

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die CK2 vermittelte Signalübertragung extrazellulärer
Wachstumsfaktoren in der Hypertrophie von Kardiomyozyten
durch Kontrolle von p27^{KIP1}

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jens-Olaf Rohne

aus Görlitz

Dekanin: Univ.-Prof. Dr. med. Annette Grütters-Kieslich

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. W. Bergmann
2. Prof. Dr. med. N. Frey
3. Prof. Dr. med. U. Kintscher

Datum der Promotion: 07.09.2012

1. Einleitung	5
1.1 Klinischer Hintergrund	5
1.2 Therapie der Herzinsuffizienz	9
1.3 Anpassungsvorgänge des Myokards (Remodeling)	11
1.4 Zellzyklusregulation	17
2. Ziele und Fragestellung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Geräte	22
3.2 Chemikalien, Trägermaterialien und vorgefertigte Lösungen	24
3.3 Biologisches Material	27
3.3.1 Antikörper	27
3.3.2 cDNA-Bibliothek	28
3.3.3 cDNA	28
3.3.4 Vektoren	28
3.3.5 Enzyme, Enzyminhibitoren	29
3.3.6 Kits	30
3.3.7 Mikroorganismen	30
3.3.6 Tiere	30
3.4 Lösungen	31
3.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System („Yeast-Two-Hybrid“)	39
3.5.1 Prinzip	39
3.5.2 Durchführung	40
3.5.2.1 Modifizierte LiAc-Transformation der Plasmide in Hefezellen	43
3.5.2.2 Koloniefilterliftverfahren	44
3.5.2.3 Plasmidisolation aus Hefezellen	45
3.5.2.4 Sequenzierung	45
3.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	45
3.7 Herstellung kompetenter Bakterien	45
3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3.9 Quantitative PCR gekoppelt mit Reverser Transcription	47
3.10 Plasmid-DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	47
3.11 Ligation von cDNA in Vektor-Plasmide	48
3.12 Agarosegelelektrophorese	48
3.13 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	49
3.14 Transformation von kompetenten E.coli HB 101 mit Hefepiasmid	49
3.15 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	49
3.16 Plasmidisolation aus Bakterien	50
3.17 Spektralphotometrische Messung	50
3.18 Zielgerichtete Mutagenese	50
3.18.1 Herstellung rekombinanter Proteine	50
3.18.2 Herstellung der TAT-Fusionsproteine	52
3.19 Lentivirale RNA-Konstrukte und RNA-Interferenz	54
3.20 Kultivierung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten	55
3.21 Morphometrische Untersuchungen der Herzen, Immunhistochemie und Apoptose-Nachweis	56
3.22 Protein-Analyse	58
3.22.1 Zellfraktionierung und Präparation von Zellextrakten	58
3.22.2 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten	58
3.23 GST-Affinitätsessay	59
3.24 Immunpräzipitation und Immunkomplex-Essays	60

3.24.1	Erzeugung von anti-CK2 α' - und anti-Phosphor-p27-Antikörpern	60
3.24.2	Immunopräzipitation	60
3.24.3	Immunkomplex-Kinase-Essay	61
3.25	Die <i>in vitro</i> Phosphorylierung von p27 durch CK2 α'	62
3.26	Immunoprecipitation von p27 in Gegenwart von Cycloheximid	62
3.27	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	63
3.28	Standard-Coomassie-Färbung zur allgemeinen Proteindetektion	63
3.29	Die Western-Blot-Analysen	64
3.30	Chemolumineszenz-Verfahren	64
3.31	Statistische Analysen	65
4.	Ergebnisse	66
4.1	CK2 α' interagiert <i>in vitro</i> und in differenzierten Kardiomyozyten mit p27	66
4.2	CK2 α' phosphoryliert <i>in vitro</i> p27 an den Aminosäuren S83 und T187	71
4.3	Phosphorylierung von p27 vermindert die Interaktion mit CK2 α' <i>in vitro</i>	73
4.4	Angiotensin II induzierte CK2 α' -Aktivität ist mit verminderter p27-Expression in Kardiomyozyten assoziiert	75
4.5	Inaktivierung von CK2 α' hebt die Phosphorylierung von p27 in Kardiomyozyten <i>in vivo</i> auf	76
4.6	Für Phosphorylierung resistentes p27 inhibiert CK2 α' in Kardiomyozyten	79
4.7	CK2 α' ist in Kardiomyozyten für den Angiotensin II gesteuerten Abbau von p27 essentiell	80
4.8	Die RNA-Interferenz vermittelte Ausschaltung von CK2 α' interferiert mit der Angiotensin-Antwort in Kardiomyozyten	82
4.9	p27 ^{-/-} - Mäuse entwickeln eine altersabhängige Myokardhypertrophie	85
4.10	Die Anfälligkeit von p27 ^{-/-} - Mäusen auf durch Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion	88
4.11	Der inhibitorische Effekt der katalytisch inaktiven CK2 α' auf die kardiale Hypertrophie ist in p27 ^{-/-} - Mäusen aufgehoben	92
5.	Diskussion	102
5.1	Die Proteinkinase CK2	103
5.2	Die Bindung von CK2 α' und p27	105
5.3	Phosphorylierung und Abbau von p27	105
5.3.1	Phosphorylierung von p27 durch CK2 α'	105
5.3.2	CK2 α' vermittelter Abbau von p27	106
5.4	Die Inhibition von CK2 α' durch p27	107
5.6	CK2 α' und p27 sind Regulatoren der kardialen Hypertrophie	108
5.7	Ausblick	111
6.	Zusammenfassung	111
7.	Abkürzungsverzeichnis	113
8.	Literaturverzeichnis	118
9.	Lebenslauf	125
10.	Publikationsverzeichnis	125
11.	Danksagung	125
12.	Selbstständigkeitserklärung	126

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Das Syndrom der Herzinsuffizienz zählt zu den häufigsten Erkrankungen mit zunehmender Inzidenz [1]. Es kann als Endstadium vieler verschiedener Krankheitsprozesse, welche die Funktion des Herzens beeinträchtigen, betrachtet werden und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet [2].

Die Prävalenz der symptomatischen Herzinsuffizienz in der europäischen Gesamtbevölkerung wird mit 0,4 bis 2% geschätzt. Bei über 65-jährigen steigt sie erwartungsgemäß auf 3,0 bis 13,0%. Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC), welche Länder mit einer Gesamtbevölkerungszahl von mehr als 900 Millionen repräsentiert, spricht von mindestens 10 Millionen Patienten mit Herzinsuffizienz in diesen Ländern. In Deutschland leiden zwischen 800.000 und 1.600.000 Personen an einer Herzinsuffizienz [AWMF S3 Leitlinie].

Wird das zu Grunde liegende Problem nicht gelöst, ist die Prognose der Herzinsuffizienz trotz medikamentöser Therapie schlecht und mit der von malignen Tumoren vergleichbar. Die Hälfte der Patienten mit dieser Diagnose stirbt innerhalb von 4 Jahren und mehr als 50% der Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz stirbt während eines Jahres [4,5].

Die Behandlung der Herzinsuffizienz verursacht in den westlichen Ländern Kosten in Höhe von 1 bis 2% des gesamten Gesundheitsbudgets.

Die häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz sind in den sogenannten entwickelten Ländern die koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie, welche sowohl allein als auch in Kombination vorkommen. Daneben spielen aber auch Kardiomyopathien, Klappen- und Septumdefekte, Rhythmusstörungen, Drogen, kardiotoxische Medikamente und andere Störungen wie z.B. Anämie und Thyreotoxikose, eine Rolle (Tabelle 1). Die effektive Pharmakotherapie könnte bei konsequenter Umsetzung die Bedeutung der Hypertonie zurückdrängen.

Aus hämodynamischer Sicht spricht man von Herzinsuffizienz, wenn das Herz trotz ausreichendem Blutrückstrom aus der Körperperipherie zum Herzen und genügendem enddiastolischem Füllungsdruck nicht mehr in der Lage ist das vom Organismus benötigte Herzminutenvolumen zu fördern. Diese, als Vorwärtsversagen bezeichnete, Symptomatik führt zu einer peripheren Minderdurchblutung des Organismus. Das Missverhältnis von vermindertem

Angebot, aber gleichbleibendem Bedarf bewirkt einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen, wodurch viele Organsysteme in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Tabelle 1:

Ursachen der Herzinsuffizienz nach [3]

Koronare Herzerkrankung

- Ischämie
- Myokardinfarkt

Hypertonie

Kardiomyopathie

- Dilatative (familiär, infektiös, nutritiv, endokrin, idopathisch, neuromuskulär, Schwangerschaft, Kollagenerkrankungen)
- Hypertroph / obstruktiv
- Restriktiv (z.B. Amyloidose, Sarkoidose, Hämochromatose)
- Obliterative

Valvuläre und kongenitale Herzerkrankungen

- Mitralklappenerkrankungen
- Aortenklappenerkrankungen
- Vorhofseptumdefekt, Ventrikelseptumdefekt

Rhythmusstörungen

- Tachycard
- Bradycard
- Vorhofflimmern / -flattern

Drogen und Medikamente

- Alkohol
- Kokain
- Kardiotoxische Medikamente (z.B. Adriamycin, Doxorubicin)
- Kardiodepressorische Medikamente (z.B. Kalziumantagonisten)

Herzinsuffizienz mit hoher Auswurfleistung „high-output-failure“

- Anämie
- Thyreotoxikose
- Septischer Schock
- Arteriovenöse Fisteln
- Paget-Erkrankung

Perikarderkrankungen

- Perikarditis konstriktiva
- Perikarderguss

Primäre Rechtsherzinsuffizienz

- Trikuspidalklappeninsuffizienz
- Pulmonale Hypertonie

Der akute Abfall der Pumpleistung des Herzens, wie er z.B. bei einer Ischämie des Myokards eintritt, verursacht eine Blutdrucksenkung. Diese führt zur Stimulierung von Barorezeptoren in Carotissinus, Aortenbogen und renalen Arteriolen und einer kompensatorischen Gegenregulation durch Aktivierung von Neurohormonen.

Die Freisetzung von Noradrenalin aus den peripheren sympathischen Nervenendigungen bewirkt eine Steigerung der Herzfrequenz, der myokardialen Kontraktilität und der Nachlast. Aus dem Hinterlappen der Hypophyse wird über zentrale Regulationsmechanismen antidiuretisches Hormon (ADH) ausgeschüttet. Der juxtaglomeruläre Apparat der Nieren setzt Renin frei und bewirkt über eine Aktivierungskaskade die Bildung von Angiotensin II, dem Schlüsselhormon des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensin II ist einer der stärksten Vasopressoren und vermindert zusätzlich den Gehalt an gefäßerweiterndem Stickstoffmonoxid (NO) in den Endothelien. Aldosteron und ADH stimulieren die Natrium- und Wasserretention (Abb.1).

Ziel dieses Systems ist die Anhebung des Blutdruckes und der Vorlast, durch die arterielle Vasokonstriktion einerseits und die Vermehrung des intravasalen Volumens andererseits.

Wird das Herzminutenvolumen im Sinne einer Rekompensation erhöht, d.h. der Sauerstoffbedarf des Organismus kann wieder gedeckt werden, kommt es durch Rückkopplungsmechanismen der Barorezeptoren zur Dämpfung der neurohumoralen Aktivierung und Ausschüttung von Hormonen aus der Gruppe der natriuretischen Peptide. ANP (Atriales Natriuretisches Peptid aus den Vorhöfen) und BNP (B-Typ-Natriuretisches Peptid aus den Ventrikeln) bewirken nicht nur eine Erhöhung der Natriumausscheidung und antiproliferative Effekte am Myokard, sondern stellen zusammen mit Prostaglandin-E₂, Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO) als vasodilatatorische Substanzen die Gegenspieler des RAAS dar. In der chronischen Phase der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz kommt es jedoch zu einer Desensibilisierung der Barorezeptoren und damit zum Verlust der inhibitorischen Impulse. Als Folge fehlt die regulatorische Funktion auf Sympathikus und RAAS. Es tritt eine überschießende Aktivierung mit Vasokonstriktion, Natrium- und Volumenretention ein. Die inadäquat gesteigerte Vor- und Nachlast führt zu einer weiteren Minderung des Herzminutenvolumens. Durch Herabsetzen der Ansprechbarkeit des Herzens auf den Sympathikus über eine Verringerung der Anzahl myokardialer β 1-Rezeptoren und einen Defekt in der adrenergen Signalübermittlung, versucht der Organismus dieser Fehlregulation zu entkommen. Da die Empfindlichkeit der vaskulären alpha-Rezeptoren gleich bleibt, kann die erhöhte Nachlast weiter auf das vorgeschädigte Myokard einwirken [82]. Es entwickelt sich das klinische Bild der manifesten Herzinsuffizienz

mit körperlicher Schwäche, zerebralen Funktionsstörungen, sowie Dyspnoe, Ödemen, Hepatomegalie und Aszites, wobei letztere durch den Rückstau des Blutes vor dem Herzen, dem sogenannten Rückwärtsversagen, ausgelöst werden. Die Linksherzinsuffizienz führt zu Stauungserscheinungen in der Lunge, während die Insuffizienz des rechten Herzens die Venen- und Lebervenenstauung auslöst.

