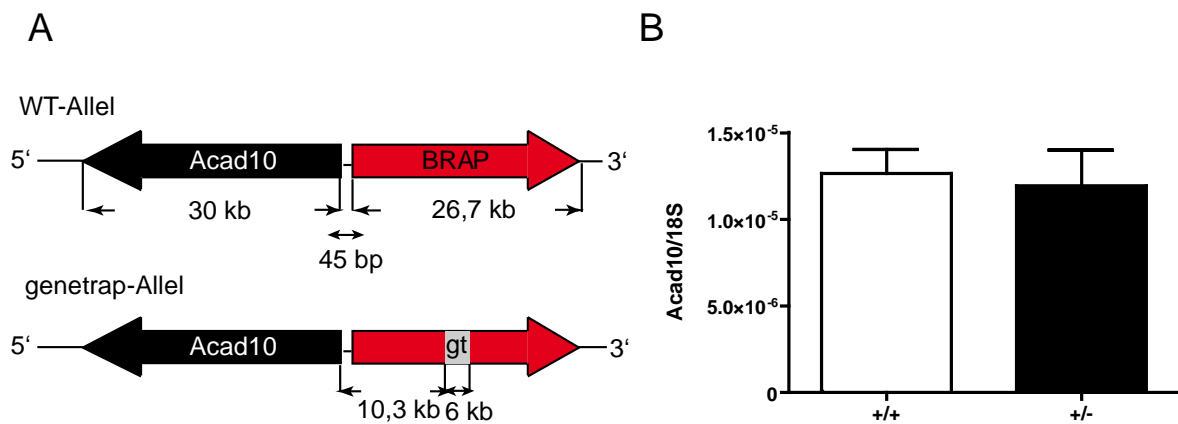


Abb. 3.23: Untersuchung der Expression von Acad10 in BRAP-*genetrap*-Mäusen. **A.** Schematische Darstellung des Genom-Kontext von BRAP. 45 bp 5'wärts des BRAP-Gens ist auf dem *antisense*-Strang das Acad10-Gen codiert. Die *genetrap*-Kassette ist 10,3 kb von Exon 1 des Acad10-Gens inseriert. Da nichts über den Promotor von Acad10 bekannt ist, galt es auszuschließen, dass durch die Insertion der *genetrap*-Kassette die Expression von Acad10 verändert wird. **B.** Nach der RNA-Isolation aus Myokard der heterozygoten *genetrap*-Mäuse wurde eine cDNA-Synthese und *Real-time* PCR mit Acad10-spezifischen Primern durchgeführt. Die Auswertung erbrachte, dass die Expression von Acad10 in den heterozygoten *genetrap*-Mäusen nicht verändert war.

3.4.2.5 Untersuchung der BRAP-Expression in Embryonen mittels X-Gal Färbung

Die *genetrap*-Kassette enthält ein lacZ-Gen, welches als Reporter genutzt werden kann, um das Expressionsmuster von BRAP im Embryo zu analysieren. Die X-Gal Färbung der homozygoten und heterozygoten Embryonen lässt auf eine ubiquitäre Expression schließen. Die deutlichste Färbung ist in den Extremitäten-Anlagen und im Vorderhirn sichtbar (3.24).

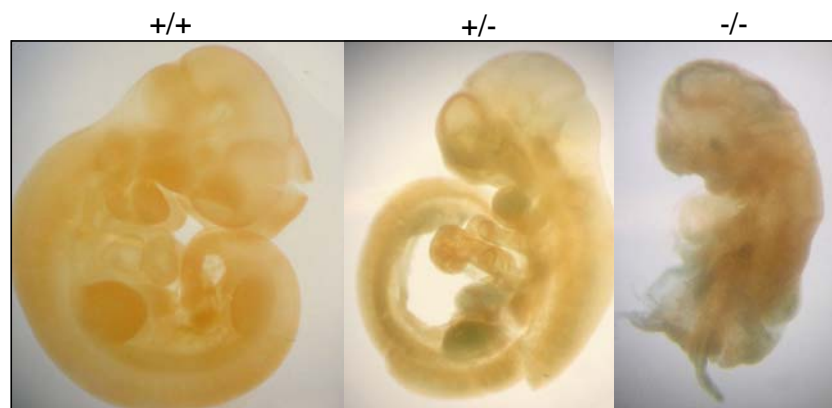


Abb. 3.24: X-Gal-Färbung eines Wildtyp- (+/+), homozygoten (-/-) und eines heterozygoten (+/-) Embryo. Da die *genetrap*-Kassette ein lacZ-Gen als Reporter für die Aktivität des BRAP-Promotors enthält, kann durch die X-Gal-Färbung heterozygoter oder homozygoter Tiere auf die BRAP-Expression während der Embryonalentwicklung zurückgeschlossen werden. Durch Ansetzen terminierter Verpaarungen zweier heterozygoter *genetrap*-Mäuse konnten zum Entwicklungszeitpunkt E9,5 Embryonen isoliert werden. Die Embryonen wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss einer X-Gal-Färbung unterzogen. Die gefärbten Embryonen wurden auf einem Durchlichttisch durch ein Binokular fotografiert.

3.4.2.6 Isolation von embryonalen Maus-Fibroblasten

Zur weiteren Phänotypisierung sollten homozygote, heterozygote und Wildtyp embryonale Maus-Fibroblasten-Zelllinien (MEF) hergestellt werden. Anhand dieser Zelllinien sollte der Effekt einer Verringerung beziehungsweise des Fehlens von BRAP auf die MAPK-Aktivierung unter Kulturbedingungen untersucht werden. Da die homozygoten MEF nach kurzer Zeit zu Neuronen-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren (Abb. 3.25) und im Folgenden kaum noch Zellteilungen erfolgen, konnte keine homozygote Zelllinie etabliert werden. Zur Zeit läuft der Versuch, ES-Zelllinien aus Blastozysten zu etablieren.

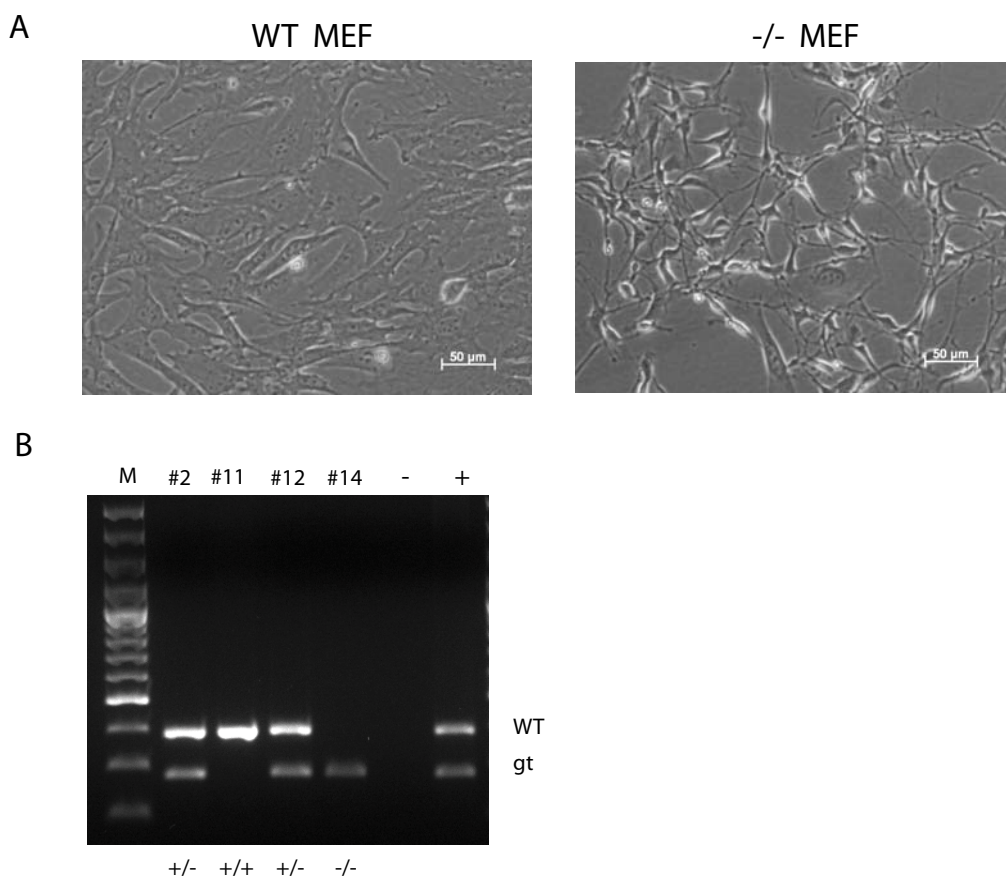


Abb. 3.25: Embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) der *genetrap*-Mäuse. **A.** Homozygote *genetrap*-MEF differenzieren nach kurzer Zeit zu Neuronen-ähnlichen Zellen. **B.** Genotypisierungsergebnis von MEF-Kulturen, die aus vier Embryonen generiert wurden. Zur Genotypisierung wurde der Dottersack verwendet und in 30 µl Direct-tail-Lyse-Puffer mit Proteinase K über Nacht bei 55°C lysiert. Die PCR wurde mit den Primern BRAP-GT-f/-r und BRAP-WT-r durchgeführt. Die Embryonen #2 und #12 waren heterozygot, Embryo #11 ein Wildtyp-Tier und #14 ein homozygoter Embryo. Bei der PCR wurde eine negativ-Kontrolle ohne Template-DNA und als positiv-Kontrolle die genomische DNA eines heterozygoten *genetrap*-Tiers mitgeführt.

3.4.3 Phänotypisierung der heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäuse

Da unter 3.4.2.3 gezeigt werden konnte, dass bei den heterozygoten BRAP-*genetrap*-Mäusen eine deutliche Verringerung der BRAP-Expression vorliegt, wurden diese im Folgenden hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht.

3.4.3.1 Morphologische Untersuchung und Analyse der Organgewichte

Die heterozygoten *genetrap*-Mäuse sind lebensfähig und zeigen bis zu einem Alter von einem Jahr keinerlei äußerliche Auffälligkeiten oder erhöhte Mortalität. Bei einer sorgfältigen Untersuchung mit Entnahme der Organe konnten keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Es wurden von insgesamt sieben Wildtyp-Mäusen und acht heterozygoten Mäusen die Gewichte von Nieren, Herz, Leber, Milz, Gehirn, Lunge und das Gesamtkörpergewicht bestimmt. Zudem wurde die Tibia präpariert und deren Länge vermessen. Die Organgewichte wurden ins Verhältnis zur Tibialänge gesetzt, um Größenunterschiede der Mäuse zu berücksichtigen. Es bestanden keine Unterschiede hinsichtlich der Organgewichte bei den heterozygoten *genetrap*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistermäusen (Abb. 3.26).

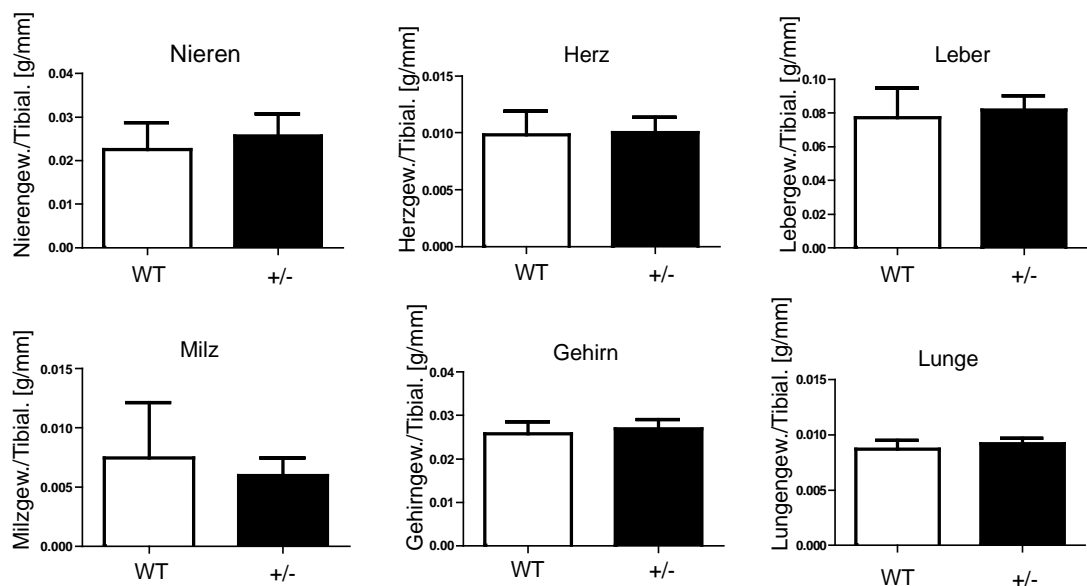


Abb. 3.26: Bestimmung von Organgewichten heterozygoter *genetrap*- und Wildtyp-Mäuse. Zwölf Wochen alte heterozygote *genetrap*-Mäuse und Wildtyp-Geschwistermäuse wurden getötet und Nieren, Herzen, Leber, Milzen, Gehirne und Lungen präpariert und gewogen. Zudem wurde die Tibia präpariert und deren Länge vermessen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen heterozygoten *genetrap*- und Wildtyp-Mäusen (WT: n=7; +/-: n=8, n.s.).

3.4.3.2 Echokardiographische Untersuchung der heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäuse

Die heterozygoten Mäuse wurden ausführlich auf einen kardialen Phänotyp hin untersucht. Es wurden insgesamt 71 Mäuse mittels Echokardiographie untersucht, wobei die heterozygoten Mäuse keinerlei Abweichungen zu Wildtyp-Geschwistertieren aufzeigten (Abb. 3.27).

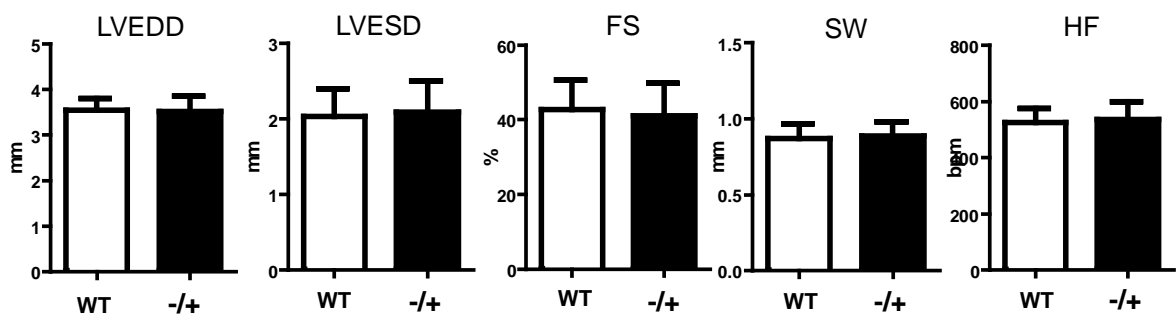


Abb. 3.27: Echokardiographische Untersuchung der heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäuse. Die Echokardiographie fünf Wochen alter heterozygoter BRAP-*genetrap* Mäuse (n=41) und Wildtyp-Geschwistermäuse (n=30) erfolgte im M-Mode in der longitudinalen Achse. Die heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistermäusen unveränderte linksventrikuläre endsystolische und diastolische Durchmesser (LVESD, LVEDD), Verkürzungsfractionen (FS- *fractional shortening*), Septumstärken (SW) und Herzfrequenzen (HF) auf. Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Frau Jessica Spitalieri durchgeführt. bpm: Herzschläge pro Minute, WT: Wildtyp-Mäuse, +/- : heterozygote BRAP-*genetrap* Mäuse.

3.4.3.3 Induktion einer Myokard-Hypertrophie durch Infarkt-Operation

Da unter basalen Bedingungen mittels Echokardiographie keine Unterschiede messbar waren, wurden 15 Mäuse einer Infarkt-Operation (Dr. Bernhard Unsöld) unterzogen, um eine Hypertrophie des Herzens auszulösen. Es sollte untersucht werden, ob die Reaktion auf einen Hypertrophie-Reiz bei einer geringeren BRAP-Expression verändert ist. Die Echokardiographie zwei und vier Wochen nach dem operativen Eingriff zeigte jedoch, dass auch hier keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *genetrap*-Mäusen bestanden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt scheinen die heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäuse trotz einer Verringerung von BRAP keinen schwerwiegenden Phänotyp zu entwickeln. Das völlige Fehlen von BRAP ist dagegen mit dem Leben nicht vereinbar.

3.5 Suche nach Interaktionspartnern von BRAP

Die Funktion eines Proteins erschließt sich selten durch eine isolierte Analyse des einzelnen Proteins. Erst im Kontext der Zelle, durch Untersuchung der Interaktionen und Netzwerke, kann die Bedeutung eines Proteins erfasst werden. Die Suche von Interaktionspartnern von BRAP stellte daher eine weitere Zielsetzung dar.

3.5.1 *yeast-two-hybrid*-Screening

3.5.1.1 Herstellung eines *bait*-Konstruktes für die *Y2H*-Analyse von BRAP

Für die *yeast-two-hybrid*-Analyse wurde die kodierende Sequenz des humanen BRAP mit der Sequenz für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert. Dazu wurde der offene Leserahmen des humanen BRAP mit den Primern BRAP259-f/r anhand des Klon pCR259-BRAP-Flag#164 amplifiziert. Bei der BRAP-Sequenz des Klon pCR259-BRAP-Flag#164 ist das Terminationscodon deletiert. Durch die Amplifikation mit den Primern BRAP259-f/r wurde das Terminationscodon wiederhergestellt und durch den rückwärts-Primer eine *Bam*HI Schnittstelle angefügt. Unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Bam*HI wurde das PCR-Produkt im richtigen Leserahmen in den Vektor pGBKT7 inkloniert und dadurch BRAP mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert (Abb. 3.28). Die abschließende Sequenzierung zeigte eine mutationsfreie Sequenz des Inserts.

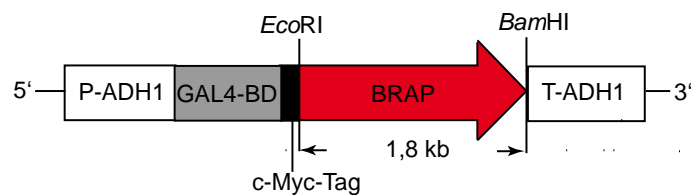


Abb. 3.28: Schematische Darstellung des DNA-Konstruktes für das *Y2H*-Screening. Die humane BRAP-cDNA Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI in den Vektor pGBKT7 inkloniert und damit die GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) an den N-Terminus von BRAP fusioniert. Zwischen der GAL4-DNA-Bindedomäne und der BRAP-Sequenz befindet sich die Sequenz für einen c-Myc-Tag. In mit dem Konstrukt transformierten Hefen wird das Fusionsprotein konstitutiv durch den Alkohol-Dehydrogenase 1 Promotor (P-ADH1) exprimiert. Am 3'-Ende des Konstruktes befindet sich ein ADH1-Terminator (T-ADH1).