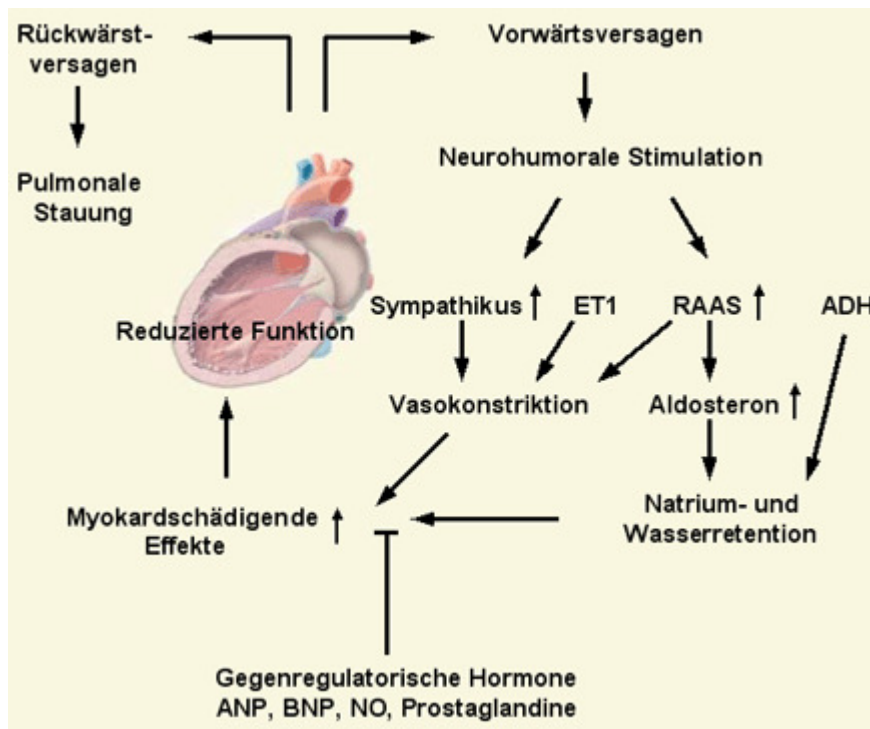


Abbildung 1: Klinische Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Herzinsuffizienz. Mit zunehmender Progression der Erkrankung dominieren die vasokonstriktorisches und antinatriuretisches Systeme. ADH = Antidiuretisches Hormon, RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ET1 = Endothelin 1, ANP = atriales natriuretisches Peptid, BNP = cerebrales („brain“) natriuretisches Peptid, NO = Stickstoffmonoxid

Das klinische Stadium wird nach den revidierten Empfehlungen der New Yorker Herzgesellschaft (NYHA – New York Heart Association) in vier Schweregrade eingeteilt: Im Stadium NYHA-I präsentieren sich die Patienten bei latenter Erkrankung als asymptomatisch. Im Stadium NYHA-II treten durch starke, bei NYHA-III durch leichte körperliche Belastung und im Stadium NYHA-IV schon in Ruhe Beschwerden auf. Diese können sich durch Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris bemerkbar machen.

Durch Untersuchungen von Druck- und Volumenparametern, z.B. mit Hilfe der Echokardiographie, ist es jedoch möglich die Funktion des erkrankten Herzens genauer zu betrachten. Um die Förderleistung des Herzens besser individuell vergleichen zu können, bezieht man das Herzminutenvolumen auf die Körperoberfläche und erhält den sogenannten Herzindex.

Dieser sollte bei einem enddiastolischen Druck unter 12 mmHg mindestens $2,5 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^2$ betragen. In der Frühform der Erkrankung kann z.B. der einzige Hinweis eine leichte Erhöhung des enddiastolischen Druckes sein. Übersteigt der enddiastolische Druck 20 mmHg, kommt es zur Lungenstauung mit Dyspnoe und Ödemen. Sinkt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 55% spricht man von einer eingeschränkte Auswurfleistung. Die systolische Funktion muss aber nicht in jedem Fall pathologisch sein. Man schätzt, dass bei 20 bis 50 Prozent der Patienten das Herz normal kontrahiert, aber die Entspannung (Diastole) des Myokards eingeschränkt ist [6]. Diese sogenannte Relaxationsstörung führt zu einer Versteifung und abnormalen Füllung der Ventrikel.

Das in den Ventrikeln als Reaktion auf Dehnung und Druckbelastung gebildete BNP (NT-pro-BNP) kann als Marker in der Herzinsuffizienzdiagnostik eingesetzt werden. Die Sensitivität des BNP für die Diagnose Herzinsuffizienz liegt bei über 90 %, im Vergleich liegt die des Röntgen-Thorax bei 81 % und der klinischen Untersuchung bei 69 % [81].

1.2 Therapie der Herzinsuffizienz

Ziel der Herzinsuffizienztherapie ist neben der Progressionshemmung und Senkung der Letalität auch die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten.

Zunächst sollten kausale Therapieansätze ausgeschöpft werden (Tabelle 2).

Ätiologie	Kausaltherapie
Koronare Herzerkrankung, Myokardischämie	Revaskularisierung (PTCA, Bypass), Statine, TAH
Arterielle Hypertonie	Antihypertensive Therapie
Vitien (erworbene, kongenitale)	Klappenersatz, Ballonvalvuloplastie
Perikarderguß, -konstriktion	Punktion, Perikardiotomie, Perikardektomie,
Metabolische Störungen	metabolischer und hormoneller Ausgleich
Bradykardie-induziert	Schrittmacher
Tachykardie-induziert	Kardioversion, Antiarrhythmika, Katheterablation

Tabelle 2: Möglichkeiten kausaler Therapieansätze bei der Herzinsuffizienz, TAH = Thrombozytenaggregationshemmer

Es muss zwischen akuter (dekompensierter) und chronischer (gegenwärtig kompensierter) Form der Erkrankung unterschieden werden. Bei akut auftretender Herzmuskelschwäche sollte initial eine Therapie mit intravenös verabreichten Diuretika eingeleitet werden. Bei hypertoner Blutdrucklage bzw. Anzeichen für eine akute Myokardischämie (Angina Pectoris, Akuter

Myokardinfarkt) ist Nitroglycerin indiziert. Bei Hypotonie ist eine vorsichtige Infusion von Dopamin, eventuell in Kombination mit Dobutamin über eine Motorspritze möglich. Unterstützend wird Sauerstoff mit 4 - 6 l/min über eine Nasensonde gereicht. Sedierung und Analgesie können bei Bedarf hinzugezogen werden. Neben klinischer und paraklinischer (Infarktlabor, Blutbild, Elektrolyte etc., Röntgen des Thorax, 12-Kanal-EKG) Untersuchung gehört ein kontinuierliches Atem- und Kreislaufmonitoring mit EKG und Pulsoxymetrie zum Standard. Weiterhin sind Reanimations- und Intubationsbereitschaft zu gewährleisten. Eine Intensiv-Therapie-Station ist eine adäquate Umgebung für den akut dekompensierten Patienten. Nach erfolgter Diagnostik muss selbstverständlich der Versuch einer kausalen Therapie erfolgen. Zusätzlich zu den in Tabelle 2 genannten Möglichkeiten steht im Falle einer schweren Lungenarterienembolie und eines akuten Myokardinfarktes die intravenöse fibrinolytische Therapie (z.B. rt-PA) in Kombination mit Thrombozytenaggregationshemmung zur Verfügung. Im Falle des akuten Koronargefäßverschlusses ist jedoch die derzeit effektivste Therapie die Akut-PTCA in Kombination mit einem GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Thrombozytenaggregationshemmer) [61,62]. Als Ziel haben alle genannten Maßnahmen die Rückführung des Patienten in einen stabilen Zustand.

In allen Stadien der chronischen Herzinsuffizienz verbessern Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) die Prognose des Patienten. Sie sind die Therapie der ersten Wahl. In der CONSENSUS I- [66], der SOLVD-Treatment- [67] und der SOLVD-Prevention- Studie [68] zeigte sich eine klare Senkung der Mortalität in unterschiedlichen Stadien. Der Nutzen für den Patienten scheint mit steigendem Schweregrad der linksventrikulären Dysfunktion ausgeprägter zu sein. Bereits bei asymptomatischer Reduktion der linksventrikulären Funktion profitieren die Behandelten von einem Überlebensvorteil [68].

Selbst Hochrisikopatienten (KHK, Diabetes mellitus, Hypertonie), deren Pumpfunktion normal ist, profitieren von der Therapie [75]. Ein Vorteil gegenüber reinen Vasodilantien, eine Symptomverbesserung und eine Minderung der kardialen Hypertrophie wurden in weiteren Studien gesehen [6,63-65]. Bei Unverträglichkeit der ACE-Hemmer (z.B. Reizhusten) ist ein AT1-Antagonist eine adäquate Therapiealternative. Eine Überlegenheit gegenüber ACE-Hemmern in Bezug auf Symptomatik oder Mortalität konnte in der ELITE II-Studie nicht bestätigt werden [70]. Die bereits bei der Therapie der akuten Herzinsuffizienz angesprochenen Diuretika und Vasodilantien können Vor- und Nachlast senken und eine deutliche Symptomverbesserung erreichen [69,71,72]. Ein Mortalitätssenkung wurde bisher nur für Vasodilantien beschrieben [73]. In der RALES-Studie wurde bei diuretischer Kombinationstherapie mit einem Aldosteronantagonisten einerseits ein Überlebensvorteil

nachgewiesen, andererseits wurde die Therapie wegen schlechter Verträglichkeit bei 10% der Patienten abgebrochen [74].

Eine Anpassung an die hämodynamische Belastung durch Steigerung der myokardialen Kontraktilität wird mit dem Einsatz von herzwirksamen Glykosiden versucht. An mehr als 7700 Patienten wurde die DIG-Studie durchgeführt [76]. Diese konnte keinen positiven Effekt auf die Mortalität, jedoch auf Ejektionsfraktion und Hospitalisierung nachweisen. Aktuell werden Sie vor allem bei tachykardem Vorhofflimmern und als Reservemedikament bei therapierefrakterer fortgeschrittener Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) verwendet [AWMF, S3 Leitlinie].

Von einer vormaligen Kontraindikation wurden die β -Blocker zum festen Bestandteil in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, wobei als Einschränkung gilt, dass keine β -Blocker mit intrinsischer Aktivität eingesetzt werden. Zwar führen sie zu einer weiteren Abnahme der myokardialen Kontraktilität, durch die bradykardisierende Wirkung verbessern sie jedoch unter anderem die Sauerstoffnutzung des Herzmuskels. Weiterhin wirken sie der adrenergen Überstimulation und der damit verbundenen Herunterregulation der β -Rezeptoren entgegen [77]. In großen Studien wie der MERIT-HF [78], der CIBIS II [79] und der COPERNICUS [80] wurde eine Lebensverlängerung unter β -Blockade gezeigt. Die Mortalität sank um 30 - 60 %. Um schwere Nebenwirkungen zu vermeiden müssen sie hier sehr langsam und mit sehr niedriger Dosierung verabreicht werden.

Normalerweise wird die Herzinsuffizienzbehandlung mit einer Kombination aus den genannten Präparaten durchgeführt. Jede weitere Medikation muss mit großer Umsicht eingesetzt werden. Vermieden werden müssen alle negativ inotropen Substanzen. Kalziumantagonisten sind bei dieser Patientengruppe kontraindiziert.

Neben der medikamentösen Therapie und den oben bereits erwähnten kausalen Möglichkeiten sind noch andere zu erwähnen. Das sind einerseits die Umstellung der Lebensgewohnheiten und die Vermeidung von Noxen (z.B. Alkohol, Fehlernährung) und andererseits als ultima ratio die Transplantation oder die Herz-unterstützenden-Systeme (engl. „cardiac assist devices“).

1.3 Anpassungsvorgänge des Myokards (Remodeling)

Remodeling (Umbau) beschreibt die Veränderung von normal existierenden Strukturen. Obwohl es sich dabei nicht notwendigerweise um einen pathologischen Prozess handeln muss, findet es beim Herzmuskel als Reaktion auf krankhafte Prozesse statt. Bei der kardialen Hypertrophie kommt es zu einer Vergrößerung der kontraktilen Masse und damit des Herzgewichts. Dies kann

sowohl pathologisch z.B. als Reaktion auf einen chronischen Hypertonus (s.u.), aber auch als sogenannte physiologische Form bei Leistungssportlern auftreten.

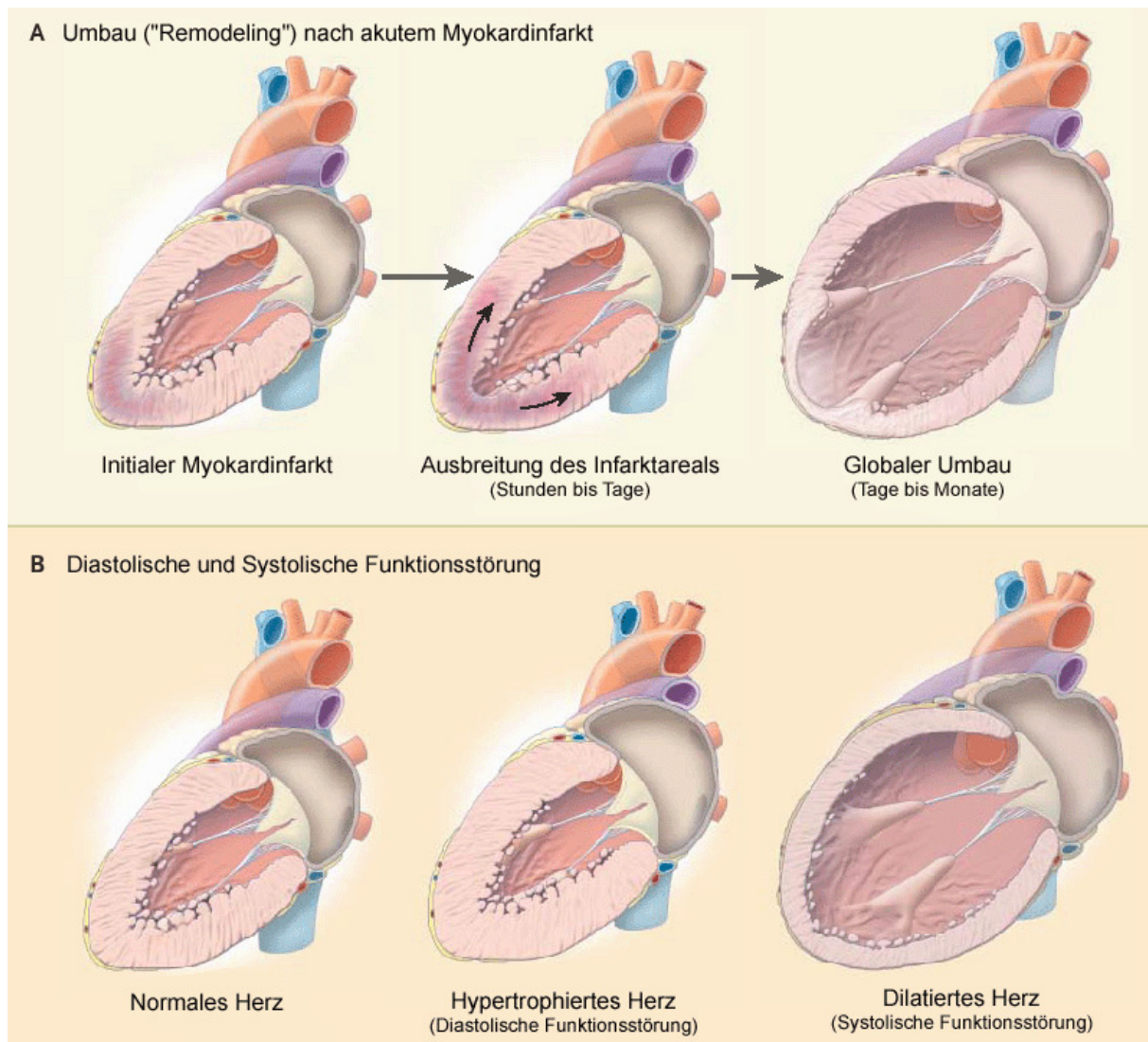


Abbildung 2: Umbauvorgänge („Remodeling“) nach akutem Myokardinfarkt (A) und bei diastolischer und systolischer Funktionsstörung (B) Nach einem Infarkt – in diesem Fall, ein apikaler – kommt es nach Stunden bis Tagen durch Ausbreitung des betroffenen Areals, zum Verlust der kontraktiven Funktion und zur Ausdünnung durch Gewebsuntergang. Innerhalb von Tagen und Monaten führt das zu Umbauvorgängen, welche das ganze Herz betreffen. Der Ventrikel dilatiert, die systolische Funktion nimmt ab und es kann zu Mitralklappendysfunktion und Aneurysmabildung kommen. In der Mitte von (B) sieht man eine typische konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie, wie sie als Ergebnis einer hypertensiven Herzerkrankung, also einer Druckbelastung, zu finden ist. Die systolische Funktion ist erhalten, aber durch die verdickten Ventrikelwände kommt es zur diastolischen Füllungsstörung des Herzens. Auf der rechten Seite von (B) ist eine typische exzentrische Formveränderung bei dilatativer Kardiomyopathie (DCM) abgebildet. Die Ventrikelwände sind ausgedünnt, die Herzkammer erweitert und die auseinanderweichende Mitralklappe führt zu Regurgitationen und damit zu weiterer Volumenbelastung. Die systolische Funktion ist erheblich vermindert. (Abb. modifiziert nach [6])

Der Umbau des Myokards vollzieht sich auf verschiedenen Ebenen und ist durch den Einfluss der neurohormonellen Systeme, die veränderte Geometrie des Herzens sowie molekulare und zelluläre Umbauvorgänge gekennzeichnet. Bei einem Myokardinfarkt ist das Remodeling

asymmetrisch und mit der Infarktausdehnung sowie dem Verlust an Myozytenmasse verbunden [59,60]. Durch die Infarktexpansion kommt es zu einer Volumenbelastung und nachfolgend zur Hypertrophie der nicht vom Infarkt betroffenen Areale.

Wenn der betreffende Stimulus von Beginn den gesamten Herzmuskel betrifft, wie z.B. bei der arteriellen Hypertonie, ist die ventrikuläre Hypertrophie symmetrisch (Abb.2). Myofibrilläre Proteine nehmen zu, um die erhöhte Last auf eine größere Zahl von Sarkomeren zu verteilen. Es kommt zu einer konzentrischen Zunahme der Ventrikelwanddicke und nach dem Gesetz von La Place wird dadurch die Wandspannung reduziert. Dies verhindert in der kompensierten Phase eine Dauerschädigung des Herzens durch erhöhte Druckbelastung [82].

Neben den hämodynamischen und renalen Effekten sind auch direkte myokardiale Wirkungen von Bedeutung. Durch verminderte Aktivität antioxidativer Systeme und vermehrter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies erhöht sich der „oxidative Stress“.

Des Weiteren finden sich erhöhte Plasmaspiegel von Endothelin 1, welches ebenfalls ein starker Vasokonstriktor ist, von Wachstumsfaktoren (IGF-1, FGF, TGF- β) und einigen proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , Interleukin 1b, 2 und 6), die nicht nur negativ inotrop sind, sondern auch ausgeprägte Effekte an Myozytenphänotyp und extrazellulärer Matrix haben. Über Rezeptoren, die sich überwiegend an der Zelloberfläche befinden, werden intrazelluläre Signalwege angestoßen, welche zur Initiation von zytosolischen und nukleären Vorgängen führen (Abb.3). Die Hypertrophie stellt dabei zu Beginn einen kompensatorischen Prozess dar, welcher der Anpassung an den gesteigerten Leistungsbedarf dient. Sie ist durch eine Zunahme der Zellgröße (nicht der Anzahl) und der Abwesenheit von Zellteilung charakterisiert.

Eine geringe mitotische Aktivität wurde allerdings beschrieben, wenn der linke Ventrikel ein Gewicht von 350g überschreitet [10]. Die Proteinsynthese, mRNA, rRNA und der Proteingehalt in den Kardiomyozyten steigen. Obwohl die Degradation von Proteinen ebenfalls gesteigert ist, überwiegt die Synthese. Das Sarkomer, als kleinste funktionelle Einheit des Herzmuskels, unterliegt ebenfalls einer Reorganisation. Im Tiermodell und in kultivierten Kardiomyozyten zeigten sich Veränderungen der Genexpression. Innerhalb von 30-60 Minuten nach einem hypertrophen Stimulus werden die früh ansprechenden Gene (engl. „early response“, z.B. Egr-1, HSP70, c-fos, c-jun, c-myc) aktiviert. Nach 6 - 20 Stunden kommt es zu einer Hochregulation von sogenannten fetalen Genen, welche normalerweise in der fetalen Periode exprimiert werden, wie z.B. β -Myosin-Schwerketten (β -MHC, „myosin heavy chain“), das α -Skeletale- (α -sk) und α -Glatte-Muskel-Actin (α -sm-actin, „smooth muscle“) und ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) [11].

Im selben Zug beobachtet man eine Herunterregulierung von α -Myosin-Schwerketten (α -MHC) und der Kalzium-Pumpe (Ca^{2+} -ATPase, SERCA) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) [7,8,9]. Die Freisetzung des Kalziums aus den longitudinalen Tubuli des SR ist ein wichtiger Faktor für die Kontraktion des Myokards und ist hierdurch vermindert. Die Aufgabe dieser Pumpe besteht darin das Kalzium während der Diastole wieder in das SR zurück zu transportieren. Gelingt dies nicht in ausreichendem Maße, sinkt dessen Konzentration im SR und damit die freigesetzte Menge während der Systole. Im Zytosol entsteht ein diastolischer Kalziumüberschuss, welcher zur intrazellulären Kalziumüberladung führt. Die darauf folgende erhöhte Expression des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers in der Plasmamembran kann die Störung der Kalziumhomöostase nicht vollständig korrigieren. Dieser Umstand trägt mit zur schlechteren myokardialen Funktion bei.

Viele Formen der Hypertrophie sind durch einen Expressionswechsel der kontraktilen Proteine Actin und Myosin charakterisiert. Durch den Wechsel von α -MHC zu β -MHC kommt es zur Verlagerung von einer Myosinspezies mit schneller enzymatischer Aktivität zu einer mit langsamerer. Dieses wird als Anpassungsprozess des belasteten Herzmuskels verstanden. Die langsamere Energieübertragung scheint eine ökonomischere Kontraktion zu ermöglichen [57]. Allerdings enthalten die Ventrikel des humanen Herzens schon fast ausschließlich β -MHC. Ein hoher Gehalt an α -MHC existiert vor allem bei kleineren Tieren wie z.B. Ratten [58]. β -Actin gehört ebenfalls zu den zytoskeletalen Proteinen und zeigt einen frühen vorübergehenden Anstieg in seiner Konzentration [85]. Die Expression von Titin (Connectin), einem Riesenprotein, welches sich zwischen Z- und M-Linie des Sarkomers (Abb. 3) ausspannt und zur Fortleitung der Kraft beiträgt, ist sowohl in experimentell dekompensierter Hypertrophie in Schweineherzen als auch im menschlichen Herzen gesteigert. Vermutlich trägt es durch seine Steifigkeit zur Verschlechterung der Kontraktilität bei [87,88]. Auf Ebene der Z-Linie formt Desmin ringförmige Banden um die Myofibrillen. Es wird vermehrt exprimiert während kompensierter und dekompensierter Hypertrophie in Schweinen und Menschen. Zusätzlich sind Anordnung und α -Actinin-Lokalisation gestört [87,89]. Vinculin verankert Actin-Filamente über α -Actinin an Sarkolemma und den interkalierten Scheiben und stellt einen Teil des Befestigungssystems der Myofibrillen an der externen Membran dar. Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist der Gehalt an Vinculin in den Kardiomyozyten erhöht [89]. Die Funktion der mikrotubulären Veränderungen ist im Moment leider noch nicht eindeutig geklärt.