3.5.1.2 Ergebnisse der Y2H-Analyse

Die *yeast-two-hybrid*-Analyse wurde in Kooperation mit dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) durchgeführt. Getestet wurde eine DNA-Bibliothek, die cDNAs von im Myokard exprimierten Proteinen enthielt (Clontec Matchmaker Library: Human Heart, #638833) und zusätzlich eine DNA-Bibliothek aus etwa 5000 einzeln klonierten cDNAs. In zwei unabhängigen Screenings der Myokard-Bibliothek konnte ein Protein identifiziert werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit mit BRAP interagiert. Mehrere Fragmente des Klons *coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3* (CHCHD3) konnten mit einem sehr starken Interaktionssignal in zwei unabhängigen Screenings identifiziert werden. Die Interaktion scheint spezifisch für BRAP zu sein, da der Klon CHCHD3 durch das RZPD in etwa 140 Screenings mit anderen *bait*-Proteinen nie identifiziert wurde. Eine weitere mögliche Interaktion mit dem Klon Galectin3 erscheint dagegen unwahrscheinlicher, da der Klon bereits in zwei Screens mit anderen *bait*-Proteinen gefunden wurde. Alle anderen Interaktionen waren ebenfalls als sehr unsicher zu bewerten. Bei CHCHD3 handelt es sich um ein Protein, welches hauptsächlich im Mitochondrium lokalisiert ist, aber teilweise auch im Nukleus nachzuweisen ist [Darshi *et al.*, 2007].

3.5.1.3 Überprüfung der Interaktion von BRAP mit CHCHD3 mittels Ko-Immunpräzipitation

Um die Interaktion von BRAP und CHCHD3 mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, wurden Ko-Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Myokard von BRAP-Flag transgen-überexprimierenden Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurde in NP40-Puffer homogenisiert. Anschließend wurde durch Verwendung eines Agarose-gekoppelten anti-Flag-Antikörpers BRAP-Flag Protein, wie unter 2.16.11 beschrieben, immunpräzipitiert. 30 µl des Präzipitats wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse mit anti-CHCHD3-spezifischem Antikörper auf eine Ko-Präzipitation von CHCHD3 hin überprüft. Im Präzipitat der BRAP-transgenen Mäuse konnte CHCHD3 nachgewiesen werden, während im Präzipitat der Wildtyp-Mäuse weder BRAP-Flag noch CHCHD3 detektiert werden konnte (Abb. 3.29). In mit BRAP-Flag-Adenovirus transfizierten HeLa-Zellen konnte kein CHCHD3 Ko-präzipitiert werden. Im Vergleich zu Myokard ist jedoch in HeLa-Zellen wesentlich weniger CHCHD3-Protein vorhanden (nicht gezeigt).

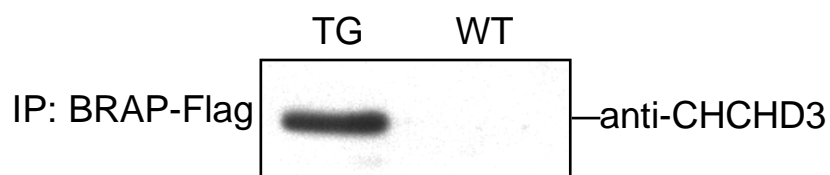


Abb. 3.29: Bestätigung der Interaktion von CHCHD3 mit BRAP durch Ko-Immunpräzipitation. BRAP-Flag Protein wurde mittels Agarose-gekoppeltem anti-Flag-Tag Antikörper aus Myokardlysat von BRAP-Flag-transgen überexprimierenden Mäusen präzipitiert. Als Kontrolle wurde Myokardlysat aus Wildtyp-Mäusen verwendet und identisch behandelt. BRAP-Flag wurde durch Flag-Peptid kompetitiv eluiert und 30 μ l des Präzipitats durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von CHCHD3 im Präzipitat erfolgte nach Western Blot mit CHCHD3-spezifischem Antikörper.

3.5.2 Immunpräzipitation von BRAP-Protein und massenspektrometische Analyse zur Identifikation von Interaktionspartnern

Als weitere Methode zur Identifikation von möglichen Interaktionspartnern, wurde BRAP mittels Immunpräzipitation aufgereinigt und das Präzipitat im Folgenden durch Massenspektrometrie analysiert. Da es sich bei der Massenspektrometrie um eine sehr sensitive Methode handelt, können auch geringe Mengen ko-präzipitierter Proteine nachgewiesen werden. BRAP-Flag Fusionsprotein wurde durch adenoviraler Transfektion von HeLa-Zellen überexprimiert. Die Präzipitation von BRAP aus dem Zelllysate erfolgte mittels Agarose-gekoppeltem anti-Flag-Antikörper und anschließend wurde das BRAP-Flag Protein unter Verwendung von Flag-Peptid kompetitiv eluiert (2.16.11). Als Kontrolle wurden nichttransfizierte Zellen nach dem gleichen Protokoll behandelt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für biophysikalische-Chemie). Es wurden drei Analysen unabhängiger Proben durchgeführt und dabei zahlreiche Proteine identifiziert, von denen eine Auswahl in Tabelle 3.I aufgeführt ist. Interessant, besonders im Zusammenhang mit den Ergebnissen unter Abschnitt 3.7, erschien die Identifizierung mehrerer Zentrosomen-assoziiierter Proteine (Pericentrin, gamma-Tubulin und *centrosomal-Nek1 associated Protein 1*), welche nur in der BRAP-Probe und nicht in der Kontrolle vorkamen. Die Ubiquitylierung von Proteinen stellt eine verbreitete posttranslationale Modifikation dar, die durch Anknüpfen von Ubiquitin-Peptiden an das Protein erfolgt.

Häufig fungiert die Ubiquitylierung als Degradationssignal für die Proteasom-Maschinerie. Bei der massenspektrometrischen Analyse des immunpräzipitierten BRAP konnte unter anderem auch Ubiquitin sowie Ubiquitin-Proteasen und -Hydrolasen in der Probe nachgewiesen werden, welche nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde. Es ist geplant die Interaktion ausgewählter identifizierter Proteine mit BRAP in Zukunft durch unabhängige Versuchsansätze zu überprüfen.

Tab. 3.I: Durch Massenspektrometrie identifizierte Protein, die nur in der BRAP-Immunpräzipitations-Probe und nicht in der Kontroll-Probe nachgewiesen wurden. Die Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Dr. Henning Urlaub und Frau Carla Schmidt durchgeführt.

<u>qi 62087336</u>	BRCA1 associated protein variant [Homo sapiens]
<u>qi 119607081</u>	hCG1810961, isoform CRA_a [Homo sapiens]
<u>qi 10434841</u>	unnamed protein product [Homo sapiens]
<u>qi 12804891</u>	TUBB protein [Homo sapiens]
<u>qi 37780055</u>	FHOS [Homo sapiens]
<u>qi 3435201</u>	unknown [Homo sapiens]
<u>qi 229532</u>	ubiquitin
<u>qi 119610414</u>	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a [Homo sapiens]
<u>qi 29466</u>	fetal-myosin heavy chain (1437 AA) [Homo sapiens]
<u>qi 18857714</u>	WIRE protein [Homo sapiens]
<u>qi 38016919</u>	hypothetical protein LOC29035 [Homo sapiens]
<u>qi 2656092</u>	proteasome subunit p58 [Homo sapiens]
<u>qi 13376751</u>	proteasomal ATPase-associated factor 1 [Homo sapiens]
<u>qi 16753254</u>	DNA cross-link repair 1A (PSO2 homolog, <i>S. cerevisiae</i>) [Homo sapiens]
<u>qi 33942</u>	integrin alpha6 subunit [Homo sapiens]
<u>qi 4507237</u>	signal sequence receptor, alpha [Homo sapiens]
<u>qi 119629683</u>	pericentrin (kendrin), isoform CRA_b [Homo sapiens]
<u>qi 6136393</u>	Werner syndrome ATP-dependent helicase
<u>qi 119619786</u>	myotubularin 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]
<u>qi 119591742</u>	cyclin M3, isoform CRA_c [Homo sapiens]
<u>qi 119618458</u>	hypothetical protein LOC196463, isoform CRA_a [Homo sapiens]
<u>qi 2439517</u>	putative RHO/RAC effector protein; 95% similarity to P49205 (PID:g1345860) [Homo sapiens]
<u>qi 4502231</u>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator isoform 1 [Homo sapiens]
<u>qi 119593724</u>	sulfotransferase family 4A, member 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
<u>qi 119569868</u>	hCG1818126 [Homo sapiens]
<u>qi 17921982</u>	heme A:farnesyltransferase [Homo sapiens]
<u>qi 113430099</u>	PREDICTED: similar to Protein CXorf48 (Tumor antigen BJ-HCC-20) [Homo sapiens]
<u>qi 157881835</u>	Chain A, Solution Structure Of The 19th Filamin Domain From Human Filamin-B
<u>qi 10438291</u>	unnamed protein product [Homo sapiens]
<u>qi 226503</u>	transcription initiation factor RAP30
<u>qi 83753568</u>	Chain A, Crystal Structure Of Human Rab18 In Complex With Gppnhp
<u>qi 119631357</u>	NCK-associated protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
<u>qi 5032007</u>	purine-rich element binding protein A [Homo sapiens]
<u>qi 2352022</u>	RaP2 interacting protein 8 [Homo sapiens]
<u>qi 4503755</u>	flavin containing monooxygenase 1 [Homo sapiens]
<u>qi 186555</u>	insulin receptor-related receptor [Homo sapiens]
<u>qi 2984657</u>	centrosomal Nek2-associated protein 1 [Homo sapiens]

3.6 Analyse posttranslationaler Modifikationen von BRAP

Die Aktivität und Stabilität von Signalproteinen wird häufig durch posttranslationale Modifikationen fein reguliert. Insbesondere Phosphorylierungen können eine Änderung der Aktivität bewirken, während sich andere Modifikationen, wie zum Beispiel Ubiquitylierung, häufig auf die Stabilität eines Proteins auswirken. Bereits in Vorarbeiten unseres Labors konnte gezeigt werden, dass BRAP in einem phosphorylierten Zustand vorliegen kann.

3.6.1 Nachweis komplexer posttranslationaler Modifikationen von BRAP durch 2D-Gelelektrophorese

Eine einzelne Phosphorylierung eines Proteins bewirkt eine Massenzunahme von 80 Da. Dies ist in einer normalen SDS-PAGE nicht differenzierbar. Da es durch die Ladung der Phosphatgruppe jedoch auch zur Änderung des für das Protein spezifischen isoelektrischen Punktes kommt, können unterschiedliche Phosphorylierungszustände gut in der 2D-Gelelektrophorese dargestellt werden. Um zu prüfen, ob posttranslationale Modifikationen von BRAP nachweisbar sind, wurde BRAP-Flag mittels adenoviralem Gentransfer in HeLa-Zellen oder Kardiomyozyten überexprimiert und anschließend wie unter 2.16.6 beschrieben eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. In Abbildung 3.30 ist eine exemplarische 2D-Western-Blot-Analyse dargestellt. Durch eine Phosphorylierung kommt es zu einer Änderung des isoelektrischen Punktes (pKI) um 0,2 pH-Einheiten. Die horizontal verschobenen detektierten Spots stellen daher am ehesten unterschiedliche Phosphorylierungszustände von BRAP dar. Modifizierungen wie Ubiquitylierungen und SUMOylierungen beeinflussen dagegen stärker das Molekulargewicht, wodurch es zur Änderung des Laufverhaltens in der vertikalen Dimension der 2D-Gel-Western Blot-Analyse kommt. Das Ergebnis dieses Versuchs lässt auf zahlreiche Modifikationen, darunter sowohl Phosphorylierungen als auch andere Modifikationen, von BRAP schließen.

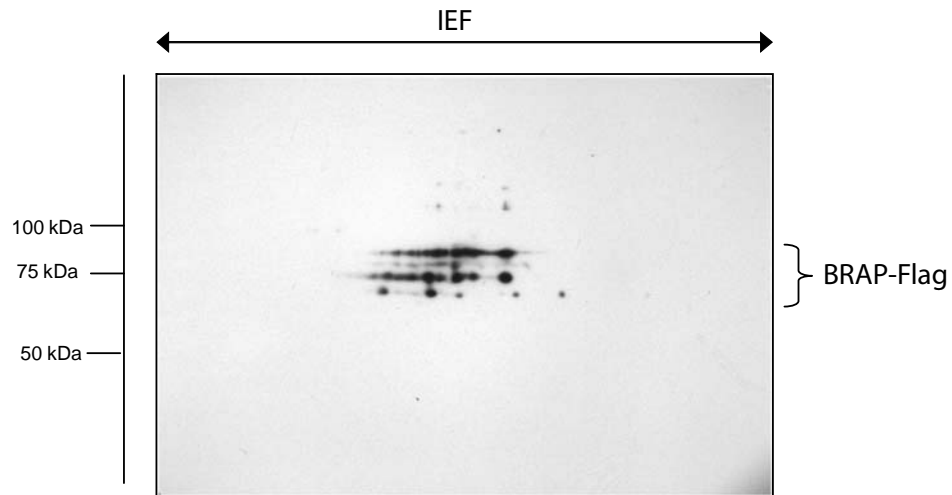


Abb. 3.30: Darstellung von posttranslationalen Modifikationen in der 2D-Western Blot-Analyse. BRAP-Flag wurde in adulten Kardiomyozyten adenoviral überexprimiert (MOI 25). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysepuffer lysiert und 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot-Analyse mit anti-Flag-Tag Antikörper wurde BRAP-FLAG Protein detektiert.

3.6.2 Identifikation phosphorylierter Aminosäuren in BRAP durch massenspektrometrische Analyse

Durch die 2D-Western Blot-Analysen (Abb. 3.30) konnte gezeigt werden, dass BRAP zahlreiche Phosphorylierungsstellen zu besitzen scheint. Da etwa sieben Isoformen mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt detektierbar waren, können also mindestens sechs Phosphorylierungsstellen erwartet werden. Daher sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) durch massenspektrometrische Analyse des immunpräzipitierten BRAP-Flag posttranslationale Modifikationen identifiziert werden. Es wurden zehn verschiedene phosphorylierte Peptide des BRAP-Proteins identifiziert (Tabelle 3.II und Abb. 4.3).

Tab. 3.II: Identifizierung von phosphorylierten Peptiden des BRAP-Proteins. Die Massenspektrometrie erfolgte in Kooperation mit Dr. Henning Urlaub und Frau Carla Schmidt.

identifiziertes phosphoryliertes Peptid	Aminosäure*
R.KS <u>S</u> EASPT <u>I</u> AQR.S	S94; T99
K.ECINAAPD <u>S</u> PSK.Q	S117; S119
R.AQADADSF <u>Y</u> M <u>I</u> CNGR.Q	Y218; T220
K.SEDGA <u>S</u> LPVMDLTELPK.C	S252
R.YCQ <u>I</u> PEPVEENK.C	T308
R.LVA <u>S</u> KTDGK.I	S380
K.IVQYECEGD <u>I</u> CQEEK.I	T395
K.IDALQLE <u>Y</u> S _Y LLTSQLESQR.I	Y408; S409
R.DVMF <u>Y</u> LETQQK.I	Y539
R.QEIQEGQINIAMASASSPA <u>S</u> SGG <u>S</u> GKLP <u>S</u> RK.G	S574; S575; S578; S583

* Anhand des Sequenzkontextes als die am wahrscheinlichsten phosphorylierte Aminosäure durch das Programm "Mascot" vorgeschlagen.

3.7 Analyse der Lokalisation von BRAP

Ein weiterer Schlüssel zum Verständnis der Bedeutung eines Proteins ist das Wissen um dessen Lokalisation. Die Untersuchung der Expression des Proteins in verschiedenen Organen kann wichtige Hinweise geben, aber auch die Expression im Verlauf der Entwicklung eines Organismus. Grundlegend ist jedoch vor allem die Lokalisation des Proteins innerhalb einer Zelle.

3.7.1 BRAP-Expression in Organen und während der Embryonalentwicklung

Um die BRAP-Expression in verschiedenen Organen der adulten Maus und zu unterschiedlichen embryonalen Entwicklungsstadien zu untersuchen, wurde die mRNA Menge mittels *Real-time* PCR quantifiziert. Als Ausgangsmaterial wurde eine cDNA-Kollektion der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Auf mRNA-Ebene ist BRAP in allen getesteten Organen sowie während der Embryonalentwicklung exprimiert. Die höchste Expression konnte in Testis nachgewiesen werden. In Leber und Nieren ist BRAP ebenfalls recht hoch exprimiert. Im Herzen konnte dagegen ein eher geringes BRAP- Niveau nachgewiesen werden.

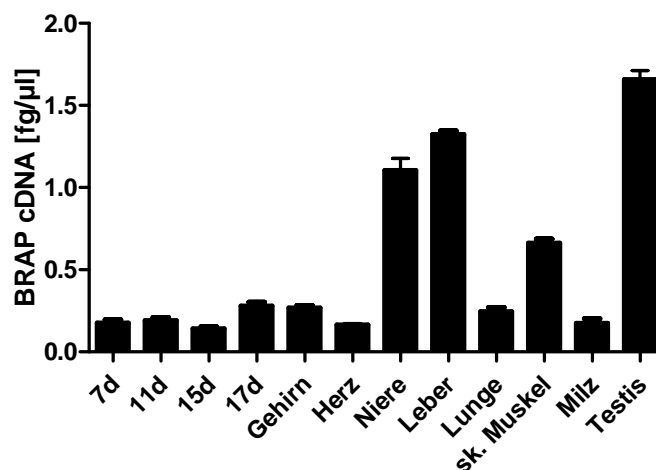


Abb. 3.31: mRNA-Expression von BRAP während der Embryonalentwicklung und in Organen adulter Mäuse. Durch *Real-time* PCR mit BRAP-spezifischen Primern wurde die Expression von BRAP in 7 dpc, 11 dpc, 15 dpc und 17 dpc Embryonen bestimmt. Ebenso wurde die BRAP-Expression in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskel, Milz und Testis adulter Mäuse bestimmt.

3.7.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BRAP

Durch die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen kann die Lokalisation von Proteinen innerhalb lebender Zellen mit einfachen Mitteln analysiert werden. Eine weitere wichtige Anwendung nutzt den Mechanismus des *Förster's resonance energy transfer* (FRET). FRET bezeichnet den Vorgang des Energietransfers zwischen zwei eng benachbarten Chromophoren. FRET kann unter anderem dafür verwendet werden, intramolekulare Konformationsänderungen eines Proteins in lebenden Zelle zu untersuchen oder intermolekulare Wechselwirkungen darzustellen. Da es in der Promotionsarbeit von S. A. Matheny [2003] Hinweise darauf gibt, dass BRAP stimulusabhängig eine Konformationsänderung eingehen kann, ist es geplant, dies in Zukunft durch FRET-Analyse zu überprüfen. Daher wurde ein DNA-Konstrukt entworfen, welches für die FRET-Analyse ebenso wie zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von BRAP geeignet sein sollte.

3.7.2.1 Lokalisation von CyPet-BRAP-YPet-Fusionsprotein in Kardiomyozyten

Bei den hier verwendeten Fluoreszenzproteinen CyPet und YPet handelt es sich um ein von Nguyen und Daugherty [2005] speziell für FRET-Analysen optimiertes Donor-Akzeptor Paar. Die kodierenden Sequenzen der Fluoreszenzproteine wurden so in den die humane BRAP-cDNA-Sequenz enthaltenden Vektor pDC516-BRAP-Flag inkloniert, dass CyPet mit dem Aminoterminus von BRAP fusioniert ist und der carboxyterminale Flag-Tag durch YPet ersetzt wurde. Ein Adenovirus zur Überexpression von CyPet-BRAP-YPet wurde wie unter 2.15.4.1 geschildert hergestellt.

Durch adenoviral-vermittelten Gentransfer wurde CyPet-BRAP-YPet in Kardiomyozyten von adulten sowie neonatalen Ratten überexprimiert und wie unter 2.20.2 beschrieben weiter verfahren. In Kardiomyozyten von neonatalen Ratten lag CyPet-BRAP-YPet in Form von zytoplasmatisch lokalisierten Partikeln vor. In adulten Kardiomyozyten war dagegen vor allem eine deutliche periplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins zu beobachten (Abb. 3.32).

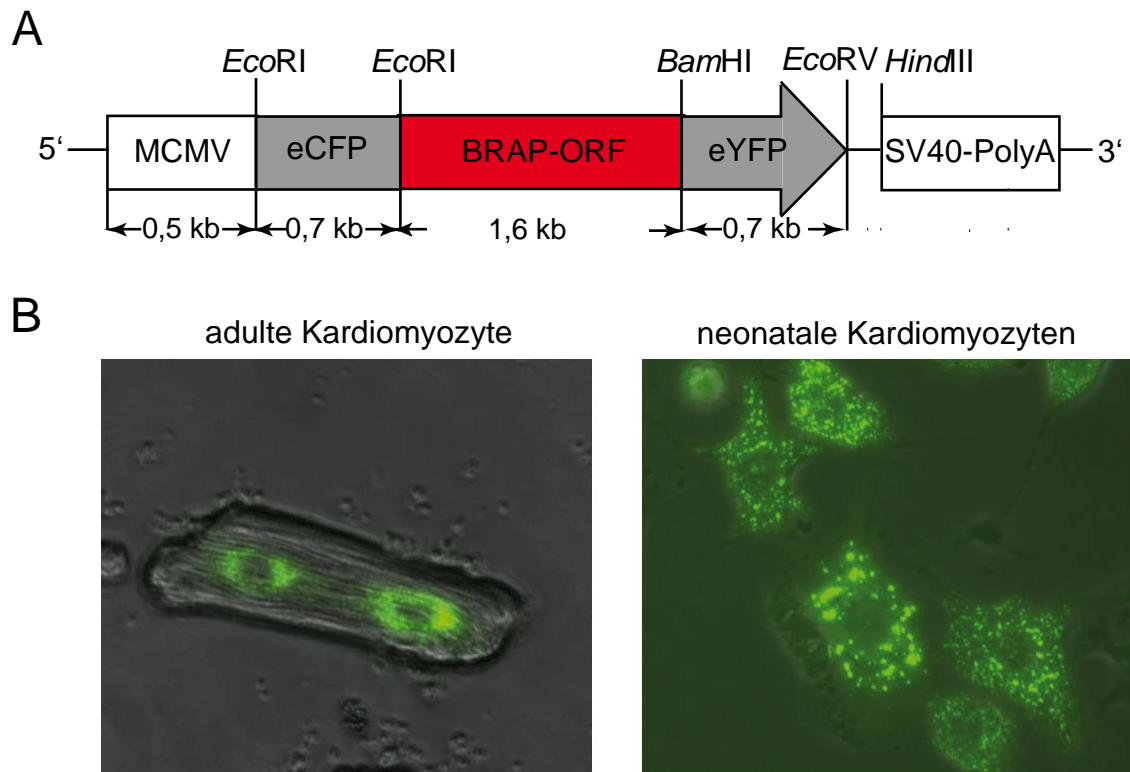


Abb. 3.32: Untersuchung der subzellulären BRAP-CFP/YFP-Lokalisation in Kardiomyozyten. **A.** DNA-Konstrukt zur Herstellung eines Adenovirus für die Überexpression eines BRAP-CFP/YFP Fusionsproteins. An das 5'-Ende der humanen BRAP-cDNA wurde die DNA-Sequenz für das *cyano fluorescent protein* CyPet (eCFP) fusioniert und an das 3'-Ende die Sequenz für das *yellow fluorescent protein* YPet (eYFP). Das Fusions-Konstrukt steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (MCMV) und besitzt am 3'-Ende der YPet-Sequenz eine SV40-PolyA-Sequenz. (BRAP-ORF: *open reading frame*) **B.** Adulte und neonatale Kardiomyozyten wurden adenoviral transfiziert und nach 24 h wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

3.7.2.2 Immunfluoreszenz-Färbung von endogenem BRAP in Kardiomyozyten

Bei der Analyse von überexprimierten Proteinen besteht immer die Möglichkeit, dass deren Lokalisation nicht der des endogenen Proteins entspricht. Auch die Fusion eines Proteins mit einem Tag oder Fluoreszenzprotein kann die native Lokalisation verändern. Um dies auszuschließen war es daher notwendig, durch Immunfluoreszenz-Färbung mit einem spezifischen Antikörper die Lokalisation des endogenen Proteins zu bestimmen.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen von BRAP in Kardiomyozyten adulter Ratten mit einem anti-BRAP-spezifischen Antikörper (3.1.1) bestätigten die Ergebnisse unter 3.7.2.1. Auch hier ergab sich eine deutliche Färbung im perinukleären Bereich. Etwas schwächer, aber ebenfalls deutlich sichtbar war eine partikuläre Färbung im Zytoplasma. Auffällig, wenn auch nicht in jeder Zelle vorhanden, erschien die Färbung zweier gegenüberliegender Foci seitlich der Zellkerne (Abb. 3.33).

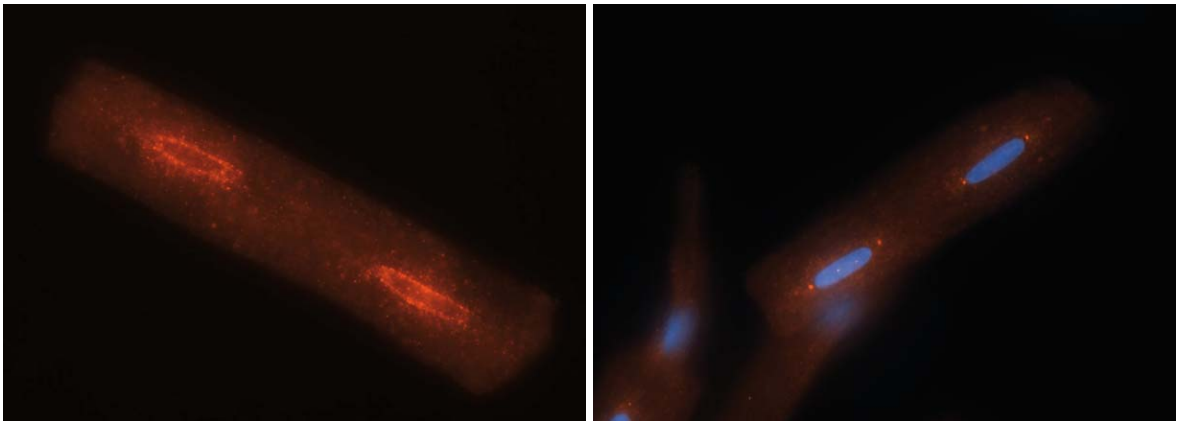


Abb. 3.33: Subzelluläre Lokalisation von endogenem BRAP in Kardiomyozyten durch Immunfluoreszenz-Färbung. Frisch isolierte Kardiomyozyten adulter Ratten wurden auf Zellkulturschalen ausgebracht und nach etwa 3 h mit Methanol/Aceton fixiert (2.20.1). Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mit BRAP-spezifischem Antikörper. Rechtes Bild: die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen und die Bilder der Fluoreszenzkanäle überlagert.

3.7.2.3 Ko-Lokalisation von BRAP mit dem Zentrosomen-Protein gamma-Tubulin

Um zu prüfen, ob es sich bei den in der Immunfluoreszenz-Färbung beobachteten, mit BRAP-spezifischem Antikörper gefärbten, perinukleären Foci um Zentrosomen handelt, wurde eine Ko-Lokalisations-Färbung des an den Zentrosomen lokalisierten Proteins gamma-Tubulin und BRAP durchgeführt. Abbildung 3.34 zeigt eine deutliche Übereinstimmung der Lokalisation von BRAP und gamma-Tubulin und bestätigt daher die Lokalisation von BRAP an Zentrosomen.

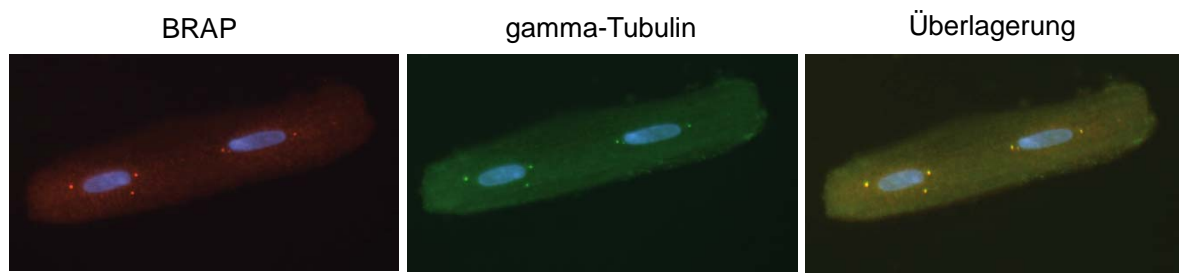


Abb. 3.34: Ko-Lokalisation von endogenem BRAP und gamma-Tubulin. Adulte Kardiomyozyten der Ratte wurden drei Stunden, nach der Isolation mit Methanol/Aceton fixiert (2.20.1) und anschließend mit BRAP-(rot) und gamma-Tubulin (grün) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen wurden bei einer 400fachen Vergrößerung fotografiert. Die Überlagerung der einzelnen Bilder zeigte die Ko-Lokalisation von BRAP und gamma-Tubulin.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In vorhergehenden Ergebnissen konnte BRAP als ein lastabhängig reguliertes Protein in einem Tiermodell der rechtsventrikulären Hypertrophie Monokrotaline-behandelter Ratten durch 2D-Gelelektrophorese identifiziert werden [Schott *et al.*, 2005]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von BRAP in Abhängigkeit neurohumoraler und mechanischer Stimulation auf Protein- und RNA-Ebene anhand von Tiermodellen der Aortenkonstriktion und des Myokardinfarktes untersucht. Dazu wurde zunächst ein Antikörper gegen das Gesamtprotein BRAP generiert. In den untersuchten Tiermodellen konnte keine lastabhängige Änderung der Expression von BRAP gezeigt werden. In Myokardproben humaner Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie konnte dagegen eine erhöhte Expression von BRAP auf RNA-Ebene festgestellt werden. Matheny *et al.* publizierten 2004 eine Ras-abhängige Ubiquitylierung von BRAP in immortalisierten Zelllinien. Übereinstimmend damit zeigten eigene Experimente, dass eine einstündige Stimulation von Kardiomyozyten mit PMA, welches Ras aktiviert, zu einer verringerten BRAP-Proteinmenge führte. Dies legte daher nahe, dass BRAP einer akuten stimulationsabhängigen posttranslationalen Veränderung unterliegt.

Um die Funktion von BRAP in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein Adenovirus zur BRAP-Überexpression in diesen Zellen generiert. Die Überexpression von BRAP in primären Kardiomyozyten bewirkte eine Hemmung der C-Raf(BXB)-vermittelten Aktivierung des Mek/Erk-Signalweges der MAPK-Signaltransduktion. Auch eine geringfügige Aktivierung der p38-Kinase durch C-Raf(BXB) wurde durch BRAP-Überexpression inhibiert, während der JNK-Signalweg durch BRAP aktiviert wurde. Eine Stimulus-induzierte Hypertrophie von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte konnte durch Überexpression von BRAP inhibiert werden. Damit stellt BRAP einen potenten Inhibitor der Signaltransduktion von C-Raf auf Mek in Kardiomyozyten dar. Dies wirkte sich *in vitro* erwartungsgemäß in einer verringerten Hypertrophieantwort aus.

Um den Einfluss einer Steigerung der BRAP-Expression auf die Entwicklung einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz *in vivo* zu beurteilen, wurden BRAP Kardiomyozyten-spezifisch transgen überexprimierende Mäuse phänotypisiert. Es wurden initial drei Mauslinien untersucht, von denen zwei eine deutliche Überexpression von BRAP auf Proteinebene aufwiesen (#314, #317), während die dritte Linie (#311) allenfalls eine sehr schwache Überexpression zeigte. Die Linien #314 (FVB-Hintergrund) und #317 (C57B6-Hintergrund) wurden nachfolgend intensiv phänotypisiert und die transgenen Tiere zeigten trotz unterschiedlicher genetischer Hintergründe einen sehr ähnlichen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistermäusen. Die transgenen Mäuse entwickelten ab einem Alter von vier Wochen vergrößerte Herzen und wiesen beginnend mit einem Alter von etwa zehn Wochen eine signifikant erhöhte Sterblichkeit auf. Die echokardiographische Untersuchung zeigte eine stark eingeschränkte Pumpfunktion mit signifikanter ventrikulärer Dilatation bei den transgenen Mäusen. Die histologische Analyse erbrachte keine Hinweise auf eine interstitielle Fibrose. Mittels *Real-time* PCR konnte ein Expressionsanstieg des Hypertrophie-Markers BNP gemessen werden. Damit zeigen BRAP-transgene Mäuse eine exzentrische Hypertrophie mit starker Kontraktilitätseinschränkung entsprechend dem Krankheitsbild einer dilatativen Kardiomyopathie. Um den Mechanismus der BRAP-Wirkung auf die Herzinsuffizienzentstehung bei den BRAP-transgenen Mäusen nachzuvollziehen, wurden die MAPK-Signalwege mittels Western Blot-Analyse zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten der Mäuse untersucht. Es ergab sich ein komplexes Aktivierungsmuster, welches sich während der Entwicklung und im Verlauf der Herzinsuffizienz veränderte. Während im Alter von drei Tagen noch keine Veränderungen der MAPK-Aktivierung auftrat, zeigte sich ab einem Alter von drei Wochen in den transgenen Tieren eine erhöhte Aktivität von Mek, die sich bei älteren Tieren noch verstärkte. Bei sieben Wochen alten transgenen Mäusen war auch die Expression von gesamt-Mek erhöht. Die Aktivität der p38-Kinase war bei den transgenen Mäusen im Alter von drei Wochen deutlich erhöht, in sieben Wochen alten und älteren Tieren dagegen verringert. Die JNK-Aktivität war nur in älteren (zwölf Wochen) transgenen Mäusen erhöht (nicht gezeigt). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die B-Raf-Expression und -Aktivierung erhöht, die Ras-Aktivität dagegen nicht verändert war. Neben den MAPK-Signalwegen wurde auch der für die Herzinsuffizienz bedeutende Calcineurin-NFAT-Signalweg untersucht, der in sieben Wochen alten BRAP-transgenen Mäusen aktiviert war. Die Untersuchung der Apoptose zeigte, dass in den transgenen Mäusen die frühen Apoptose-Ereignisse induziert waren. So war das Verhältnis der pro- beziehungsweise antiapoptotischen Proteine Bax/Bcl-2 bei den transgenen Mäusen erhöht und ebenso der Anteil des zytoplasmatischen Cytochrom C.

Hinsichtlich der nachgeordneten Apoptose-Ereignisse zeigte sich dagegen, dass die transgenen Mäuse ab einem Alter von drei Wochen sogar eine geringere Caspase 9-Aktivität aufwiesen. Um den Effekt einer akuten Überexpression von BRAP im adulten Herzen zu untersuchen, wurden induzierbare herzspezifische BRAP-transgene Mäuse basierend auf dem tet-off-System generiert. Es wurden bisher zwei Linien auf Funktionalität geprüft, von denen beide Linien das Kriterium der Reprimierbarkeit erfüllten, also unter Doxycyclin-Behandlung keine Überexpression von BRAP aufwiesen. Bei Linien #35 war die BRAP-Expression nach Absetzen des Doxycyclins induzierbar. Damit erfüllte Linie #35 beide Kriterien der Funktionalität und eignete sich für die weitere Phänotypisierung. Linie #42 konnte bisher nicht auf ihre Induzierbarkeit hin getestet werden. Initiale Phänotypisierungen der Linie #42 weisen jedoch bereits auf eine verringerte Kontraktilität der Herzen vier Wochen nach der Induktion der BRAP-Überexpression hin. Zusammenfassend zeigte sich eine Kompensation und in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt sogar eine Überkompensation der Mek-Aktivierung *in vivo*. Allerdings scheint diese durch die B-Raf Isoform hervorgerufene Reaktion Mek-unabhängige C-Raf-Wirkungen, wie mitochondriale Integrität nicht auszugleichen.