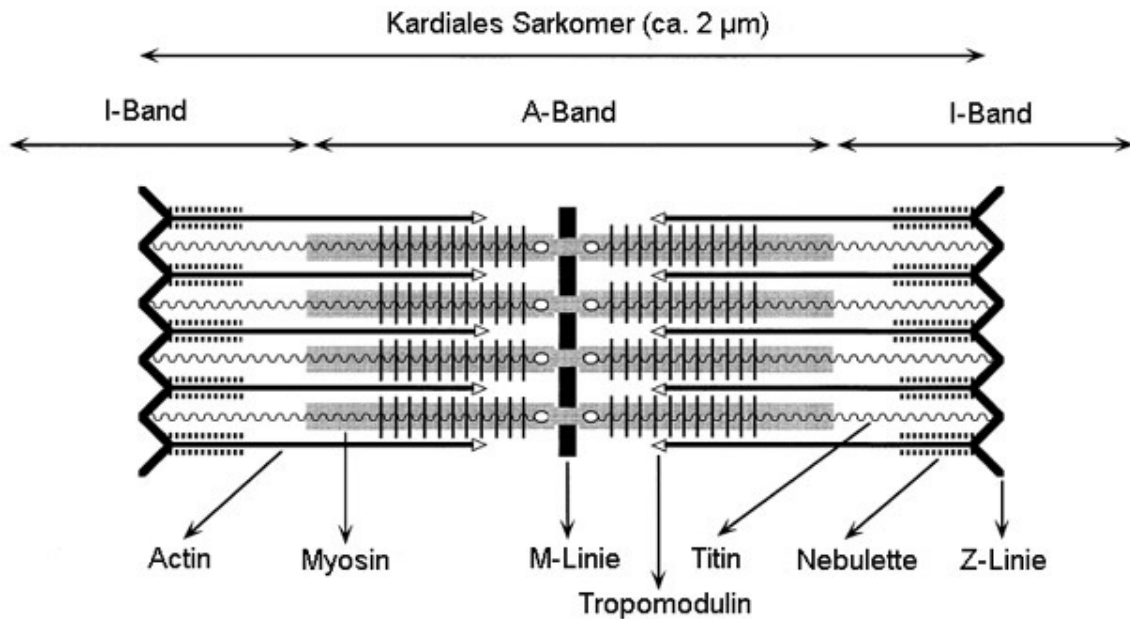


Abbildung 3:

Schema des kardialen Sarkomers, der kontraktile Grundeinheit des Herzmuskels. Die M-Linie besteht überwiegend aus Myomesin, dem 165kDa M-Linien-Protein und der Creatinkinase. Die Z-Linie enthält α -Actinin und Cap-Z, welches früher β -Actinin genannt wurde sowie eine Anzahl weiterer noch schlecht beschriebener Proteine. Titin ist mit seinem N-terminalen Ende an die Z-Linie gebunden und interagiert mit seinem C-terminalen globulären Ende mit dem M-Linien-Protein und Myomesin. Tropomodulin sitzt als Kappe auf einem Ende des Actin-Filamentes. Das dünne Actin-Filament entspringt mit seinem C-Terminus der Z-Linie und wird dort von zwei Nebulette-Molekülen flankiert. (Abb. modifiziert nach [11])

Eine weitere Veränderung stellt die Fibrosierung des Herzmuskels dar. Diese beinhaltet eine Zunahme der Kollagenkonzentration. Da Kollagen-1 ein sehr steifes Protein ist, verschlechtert es sowohl die passive Compliance als auch die systolische Funktion. Hinzu kommt eine proarrhythmische Wirkung durch Heterogenisierung und Reizleitungsstörung im Myokard [83,84]. Der plötzliche Herztod als Folge schwerer Arrhythmien ist dabei für mehr als 50% der Todesfälle bei Patienten mit Herzinsuffizienz verantwortlich.

Beim Myokardinfarkt z.B. werden nicht nur die Infarktzone sondern auch der übrige Ventrikel in die Fibrosierung involviert. Die reparative Fibrose ist als Narbe organisiert und von reaktiver Fibrose und kompensatorischer Hypertrophie umgeben.

Die Verletzung des Gewebes lockt inflammatorische Zellen vor allem Makrophagen an. Diese produzieren TGF β 1 (transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor) welcher unter anderem interstitielle Fibroblasten in Myofibroblasten transformiert. Sie sind vier Tage nach dem Infarkt auf Grund ihres Gehalts an sm- α -Actin, verschiedener Kollagenasen, von ACE

sowie der hohen Dichte an Angiotensin-II-Rezeptoren nachweisbar. TGFβ1 und Angiotensin-II sind beide für die Kollagenanreicherung verantwortlich [86].

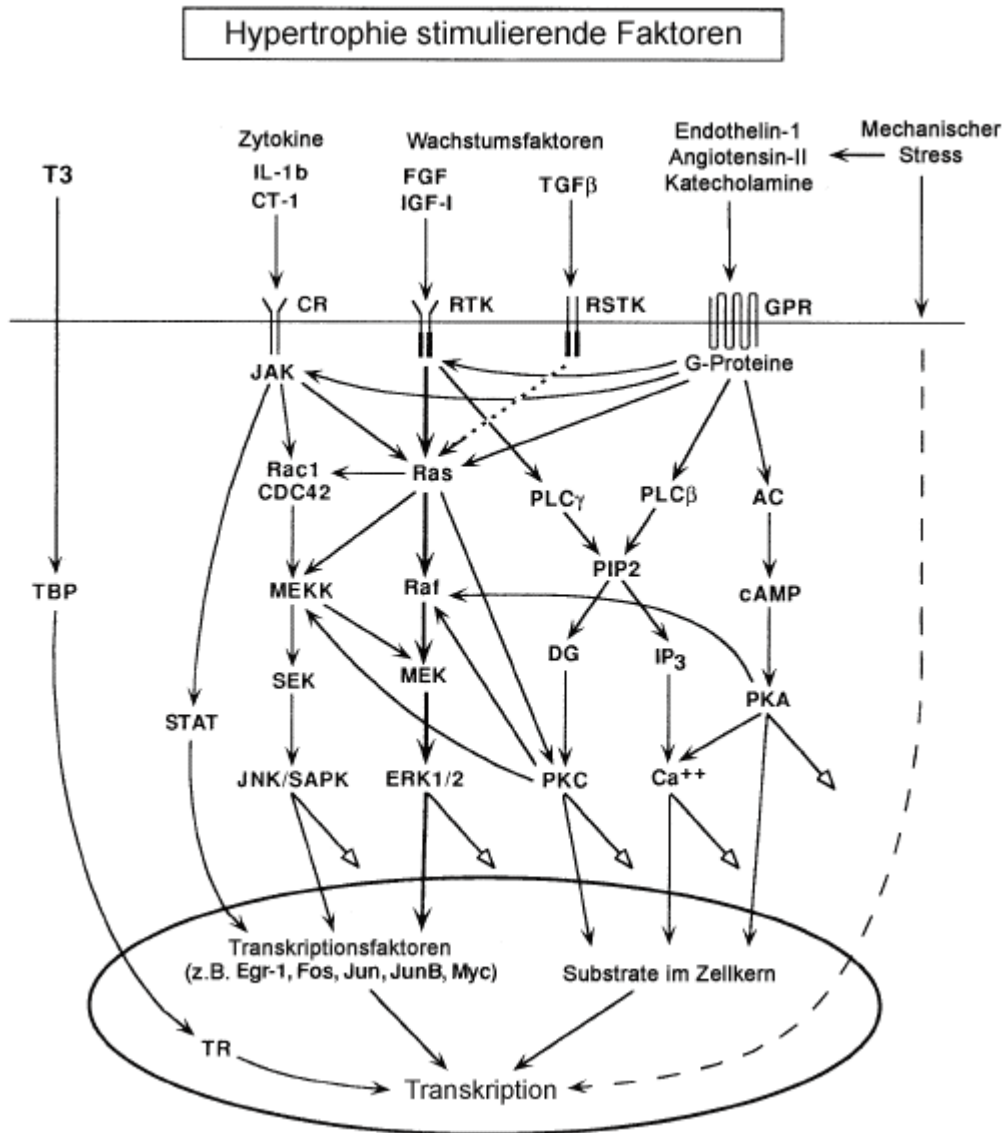


Abbildung 4:

Verschiedene Hypertrophie induzierende Faktoren bewirken eine Reihe von intrazellulären Signalwegen, die Prozesse in Zytosol und Zellkern aktivieren, zur Transkription bestimmter Gene führen und damit zu morphologischen und funktionellen Veränderungen an den Kardiomyozyten. Ein Hypertrophie-Stimulus kann die Aktivierung von verschiedenen parallelen und interagierenden Reaktionswegen in Gang setzen. (Pfeile: Hauptreaktionswege, weiße Pfeile: Reaktionswege zu zytosolischen Substraten, gepunktete Pfeillinie: fragliche Ras-Aktivierung durch RSTK, gestrichelte Pfeillinie: direkte Genaktivierung durch mechanischen Stress; detaillierte Erklärungen im Text (Abb. modifiziert nach [11])

Um die Veränderung des Herzmuskels zu verstehen und gegebenenfalls therapeutische Ansätze zu finden, ist es von Vorteil, die Signalwege in den Zellen sowie die darauf folgenden

Veränderungen der Kardiomyozyten zu verstehen. Durch die Verwendung von Zellkulturmodellen als ein *in vitro* Modell für die Hypertrophie wurden zahlreiche Hypertrophiestimuli identifiziert. Dazu gehören unter anderem die bereits erwähnten Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide und Katecholamine (Abb. 4). Die meisten sind *in vivo* unter normalen Umständen in Balance. Wird diese gestört, resultiert eine entsprechende Veränderung der Herzmuskelzellen. Dabei handelt es sich um ein komplexes Netzwerk von multiplen interagierenden Signalwegen, welche zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. Als Beispiel führen Trijodthyronin (T₃) und bFGF (engl. „basic fibroblast growth factor“, Fibroblastenwachstumsfaktor) zum gleichen Zellbild, obwohl sie unterschiedliche intrazelluläre Signalwege nutzen. IGF I („insulin like growth factor“, Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor), welcher Muskelzelldifferenzierung stimuliert und bFGF, ein Inhibitor der Differenzierung, verursachen komplett andere Phänotypen, obwohl beide über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und eine Aktivierung des Ras-Raf-MEK-MAP-Kinase Signalwegs führen [11].

1.4 Zellzyklusregulation

Als Zellzyklus bezeichnet man das universale Programm nach dem die somatische Zellteilung abläuft. Er wird traditionell in vier Phasen aufgeteilt. Die G₁-Phase (G steht für Gap bzw. Lücke zwischen den anderen Phasen) beinhaltet eine Erhöhung der Syntheserate in der Zelle und die Vorbereitung auf die DNA-Replikation [12,13]. In der S-Phase (S = Synthese) wird die DNA repliziert. Die anschließende G₂-Phase dient als Vorbereitung für die Separation der Chromosomen und den Aufbau des Spindelapparates [14,15]. Während der M-Phase (M = Mitose) findet die Chromosomenseparation und die Zellteilung statt [16]. Um einen fehlerfreien Ablauf von Zellzyklus und Zellteilung zu gewährleisten und zwei identische Tochterzellen zu erhalten, überprüft die Zelle an sogenannten Kontrollpunkten streng, ob die vorhergegangenen Prozesse wie gewünscht abgelaufen sind [17]. Differenzierte Zellen wie z.B. Kardiomyozyten befinden sich in der G₀-Phase und sind aus dem Zellzyklus ausgetreten. (Abb.5).

Eine Gruppe von Enzymen, die sogenannten Cyclin-abhängigen-Kinasen („cyclin dependent kinase“, CDK) regeln den Ablauf des Zellzyklus. Kinasen sind Enzyme die Phosphatgruppen auf ihre Substrate übertragen. Die CDK-Aktivität wird über mehrere verschiedene Regulationsmechanismen gesteuert. Für ihre Aktivität benötigen sie die Bindung von sogenannten Cyclinen, deren Expressionslevel in Abhängigkeit vom Zellzyklus oszilliert [18,19].