Um den Effekt einer Verringerung beziehungsweise eines Fehlens von BRAP *in vivo* zu untersuchen, wurden anhand eines ES-Zellklons BRAP-*genetrap* Mäuse generiert. Homozygote BRAP-*genetrap* Mäuse starben während der Embryonalentwicklung zwischen E9,5 und E10,5. Mittels X-Gal-Färbung konnte anhand der durch die *genetrap*-Kassette codierten beta-Galaktosidase, deren Transkription bei den BRAP-*genetrap* Mäusen durch den BRAP-Promotor reguliert wird, auf die Expression von BRAP während der Embryonalentwicklung zurückgeschlossen werden. Die BRAP-Expression in 9,5 Tage alten Embryonen ist nahezu ubiquitär. Die stärkste Expression ist in den Extremitätenanlagen und im Vorderhirn zu beobachten. Kultivierte embryonale Fibroblasten homozygoter Embryonen differenzierten nach kurzer Zeit zu Neuronen-ähnlichen Zellen aus und ließen sich daher nicht in Kultur halten. Die heterozygoten Mäuse, die auf RNA- und Proteinebene etwa die Hälfte an BRAP exprimieren, zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Eine Untersuchung der Organgewichte, die echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion, basal und nach operativer Belastung durch Aortenkonstriktion, offenbarten keine Unterschiede zwischen heterozygoten BRAP-*genetrap* Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Zusammenfassend belegt das BRAP-*genetrap* Mausmodell eine essentielle Rolle von BRAP für die Embryonalentwicklung.

Die Suche nach neuen Interaktionspartnern von BRAP durch ein *yeast-two-hybrid*-Screening erbrachte den neuen potentiellen Bindungspartner CHCHD3 (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3*). Durch Ko-Immunpräzipitation von überexprimiertem BRAP und endogenem CHCHD3 aus Myokardgewebe von BRAP-transgenen Mäusen konnte die Interaktion bestätigt werden. Die Signifikanz dieser Interaktion soll in Folgestudien geklärt werden.

Mittels 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse konnte ein komplexes Muster posttranslationaler Modifikationen von BRAP gezeigt werden. Durch Immunpräzipitation von überexprimiertem BRAP und anschließende Massenspektrometrie konnten zehn phosphorylierte Peptide identifiziert werden. Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BRAP in adulten Kardiomyozyten durch Überexpression von YFP/CFP-BRAP-Fusionsprotein zeigte eine zytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation. Die Immunfluoreszenz-Färbung von endogenem BRAP bestätigte die vorwiegend perinukleäre Lokalisation und zeigte zudem in einigen Zellen eine Lokalisation von BRAP an Zentrosomen, die durch Ko-Lokalisation mit dem zentrosomal lokalisierten Protein gamma-Tubulin verifiziert wurde. Die Herstellung des Adenovirus zur Überexpression eines YFP/CFP-BRAP-Fusionsproteins soll in Zukunft die Untersuchung der Rolle der posttranslationalen Modifikationen von BRAP auf dessen Konformation ermöglichen.

4.2 Differentielle Regulation von BRAP in der Herzinsuffizienz

In Vorarbeiten wurde die Verringerung eines als BRAP identifizierten Protein-Spots in 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Myokardproben eines rechtsventrikulär-hypertrophierten Tiermodells gezeigt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiermodelle der Aortenkonstriktion und des Myokardinfarktes zeigten auf RNA-Ebene sowie in der Western Blot-Analyse keine Unterschiede der BRAP-Expression. In Proben von Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie wurde dagegen eine erhöhte BRAP-Expression auf RNA-Ebene gezeigt. Die erhöhte Ras/MAPK-Aktivierung ist ein Kennzeichen der Herzinsuffizienz. Eine Stimulation von isolierten Kardiomyozyten mit dem Ras-Aktivator PMA bewirkte nach einer Stunde eine Verringerung der detektierten BRAP-Proteinmenge. Während es unter bestimmten Hypertrophie-Bedingungen zu einer Steigerung der BRAP-RNA-Menge kam (3.1.3), schien die BRAP-Proteinmenge eher vermindert zu sein.

Dieser scheinbar gegensätzliche Befund, weist auf eine Regulation von BRAP auf verschiedenen Ebenen hin. Matheny *et al.* [2004] konnten eine Ras-abhängige Ubiquitylierung von BRAP in immortalisierten Zelllinien zeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit nach Stimulation von kultivierten Kardiomyozyten mit PMA weisen ebenfalls darauf hin, dass eine Ras-abhängige Degradation des BRAP-Proteins in Kardiomyozyten stattfindet (3.1.4). Die Steigerung der RNA-Expression bei Patienten mit DCM oder ICM (3.1.3) könnte Resultat eines Gegenregulationsmechanismus sein, um ein basales BRAP-Proteinniveau aufrecht zu erhalten. Da die in den humanen Proben gemessene Expressionsänderung auf RNA-Ebene zwar statistisch signifikant, absolut betrachtet jedoch relativ gering war, erscheint deren Relevanz bislang fraglich. Dagegen ist als alternativer Mechanismus eine stimulationsabhängige Konformationsänderung, am ehesten in Folge posttranslationaler Modifikation denkbar. Dies wird durch den Nachweis zahlreicher Phosphorylierungen von BRAP (3.6.2) unterstützt. Inwieweit sich diese posttranslationale Modifikationen auf die Konformation von BRAP auswirkt, soll unter anderem mit Hilfe des YFP/CFP-BRAP-Konstruktes und FRET-Analysen zukünftig untersucht werden (3.7.2.1).

4.3 BRAP und die MAPK-Signalkaskade in primären Kardiomyozyten

Die Überexpression von BRAP in adulten Kardiomyozyten bewirkte eine dosisabhängige Inhibition der C-Raf abhängigen Mek-Aktivierung (Abb. 3.5). Im Gegensatz zu den Ergebnissen an immortalisierten Zelllinien [Matheny *et al.*, 2004], in denen BRAP nur den Mek/Erk-Weg beeinflusste, wurden in Kardiomyozyten zudem Effekte auf die anderen MAPK-Zweige beobachtet. Welcher Mechanismus zu der Aktivierung von JNK führt bleibt jedoch spekulativ. Die p38-Kinase wurde durch Raf-BxB-Überexpression geringfügig aktiviert. Die Inhibierbarkeit dieser Aktivierung durch BRAP suggeriert, dass die Wirkung von BRAP nicht spezifisch für die C-Raf/Mek-Interaktion ist, sondern auch weitere C-Raf Interaktionen betreffen könnte. *In vivo* Studien weisen darauf hin, dass eine Aktivierung des Mek/Erk-Signalwegs mit einer kompensatorischen Hypertrophie assoziiert ist. So bewirkt eine herzspezifische Überexpression von Mek1 eine kompensierte Hypertrophie, ohne zu einer Herzinsuffizienz zu führen [Bueno *et al.*, 2000]. Übereinstimmend damit führt eine Inhibierung des Mek/Erk-Weges durch BRAP zu einer Hemmung der Hypertrophieantwort in neonatalen Kardiomyozyten (Abb. 3.7).

4.4 B-Raf und C-Raf besitzen nicht-redundante Funktionen

Die Familie der Raf-Kinasen besteht aus den drei Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf. C-Raf stellt die am intensivsten untersuchte Isoform dar, über A-Raf ist dagegen am wenigsten bekannt. Alle drei Isoformen besitzen eine Ras-bindende Domäne (RBD) am aminoterminalen Ende. Obwohl alle Isoformen mit Ras einen gemeinsamen Aktivator und MEK als gemeinsames Substrat besitzen, gibt es auch zahlreiche Unterschiede. Ras aktiviert C-Raf nicht direkt, sondern transloziert C-Raf vom Zytosol zur Plasmamembran, wo es über komplexe Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Mechanismen zur Aktivierung von C-Raf kommt. Dagegen wird B-Raf direkt durch Ras-Bindung im Zytosol aktiviert. B-Raf kann zudem durch andere Proteine wie zum Beispiel cAMP-induziertes Rap1 aktiviert werden [York *et al.*, 1998]. *In vitro* Kinase-Assays zeigten, dass B-Raf die höchste Mek-Kinase Aktivität besitzt, gefolgt von C-Raf und A-Raf [Prichard *et al.*, 1995]. Die vereinfachte Vorstellung von linear ablaufenden Signalwegen ändert sich mit zunehmendem Wissensstand immer mehr hin zu einem Bild komplexer Netzwerke mit Interaktionen und Regulationsmechanismen innerhalb eines Weges und zwischen unterschiedlichen Signalwegen. B-Raf und C-Raf können Heterodimere bilden, die eine deutlich höhere Mek-Kinase-Aktivität als die entsprechenden Homodimere oder Monomere aufweisen [Rushworth *et al.*, 2006]. Unabhängig von seiner Kinase-Aktivität kann B-Raf C-Raf über den Mechanismus der Heterodimerisierung aktivieren [Garnett *et al.*, 2005]. Die durch Ras aktivierte Heterodimerisierung ist abhängig von der Anwesenheit des "Ankerproteins" KSR. BRAP ist dagegen in der Lage, die Heterodimerisierung und damit auch die über diesen Mechanismus stattfindende Aktivierung von C-Raf zu inhibieren [Chen *et al.*, 2008]. BRAP inhibiert auch die C-Raf-KSR Komplexbildung, wohingegen B-Raf-KSR Komplexe BRAP-insensitiv sind. Die erhöhte Mek-Aktivität, die normalerweise aus einer BRAP-Verminderung resultiert, wird aufgehoben durch zusätzliche Verminderung von C-Raf [Chen *et al.*, 2008]. Diese Resultate suggerieren, dass die Effekte von BRAP auf die Mek-Signaltransduktion spezifisch für C-Raf sind.

Am überzeugendsten zeigen die publizierten *knockout*-Studien nicht-redundante, isoformspezifische Funktionen von B-Raf und C-Raf. Sowohl B-Raf- als auch C-Raf-defiziente Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung [Wojnowski *et al.*, 1997; Hüser *et al.*, 2001; Mikula *et al.*, 2001]. C-Raf^{-/-}-Embryonen weisen eine erhöhte Apoptose-Rate in der Leber und vaskuläre Defekte in Dottersack und Plazenta auf. Erstaunlicherweise war die Erk-Aktivierung in C-Raf-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten (MEFs) nicht beeinträchtigt, wahrscheinlich aufgrund einer Kompensation durch B-Raf [Hüser *et al.*, 2001]. Ebenso überraschend konnte die Überexpression einer Kinase-defizienten C-Raf-Mutante den lethalen Phänotyp der C-Raf^{-/-}-Mäuse aufheben [Hüser *et al.*, 2001]. Demnach ist die Mek-Kinase-Aktivität von C-Raf nicht essentiell für die Embryonalentwicklung. Vielmehr scheinen Kinase-unabhängige Funktionen von C-Raf eine größere Bedeutung zu haben, während B-Raf für eine normale Mek-Aktivierung nötig und ausreichend ist. So scheint C-Raf auf mehrere proapoptotische Signalwege hemmende Wirkung zu haben. Zum Beispiel inhibiert C-Raf Apoptose durch eine Hemmung der Dimerisierung der proapoptotischen Kinase MST2 (*mammalian sterile-twenty-like 2*) [O'Neill *et al.*, 2004]. C-Raf defiziente Zellen besitzen eine gesteigerte MST2-Aktivität und Apoptose-Sensitivität, während eine zusätzliche Defizienz von MST2 die gesteigerte Apoptose-Sensitivität aufhebt. C-Raf bindet MST2 über die bei B-Raf nicht vorhandene CR2-Domäne, was MST2 zu einem C-Raf-spezifischen Target macht. Eine weitere Verbindung zwischen C-Raf und der Apoptose-Kaskade besteht darin, dass die *p21-activated kinase 1* (Pak1)-abhängige Phosphorylierung von C-Raf zu einer Translokation von C-Raf zu den Mitochondrien und einer Phosphorylierung von Bad führt [Jin *et al.*, 2005]. An den Mitochondrien bindet C-Raf an das antiapoptotische Protein Bcl-2 [Wang *et al.*, 1996], was eine Verminderung der Interaktion von Bcl-2 und Bad bewirkt. Bcl-2 wirkt antiapoptotisch, indem es das proapoptotische Protein Bax antagonisiert und dadurch die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran gewährleistet. Bad bindet und inhibiert Bcl-2. Wird Bad phosphoryliert, entlässt es Bcl-2, welches dann antiapoptotische Wirkung besitzt. Weiterhin wird die proapoptotische Kinase ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) über Kinase-unabhängige Wirkung von C-Raf inhibiert, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht bekannt ist [Chen *et al.*, 2001].

Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen C-Raf-Defizienz entwickeln eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion und Dilatation [Yamaguchi *et al.*, 2004]. Auch in diesem Maus-Modell konnte keine Verminderung der Mek-Aktivierung nachgewiesen werden.

Der Phänotyp konnte durch zusätzliche Defizienz von ASK1 aufgehoben werden, was die Hypothese bestärkt, dass eine wesentliche Funktion von C-Raf die Inhibition der Apoptose-Initiation betrifft. In dieser Arbeit wurde der Effekt einer C-Raf Inhibition durch Überexpression von BRAP *in vivo* untersucht. Neben den Auswirkungen der C-Raf-Inhibition auf die MAPK-Signaltransduktion wurden im Hinblick auf die Mek-unabhängigen Funktionen von C-Raf insbesondere die Effekte auf die Apoptose-Signalkaskade intensiv untersucht.

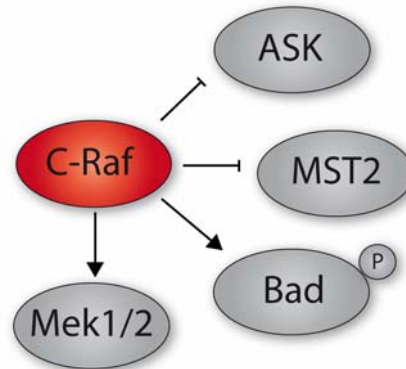


Abb. 4.1: C-Raf antagonisiert Apoptose auf verschiedenen Ebenen über Interaktionen mit mehreren an der Apoptose beteiligten Signalwegen. C-Raf inhibiert die proapoptotischen Kinasen ASK [Chen *et al.*, 2001] und MST2 [O'Neill *et al.*, 2004]. Eine Pak1-abhängige Translokation von C-Raf zu den Mitochondrien führt zu einer Phosphorylierung von Bad, wodurch die hemmende Wirkung von Bad auf das antiapoptotische Protein Bcl-2 aufgehoben wird. Eine Aktivierung von Mek1/2 bewirkt eine Inhibition der Apoptose auf der Ebene der Caspase-Aktivierung [Erhardt *et al.*, 1999].

4.5 Wie beeinflusst BRAP die Signaltransduktion *in vivo*?

Die Resultate der kürzlich publizierten Studie von Chen *et al.* [2008] weisen darauf hin, dass BRAP spezifisch die C-Raf-abhängige Signaltransduktion inhibiert, die B-Raf-Mek Interaktion dagegen nicht direkt beeinträchtigt. Daher wird im Folgenden auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der mechanistisch verwandten Mausmodelle des Kardiomyozyten-spezifischen C-Raf-*knockout* [Yamaguchi *et al.*, 2004] und der Kardiomyozyten-spezifischen BRAP-Überexpression eingegangen.

Kardiomyozyten-spezifische C-Raf-*knockout*-Mäuse (C-Raf-cKO) entwickeln ab einem Alter von fünf Wochen eine dilatative Kardiomyopathie mit einer Funktionsminderung, die sich in einer geringeren relativen Verkürzung und Ejektionsfraktion äußert. Im Alter von zehn Wochen ist die Funktion nochmals signifikant vermindert und bleibt dann mit zunehmendem Alter stabil auf geringem Niveau. Histologische Untersuchungen der Herzen zeigten ein erhöhtes Maß an Fibrose, aber keine Hypertrophie auf zellulärer Ebene. Eine erhöhte Letalität ist nicht mit dem Phänotyp verbunden [Yamaguchi *et al.*, 2004]. Kardiomyozyten-spezifische BRAP-transgen überexprimierende Mäuse (BRAP-TG) entwickeln im Alter von fünf Wochen ebenfalls eine dilatative Kardiomyopathie und eine erhebliche Einschränkung der Herzfunktion durch eine deutlich reduzierte kontraktile Funktion. Mit steigendem Alter nimmt die Dilatation der Herzen zu und ab einem Alter von zehn Wochen kommt es zu einer erhöhten Mortalität (Abb. 3.9). Histologisch konnte kein erhöhtes Maß an interstitieller Fibrose nachgewiesen werden. Der Phänotyp der beiden Maus-Modelle ähnelt sich stark, weist aber hinsichtlich der Mortalität und des Grades der Fibrose der Herzen auch Unterschiede auf (Abb. 3.11).

Die Analyse der MAPK-Signalwege zeigte, dass es bei den C-Raf-cKO Mäusen zu keiner Veränderung der Mek/Erk-Aktivierung kommt, während die p38-Kinase im Alter von drei Wochen und JNK im Alter von drei und vier Wochen erhöht aktiviert ist. Bei den BRAP-transgenen Mäusen war die Mek-Aktivität ab einem Alter von drei Wochen sogar gesteigert und ebenso die p38-Phosphorylierung (Abb. 3.13). Aus der in ihrem Mausmodell unveränderten Mek-Aktivierung schließen Chen *et al.*, dass C-Raf nicht für die Aktivierung von Mek erforderlich ist, da andere Raf-Isoformen oder Kinasen den C-Raf-Verlust kompensieren. Die Untersuchung der Brap-transgenen Mäuse zeigte, dass die B-Raf-Expression und B-Raf-Phosphorylierung in diesen Mäusen gesteigert ist (Abb. 3.15), was im Folgenden die erhöhte Mek-Aktivierung durch eine Überkompensation bewirken könnte. Übereinstimmend damit zeigten Mikula *et al.* bei aus C-Raf^{-/-} Mäuse-Embryonen isolierten Fibroblasten ebenfalls eine erhöhte Aktivität von B-Raf und eine gesteigerte basale Aktivierung von Mek und Erk [Mikula *et al.*, 2001]. Offensichtlich existieren bisher unbekannte Rückkopplungsmechanismen, die bei einer verminderten C-Raf-Expression oder Signaltransduktion auf Mek eine erhöhte Aktivität von B-Raf bewirken. Umgekehrtes könnte möglicherweise auch für eine Verminderung von B-Raf gelten [Galabova-Kovacs *et al.*, 2006]. Damit gleichen die auf den ersten Blick gegensätzlichen Effekte der BRAP-Wirkung auf Mek *in vitro* gegenüber *in vivo* der publizierten Datenlage.

Die Herzen der C-Raf-cKO Mäuse weisen eine erhöhte spontane Apoptoserate auf, was durch ein erhöhtes Bax/Bcl-2-Verhältnis und eine signifikant erhöhte Rate (TUNEL-positiv gefärbter) apoptotischer Kardiomyozyten im Alter von drei bis fünf Wochen gezeigt werden konnte. Auch die Herzen der BRAP-transgenen Mäuse zeigen Anzeichen einer erhöhten Apoptoseinitiation mit einem erhöhten Bax/Bcl-2 Verhältnis und erhöhter Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien. Dagegen kommt es in diesen Tieren nicht zu den mittleren und späten Ereignissen der Apoptose, Caspase-9 scheint sogar eher weniger aktiv zu sein (Abb. 3.17) und die Herzen der BRAP-transgenen Mäuse weisen auch nicht mehr apoptotische Kardiomyozyten auf als Wildtyp-Geschwistertiere. Dies scheint zunächst widersprüchlich zu sein, ist jedoch im Zusammenhang mit der Aktivierung des Mek/Erk-Signalwegs in den BRAP-transgenen Mäusen erklärbar. Es ist bekannt, dass B-Raf über eine Aktivierung von Mek hemmenden Einfluss auf Apoptose auf dem Level der Caspase-Aktivierung ausübt [Erhardt *et al.*, 1999]. Die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien wird dabei nicht beeinflusst, da B-Raf-Überexpression nur die anschließende Caspase-Aktivierung inhibiert. Auch Kardiomyozyten-spezifisch Mek1 überexprimierende Mäuse weisen eine deutliche Resistenz gegenüber proapoptotischen Stimuli auf [Bueno *et al.*, 2000].

Im Modell der C-Raf-cKO-Mäuse scheint es durch die C-Raf Defizienz zu einer erhöhten Aktivität von ASK1 und infolgedessen über eine Aktivierung von p38 und JNK zu erhöhter Apoptose und kardialer Dysfunktion zu kommen. Ob die p38-Aktivierung bei den BRAP-transgenen Mäusen ebenfalls durch eine erhöhte Aktivität von ASK1 infolge einer C-Raf Hemmung durch BRAP bewirkt wird, bleibt bislang spekulativ. Eine gesteigerte Phosphorylierung von ASK1 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), dies läßt jedoch im Fall von ASK1 keinen eindeutigen Rückschluss auf dessen Aktivierung zu. In den Herzen der BRAP-transgenen Mäusen kommt es dagegen eindeutig zur Initiation früher Mitochondrien-abhängiger Apoptoseereignisse, nicht aber zu den finalen Ereignissen der Apoptose, da wahrscheinlich die Caspase-Aktivierung durch die erhöhte Mek-Aktivität inhibiert wird. Folglich kann die Entstehung der kardialen Dysfunktion im Mausmodell der kardialen BRAP-Überexpression nicht über einen apoptotisch bedingten Zellverlust erklärt werden. Was ist also die Ursache für den Verlust der Herzfunktion in diesen Tieren? Um sich dieser Frage zu nähern, werden im folgenden Abschnitt die Mechanismen des Zelltods im Zusammenhang mit der Entwicklung der Herzinsuffizienz diskutiert.

4.6 Die Bedeutung von Apoptose, Autophagie und Nekrose bei der Herzinsuffizienz

Im Allgemeinen werden drei verschiedene Wege des Zelltodes unterschieden: Apoptose, Autophagie und Nekrose. Die Apoptose ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus, der fundamentale biologische Prozesse, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Zelltod reguliert. Kardiomyozyten beantworten zahlreiche Stimuli wie Hypoxie, mechanische Last, oxidativen Stress, Nährstoffmangel und Zytostatika mit Apoptose. Insbesondere der Myokardinfarkt, aber auch Kardiomyopathien, Myokarditis und Herzinsuffizienz sind mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten assoziiert. Zum Nachweis, dass Apoptose von Kardiomyozyten eine kausale Bedeutung bei der Entstehung dieser Krankheiten besitzt, wurden genetische und pharmakologische Ansätze zur Hemmung der Apoptose im Herzen verfolgt. Beispielsweise bewirkte eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in Mäusen eine verringerte Infarktgröße nach Myokardinfarkt-Operation und eine verbesserte Herzfunktion nach Ischämie und anschließender Reperfusion [Brocheriou *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001]. Auch durch pharmakologische Hemmung der Apoptose konnten protektive Effekte im Mausmodell nach Ischämie/Reperfusion erzielt werden [Huang *et al.*, 2000; Holly *et al.*, 1999]. Da im Modell der herzspezifischen BRAP-Überexpression mechanistisch eine Hemmung der antiapoptotischen Funktionen von C-Raf vermutet wurde, erfolgte eine Untersuchung der Apoptose-Kaskade auf mehreren Ebenen (Abb. 3.17). Es zeigte sich, dass in den BRAP-transgenen Mäusen die frühen Ereignisse der Apoptose induziert waren, die späteren Ereignisse und letztendlich der Zellverlust jedoch nicht vermehrt eintraten.

Bei Autophagie handelt es sich um einen Lysosomen-abhängigen Prozess zur Degradation langlebiger Proteine und Organellen. Durch zellulären Stress wird die unter normalen Bedingungen wenig stattfindende Autophagie induziert. Autophagie bewirkt durch Proteinabbau eine erhöhte Verfügbarkeit freier Aminosäuren und Fettsäuren, die für die Energieproduktion nötig sind, eine Zerstörung beschädigter Organellen und beugt einer Anhäufung von Protein-Aggregaten vor. Daher scheint die Autophagie protektive Wirkung zu haben. Auch im Herzen spielt Autophagie eine wichtige Rolle.

In Myokard, welches einer Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt wurde, ist die Autophagie induziert [Decker und Wildenthal, 1980] und auch bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz ist die Anzahl von Autophagosomen erhöht [Dammrich und Pfeifer, 1983; Shimomura *et al.*, 2001]. Ob Autophagie einen Weg hin zum Zelltod darstellt oder ob dieser durch Autophagie eher verhindert wird, ist bisher nicht abschließend geklärt. Beispielsweise bewirkt eine Defizienz des für Autophagie essentiellen Proteins Atg5 im Herzen eine Akkumulation defekter Organellen und kardiale Dysfunktion [Nakai *et al.*, 2007]. Einige Studien konnten zeigen, dass eine gesteigerte Autophagie während Ischämie/Reperfusion kardioprotektive Wirkung ausübt [Matsui *et al.*, 2007]. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, dass eine Hemmung der Autophagie eine Verringerung des Zelltods nach Ischämie/Reperfusion bewirkt [Valentim *et al.*, 2006]. Diese und weitere Publikationen suggerieren, dass Autophagie eine zweifache Rolle im Herzen zu spielen scheint. Ein geringes Ausmaß an Autophagie während Ischämie/Reperfusion könnte protektive Effekte auf die Zelle ausüben, während längerfristige und übermäßige Autophagie durch Degradation essentieller Proteine oder Organellen möglicherweise zum Zelltod führen kann. Darüber hinaus scheinen auch Wechselwirkungen zwischen Autophagie und apoptotischem Zelltod zu bestehen [Patingre *et al.*, 2005]. Eine Beteiligung der Autophagie an der Entstehung der Herzinsuffizienz des Mausmodells der BRAP überexprimierenden Mäuse wurde bislang nicht untersucht, ist aber für die Zukunft geplant.

Nekrose galt lange als ein passiver, unkontrollierbarer Prozess der ohne einen spezifischen Mechanismus zum Zelltod führt. Diese Sichtweise ändert sich jedoch dahingehend, dass evolutionär konservierte Signalwege den nekrotischen Zelltod über spezifische Mechanismen kontrolliert einleiten [Casey *et al.*, 2007]. Casey *et al.* konnten zeigen, dass oxidativer Stress durch Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Kardiomyozyten zu nekrotischem Zelltod führt. Bei einer Ischämie ändert sich der Stoffwechsel der Kardiomyozyten von aerober zu anaerober Glykolyse. Durch die fehlende Blutversorgung sammeln sich Stoffwechselmetabolite wie Lactat, Acetyl-CoA, NADPH sowie CO₂ und H⁺-Ionen an. Diese wirken im Übermaß zelltoxisch, da sie in hohen Konzentrationen die glykolytische ATP-Bildung blockieren und die Zellmembranen schädigen. Es kommt zu einer Schwellung der Zelle, weshalb auch der Terminus Onkose verwendet wird. Insgesamt ist der Vorgang der Nekrose weit weniger intensiv erforscht als die Mechanismen der Apoptose. Bei der Initiation des nekrotischen Zelltod spielen wie auch bei der Apoptose die Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Der Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran scheint dabei ein wesentlicher Faktor zu sein [Crompton *et*

al., 2002; Halestrap, 2006]. Erst kürzlich wurde in einer aufwendigen Studie gezeigt, dass Kalzium- und Mitochondrien-abhängige Nekrose primär zu Herzinsuffizienz führen kann [Nakayama *et al.*, 2007]. In den transgenen BRAP-Mäusen scheint ebenfalls die Mitochondrienmembran beeinträchtigt zu sein, dennoch zeigt die nicht vorhandene Fibrose des Myokards, dass ein massiver Zellverlust durch Nekrose nicht auftritt.

4.7 Zur Bedeutung von Mitochondrien in Kardiomyozyten

Die meisten zellulären Signalwege basieren auf energieabhängigen Prozessen. Kardiomyozyten besitzen einen besonders hohen Energiebedarf, um Prozesse wie Ionen-transport und Sarkomerfunktion zu gewährleisten. Die ATP-erzeugenden Mechanismen müssen auf wechselnde physiologische Anforderungen reagieren.

Daher ist die Funktion der Mitochondrien und ihre Interaktion mit zahlreichen Signalwegen der Zelle absolut essentiell für den kardialen Energiemetabolismus. Fettsäuren stellen die primäre Energiequelle des Herzmuskels dar [Bing *et al.*, 1954; Shipp *et al.*, 1961]. In der Mitochondrienmatrix findet die β -Oxidation der Fettsäuren zu Acetyl-CoA statt, welches über den Citratzyklus unter Bildung der Reduktionsäquivalente NADH und $FADH_2$ weiter abgebaut wird. Diese dienen als Elektronendonoren der Atmungskette und es erfolgt die Bildung eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran. Die Energie dieses Redoxpotentials nutzt die ATP-Synthetase zur Generierung von ATP. Apoptotische Stimuli bewirken die Translokation von Bax zum Mitochondrium. Es ist bekannt, dass Bax eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bewirkt [Crow *et al.*, 2004]. Über den genauen Mechanismus gibt es jedoch mehrere Hypothesen. Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führt zu einem Ausstrom von Cytochrom C in das Cytoplasma und einer Verringerung der Effizienz der Elektronentransportkette [Eskes *et al.*, 1998; Jurgenmeier *et al.*, 1998]. Eine reduzierte Fähigkeit der ATP-Produktion bewirkt die Dysregulation zellulärer Prozesse, welche für die kardiale Pumpfunktion essentiell sind. Energiemangel kann einerseits eine Folge von Herzinsuffizienz sein, aber auch primär infolge einer Störung des mitochondrialen Energiemetabolismus Herzinsuffizienz auslösen [Huss und Kelly, 2005]. Sowohl das mitochondriale Genom als auch das nukleäre Genom sind essentiell für die Biogenese der Atmungskettenproteine.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Mutationen in beiden Genomen identifiziert und mit Krankheiten korreliert, die auf eine mitochondrielle Dysfunktion zurückgehen [Wallace, 1999]. Mutationen in Genen, welche für die Mitochondrienbiogenese von Bedeutung sind, können beim Menschen unter anderem Kardiomyopathien verursachen, was die Bedeutung der mitochondrialen ATP-Produktion für die Funktion von Kardiomyozyten bestätigt [Larsson und Oldfors, 2001; DiMauro und Schon, 2001]. Mausmodelle der mitochondrialen Dysfunktion lieferten weitere Informationen über die Bedeutung eines deregulierten Mitochondrienstoffwechsels bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [Graham *et al.*, 1997; Murdock *et al.*, 1999]. Diese Modelle weisen darauf hin, dass die beobachteten pathophysiologischen Veränderungen hauptsächlich auf einen ATP-Mangel zurückgehen. Als weitere pathophysiologische Ursache scheinen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch die mitochondrielle Dysfunktion entstehen und zu einer Schädigung zahlreicher zellulärer Moleküle führen können, in Betracht zu kommen [Esposito *et al.*, 1999].

4.8 Wie bewirkt BRAP-Überexpression die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie?

Anhand der bisher publizierten Daten [Chen *et al.*, 2008] und der eigenen Ergebnisse an isolierten Kardiomyozyten kann gefolgert werden, dass BRAP die Signaltransduktion von C-Raf auf Mek hemmt. Über einen bislang nicht geklärten Mechanismus kommt es in Kardiomyozyten der BRAP-transgen überexprimierenden Mäusen zu einer Aktivierung von B-Raf. Dies führt offensichtlich zu einer Überkompensation und im Folgenden zu einer gesteigerten Aktivierung von Mek. Es ist wahrscheinlich, dass BRAP auch Mek-unabhängige C-Raf Interaktionen beeinflusst. So könnte die gesteigerte p38-Aktivierung in den BRAP-transgenen Mäusen durch Steigerung der ASK1-Kinaseaktivität, infolge einer verringerten Hemmung durch C-Raf nach BRAP-Überexpression erfolgen. Dies bleibt aber bisher spekulativ. Auch der genaue Mechanismus, der bei den BRAP-transgenen Mäusen zur Initiation der Apoptose-Kaskade mit erhöhtem Bax/Bcl-2 Verhältnis und Cytochrom C Ausstrom aus den Mitochondrien führt, ist nicht bekannt.

Capano und Crompton [2006] konnten zeigen, dass es in Kardiomyozyten unter Ischämie-Bedingungen zu einer Translokation von Bax zu den Mitochondrien kommt und diese Translokation durch eine Aktivierung von p38 erfolgt. Es wäre daher denkbar, dass es in den Kardiomyozyten der BRAP-transgen überexprimierenden Mäuse infolge der gesteigerten Aktivierung von p38 ebenfalls zur Translokation von Bax zu den Mitochondrien und schließlich zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kommt. Als weitere Möglichkeit kommt in Betracht, dass BRAP die Interaktion zwischen C-Raf und Bcl-2 hemmt. Bcl-2 würde dann wie bereits erläutert weiterhin in einem Komplex mit Bad vorliegen und nicht als Antagonist von Bax zur Verfügung stehen, was ebenfalls zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen würde.

Trotz der gesteigerten Initiation der Apoptose in den Herzen der BRAP-transgenen Mäuse kommt es, wahrscheinlich durch die erhöhte Mek-Aktivität und deren inhibierende Wirkung auf Caspasen, nicht zu einer Aktivierung der weiteren Apoptose-Ereignisse. Welche Prozesse führen also zu der Entstehung der massiven Herzinsuffizienz der BRAP-transgen überexprimierenden Mäuse, wenn nicht Apoptose? Eine Aktivierung des Mek/Erk-Signalweges führt zu der Entwicklung einer kompensierten, physiologischen Hypertrophie, nicht aber zu einer Einschränkung der Herzfunktion [Bueno *et al.*, 2000]. Die gesteigerte Mek-Aktivierung in den Herzen der BRAP-transgenen Mäuse kann demnach allenfalls die erhöhten Herzgewichte erklären. Eine alternative Ursache für die Entwicklung der Herzinsuffizienz ist die gesteigerte p38-Aktivität. Eine herzspezifische Überexpression der aktivierten p38-Kinasen MKK3 oder MKK6 bewirkt eine erhöhte p38-Aktivität und führt zu einer erhöhten Letalität im Alter von sieben bis neun Wochen. Die Herzen der Mäuse, die aktiviertes MKK3 überexprimierten, besitzen vergrößerte endsystolische Ventrikelvolumina und dünnere Ventrikelwände [Liao *et al.*, 2002]. Eine erhöhte Apoptoserate konnte von den Autoren nicht detektiert werden. Mehrere Studien konnten einen Effekt der p38-Aktivierung auf die Kraftentwicklung von Kardiomyozyten zeigen [Chen *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2002]. Liao *et al.* konnten zeigen, dass eine Aktivierung von p38 in Kardiomyozyten signifikant die basale Kontraktilität vermindert. Inhibition von p38 führte zu einer gesteigerten Kontraktilität, ohne dass Veränderungen der L-Typ-Kalziumströme oder der Kalziumtransienten auftraten. Daher scheint p38-Aktivierung die Kontraktilität von Kardiomyozyten durch eine Verringerung der Kalziumsensitivität der Myofilamente zu vermindern. Dieser Mechanismus könnte auch in den BRAP-transgen überexprimierenden Mäusen zu einer verminderten Kontraktilität der Kardiomyozyten und in der Folge zur verringerten Pumpfunktion des Myokards und Herzinsuffizienz führen.

Eine weitere Hypothese zum Mechanismus der Herzinsuffizienzentwicklung basiert auf den Beobachtungen hinsichtlich einer Schädigung der Mitochondrien in den BRAP-transgen überexprimierenden Mäusen. Die stark erhöhte Konzentration an zytoplasmatischem Cytochrom C spricht für eine massive Permeabilisierung der äußeren Membran der Mitochondrien. Es ist wahrscheinlich, dass es bei einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und einem Ausstrom von Cytochrom C zu einer verminderten Effizienz der Elektronentransportkette kommt und der resultierende Energiemangel entweder zu einer geringeren Kraftentwicklung oder zum Untergang der Zelle durch Nekrose führt. Beides würde die Funktionsfähigkeit des Myokards deutlich beeinträchtigen und könnten die bei den BRAP-transgen überexprimierenden Mäusen stattfindende Remodulierung des Herzens auslösen.

Die beobachtete Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalwegs kommt weniger als Ursache in Betracht. Vielmehr scheint dies ein sekundärer Effekt der Herzinsuffizienz zu sein, denn im Gegensatz zu den oben genannten molekularen Veränderungen, die bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nachzuweisen waren, zeigte sich die erhöhte Aktivierung des Calcineurin-NFAT Signalwegs erst bei sieben Wochen alten BRAP-transgenen Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Herzfunktion der BRAP-transgenen Mäuse schon deutlich beeinträchtigt. Die damit einhergehende systemische neurohumorale Stimulation erschwerte daher die Interpretation hinsichtlich Ursache und Wirkung molekularer Veränderungen bei der Herzinsuffizienzentstehung *in vivo*.