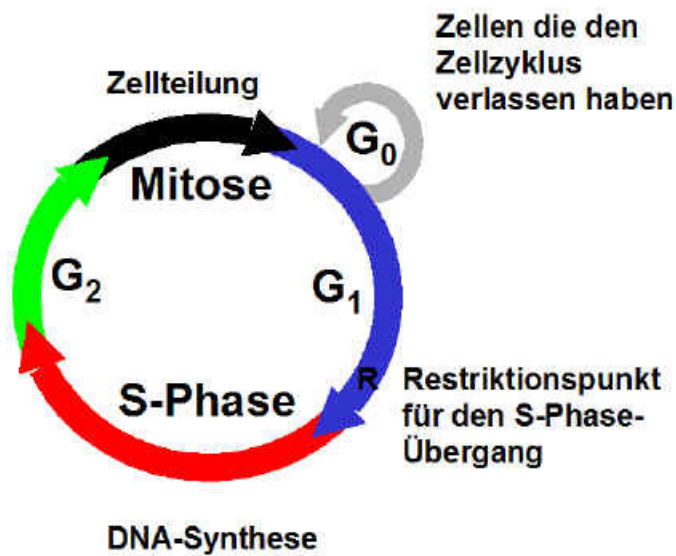


Abbildung 5: Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in vier Phasen aufgeteilt. In der S-Phase wird die DNA repliziert, in der M-Phase findet die Separation der Chromosomen und anschließend die Zellteilung statt. In der G₁-Phase ist die Biosyntheserate als Vorbereitung auf die DNA-Replikation erhöht. Der Übergang wird am Restriktionspunkt streng überwacht. Die G₂-Phase dient als Vorbereitungsphase für die Chromosomenseparation und den Aufbau des Spindelapparates. Zellen die den Zellzyklus verlassen haben befinden sich in der G₀-Phase.

Die Aktivierung durch die CDK-aktivierende-Kinase (CAK) [41], die Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten und die CDK-Inhibitoren („Cyclin dependent kinase inhibitors“, CKIs) stellen weitere Regulationsmechanismen dar (Abb.6) [20,21]. Eine Familie von CKIs wird aufgrund ihrer Struktur und ihrer Eigenschaft spezifisch CDK4 und CDK6 zu inhibieren INK4 (Inhibitor der CDK4) genannt. Dazu gehören p16^{INK4a} [22], p15^{INK4b} [23], p18^{INK4c} [24,25] und p19^{INK4d} [25,26], welche durch multiple Ankyrin-Wiederholung charakterisiert sind und ausschließlich an Cyclin-D-CDK4- bzw. CDK6-Komplexe binden und diese inaktivieren. Weder andere CDKs noch D-Typ-Cycline werden von ihnen gebunden. Die breiter agierende Cip/Kip-Familie beeinflusst dagegen Cyclin A-, E- und D-abhängige Kinasen. Zu ihr gehören p21^{Cip1} [27-32], p27^{Kip1} [33,34] und p57^{Kip2} [35,36]. Diese Gruppe trägt charakteristische Motive an ihrem Amino-terminalen Ende, welche erlauben, dass sie sowohl Cycline als auch CDK-Untereinheiten binden können [37-40]. Betrachtet man die Zuordnung von CDKs und Cyclinen zu einzelnen Zellzyklusphasen, so zeigt sich, dass auch hier eine gewisse Gruppierung zu finden ist. In der G₁-Phase und am Übergang zur S-Phase sind CDK2,-4,-6, Cyclin-C und Cyclin-D₁₋₃ vertreten. Cyclin-A wird von der G₁- bis zur M-Phase benötigt. Cyclin-B und cdc2 (engl. „cell division cycle 2“, Zellteilungszyklus 2) sind spezifisch für G₂- und M-Phase. Eine Besonderheit der Cip-/Kip-Familie ist die Tatsache, dass sie einerseits starke inhibitorische Effekte auf die

Cyclin-E- und Cyclin-A-abhängige-CDK2 haben und andererseits positive Regulatoren von Cyclin-D-abhängigen Kinasen (CDK4 und CDK6) sind [43].

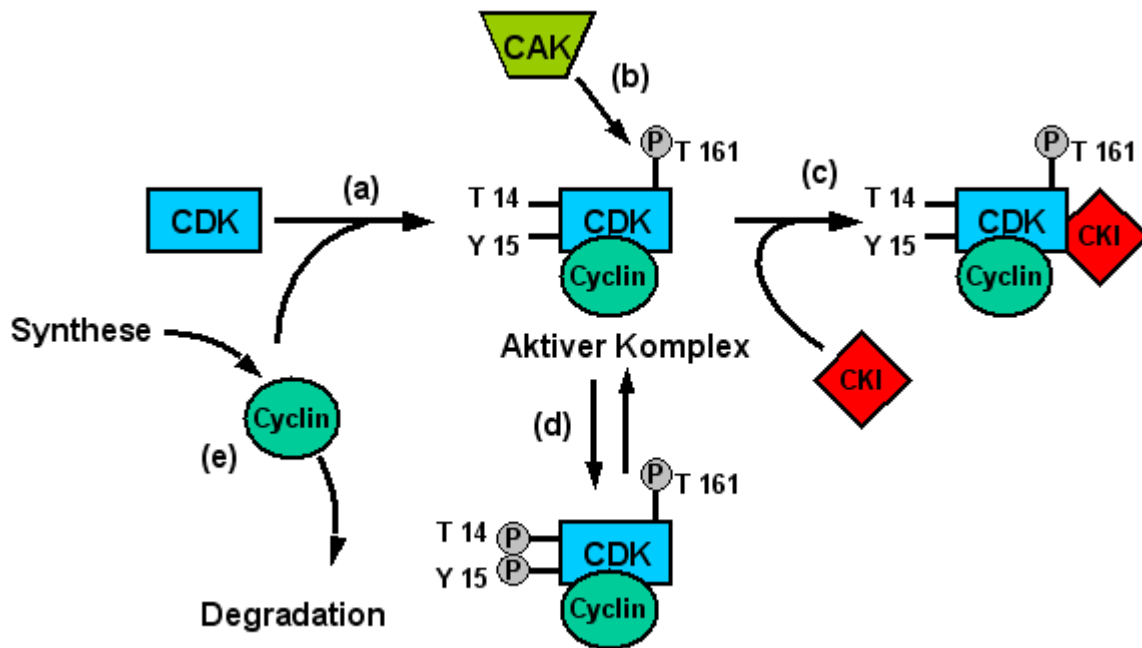


Abbildung 6:

Die Regulation der CDK-Aktivität wird über verschiedene Ebenen kontrolliert. (a) Bindung des zugehörigen Cyclins, (b) Phosphorylierung des Threonin-Restes (T 161) durch die CDK-aktivierende-Kinase (CAK) und damit Aktivierung des CDK-Cyclin-Komplexes, (c) Bindung von Kinaseinhibitoren (CKI) und damit Inaktivierung, (d) Dephosphorylierung (Aktivierung) bzw. Phosphorylierung (Deaktivierung) des Threonin-Restes (T 14) bzw. des Tyrosin-Restes (Y 15), (e) Synthese und Ubiquitin / Proteasom vermittelte Degradation der Cycline [42].

In der G₁-Phase werden als Antwort auf sogenannte Mitogene, also zur Zellteilung anregende Signale (Abb. 4), Gene der D-Typ-Cycline induziert. Dabei wird durch Ras eine Kinase-Kaskade angestoßen, welche von der sequentiellen Aktivität von Raf-1, der „Mitogenaktivierten-Protein-Kinase-Kinase“ (MEK1 und MEK2) und den „Extrazellulär-regulierten-Protein-Kinasen“ (ERKs) abhängig ist [44-48]. Die gleiche Kaskade ist für das Zusammenlagern von neu synthetisiertem Cyclin-D1 und CDK4 verantwortlich [49,50]. Fehlen mitogene Signale können sich ektop produzierte Cyclin-Untereinheiten nicht effizient mit den CDKs verbinden [51]. Der Umsatz der D-Cycline ist abhängig von einem anderen Ras-Signalweg. Hier sind Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Protein-Kinase-B (Akt) beteiligt. Sie regulieren die Phosphorylierung von Cyclin-D1 an einem Threonin-Rest (Thr-286) durch die Glycogen-Synthase-Kinase-3β (GSK-3β) negativ [52]. Bei Inhibierung dieses Ras-Signalwegs, führt die Phosphorylierung zum gesteigerten Export von Cyclin-D1 aus dem Zellkern und nachfolgend

zur beschleunigten Ubiquitin-/Proteasom-vermittelten Degradation im Zytoplasma. Die D-Typ-Cycline agieren somit als eine Art Wachstumsfaktor-Sensor. Jeder Schritt, die Transkription, die Zusammenlagerung mit den CDKs und der Abbau, ist abhängig bzw. beeinflusst von Mitogenen.

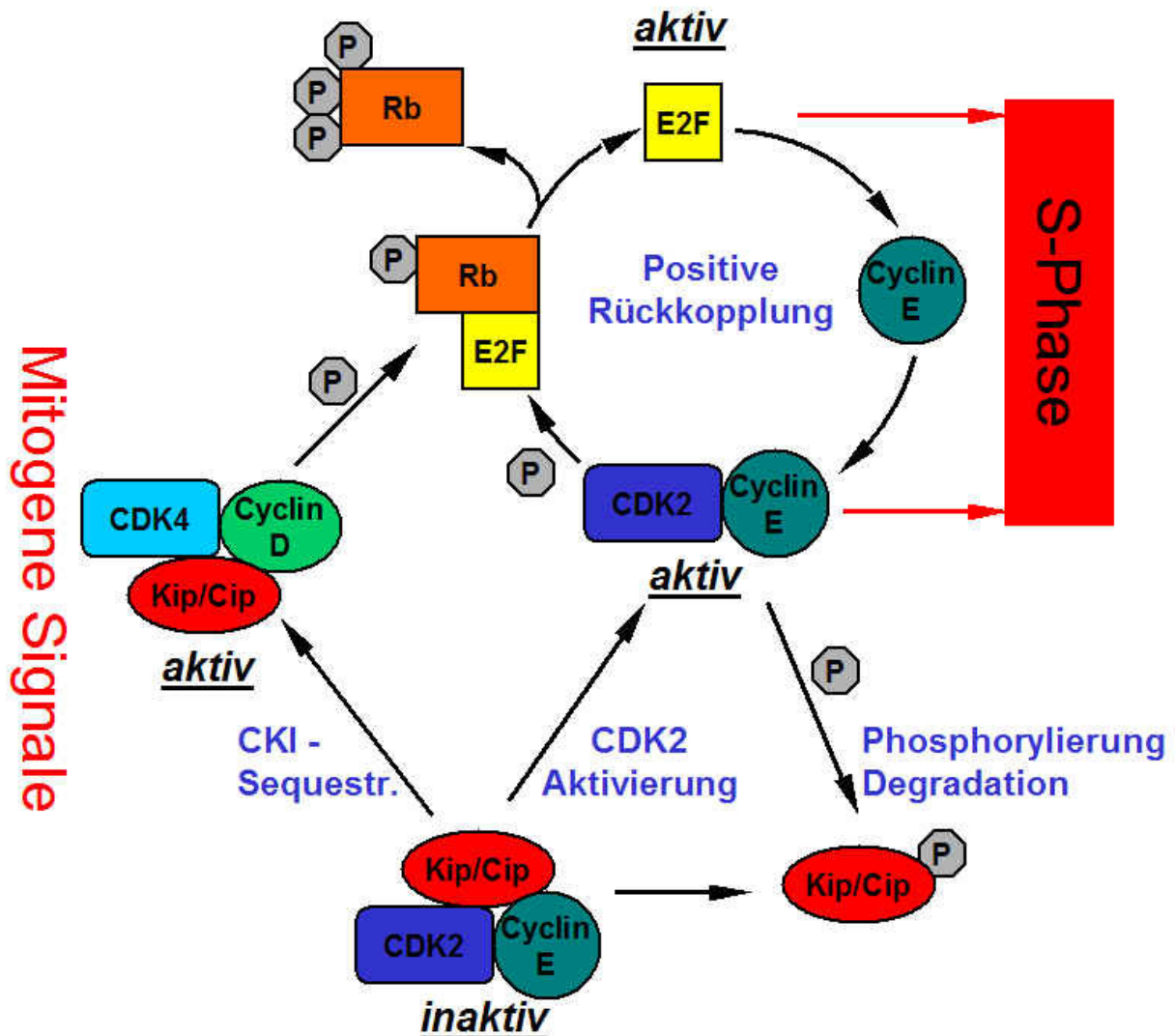


Abbildung 7:

Die Regulation des G₁-/S-Phase-Übergangs.

Die Zusammenlagerung von aktiven Cyclin-D-abhängigen Kinasen (CDK4 oder 6) und einem CIP- oder KIP-Protein wird durch mitogene Signale gefördert. Die Sequestrierung der CIP- bzw. KIP-Proteine verringert ihren inhibitorischen Effekt und trägt zur Aktivierung des Cyclin-E-CDK2-Komplexes bei. Die aktiven Komplexe von CDK2 und CDK4 phosphorylieren pRb (Rb). Damit wird die repressive Wirkung auf die E2F-Familie aufgehoben und die für den Eintritt in die S-Phase nötigen Gene können aktiviert werden. Dazu gehören neben Cyclin-E und Cyclin-A eine Reihe von Genen, die für den Nucleotid-Metabolismus und die DNA-Synthese an sich verantwortlich sind [92,93]. P27 wird durch Cyclin-E-CDK2 phosphoryliert und anschließend durch Proteolyse degradiert. Die Degradation der CIP- und KIP-Proteine und die Induktion der Cycline durch E2F führt zur Mitogen-Unabhängigkeit und damit zur Irreversibilität des S-Phase-Übergangs.

Eine wichtige Funktion der Cyclin-D-abhängigen Kinasen ist die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb), einem Protein der sogenannten Pocketproteinfamilie. Dieses Protein ist nach einem Tumor des kindlichen Auges benannt, der auftritt, wenn beide Allele des pRb-Genes inaktiv sind. Die Verbindung zwischen dem Funktionsverlust des pRb-Proteins und der Tumorentstehung klassifiziert es als Tumorsuppressor. Im allgemeinen stehen Fehlfunktionen im Zellzyklus häufig mit Tumorgenese in Verbindung. Dieser Aspekt wird in der zum jeweiligen Zellzyklusfaktor angegebenen Literatur angesprochen und würde hier zu weit vom eigentlichen Thema wegführen.

Die Entscheidung für den Übergang von der G₁- zur S-Phase fällt am sogenannten Restriktionspunkt und dort steht die Phosphorylierung von pRb im Mittelpunkt. Die Cyclin-D-Kinasen (CDK 4 und 6) initiieren sie in der mittleren G₁-Phase nach welcher Cyclin-E-CDK2 aktiv wird und die pRb-Phosphorylierung an zusätzlichen Stellen komplettiert. Die aktive und damit wachstumshemmende Form von pRb ist die hypophosphorylierte. Um den Zellzyklus voran zu treiben muss pRb demnach hyperphosphoryliert vorliegen [51,53-56] (Abb.7). Die Hyperphosphorylierung löst pRb von Proteinen der E2F-Familie und ermöglicht, nach Bindung von E2F an den Transkriptionsfaktor DP, die Aktivierung einer Reihe von S-Phase-Genen, welche zur DNA-Synthese notwendig sind [92,93]. Cyclin-A- und Cyclin-B-abhängige Kinasen halten pRb in hyperphosphorylierter Form bis die Zelle die M-Phase verlässt und pRb in der nächsten G₁-Phase wieder hypophosphoryliert vorliegt [90,91].

2. Ziele und Fragestellung

Über die Funktion von Zellzyklusfaktoren in Herzmuskelzellen ist wenig bekannt. Die p27-Proteinkonzentration in postmitotischen kardialen Muskelzellen ist hoch, wogegen CDK2 als das am besten charakterisierte Ziel von p27 wenig exprimiert wird.

Daher sollte die Rolle von p27 in der Regulation der myokardialen Hypertrophie untersucht werden. Zunächst stellte sich die Frage, welche anderen vielleicht noch unbekannt Proteine mit p27 interagieren können und das hypertrophe Wachstum in Herzmuskelzellen beeinflussen. Hierfür wurde eine cDNA-Sammlung aus dem adulten humanen Herzen mit dem Hefe-2-Hybrid-System („Yeast Two Hybrid“) systematisch untersucht. Im Anschluss an die erfolgreiche Suche nach einem interessanten Bindungspartner wurde die Interaktion von p27 und CK2 in *in vitro* und *in vivo* Studien weiter beleuchtet, um möglicherweise neue therapeutische Ansätze oder zumindest ein tieferes Verständnis über die Pathomechanismen der Hypertrophie auf

molekularer Ebene zu gewinnen. Hypothese: Modulation von p27 und des Zellzyklus verhindert eine pathologische kardiale Hypertrophie.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Labor- und Glasgeräte ohne Aufführung wurden von der Firma Roth bezogen.

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH, Vaculab S 3000
Autoradiographiefilm	Amersham Life Science, Hyperfilm TM ECL TM
Brutschränke	Bakterien: Heraeus Instruments GmbH, Typ B6060 Säugerzellkultur: Labotec, Forma Scientific, Inc., Modell 3862S/ N36497-402 (Labor-Technik-Göttingen)
Cryo-Röhrchen	Nunc, 1,8 ml
Deckgläser (12 mm Durchmesser)	Werkstätte Chemie und Photo
Durchflußzytometer	Coulter, Coulter Epics XL
Einmalskalpell Cutfix	Braun, Werkstätte Chemie und Photo
Elektrophoresekammern	20 x 20 cm: Biometra, Maxigel/ Amersham Pharmacia 10 x 10 cm: Biotech, Hoefer Mighty Small Mini SE 260
Elektrophoresezubehör	Biometra / Amersham Pharmacia Biotech
Entwicklungsgerät	AGFA, CURIX 60
Expositionskassetten	Kodak, X-Omatic
Gelgießvorrichtung	Amersham Pharmacia Biotech, Mighty Small Gel Casters
Geltrockner	Savant, Slab Gel Dryer SGD 2000
Hand-Homogenisator	Werkstätte Chemie und Photo
Heizblock	Techne, DRI-Block DB-2A
Kulturschalen/ Zentrifugenröhrchen	TPP®/ Greiner-Labortechnik
Mikroliterspritze	Roth, Standard-Mikroliterspritzen
Mikroskope	Olympus, BX 60 und IX 70 Leica, Invertmikroskop

Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, 96 Well Platte/U-Form
Mikrotiterplattenplatten-Lesegerät	DYNATECH Laboratories, MRX
Milli-Q-Anlage mit Pyrogenfilter	Millipore
Operationsbesteck	PRO-MED
Osmotische Pumpe Alzet [®]	DURECT Corporation, Cupertino, Kanada
pH-Meter	Beckman F32 pH Meter
Phosphorimager	Fuji Photo Film Co.,LTD., Fujix BAS 2000
Phosphorimagerkassetten	Fuji Photo Film Co.,LTD., BAS 2040
Phosphorimagerplatten	Fuji Photo Film Co.,LTD., BAS-III
Photometer	Beckman, DU [®] 640
Pipetten	Eppendorf, Eppendorf Research
Pipettierhilfe	Roth, Pipetus [®] -Akku
Rührer	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG (IKAMAK [®] RET bzw. IKATRON ETS cD3)
Schüttler	EB Edmund Bühler, WS-5
Semi-Dry-Transfereinheit	Biometra, Fastblot [™] , Typ B32
Thermocycler	Mastercycler EP Realplex, Eppendorf
Ultraschall-Homogenisatoren:	
Sonoplus HD70	Bachhofer, Reutlingen
Polytron Homogenisierer	Kinematica AG, Schweiz
UV-Transilluminator	Carl Roth
Spannungsgeber	Biometra, Power Pack P25
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, UVF6.12S
Sterilfilter	Schleicher und Schuell FP 030/3
Ultraschall 12-MHz Schallkopf	Acuson Sequoia, Erlangen, Germany
Überkopf-Drehmischer	Novodirect GmbH, Mischer mit 33 U/min
Waagen	Sartorius, Basic Typ BA 310S und BA 4100
Wasserbäder	GFL-Wasserbad, Werkstätte Chemie und Photo
Zählkammer nach Neubauer	Werkstätte Chemie und Photo
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge (0,5 bis 2 ml)	Haraeus Instruments GmbH, Biofuge fresco
Standzentrifuge (bis 50 ml)	Haraeus Instruments GmbH, Varifuge 3.0R
Großzentrifuge (bis 250 ml)	Beckman, Typ J2-HS
Plattenzentrifuge	Beckman, Typ GS-6R

3.2 Chemikalien, Trägermaterialien und vorgefertigte Lösungen

Die verwendeten Chemikalien entsprechen, wenn nicht anders angegeben, der Reinheitsnorm p.a. („pro analysi“, zur Analyse) und wurden von den angegebenen Firmen geordert.

3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma
Acrylamid	Bio-RAD
Agar	DIFCO
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma
Ampicillin (Zellkultur getestet)	Sigma
Angiotensin II	Sigma
Arabinosyl-Cytosin (Ara-C)	Sigma
[γ - ³² P]-ATP (10 mCi/ml)	NEN
Bactotrypton	Difco
Bovines (Rinder) Serum Albumin (BSA)	Sigma
BSA Fraktion V	Sigma
5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde
Coomassie Brilliant Blau	Pharmacia
CHAPS	Calbiochem
(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)	
dNTP's	Roche Molecular Biochemicals
DAPI	Roche Molecular Biochemicals
Dextrose 40%	Sigma
Difco Peptone	Difco
Difco Hefe Nitrogen Basis ohne Aminosäuren	Difco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM/F12 Medium	GIBCO
Essigsäure	Merck
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck

Ethanol	Merck
Ehtidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenantridium-bromid)	Sigma
FCS	PAA
Glycin	Bio-RAD
Glycerol	Sigma
Herring Sperm DNA	Sigma
HCL (Salzsäure)	Merck
Heparin (Liquemin)	Roche
Histone H1	Roche
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Sigma
Imidazol	Sigma
Insulin (vom Rind, Zinkkristalle)	GIBCO
Insulin-Transferrin-Natriumselenit (getestet für die Zellkultur)	Sigma
Isopropyl-beta-D-Thiogalacto-Pyranoside (IPTG)	Sigma
KCL	Roth
Kreatinphosphat	Roche
L-Adenine Hemisulfate Salz	Sigma
L-Arginin HCl	Sigma
L-Isoleucin	Sigma
L-Lysin HCl	Sigma
L-Methionin	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
L-Threonin	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
L-Uracil	Sigma
L-Valin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
LumiGLO®	Cell Signaling
[β- ³⁵ S]-Methionin/Cystein "EasyTag" (1000 Ci/mmol)	NEN
MgSO ₄	Roth
Molekulargewichtsmarker („Rainbow Marker“)	Amersham Pharmacia Biotech
Molekulargewichtsmarker (1 kb „DNA Ladder“)	GIBCO

N'N'-bis-methylen-acrylamid	Bio-RAD
N,N-dimethylformamid (DMF)	Serva
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
NaCL	Sigma
Na-Deoxycholat	Merck
NaHCO ₃ (Zellkultur getestet)	SERVA
NaH ₂ PO ₄	Roth
Natriumpyruvat	Boehringer Mannheim
Nonidet P40	Roche Molecular Biochemicals
NTP (dNTP)	Roche Molecular Biochemicals
Orange G	Fluka
Oligonucleotide ("primer")	BioTeZ Berlin-Buch GmbH
Penicillin	GIBCO
Pferdeserum	Sigma
Phenol	Roth
Polybrene TM	Sigma
Polyethylenglycol (PEG)	SERVA
Prolin	Sigma
Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF	Qiagen
Streptomycin	GIBCO
TEMED	Merck
Tetrazyklin	Sigma
Thymidin (Zellkultur getestet)	Sigma
Thiamin-HCL	Sigma
Trichloressigsäure	FLUKA
Trichlormethan (Chloroform)	Roth
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck
Triton TM X-100	Sigma
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyanosid)	Sigma

ECL Hyperfilm	GE Healthcare
Falconröhrchen 50ml, 20ml, 10 ml	Eppendorf
Filterpapier #5, 125mm, 75mm	Whatman
Glaskügelchen, säuregewaschen	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia
Kulturschalen 15 cm ²	Eppendorf
Probenbehälter 1.5ml, 2.0ml	Eppendorf
Protein-A Agarose Kügelchen	Roche
Protein-G Agarose Kügelchen	Roche
PVDF-Membran	Roche
SDS-PAGE Gradienten Gel	Pierce
Ziegenserum	Jackson