4.9 Hypothesen zur Funktion von BRAP während der Embryonalentwicklung

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten BRAP-*genetrap* Mäuse stellen funktionell ein *knockout*-Modell dar, da im homozygoten Zustand kein BRAP-Protein detektierbar war. Die für die BRAP-*genetrap*-Kassette homozygoten Embryonen starben während der Embryonalentwicklung zwischen E9,5 und E10,5. Eine Letalität während dieses Entwicklungsstadiums hat häufig hämatopoetische Defekte, kardiale Abnormalitäten oder einen Plazentadefekt zur Ursache [Papaioannou und Behringer, 2005]. Da BRAP in dieser Phase der Embryonalentwicklung nahezu ubiquitär exprimiert wird, gibt das Expressionsmuster keine sicheren Hinweise auf eine mögliche Ursache des Absterbens.

Isolierte embryonale Fibroblasten der homozygoten Embryonen beginnen, zu Neuronen-ähnlichen Zellen auszudifferenzieren und weisen nach kurzer Zeit keine Proliferationsfähigkeit mehr auf. Matheny *et al.* konnten zeigen, dass eine si-RNA-vermittelte Verminderung der BRAP-Expression in PC12-Zellen zu einer erhöhten Aktivierung des Mek/Erk-Signalweges nach EGF-Stimulation führt und dass dies zu einer Induktion des Auswachsens von Neuriten führt [Matheny *et al.*, 2004].

Der Mek/Erk-Signalweg ist in vielfältige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Zellteilung und Zelltod involviert [Lewis *et al.*, 1998; Schaeffer und Weber 1999]. Paradoxerweise scheint der Mek/Erk-Signalweg sowohl eine Stimulation als auch eine Inhibition der zellulären Proliferation vermitteln zu können [Pages *et al.*, 1993; DeSilva *et al.*, 1998; Sewing *et al.*, 1997]. Im Jahr 1995 interpretierte Marshall die zahlreichen Studien zu dieser Thematik dahingehend, dass sowohl die Dauer als auch die Intensität der Erk-Aktivierung entscheidend für die Signalantwort ist [Marshall, 1995]. So bewirkt eine dauerhaft hohe Aktivität des Mek/Erk-Signalweges einen Zellzyklusarrest und kann assoziiert sein mit Apoptose, Seneszenz und Differenzierung. Dagegen führt eine kurzfristig hohe Erk-Aktivierung, gefolgt von längerfristig moderat erhöhter Aktivierung in vielen Zellen zur Proliferation [Kahan *et al.*, 1992; Qui *et al.*, 1992] (Abb. 4.2). Dieser Mechanismus wird über den *cyclin-dependent kinase* (cdk2)-Inhibitor p21^{cip1} und Cyclin D1 vermittelt. Die p21^{cip1}-Expression wird in der frühen G1-Phase durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren induziert [Bottazzi *et al.*, 1999]. Während der mittleren bis späten G1-Phase kommt es zu einer Verringerung des p21^{cip1}-Levels. Diese Verringerung des p21^{cip1}-Protein-Levels scheint wichtig für die während der späten G1-Phase auftretenden Aktivierung von Cyclin E-cdk2 zu sein [Bottazzi *et al.*, 1999]. Eine langfristige Induktion von p21^{cip1} führt dagegen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase [Sewing *et al.*, 1997; Pumiglia *et al.*, 1997]. Die Induktion von Cyclin D1 stimuliert den Übergang der Zelle von der G1-Phase zur S-Phase [Musgrove *et al.*, 1994]. Während die Expression von p21^{cip1} schon durch kurzfristige Erk-Aktivierung induziert wird, ist für die Induktion der Expression von Cyclin D1 eine längerfristige, moderat erhöhte Erk-Aktivierung nötig. Daher löst eine transiente Erk-Aktivierung, aufgrund einer fehlenden Cyclin D1-Induktion, keine zelluläre Proliferation aus [Alessi und Cohen, 1998; Roovers *et al.*, 2000].

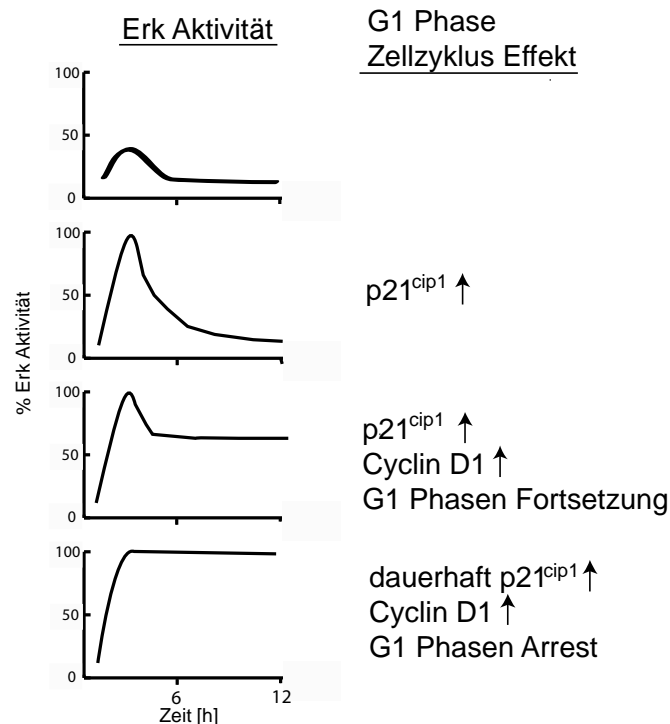


Abb. 4.2: Die Effekte von Erk auf den Zellzyklus sind abhängig von der Höhe und der Dauer der Aktivierung von Erk [Roovers *et al.*, 1999]. Die Abbildung zeigt unterschiedliche Aktivierungsmuster von Erk und deren Auswirkung auf die Expression von p21^{cip1} und Cyclin D1, sowie deren Wirkung auf den G1 Phasen Zellzyklus (Details siehe Text).

Sewing *et al.* [1997] untersuchten die Auswirkung unterschiedlicher C-Raf-Aktivität auf die Zell-Proliferation und den Zellzyklusarrest. Sie konnten zeigen, dass moderate C-Raf-Aktivität die Proliferation fördert, während eine hohe C-Raf-Aktivität zu einem Zellzyklusarrest führt. Es ist denkbar, dass es in den BRAP^{-/-}-Fibroblasten beziehungsweise in den Zellen der homozygoten Embryonen ebenfalls durch eine erhöhte C-Raf-Aktivität infolge des Wegfalls der Inhibition durch BRAP zum Zellzyklusarrest und zur Ausdifferenzierung kommt. Aufschlussreich wäre eine Untersuchung der Erk-Aktivierungskinetik nach einer Stimulation des Mek/Erk-Signalwegs in BRAP^{-/-}-Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten.

Da jedoch die BRAP^{-/-}-Fibroblasten nach kurzer Zeit ausdifferenzieren und sich nicht mehr teilen, war diese Untersuchung technisch nicht möglich. Für diese Zwecke soll daher versucht werden, eine BRAP^{-/-}-Zelllinie aus embryonalen Stammzellen zu generieren. Eine BRAP^{-/-}-Zelllinie würde zahlreiche neue Untersuchungen zur Analyse der Funktion von BRAP hinsichtlich der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen ermöglichen.

Eine Reduktion der BRAP-Expression um die Hälfte, wie bei den heterozygoten BRAP^{-/+}-Mäusen, scheint dagegen keinen offensichtlichen Phänotyp hervorzurufen. Warum sollte die Menge an BRAP-Protein dann aber abhängig von einer Ras-Stimulation durch Ubiquitylierung reguliert werden (eigene Ergebnisse Abb. 3.4 und Matheny *et al.*, 2004)? Wäre dieser Aufwand an Energie nicht unnötig, wenn die Menge an BRAP-Protein nicht relevant ist? Mäuse scheinen mit der Hälfte der normalen BRAP-Menge offensichtlich leben zu können, ob sie aber einen, eventuell unter Laborbedingungen nicht erkennbaren, dezenten Phänotyp entwickeln, der evolutionär nachteilig wäre, bleibt ungewiss. Vielleicht spielen aber auch eine Regulation der BRAP-Aktivität oder eine dynamische Änderung der Expression eine Rolle. Eine Erklärung für die Diskrepanz des fehlenden offensichtlichen Phänotyp der BRAP^{-/+}- Mäuse und der Stimulus-abhängigen Degradation wäre, dass nicht die absolute Menge an BRAP-Protein von Bedeutung ist, sondern die (Ras-abhängige) Änderung (Differenz) des BRAP-Proteins. Demnach könnte eine akute Veränderung des BRAP-Niveaus ein Signal für nachgeschaltete Wege darstellen, während die dauerhafte Verminderung des BRAP-Niveaus, wie bei den BRAP^{-/+}- Mäusen, möglicherweise keinen Effekt hat. Ein weitere denkbare Erklärung wäre, dass die geringere BRAP-Menge bei den BRAP^{-/+}- Mäusen durch eine gesteigerte Aktivität des verbleibenden BRAP kompensiert wird. Eine mögliche Regulation von BRAP durch posttranslationale Modifikationen wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Eine weitere direktere Verbindung zwischen BRAP und dem Zellzyklus könnte über die von Asada *et al.* [2004] beschriebene Interaktion zwischen BRAP und der Kernlokalisations-Sequenz von p21 bestehen. Die Untersuchung der Relevanz dieser Interaktion *in vivo* könnte diesbezüglich neue interessante BRAP-abhängige Mechanismen aufzeigen.

4.10 Wie wird BRAP posttranslational reguliert?

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse und die Untersuchung dieser Modifikationen stellt einen wichtigen Aspekt im Verständnis der Signalwege der Zelle dar. Zahlreiche Arten der Modifikation von Proteinen sind bekannt, darunter Phosphorylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung, Glykosylierung, Farnesylierung, Acetylierung und Hydroxylierung.

Posttranslationale Modifikationen regulieren unter anderem die Aktivität, Interaktionen, den Abbau, die Konformation und die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins. Etwa 2% des eukaryontischen Genoms kodieren für Proteinkinasen [Manning, 2005], die schätzungsweise 30% aller eukaryontischen Proteine phosphorylieren [Cohen, 2002]. Die Massenspektrometrie ermöglicht die Identifikation von posttranslationalen Modifikationen und unter Verwendung von Markierungstechniken mit stabilen Isotopen sogar deren Quantifizierung [Ong *et al.*, 2002].

Nachdem durch 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse für BRAP einige posttranslationale Modifikationen erwartet werden konnten, wurde eine Immunpräzipitation und in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie eine massenspektrometrische Analyse des Präzipitats durchgeführt. Dabei wurden zehn verschiedene phosphorylierte Peptide identifiziert. Bei Peptiden mit mehr als einer potentiell phosphorylierbaren Aminosäure wurde anhand eines, auf dem Sequenzkontext basierenden Algorithmus (MASCOT-Programm) die am wahrscheinlichsten phosphorylierte Aminosäure berechnet. Zusätzlich wurde die evolutionäre Konservierung der Aminosäuresequenz von BRAP in die Betrachtung miteinbezogen. Demnach besitzt BRAP mindestens zehn, wahrscheinlich aber noch mehr Phosphorylierungsstellen. Die identifizierten Phosphorylierungen sind über das Protein verteilt, auffällig ist allerdings, dass sich im Bereich der Ring Domäne, der Zink-Finger Domäne und der coiled-coil Domäne keine Phosphorylierungsstellen befinden (Abb. 4.3).

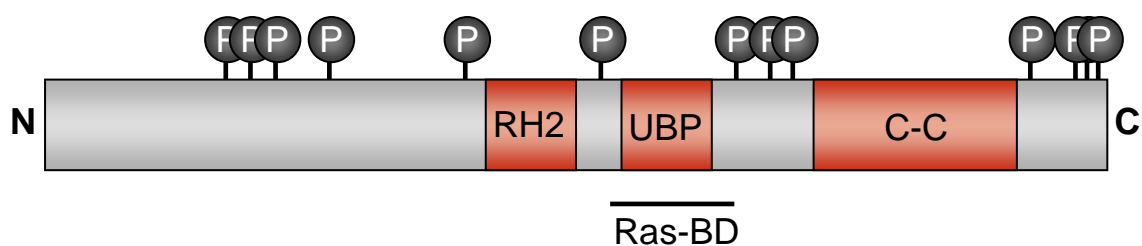


Abb. 4.3: Übersichtsdarstellung zur Domänen-Struktur von BRAP und zur Lage der identifizierten Phosphorylierungsstellen. RH2: Ring-H2 Domäne, UBP: UBP-Zink-Finger Domäne, C-C: coiled coil Domäne, Ras-BD: minimaler Ras-bindender Bereich, P: phosphorylierbare Aminosäure.

Um Hinweise auf die Kinasen zu erhalten, wurden die Programme "NetPhosK" und "Phosida" verwendet, die anhand der Aminosäuresequenz im Kontext der Phosphorylierungsstelle potentielle Kinasen vorhersagen. Für Aminosäure T308 wurde beispielsweise die p38-Kinase vorgeschlagen. Insgesamt sind solche Vorhersagen als sehr unsicher zu bewerten und geben allenfalls Hinweise, die experimentell überprüft werden müssen (Tab. 4.I). Die Identifikation der zahlreichen Phosphorylierungsstellen und der Ubiquitylierung zeigen, dass die Zelle BRAP unter ATP-Verbrauch modifiziert. Vor diesem Hintergrund scheint ein evolutionärer Nutzen der Phosphorylierung von BRAP wahrscheinlich. Die Untersuchung der posttranslationalen Modifikationen von BRAP, deren Relevanz und die Suche nach den Kinasen wird weitere Erkenntnisse zur Funktionsweise von BRAP und zur Kontrolle der MAPK-Signaltransduktion erbringen.

Tabelle 4.I: Ergebnisse der Kinase-Vorhersage Programme "NetPhosK" und "Phosida" für die identifizierten Aminosäuren.

Aminosäure	"NetPhosK" Kinase-Vorhersage	"Phosida" Kinase-Vorhersage
S94	RSK	-
T99	PKC	-
S117	cdk5	cdk2, cdk1
S119	-	-
Y218	EGFR	-
T220	-	-
S252	-	-
T308	p38 MAPK	-
S380	-	NEK6
T395	CKII	CK2
Y408	-	ALK
S409	cdc2	-
Y539	EGFR	-
S574	PKC, GSK3, CKI	GSK3, CKI
S575	-	CKI
S578	PKC	GSK3, CKI
S583	PKC	-

4.11 Interaktionen und Lokalisation von BRAP

Die ersten Publikationen über BRAP berichten eine Interaktion von BRAP mit dem Kernlokalisations-Motiv von BRCA1 (*breast cancer 1*) [Li *et al.*, 1997] und p21 [Asada *et al.*, 2004], deren Relevanz bisher jedoch unklar ist. Die Identifikation von BRAP als ein Ras-bindendes Protein und die weiteren Studien von Matheny *et al.* konnten BRAP funktionell als Inhibitor der Mek/Erk-Signalkaskade einordnen. BRAP wird seitdem auch *impedes mitogenic signal propagation* (IMP) genannt. In diesem Zusammenhang wurde eine direkte Interaktion von BRAP mit dem "Ankerprotein" KSR gezeigt.

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *yeast-two-hybrid*-Screening erbrachte als einzigen validen Bindungspartner das Protein CHCHD3 (*coiled-coil helix coiled-coil helix domain containing protein 3*). Durch Ko-Immunpräzipitation von BRAP-Flag und endogenem CHCHD3 konnte die Interaktion bestätigt werden. CHCHD3 ist als mitochondrielles Protein bekannt, dessen Funktion bisher weitgehend ungeklärt ist. Für CHCHD3 konnte eine Interaktion mit dem an der inneren Mitochondrien-Membran lokalisierten Mitofilin gezeigt werden [Xie *et al.*, 2007]. Mitofilin kontrolliert die Cristae-Morphologie von Mitochondrien [John *et al.*, 2005]. Weiterhin scheint CHCHD3 ein Substrat der Protein Kinase A (PKA) darzustellen [Schauble *et al.*, 2007] und eventuell Teil der Import-Maschinerie für mitochondrielle Proteine zu sein. Wie wahrscheinlich ist nun, dass BRAP *in vivo* in der intakten Zelle mit dem mitochondriellen CHCHD3 funktionell interagiert? Grundlegende Voraussetzung für eine physische Interaktion wäre eine zumindest temporäre Überlagerung der intrazellulären Lokalisation. Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass BRAP zum Teil auch in Mitochondrien vorliegt, denn mittels Western Blot konnte BRAP in isolierten Mitochondrien-Fraktionen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Bislang steht jedoch nicht fest, ob es sich eventuell um eine Kontamination mit anderen Organellen oder Membranen handelt. Da jedoch einige Proteine der MAPK-Signalkaskade nachweislich am oder im Mitochondrium vorliegen können, wäre dies für BRAP ebenfalls denkbar. Für die Lokalisation von CHCHD3 gibt es Hinweise darauf, dass CHCHD3 im Mitochondrium durch PKA phosphoryliert werden kann und daraufhin in den Zellkern transloziert [Darshi *et al.*, 2007]. Theoretisch ist es also durchaus möglich, dass BRAP und CHCHD3 *in vivo* interagieren, der experimentelle Nachweis durch Ko-Immunfluoreszenz-Färbung wurde bislang noch nicht erbracht.

Bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern von BRAP durch Immunpräzipitation und massenspektrometrische Analyse wurden zahlreiche Proteine identifiziert, von denen sich die meisten jedoch als Artefakte herausstellten, da sie auch in einer der Kontrollproben identifiziert werden konnten. Die Identifikation von Ubiquitin und mehrerer Ubiquitin-Hydrolasen und Proteasen bestätigte die Ubiquitylierung von BRAP. Ein interessanter Befund war die Identifikation mehrerer Zentrosomen- und Zellzyklus-assoziiierter Proteine darunter Pericentrin, gamma-Tubulin und *centrosomal Nek1 associated protein 1* in der BRAP-Immunpräzipitationsprobe. Darauf wird im nächsten Abschnitt im Zusammenhang mit der Untersuchung der Lokalisation von BRAP näher eingegangen. Bereits bekannte Interaktionspartner von BRAP konnten in diesem Experiment nicht identifiziert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Bedingungen der Immunpräzipitation zu stringent gewählt wurden und daher schwächere Interaktionen nicht erfasst werden konnten. Denkbar wäre auch ein zu hohes Maß an Überexpression von BRAP, so dass die im Allgemeinen gering exprimierte MAPK-Signalproteine unterrepräsentiert und daher nicht nachweisbar waren. Für die Interaktion von BRAP mit Ras konnte gezeigt werden, dass diese abhängig von einer Aktivierung von Ras stattfindet. Demnach könnte auch die fehlende Ras-Stimulation eine Ursache dafür sein, dass unter diesen Bedingungen keine Interaktion nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation eines Proteins gibt häufig wichtige Hinweise auf dessen Funktion. Für BRAP wurde beschrieben, dass es in HEK293-Zellen zusammen mit KSR in Triton-unlöslichen Strukturen lokalisiert ist. Die Überexpression einer onkogenen, konstitutiv aktiven Ras-Isoform (Ras12V) soll die Lokalisation von BRAP in Triton-unlöslichen Strukturen aufheben [Matheny *et al.*, 2004]. In adulten Kardiomyozyten der Ratte ist BRAP vorwiegend perinukleär und zytoplasmatisch lokalisiert. Vorläufige Daten aus Zellfärbungen mit Organellen-Markern die spezifisch für Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum oder Golgi-Apparat sind, geben Hinweise auf eine mögliche Überlagerung der perinukleären Lokalisation mit Strukturen des Golgi-Apparates (Daten nicht gezeigt). Der Golgi-Apparat ist Teil des Endomembransystems eukaryontischer Zellen, dessen Hauptfunktion die Modifikation von Proteinen und deren Sortierung innerhalb der Zelle, sowie die Bildung von exozytotischen Vesikeln ist. In vielen tierischen Zellen, so auch in Kardiomyozyten, ist der Golgi-Apparat perinukleär lokalisiert. Aktuelle Arbeiten zur Lokalisation der GTPase Ras zeigen, dass Ras im Gegensatz zur früheren Lehrmeinung nicht nur an der Plasmamembran agiert, sondern auch am Endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat wichtige Funktionen besitzt [Chiu *et al.*, 2002].

Abhängig von einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren transloziert Ras zum Endoplasmatischen Retikulum oder zum Golgi-Apparat. Die subzelluläre Lokalisation von aktivem Ras scheint zu beeinflussen, welche nachgeschalteten Signalwege aktiviert werden. So bewirkt aktives Ras am Golgi-Apparat vornehmlich eine Aktivierung von Erk, am Endoplasmatischen Retikulum führt es dagegen zur Aktivierung von JNK [Chiu *et al.*, 2002]. Da BRAP mit Ras interagiert [Matheny *et al.*, 2004], wäre eine Lokalisation von BRAP am Golgi-Apparat oder Endoplasmatischen Retikulum möglich.

In einem Teil der Zellen war BRAP an zwei gegenüberliegenden perinukleäre Foci lokalisiert. Durch Ko-Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen gamma-Tubulin konnten diese Foci mit hoher Wahrscheinlichkeit als Zentrosomen identifiziert werden (Abb. 3.34). Diesen Befund stützend wurden bei der Interaktions-Analyse von BRAP einige Proteine der Zentrosomen identifiziert: gamma-Tubulin, Pericentrin und Proteine die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Zentrosomen wurden vor über 100 Jahren von Theodor Boveri entdeckt [Boveri, 1888]. Zentrosomen sind Organellen, die eine wichtige Rolle bei der Organisation der Mikrotubuli tierischer Zellen und als Regulator des Zellzyklus spielen. Sie bestehen aus zwei orthogonal angeordneten Zentriolen, die von der perizentriolaren Matrix umgeben sind. Die perizentriolare Matrix enthält unter anderem die Proteine gamma-Tubulin, Pericentrin und Ninein. Von der perizentriolaren Matrix ausgehend bilden sich Mikrotubuli, die sich während der Zellteilung zur mitotischen Spindel organisieren [Zheng *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 1996]. Wie bereits unter 4.9 erläutert, besteht über Erk eine Verbindung zur Regulation des Zellzyklus. Möglicherweise existieren weitere Verknüpfungen über die Lokalisation von BRAP an den Zentrosomen.

4.12 Perspektiven

Obwohl die MAPK-Signaltransduktion eine seit Jahrzehnten intensiv untersuchte Thematik darstellt, sind viele Fragen bislang ungeklärt. Wie steuert die Zelle die MAPK-Signalkaskaden, warum sind diese Signalwege bei einigen Krankheiten dereguliert, handelt es sich um Kompensationsmechanismen oder ist die Dysregulation die Ursache der Krankheit? All dies sind Fragen, die Wissenschaftler unterschiedlichster Gebiete zu klären versuchen. Die Untersuchungen des relativ neu in diesen Zusammenhang gebrachten Proteins BRAP stehen noch ganz am Anfang. Nach den bisherigen Veröffentlichungen schien BRAP als Inhibitor des "Ankerproteins" KSR ein Modulator des Mek/Erk-Signalwegs zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten zeigen, dass sich die Wirkung von BRAP nicht nur auf den Mek/Erk-Signalweg beschränkt, sondern auch andere Signalwege betrifft. Die weitere Aufklärung der genauen Funktion von BRAP und den involvierten Signalwegen wird ein Schritt zum Verständnis der Herzinsuffizienz- und Hypertrophie-Entwicklung sein, der eine Übersetzung in therapeutische Ansätze ermöglichen könnte. Das Mausmodell der herzspezifischen Überexpression von BRAP zeigt, dass ein Übermaß an BRAP eine Herzinsuffizienz auslösen kann. Durch die Untersuchung des im Rahmen dieser Arbeit generierten Mausmodells der induzierbaren herzspezifischen BRAP-Überexpression werden weitere wichtige Erkenntnisse erwartet. So unter anderem die Frage, ob es nach einer Beendigung der BRAP-Überexpression zu einer Rückbildung des Phänotyps kommt. In Bezug auf einen möglichen therapeutischen Ansatz stellte sich die Frage, ob durch eine Hemmung von BRAP eine positive Wirkung auf die Herzfunktion erzielt werden kann. Wie die Ergebnisse der Untersuchung der heterozygoten BRAP^{+/+}-Mäuse zeigen, scheint eine dauerhaft verminderte Expression von BRAP keine Relevanz zu haben. Da in diesen Tieren möglicherweise die verminderte Expression durch eine Anpassung der Aktivität von BRAP kompensiert wird, sollte die bislang weitgehend unbekannte Regulation von BRAP durch posttranslationale Modifikationen weiter untersucht werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen von BRAP werden daher zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe DNA-Konstrukte zur Überexpression von an diesen Aminosäuren nicht-phosphorylierbaren BRAP-Isoformen hergestellt. Der Einfluss der posttranslationalen Modifikationen auf die Fähigkeit von BRAP, die Interaktion zwischen C-Raf und Mek zu hemmen, soll anhand eines für diese Zwecke optimierten *mammalian two-hybrid* Systems untersucht werden.

Die Interaktion von Mek1, fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne, und C-Raf, fusioniert mit dem VP16-Transaktivator, wird durch die Expression des Luciferase-Reportergens indirekt messbar. Potentielle Kinasen und Phosphatasen sollen durch die Verwendung von Kinase- beziehungsweise Phosphatase-Inhibitoren identifiziert werden.

Die Erkenntnis, dass BRAP essentiell für die Embryonalentwicklung ist, zeigt die globale Relevanz von BRAP. Da die MAPK-Signaltransduktion, über die kardiale Bedeutung hinaus, eine wichtige Rolle bei vielen grundlegenden zellulären Prozessen zu spielen scheint, könnte BRAP auch bei der Entstehung von Tumoren oder Erkrankungen des zentralen Nervensystems von Bedeutung sein. Eine weitere intensive Untersuchung der homozygoten BRAP-*knockout* Embryonen könnte neue Informationen über die Funktionen von BRAP während der Embryonalentwicklung bringen. Insbesondere Apoptose und Proliferation verschiedener Organe sollen anhand von histologischen Methoden untersucht und mittels *Whole mount in situ*-Hybridisierung morphologische Auffälligkeiten analysiert werden. Zahlreiche Möglichkeiten würde eine homozygote Zelllinie aus embryonalen Stammzellen bieten, an deren Etablierung wir derzeit arbeiten. Darunter interessieren insbesondere die Untersuchung der Auswirkungen auf die MAPK-Signaltransduktion bei einem Fehlen von BRAP und die Folgen für Proliferationsfähigkeit und Apoptosesensitivität. Auch eine Untersuchung des Differenzierungspotentials dieser Zellen, beispielsweise zu neuronalen oder kardialen Zellen, soll in Zusammenarbeit mit der auf Stammzellforschung spezialisierten Arbeitsgruppe von Frau Dr. Guan (Kardiologie, Universitätsmedizin Göttingen) realisiert werden.

5. Zusammenfassung

Die MAPK-Signalkaskade reguliert entscheidende zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Zellteilung und Apoptose und spielt eine wesentliche Rolle bei der kardialen Signaltransduktion. In Vorarbeiten konnte *BRCA1 associated protein 1* (BRAP) im Rahmen einer Proteomstudie als ein Protein identifiziert werden, welches in Herzen eines Ratten-Modells der kompensierten Hypertrophie verringert vorliegt. BRAP interagiert in immortalisierten Zelllinien mit Ras und inhibiert KSR, ein "Ankerprotein", welches für die Signaltransduktion von C-Raf zu Mek förderlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von BRAP in Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für die Untersuchung der BRAP-Expression in Tiermodellen der Hypertrophie wurde ein Antikörper gegen das gesamt-Protein BRAP hergestellt. In den Modellen des Myokardinfarktes und der Aortenkonstriktion konnte keine Änderung der BRAP-Menge auf Protein- oder RNA-Ebene festgestellt werden. Untersuchungen an Biopsiematerial von Patienten mit DCM oder ICM zeigten eine signifikante Zunahme der BRAP-RNA-Menge in diesen Proben. Die Stimulation der Ras-Aktivität in Kardiomyozyten führte zu einer Verringerung der detektierten BRAP-Proteinmenge nach einer Stunde, übereinstimmend mit dem publizierten Mechanismus einer Ras-abhängig induzierten Autoubiquitylierung und Degradation von BRAP. Zur Untersuchung der Wirkung von BRAP auf die Signaltransduktion in isolierten primären Kardiomyozyten wurde BRAP durch adenoviral vermittelten Gentransfer überexprimiert und die MAPK-Aktivierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass BRAP eine starke Hemmung der C-Raf abhängigen Mek-Aktivierung bewirkt. Eine durch Stimulation induzierte zelluläre Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten konnte durch BRAP-Überexpression verhindert werden.

In vivo bewirkte die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von BRAP den Phänotyp einer ausgeprägten dilatativen Kardiomyopathie verbunden mit einer deutlich verminderten Kontraktilität und erhöhter Mortalität im Modell der BRAP-transgenen Maus. Die Aktivität von Mek war bei drei Tage alten BRAP-transgenen Mäusen unverändert und ab einem Alter von drei Wochen, über eine Kompensation durch gesteigerte B-Raf-Aktivität, sogar stärker aktiviert. Es konnte anhand einer erhöhten Konzentration an zytoplasmatischem Cytochrom C und eines erhöhten Bax/Bcl2-Verhältnis gezeigt werden, dass es bereits vor der Entstehung der exzentrischen Hypertrophie zu einem Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran bei den BRAP-transgenen Mäusen kam. Damit ist

molekular eine C-Raf spezifische mitochondriale Schädigung eine wesentliche Ursache für den Phänotyp. Das Modell der BRAP-transgenen Maus zeigt auf molekularer und makroskopischer Ebene zahlreiche Parallelen zum Mausmodell des Kardiomyozyten-spezifischen C-Raf-*knockout*, was den Zusammenhang zu der *in vitro* gezeigten C-Raf-Inhibition erhärtet. Die gezeigte mitochondriale Schädigung führte jedoch nicht zu den nachfolgenden Prozessen der Apoptose, welche sehr wahrscheinlich infolge der erhöhten Mek-Aktivität inhibiert wurden. Zudem konnte eine erhöhte Aktivität der p38-Kinase in den Herzen drei Wochen alter BRAP-transgener Mäuse nachgewiesen werden. Eine Aktivierung der p38-Kinase vermindert die basale Kontraktilität von Kardiomyozyten [Liao *et al.*, 2002]. Demnach könnte auch die erhöhte p38-Kinase Aktivität in den BRAP-transgenen Mäusen über eine verminderte Kontraktilität zur Herzinsuffizienz führen. Für die Untersuchung einer akuten Steigerung von BRAP-Protein im adulten Herzen wurde ein Mausmodell zur Tetrazyklin-kontrollierbaren Kardiomyozyten-spezifischen Überexpression generiert. Erste vorläufige Daten der Phänotypisierung weisen darauf hin, dass auch eine akute Überexpression von BRAP auf niedrigem Niveau in adulten Mäusen zu einer verringerten Herzfunktion führt.

Zur Untersuchung der Auswirkung eines Fehlens und einer Verminderung von BRAP wurde anhand eines *genetrap*-ES-Zellklons ein *knockout*-Mausmodell generiert. Es konnte gezeigt werden, dass BRAP essentielle Funktionen während der Embryonalentwicklung besitzt, da homozygote BRAP^{-/-}-Embryonen zwischen E9,5 und E10,5 sterben. Am Tag E9,5 weisen homozygote BRAP^{-/-}-Embryonen häufig eine verminderte Größe und teilweise ein verzögertes Entwicklungsstadium auf. Isolierte Fibroblasten der BRAP^{-/-}-Embryonen beginnen nach wenigen Tagen in Kultur zu Neuronen-ähnlichen Zellen auszudifferenzieren und lassen sich daher nicht länger kultivieren. Ein, wie bei den heterozygoten BRAP^{+/-}-Mäusen, um die Hälfte vermindertes BRAP-Niveau bewirkt keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Mäuse werden gesund geboren und zeigen bis zu einem Alter von einem Jahr keine Auffälligkeiten oder erhöhte Mortalität. Weder anhand der Bestimmung von Organengewichten, noch durch echokardiographische Untersuchung der basalen oder durch Myokardinfarkt belasteten Herzfunktion konnte ein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden.

Die Suche nach neuen Interaktionspartnern von BRAP durch ein *yeast-two-hybrid* Screening erbrachte den neuen potentiellen Bindungspartner CHCHD3 (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3*). Durch Ko-Immunpräzipitation von überexprimiertem BRAP und endogenem CHCHD3 aus Myokardgewebe von BRAP-

transgenen Mäusen konnte die Interaktion bestätigt werden. Mittels 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse konnte ein komplexes Muster posttranslationaler Modifikationen von BRAP gezeigt werden. Durch Immunpräzipitation von überexprimiertem BRAP und anschließende Massenspektrometrie konnten zehn verschiedene phosphorylierte Peptide von BRAP identifiziert werden, anhand derer auf mindestens zehn Phosphorylierungsstellen geschlossen werden kann.

Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation in adulten Kardiomyozyten durch Überexpression eines YFP/CFP-BRAP-Fusionsproteins zeigte eine cytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation. Die Immunfluoreszenz-Färbung bestätigte die vorwiegend perinukleäre Lokalisation und zeigte zudem in einigen Zellen eine Lokalisation von BRAP an Zentrosomen, die durch Ko-Lokalisation von gamma-Tubulin verifiziert wurde. Dies weist darauf hin, dass BRAP neben der beschriebenen Funktion als Inhibitor des "Ankerproteins" KSR weitere Funktionen, möglicherweise bei der Zellzyklusregulation, besitzen könnte. Insgesamt zeigen die erhobenen Daten, dass BRAP ein bedeutendes, komplex reguliertes Protein ist, dessen kardiale Überexpression über eine durch C-Raf-Inhibition erfolgende mitochondrielle Dysfunktion und erhöhte p38-Kinase-Aktivität zur Kontraktilitätsverminderung und schließlich zur Herzinsuffizienz führt, während ein Fehlen von BRAP im gesamten Organismus zu embryonaler Letalität führt.

6. Literaturverzeichnis

ADAMS JW, SAKATA Y, DAVIS MG, SAH VP, WANG Y, SAH VP, WANG Y, LIGGETT SB, CHIEN KR, BROWN JH, DORN GW (1998). Enhanced $G\alpha_q$ signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci. USA* **95**: 10140–45.

ALESSI DR, COHEN P (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev.* **8**: 55-62.

ASADA M, OHMI K, DELIA D, ENOSAWA S, SEIICHI S, YUO A, SUZUKI H, MIZUTANI S (2004). BRAP2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* **24**: 8236-8243.

AVRUCH J, KHOKLATCHEV 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**: 127–155.

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

BING RJ, SIEGEL A, UNGAR I, GILBERT M (1954). Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med.* **16**: 504-515.

BOTTAZZI ME, ZHU, X, BÖHMER RM, ASSOIAN RK (1999). Regulation of p21^{cip1} expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *J Cell Biol.* **146**: 1255-1264.

BOVERI T (1888). Zellenstudien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Jena Zeit Naturw.* **22**: 685 - 882.

BRAZ JC, BUENO OF, LIANG Q, WILKINS BJ, DAI YS, PARSON S, BRAUNWART J, GLASCOCK BJ, KLEVITSKY R, KIMBALL TF, HEWETT TE, MOLKENTIN JD (2003). Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *Clin Invest.* **111**: 1475-1486.

BROCHERIOU V, HAGEGE AA, OUTBNAISSA A, LAMBERT M, MALLET VP, DURIEZ M, WASSEF M, KAHN A, MENASCHE P, GILGENKRANTZ H (2000). Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med.* **2**: 326-333.

BRUDER JT, HEIDECKER G, RAPP UR (1992). Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from p-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes and Dev.* **6**: 545-556

BUENO OF, De WINDT LJ, TYMITZ KM, WITT SA, KIMBALL TR, KLEVITSKY R, HEWETT TE, JONES SP, LEFER DJ, PENG CF, KITSIS RN, MOLKENTIN JD (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**: 6341-6350.

CAPANO M und CROMPTON M (2006). Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem J.* **395**: 57-64.

CASEY TM, ARTHUR PG, BOGOYEVITCH MA (2007). Necrotic death without mitochondrial dysfunction-Delayed death of cardiac myocytes following oxidative stress. *Biochem Biophys Acta.* **1773 (3)**: 342-351

CHEN C, LEWIS RE, WHITE MA (2008). IMP modulates KSR1-dependent multivalent complex formation to specify ERK1/2 pathway activation and response thresholds. *JBC.* **283 (19)**: 12789-12796.