3.3 Biologisches Material

3.3.1 Antikörper

Spezifität	Typ	Spezies	Isotyp	Firma
Actin	#4968	Kaninchen	IgG, pk	Cell Signaling
Anti-His ₍₆₎ G	R940-25	Maus	IgG, mk	Invitrogen
β-Tubulin	#2146	Kaninchen	IgG, pk	Cell Signaling
BrdU		Maus	IgG, mk	Roche
CDK2	SC-193	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
CK2	α, α', β	Kaninchen	IgG, pk	David Litchfield (University of Western Ontario, Canada)
GATA4	G-4	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
Kaninchen	A-11024 Fluor 488 konjug.	Esel	IgG (H+L)	Invitrogen
Kaninchen	Ig HRP NA 934	Esel	IgG (H+L)	Amersham
Kaninchen	Ig HRP #7074	Ziege	IgG (H+L)	Cell Signaling
Kaninchen	Ig FITC/TRITC	Ziege	IgG (H+L)	Jackson
Lamin A/C	#2032	Kaninchen	IgG, pk	Cell Signaling
Maus	A-11029 Fluor 750	Esel	IgG (H+L)	Invitrogen
Maus	Ig FITC/TRITC	Ziege	IgG (H+L)	Jackson

Maus	Ig HRP #7076	Pferd	IgG (H+L)	Cell Signaling
p16INK4	SC-759	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
p21CIP1	SC-756	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
p27 ^{KIP1}	#2552	Kaninchen	IgG, pk	Cell Signaling
p27 ^{KIP1}	610241	Maus	IgG, mk	BD Transduction Lab.
Tropomyosin	#4002	Kaninchen	IgG, pk	Cell Signaling

3.3.2 cDNA-Bibliothek

Adultes humanes Herz HL4013AB, lot 51034 Clontech

3.3.3 cDNA

CK2 α' Prof. David Litchfield (University of Western Ontario, London, Ontario, Canada)
kd.CK2 α' Prof. David Litchfield (University of Western Ontario, London, Ontario, Canada)
CK2 β Prof. David Litchfield (University of Western Ontario, London, Ontario, Canada)

3.3.4 Vektoren

pGAD10 Clontech
pAS2-1 Clontech
pEXP2 Invitrogen
pGEX-2 λ T GE Healthcare
pRSET-C Manfred Gossen, Max Delbrück Center für
Molekulare Medizin, Berlin
pTAT S. Dowdy, Howard Hughes Medical
Institute, La Jolla, USA)
pLENTI6/BLOCK-iT-DEST Invitrogen

3.3.5 Enzyme und Enzyminhibitoren

Ac-DEVD-CHO	BD Pharmingen™
Aprotinin	Sigma
BamH1	Sigma
β-Glycerophosphate	Sigma
Cycloheximid	Sigma
Caspase 3	Calbiochem-Behring
DNase I	Sigma
EGTA	
(Ethylenglycol bis - (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
Kollagen I	Gibco
Kollagenase Typ II	Invitrogen
Kalbsphosphatase, intestinal	NEB
Lactacystin	Calbiochem-Behring
Leupeptin	Sigma
LLM (N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methioninal)	Calbiochem-Behring
LumiGlo Chemilumineszenz	Cell Signaling
DMAT	
(2-dimethylamino- 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol)	Calbiochem-Behring
Natriumfluorid (NaF)	Sigma
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Pankreatin	Sigma
Phosphokreatinkinase	Roche
Protease Inhibitor Cocktail #4693132001	Roche
Ribonuklease A (DNase frei)	Roche
Trypsin 1:250, 4 bis 6 U/mg	SERVA
T4-DNA-Ligase	Promega
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Boeringer Mannheim Biochemica
Lysozym	Sigma

3.3.6 Kits

Advantage [®] cDNA PCR Kit & Polymerase Mix	Clontech
BigDye [®] Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Coomassie Preotein Assay Reagent Kit	Pierce
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham
Matchmaker [™] Two-Hybrid System	Clontech
NE-PER [®] Nuclear & Cytplasmic Reagents Assay Kit	Pierce
pLenti6/Block-iT [™] -DEST RNAi Gateway [®] Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Maxi- und Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
QuickChange [®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Superscript [™] III RT-PCR Kit	Invitrogen
TNT [®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

3.3.7 Mikroorganismen

Escherichia coli	BL21	Pharmacia
Escherichia coli	BL21(DE3)pLysS	Promega
Escherichia coli	DH5 α	Pharmacia
Escherichia coli	HB101	Pharmacia
Saccharomyces cerevisia	Y190	Clontech

3.3.6 Tiere

drei Tage alte neonatale Wistar-Ratten

wt-C57BL/6 und p27^{-/-} Mäuse

Die Tiere wurden von der Tieraufzuchtstelle des Max-Delbrück-Centrum geliefert.

Es lag eine Tötungsanzeige bei der zuständigen Behörde vor.

3.4 Lösungen

H ₂ O	aus einer Milli-Q-Anlage mit Pyrogenfilter
10x Aminosäure-Ausschluss-Lösung	„Synthetic dropout“ (SD/His-/Leu-/Trp-) L-Isoleucin 300 mg/l L-Valin 1500 mg/l L-Adenin Hemisulfat Salz 200 mg/l L-Arginin HCL 200 mg/l L-Lysin HCL 300 mg/l L-Methionin 200 mg/l L-Phenylalanin 500 mg/l L-Threonin 2000 mg/l L-Tyrosin 300 mg/l L-Uracil 200 mg/l „Synthetic dropout“ (SD/Leu-) zusätzlich hinzufügen: L-Histidin HCL Monohydrat 200 mg/l L-Tryptophan 200 mg/l - autoclavieren, bei 4°C bis zu 1 Jahr haltbar
10x TE Puffer	Tris-HCL 0,1 M EDTA 10 mM - pH 7,5 - autoclavieren
10x LiAc Lösung	LiAc 1 M - pH mit verdünnter Säure auf 7,5 einstellen - autoclavieren
10% (w/v) SDS-Lösung	SDS 10 g Aqua dest. 100 ml

10% Ammonium-Persulfat-Lösung	APS	100 mg
	Aqua dest.	100 ml
50x TAE Agarosegelelektrophorese - Puffer	Tris-Base pH 8,5	242 g
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	36,4 g
	Essigsäure	57,1 ml
	Lösung auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen	
1x TAE Puffer für AGE	50x TAE	20 ml
	Aqua dest.	980 ml
1.5M Tris-HCL	Tris-Base	54,45 g
	Aqua dest.	150 ml
	HCL bis pH 8,8	
	Aqua dest. auffüllen bis	300 ml
0.5M Tris-HCL	Tris-Base	6 g
	Aqua dest.	60 ml
	HCL bis pH 6,8	
	Aqua dest. auffüllen bis	100 ml
5x-Elektroden Puffer pH 3,8	Tris-Base	15 g/l
	Glycin	72 g/l
	SDS	5 g/l
	- Verdünnung für eine Anwendung: 300 ml 5x Puffer und 1200 ml Aqua dest.	
	- Keine pH-Einstellung mit Säure oder Base	
Acrylamid/Bis-Lösung	Acrylamid	146 g
	N'N'-bis-Methylen-Acrylamid	4 g
	Aqua dest. auffüllen bis	500 ml
	Lagerung: dunkel bei 4°C bis max. 30 Tage	

Agarosegel für die Elektrophorese	1%ig	
	Agarose auf 1 Liter 1xTAE	10 g
	2%ig	
	Agarose auf 1 Liter 1xTAE	20 g
Agar ⁽⁺⁾ -Platten (autoclaviert)	NaCl	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Difco Pepton	10 g/l
	Agar	15 g/l
	- pH auf 5,8 einstellen und autoclavieren - Abkühlen auf 55°C abwarten - Ampicillin bis Endkonzentration 50 µg/ml zugeben - in Petrischalen gießen	
Agar ⁽⁻⁾ -Platten (autoclaviert)	NaCl	10 g/l
	Difco Hefe Nitrogen Basis	
	ohne Aminosäuren	6,7 g/l
	Agar	15 g/l
	10x AS-Ausschluss-Lösung	
	(SD/His-/Leu-/Trp-/)	100 ml/l
	40% Dextrose Lösung	50 ml/l
	1M 3-Amino-1,2,4-Triazol	25 ml/l
	Aqua dest.	850 ml
	- pH auf 5,8 einstellen und autoclavieren - Abkühlen auf 55°C abwarten - Ampicillin bis Endkonzentration 50 µg/ml zugeben - in Petrischalen gießen	
Elutionspuffer	Tris basisch pH 8,0	50 mM
	Glutathion reduziert	10 mM
Hefezellen-Lyse-Lösung	Triton X-100	2%
	SDS	1%

	NaCl	100 mM
	Tris-Base, pH 8,0	10 mM
	EDTA	0,1 mM
Hypotonischer Puffer (autoclaviert)	HEPES-NaOH pH 7,35	10 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,5 mM
Kinase-Essay-Puffer	Tris-HCL pH 7,5	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	NaCL	150 mM
	ATP	30 µM
	[γ- ³² P]-ATP (10 mCi/ml)	5 µCi
	Histone H1 (1 µg/µl)	5 µg
	DTT	1 mM
	β-Glycerophosphat	10 mM
LB-Medium	NaCl	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Bacto Pepton	10 g/l
Medium für neonatale Kardiomyozyten: (steril angesetzt)	DMEM/F12-Medium	500 ml
	Natrium-Pyruvat	3,0 mM
	L-Glutamin	2,0 mM
	Ascorbinsäure	0,1 mM
	Insulin	1 µg/ml
	Transferrin	1 µg/ml
	Natriumselenit	1 ng/ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	BSA	0,2 % (v/v)

NETN-Puffer (autoclaviert)	Tris basisch, pH 8,0	20 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	NP40	0,5% (v/v)
	Aprotinin	5 µg/ml
	Leupeptin	5 µg/ml
	Pefabloc SC	1 mM
	Pepstatin	1µg/ml
	- Inhibitoren unmittelbar vor Versuchsbeginn zusetzen	

PBS	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4	10,14 mM
	KH ₂ PO ₄	1,76 mM
	KCL	2,7 mM
	NaCl	137 mM

PEG/LiAc-Lösung (frisch ansetzen)	PEG 4000 50%	8 ml
	10x TE Puffer	1 ml
	10x LiAc	1 ml

Polyacrylamidgel

<u>Trenngel:</u>	<u>10%ig</u>	<u>12%ig</u>	<u>15%ig</u>
dest. Wasser	40,0 ml	33,5 ml	23,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	25,0 ml	25,0 ml	25,0 ml
10% (w/v) SDS-Lösung	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Acrylamid/bis-Lösung	33,5 ml	40,0 ml	50,0 ml
10% Ammoniumpersulfat	500 µl	500 µl	500 µl
TEMED	50µl	50 µl	50 µl

<u>Sammelgel:</u>	<u>16 cm</u>	<u>20 cm</u>
dest. Wasser	6,1 ml	12,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml	5,0 ml
10% (w/v) SDS-Lösung	0,1 ml	0,2 ml
Acrylamid/bis-Lösung	1,3 ml	2,6 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,5 µl	100 µl
TEMED	10 µl	20 µl

RIPA-Puffer	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0	10 mM	1,42 g/l
(wurde autoclaviert)	NaCl	300 mM	17,53 g/l
	EDTA (Di-Natriumsalz) 2 mM		0,744 g/l
	Na-Deoxycholat 1% (w/v)		10 g/l
	NP40 1% (w/v)		10 ml/l
	SDS 0,1% (w/v) vom 10%-Stock		10 ml/l
	DTT (immer frisch ansetzen)		1 mM

Kurz vor der Anwendung hinzufügen:

NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	1 µg/ml
Aprotinin	5 µg/ml

SD-Medium („Synthetic dropout“ SD/His-/Leu-/Trp-)

Difco Hefe Nitrogen Basis	6,7 g/l
ohne Aminosäuren	
10x AS-Ausschluss-Lösung	100 ml/l
(SD/His-/Leu-/Trp-)	
40% Dextrose Lösung	50 ml/l
1M 3-Amino-1,2,4-Triazol	25 ml/l
Aqua dest.	850 ml

- pH auf 5,8 einstellen und autoclavieren,
- Abkühlen auf 55°C abwarten,
- Ampicillin bis Endkonzentration 50 µg/ml zugeben

SDS-Proben-Puffer	Aqua dest.	3,8 ml
	0.5M Tris-HCL pH 6,8	1,0 ml
	Glycerol	0,8 ml
	10% (w/v) SDS-Lösung	1,6 ml
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml
	0,05% (w/v) Bromphenolblau	0,4 ml

Standard-Comassie-Färbung	Lösung A:	
	0,2% Comassie R-250/Methanol	2 g/l
	Lösung B:	
	20% Trichloressigsäure	200 ml/l
	Fixierung:	
	20% Trichloressigsäure	200 ml/l
	Entfärbung:	
	20% Methanol	200 ml/l
	10% Trichloressigsäure	100 ml/l