CHEN J, FUJII K, ZHANG L, ROBERTS T, FU H (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *PNAS.* **98**: 7783-7788.

CHEN Y, RAJASHREE R, QINGHANG L, HOFMANN P (2003). Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**: 2578-2586.

- CHEN Z, CHUA CC, HO YS, HAMDY RC, CHUA BH (2001). Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280**: 2313-2320.
- CHIEN A, EDGAR DB, TRELA JM (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* **127**: 1550-1557.
- CHIU VK, BIVONA T, HACH A, SAJOUS B, SILLETTI J, WIENER H, JOHNSON RL, COX AD, PHILIPS MR (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.* **4**: 343-350.
- COHEN P (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol.* **4**: E127-E130.
- CROMPTON M, BARKSBY E, JOHNSON N, CAPANO M (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie.* **84**: 143-152.
- CROW MT, MANI K, NAM YJ, KITSIS RN (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* **95**: 957-970.
- DAMMIRICH J und PFEIFER U (1983). Cardiac hypertrophy in rats after supra-avalvular aortic constriction. II. Inhibition of cellular autophagy in hypertrophying cardiomyocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* **43**: 287-307.
- D'ANGELO DD, SKATA Y, LORENZ JN, BOIVIN GP, WALSH RA, LIGGETT SB, DORN GW (1997). Transgenic G_{αq} overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 8121-26.
- 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.
- DARSHI M, SCHAUBLE S, MA Y, TAYLOR SS (2007). Characterization of Chchd3; a novel cAMP dependent protein kinase A substrate in mitochondria. *FASEB J.* **21**: 784.8.

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

DESILVA DR, JONES EA, FAVATA MF, JAFFEE BD, MAGOLDA RL, TRZASKOS JM, SCHERLE PA (1998). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol.* **160**: 4175-4181.

DIMAURO S, SCHON EA (2001). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J. Med Genet.* **106**: 18-26.

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.

DU J, CAI SH, SHI Z, NAGASE F (2004). Binding activity of H-Ras is necessary for *in vivo* inhibition of ASK1 activity. *Cell Res.* **14**: 148-154.

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

ERHARDT P, SCHREMSER EJ, COOPER GM (1999). B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrom c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol.* **19**: 5308-5315.

ESKES R, ANTONSSON B, OSEN-SAND A, MONTESSUIT S, RICHTER C, SADOUL R, MAZZEI G, NICHOLS A, MARTINOUC JC (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol.* **144**: 891-901.

ESPOSITO LA, MELOV S, PANOVA A, COTTRELL BA, WALLACE DC (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 4820-4825.

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

FOLGER KR, WONG EA, GEOFFREY W, CAPECCHI MR (1982). Patterns of Integration of DNA Microinjected into Cultured Mammalian Cells: Evidence for Homologous Recombination Between Injected Plasmid DNA Molecules. *Mol Cell Biol.* **2**: 1372-1387

FRÖDIN M, GAMMELTOFT S (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol.* **151**: 65-77.

GALABOVA-KOVACS G, MATZEN D, PIAZZOLLA D, MEISSL K, PLYUSHCH T, CHEN AP, SILVA A, BACCARINI M (2006). Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 1325-1330.

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**: 963-969.

GIJON MA, LESLIE CC (1999). Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukoc Biol.* **65**: 330-336.

GRAHAM BH, WAYMIRE KG, COTTRELL B, TROUNCE IA, MACGREGOR GR, WALLACE DC (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet.* **16**: 226-234.

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.

GUILICK J, SUBRAMANIAM A, NEUMANN J, ROBBINS J (1991). Isolation and Characterization of the Mouse Cardiac Myosin Heavy Chain Genes. *J Biol Chem.* **266**: 9180-9185.

- GUSTAFSSON A, GOTTLIEB R (2008). Recycle or die: The role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* **44**: 654-661.
- HALESTRAP AP (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* **34**: 232-237.
- HAMACHER-BRADY A, BRADY NR, GOTTLIEB RA (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* **281**: 29776-29787.
- HANAHAH D (1983). Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580.
- HOLLY TA, DRINCIC A, BYUN Y, NAKAMURA S, HARRIS K, KLOCKE FJ, CRYNS VL (1999). Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* **31**: 1709-1715.
- HOUSER SR, PIACENTINO V, WISSER J (2000). Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol.* **32**: 1595-1607.
- HUANG JQ, RADINOVIC S, REZAEIFAR P, BLACK SC (2000). In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia. *Eur J Pharmacol.* **402**: 139-142.
- 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.
- HÜSER M, LUCKETT J, CHILOECHES A, MERCER K, IWOBI M, GIBLETT S, SUN XM, BROWN J, PRITCHARD C (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J.* **20**: 1940-1951.
- HUSS JM, KELLY DP (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* **115**: 547-555.

JIN, S, ZHUO Y, GUO W, FIELD J (2005). P21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD und Bcl-2 association. *J Biol Chem.* **280**: 24698-24705.

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.

JOHN GB, SHANG Y, LI L, RENKEN C, MANNELLA CA, SELKER JML, RANGELL, BENNET MJ, ZHA J (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell.* **16**: 1543-1554.

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

JURGENMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q, ELLERBY L, BREDSSEN D, REED JC (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Nat Cell Biol.* **2**: 156-162.

KAHAN C, SEUWEN K, MELOCHE S, POUYSSEGUR J (1992). Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem.* **267**: 13369-13375.

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.

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.

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.

- KOLCH W (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 827-837.
- KORTUM RL, LEWIS RE (2004). The molecular scaffold KSR1 regulates the proliferative and oncogenic potential of cells. *Mol Cell Biol.* **24**: 4407-4416.
- LÄMMLI 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.
- LARSSON NG, OLDFORS A (2001). Mitochondrial myopathies. *Acta Physiol Scand.* **171**: 385-393.
- LEON J, GUERRERO I, PELLICER A (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol.* **7**: 1535-1540.
- LEW DJ, DULIC V, REED SI (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell.* **66**: 1197-1206.
- LEWIS TS, SHAPIRO PS, AHN NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* **74**: 49-139.
- LI S, KU CY, FARMER AA, CONG YS, CHEN CF, LEE WH (1998). Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. *JBC.* **273**: 6183-6189.
- LIANG Q, BUENO OF, WILKINS BJ, KUAN CY, XIA Y, MOLKENTIN JD (2003). c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J.* **22**: 5079-5089.
- LIAO P, WANG SQ, WANG S, ZHENG MA, ZHENG ME, ZHANG SJ, CHENG H, WANG Y, XIAO RP (2002). P38 mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res.* **90**: 190-196.

- MANNING G. (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook*. 1-19.
- MARAI S, 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.
- 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 M (1995) Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol Reprod Dev*. **42**: 493-499.
- MATHENY SA (2003). Uncovering the complexity of ras signaling networks. (Dissertation)
- 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.
- MATSUI Y, TAKAGI H, YU X, ABDELLATIF M, SAKODA H, ASANO T, LEVINE B, SADOSHIMA J (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*. **100**: 914-922.
- MENDE U, KAGEN A, COHEN A, ARAMBURU J, SCHOEN FJ, NEER EJ (1998). Transient cardiac expression of constitutively active G_{αq} leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 13893-98
- MIKULA M, SCHREIBER M, HUSAK Z, KUCEROVA L, RÜTH 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**: 1952-1962.
- MOLKENTIN JD (1998). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardv Res*. **63**: 467-475.

MOLKENTIN JD (2004). Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardv Res.* **63**: 467-475.

MORRISON DK (2001). KSR: a scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci.* **114**: 1609-1612.

MORRISON TB, WEIS JJ, WITTEWER CT (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* **24**: 954-958, 960, 962.

MOUDJOU M, BORDES N, PAINTRAND M, BORNENS M (1996). Gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J Cell Sci.* **109**: 875-887.

MURDOCK DG, BOONE BE, ESPOSITO LA, WALLACE DC (1999). Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *J Biol Chem.* **274**: 14429-14433.

MUSGROVE EA, LEE CS, BUCKLEY MF, SUTHERLAND RL (1994). Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 8022–8026.

NAGY A, GERTSENSTEIN M, VINTERSTEN K, BEHRINGER R (2003). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition). *CHS Press.*

NAKAGAWA T, SHIMIZU S, WATANABE T, YAMAGUCHI O, OTSU K, YAMAGATA H, INOHARA H, KUBO T, TSUJIMOTO Y (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* **434**: 652-658.

NAKAI A, YAMAGUCHI O, TAKEDA T, HIGUCHI Y, HIKOSO S, TANIIKE M (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* **13**: 619-624.

NAKAYAMA H, CHEN X, BAINES CP, KLEVITSKY R, ZHANG X, ZHANG H, JALEEL N, CHUA BHL, HEWETT TE, ROBBINS J, HOUSER SR, MOLKENTIN JD (2007). Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest.* **117**: 2431-2444.

NGUYEN AW, DAUGHERTY PS (2005) Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotech.* **23**: 355-360.

NGUYEN A, BURACK RW, STOCK JL, KORTUM R, CHAIKA OV, AFKARIAN M, MULLER WJ, MURPHY KM, MORRISON DK, LEWIS RE, McNEISH J, SHAW AS (2002). Kinase Suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol.* **22**: 3035-3045.

NISHIDA K, YAMAGUCHI O, HIROTANI S, HIKOSO S, HIGUCHI Y, WATANABE T, TAKEDA T, OSUKA S, MORITA T, KONDOH G, UNO Y, KASHIWASE K, TANIIKE M, NAKAI A, MATSUMURA Y, MIYAZAKI J, SUDO T, HONGO K, KUSAKARI Y, KURIHARA S, CHIEN KR, TAKEDA J, HORI M, OTSU K (2004). P38 mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol.* **24**: 10611-10620.

NYBERG-HOFFMAN C, AGUILAR-CORDOVA E (1999). Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med.* **5**: 955-957.

OHMACHI M, OHMACHI M, ROCHELEAU CE, CHURCH D, LAMBIE E, SCHEDL T, SUNDARAM MV (2002) C. elegans ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. *Curr Biol.* **12**: 427-433.

O'NEILL E, RUSHWORTH L, BACCARINI M, KOLCH W (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the protooncogene product Raf-1. *Science.* **306**: 2267-2270.

ONG SE, BLAGOEV B, KRATCHMAROVA I, KRISTENSEN DB, STEEN H, PANDEY A, MANN M (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* **1**: 376-386.

PACKER M (1999). Implications of the ATLAS study for clinical practice. *Int J Clin Pract Suppl.* **100**: 21-23.

PAGES G, LENORMAND P, L'ALLEMAIN G, CHAMBARD JC, MELOCHE S, POUSSEGUR J (1993). Mitogen-activated protein kinases p42^{mapk} and p44^{mapk} are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 8319-8323.

- PAPAIOANNOU VE, BEHRINGER RR (2005). Mouse Phenotypes. A handbook of mutation analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory press*. 115-124.
- PATTINGRE S, TASSA A, YU X, GARUTI R, LIANG XH, MIZUSHIMA N, PACKER M, SCHNEIDER MD, LEVINE B (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. **122**: 927-939.
- PETRICH BG, MOLKENTIN JD, WANG Y (2003). Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB J*. **17**: 749-751.
- PORATH J, CARLSSON J, OLSSON I, BELFRAGE G (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. **258**: 598-599.
- POUYSSÉGUR J, VOLMAT V, LENORMAND P (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*. **64**: 755-763.
- 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.
- 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**: 614-617.
- PUMIGLIA KM, DECKER SJ (1997). Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**: 448-452.
- QUI MS, GREEN SH (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron*. **9**:705-717.
- REDDY KB, NABHA SM, ATANASKOVA N (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. **22**: 395-403.

- ROOVERS K, ASSOIAN RK (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bio Essays*. **22**: 818-826.
- RUSHWORTH LK, HINDLEY AD, O'NEILL E, KOLCH W (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*. **26**: 2262-2272.
- 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.
- SANBE A, GULICK J, HANKS MC, LIANG Y, OSINSKA H, ROBBINS J (2003). Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin-heavy-chain Promoter. *Circ Res*. **92**: 609-616.
- SANNA B, BUENO OF, DAI YS, WILKINS BJ, MOLKENTIN JD (2005). Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol*. **25**: 865-878.
- SCHAEFFER HJ, WEBER MJ (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*. **19**: 2435-2444.
- SCHAUBLE S, KING CC, DARSHI M, KOLLER A, SHAH K, TAYLOR SS (2007). Identification of ChChd3 as a Novel Substrate of the cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Using an Analog-sensitive Catalytic Subunit. *JBC*. **282**: 14952-14959.
- 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 a epidermoid carcinoma of the cervix. *J Ex Med*. **97**: 695-710.
- SCHOTT P, SINGER S, KÖGLER H, NEDDERMEIER D, LEINEWEBER K, BRODDE OE, REGITZ-ZAGROSEK V, SCHMIDT B, DIHAZI H, HASENFUSS G (2005). Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteom. *Proteomics*. **5**: 1372-1381.

SEWING A, WISEMAN B, LLOYD AC, LAND H (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol.* **17**: 5588-5597.

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

SHIMOMURA H, TERASAKI F, HAYASHI T, KITaura 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.

SHIPP JC, OPIE LH, CHALLONER D (1961). Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. *Nature.* **189**: 1018-1019.

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 PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVNAZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLANK DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 75-85.

SOUTHERN EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**: 503-517.

Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung 288, 2004

SUBRAMANIAM A, JONES WK, NEUMANN WK, GUILICK J, WERT S, NEUMANN J, ROBBINS J (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem.* **266**: 24613-24629.

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

TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**: 153–208.

- THERRIEN M, MICHAUD NR, RUBIN GM, MORRISON DK (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev.* **10**: 2684-2695.
- 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**: 2244-49.
- VALENTIM L, LAURENCE KM, TOWNSEND PA, CARROLL CJ, SOOND S, SCARABELLI TM, KNIGHT RA, LATHCHMAN DS, STEPHANOU A (2006). Urocortin inhibits Beclin 1-Mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* **40**: 846-852.
- VANHAESEBROECK B und ALESSI DR (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* **346**: 561-576.
- VERIN AD, LIU F, BOGATCHEVA N, BORBIEV T, HERSHENSON MB, WANG P, GARCIA JGN (2000). Role of Ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**: 360-370.
- VOGELSTEIN B, GILLESPIE D (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**: 615-619.
- WALLACE DC (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* **283**: 1482-1488.
- WANG HG, RAPP UR, REED JC (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell.* **87**: 629-638.
- WETTERSCHURECK N, RÜTTEN H, ZYWIETZ A, GEHRING D, WILKIE TM, CHEN J, CHIEN KR, OFFERMANN S (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of $G_{\alpha q}$ / $G_{\alpha 11}$ in cardiomyocytes. *Nature Med.* **7**: 1236-1240.
- WOJNOWSKI L, ZIMMER AM, BECI TW, HAHN H, BERNAL R, RAPP UR, ZIMMER A (1997). Endothelial apoptosis in B-Raf deficient mice. *Nat Genet.* **16**: 293-297.

XIE J, MARUSICH MF, SOUDA P, WHITELEGGE J, CAPALDI RA (2007). The mitochondrial inner membrane protein Mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Letters*. **581**: 3545-3549.

YAMAGUCHI O, WATANABE T, NISHIDA K, KASHIWASE K, HIGUCHI Y, TAKEDA T, HIKOSO S, HIROTANI S, ASAHI M, TANIKE 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**: 937-943.

YAMAZAKI T, KOMURO I, YAZAKI Y (1998). Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal*. **10**: 693-698.

YANG J, ROTHERMEL B, VEGA RB, FREY N, MCKINSEY TA, OLSON EN, BASSEL-DUBY R, WILLIAMS RS (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*. **87**: 61-68.

YORK RD, YAO H, DILLON T, ELLIG CL, ECKERT SP, MCCLESKEY EW, STORK PJ (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*. **392**: 622-626.

ZHENG X, WONG ML, ALBERTS B, MITCHISON T (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. **378**: 578-583.

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.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Hasenfuß für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung forschen zu dürfen und ganz besonders auch für seine konstruktive Kritik und sein Interesse an meinem Thema.

Herrn Prof. Dr. Tomas Pieler und Herrn Prof. Dr. Uwe Groß danke ich sehr für ihre Bereitschaft meine Promotion zu betreuen und das Referat meiner Arbeit zu übernehmen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Tim Seidler bedanken. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, die vielen Anregungen und Ideen, für das Vertrauen und die freundschaftliche Unterstützung, die maßgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön geht an Jessica Spitalieri, Elisabeth Roth und Viola Beuermann für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Bernhard Unsöld und Dr. Karl Toischer danke ich für die Hilfe bei den operativen Mausmodellen.

Bei Dr. Henning Urlaub und Carla Schmidt möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Massenspektrometrie-Analysen bedanken.

Jessica, Lisa, Nadine und Theda danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für ihre Nachsicht in der letzten Phase meiner Arbeit. Ganz besonders Jessica danke ich für ihren Einsatz, der häufig auch deutlich über die reguläre Arbeitszeit hinaus ging. Theda möchte nochmals für die Korrektur danken und für die radikale Vernichtung (fast) aller Binde-Striche. Danke auch für die Einführung des System-Tags (wir sollten mal wieder einen einplanen), die drei Credits (ich habe sie mir hart verdient!!!) und die gute Laune, die du im Labor verbreitet hast.

Peter danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für die vielen Gespräche, die mir oft eine andere Sichtweise auf die Dinge zeigten.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Cornelia Grebe
Geburtsdatum: 29.10.1980
Geburtsort: Bad Hersfeld
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1987 – 06/1991 Grundschole: Wilhelm-Neuhaus Schule, Bad Hersfeld
08/1991 – 06/2000 Rabanus-Maurus Schule (Domgymnasium), Fulda

Studium:

10/2000 – 06/2005 Georg-August-Universität, Göttingen: Grund- und Hauptstudium im Fach Biologie

10/2003 – 12/2004 Anstellung als studentische Hilfskraft im Institut für Humangenetik

05/2004 – 05/2005 Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Titel „Analyse von Mutationen im MYBPC3-Gen bei Patienten mit Kardiomyopathie“ im Institut für Humangenetik

06/2005 Diplomprüfung (Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Biochemie und Mikrobiologie)

07/2005 – 09/2008 Anfertigung einer Promotionsarbeit mit dem Thema „Die Bedeutung von BRCA1-assoziiertem Protein in der Entwicklung der Last-induzierten Myokardhypertrophie“ in der Abteilung Kardiologie, Göttingen

Göttingen, 15.09.08