Transferpuffer (Western Blot)	Glycin	39 mM
	Tris-basisch	48 mM
	SDS	0,0375% (w/v)
	Methanol	20% (v/v)

TSS-Puffer (sterilfiltriert)	LB Medium	
	PEG 6000	10% (w/v)
	MgCl ₂	20 mM
	DMSO	5% (v/v)
	- pH auf 6,5 mit NaOH einstellen	
Verdauungspuffer	HEPES NaOH pH 7,6	20 mM
	NaCl	130 mM
	KCL	3 mM
	NaH ₂ PO ₄	1 mM
	unmittelbar vor Beginn wurde hinzugefügt:	
	Glucose	4 mM
	DNase I	15 µg/ml
	Pancreatin	1 mg/ml
	Collagenase II	0,5 mg/ml
X-Gal Lösung, konzentriert	X-Gal 20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (DMF)	
YPD-Medium	NaCl	10 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	Difco Pepton	20 g/l
	(Agar, nur für Platten	18 g/l)
	- pH auf 5,8 einstellen und autoclavieren	
	- Abkühlen auf 55°C abwarten	
- Ampicillin bis Endkonzentration 50 µg/ml zugeben		
Zell-Lyse-Puffer (Cell Signaling)	Tris-HCL pH 7,5	50 mM
	NaCL	150 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	1%

	NaP ₂ O ₇	2.5 mM
	β-Glycerophosphat	1 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	Leupeptin	1 mg/ml
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	16,1 g/l
	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	5,5 g/l
	KCL	0,75 g/l
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,246 g/l
	- pH auf 7,0 einstellen und autoclavieren	
Z-Puffer/X-Gal Lösung	Z-Puffer	100 ml
	β-Mercaptoethanol	0,27 ml
	X-Gal Lösung, konzentriert	1,67 ml

3.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System („Yeast-Two-Hybrid“)

3.5.1 Prinzip

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine gentechnische Methode zur Bestimmung von Protein-Protein Interaktionen. Bisher unbekannte Bindungspartner können identifiziert werden. Das Prinzip des Systems basiert auf der Tatsache, dass die meisten transkriptionellen Aktivatoren in eukaryotischen Zellen, zu denen auch die Hefen zählen, aus zwei funktionellen Einheiten zusammengesetzt sind. Beide Einheiten sind für eine Genaktivierung notwendig. Die DNA-bindende-Domäne (BD) ist verantwortlich für die Bindung an die DNA. Die aktivierende Domäne (AD), ist für die Aktivierung des Transkriptionskomplexes zuständig. Beim Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden beide Einheiten durch rekombinante DNA-Technologien so voneinander getrennt, dass sie selbstständig nicht mehr aneinander binden können und somit eine Transkription verhindert wird. Fusioniert man jetzt Proteine von Interesse mit jeweils einer der Domänen, so kann eine Transkription nur stattfinden, wenn diese aneinander binden können. Diese Proteine nennt man Hybriden.

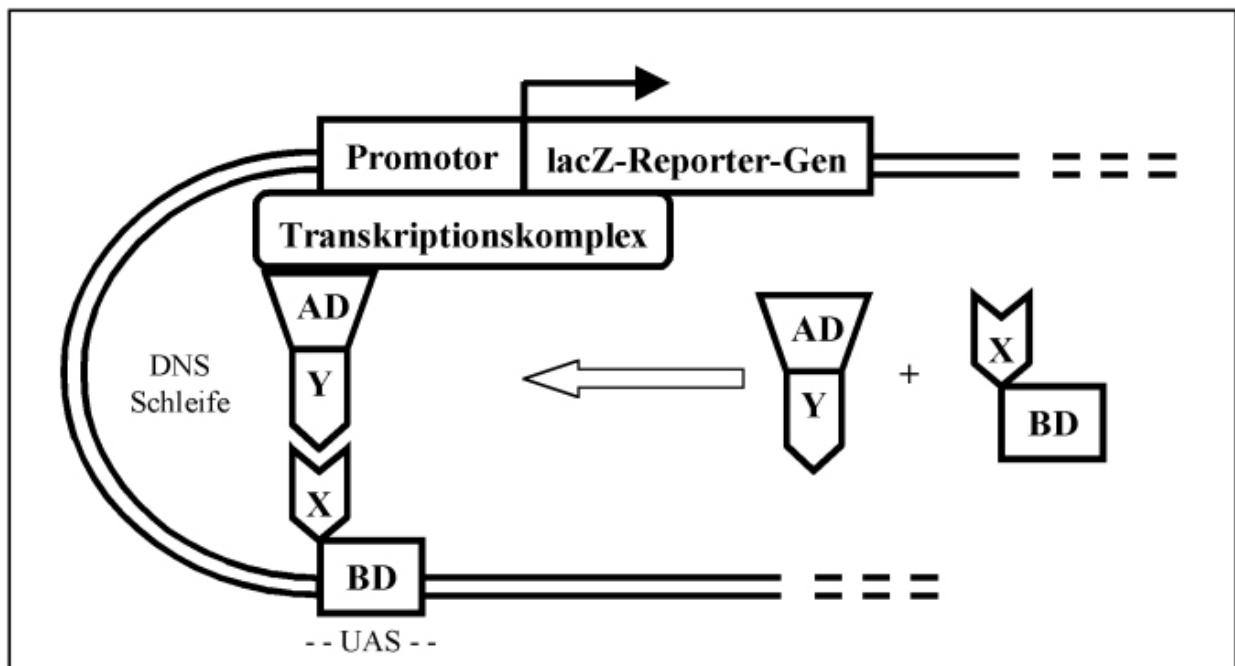


Abb.8: Reporter-Genaktivierung beim Hefe-Zwei-Hybrid-System

Eine erfolgreiche Transkription kann nur durch Interaktion der Hybridproteine stattfinden. AD = aktivierende Domäne, BD = DNA-bindende Domäne, UAS = vorgelagerte Aktivierungs-Sequenz (engl. „upstream activation sequence“), Y-AD und X-BD = Hybridproteine, X = „Köder“ (Protein, dessen Interaktionspartner gesucht wird), Y = „Beute“ (Protein einer cDNA-Datenbank), DNS = DNA, lacZ = Reporter-Gen, welches zur Blaufärbung führt und damit eine physische Interaktion anzeigt.

Um die Aktivierung der Transkription und damit die Bindung der Proteine phänotypisch sichtbar und damit gut detektierbar zu machen, bedient man sich eines Reporter-Genessays. Das zu aktivierende Gen ist ein Enzym (β -Galactosidase 4), welches bei Zugabe seines Substrates (X-Gal) eine Blaufärbung produziert (Abb.8).

3.5.2 Durchführung

Das verwendete Matchmarker Hefe-Zwei-Hybrid-System der Firma Clontech, nutzt den Gal4-Transkriptionsfaktor in *Sacharomyces cerevisiae*. Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert über die Gal1-AD (AD = Aktivierungsdomäne) das Ablesen der Reporter-gene LacZ und His3. Es kommt zur Bildung der Transkriptionsprodukte Histidin und einem Enzym des Galaktosestoffwechsels der β -Galactosidase. Die Aktivität dieses Enzyms wird zum Nachweis der Proteininteraktion herangezogen. Das durch die Gal1-AD regulierte Gal4-Reporter-Gen beinhaltet bei dem hier verwendeten Hefestamm Y190 auch das His3-Reporter-Gen. Die Starterbox ist zweigeteilt. Der TR-Teil befindet sich unter Kontrolle der regulierenden Gal1-UAS (engl. „upstream activation sequence“) und führt somit zur Produktion von Histidin durch die Hefezelle. Diese Eigenschaft

wird zur weiteren Selektion positiver Clone genutzt. Der TC-Teil ist von der Gal1-UAS unabhängig und bewirkt eine kontinuierliche leichte Produktion von Histidin. Durch Zugabe von 3-Aminotriazol (3-AT) wird die Histidinproduktion unterdrückt.

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Zellen (z.B. Hefezellen oder Bakterien) wird als Transformation bezeichnet. Es gibt zahlreiche, an die jeweiligen Bedingungen angepasste Protokolle zu ihrer Durchführung (siehe 3.5.2.1, 3.14, 3.15).

Vor dem Screeningstart wurden Probetransformationen als Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Die leeren Vektoren pAS2-1, pACT und pGAD10 wurden als Negativkontrollen getestet. Eine Autoaktivierung oder Beeinflussung des Hefewachstums konnte ausgeschlossen werden. Die Positivkontrolle erfolgte mit pVA3-1 (DNA-BD und p53 Antigen in pAS2-1) und pTD1 (DNA-AD und SV40-large-T-Antigen in pACT2).

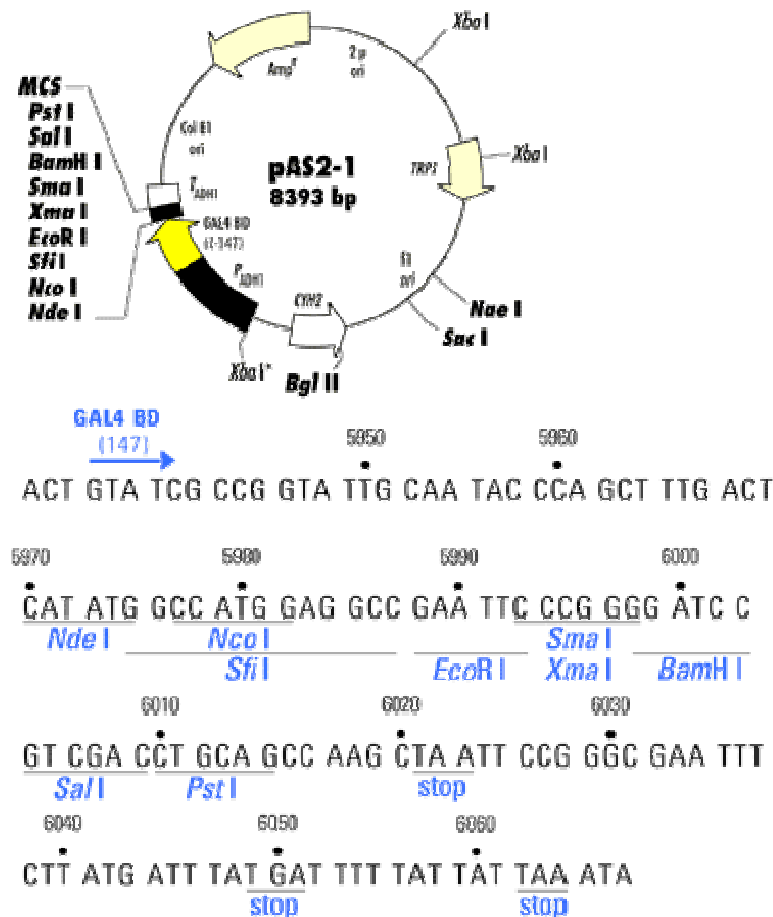


Abb. 9:

Plasmid-Karte und Übersicht der multiplen Klonierungsstellen von pAS2-1

pAS2-1 wird zur Konstruktion eines Hybridproteins mit der DNA-BD (AS 1-147) genutzt. Das interessierende Protein kann in eine der multiplen Klonierungsstellen geklont werden. BamH-I, EcoR-I, Nco-I, Nde-I, Sal-I, Pst-I, Sfi-I und Xma-I kennzeichnen die Schnittstellen für diese Restriktionsendonucleasen, Stop = Stoppcodon. GAL4BD = GAL4-DNA-Bindungsdomäne, Amp^r = Gen für die Ampicillin-Resistenz, MCS = multiple Klonierungsstellen [Clontech].

Die Aminosäuren 1-199 der cDNA von p27^{Kip1} wurden als BamHI-Fragment in korrekter Orientierung („in frame“, N-Terminus) mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne in den Vektor pAS2-1 kloniert (siehe 3.11) und fungierten als sogenannter Köder (engl. „bait“). Der Vector trägt das Wildtyp-CYH.s2-Gen (CYH2) für die Cycloheximidsensibilität, das Reporter-gen für Tryptophan (TRP1) und die ersten 147 Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne (Abb.9).

Als sogenannte Beute (engl. „prey“) wurden 2µl einer randomisierten cDNA-Datenbank des humanen Herzens (HL4013AB, Clontech) gebunden an die GAL4-Aktivierungsdomäne in den Vektor pGAD10 kloniert (siehe 3.11). Der Vektor trägt das Amp^r-Gen für die Ampicillin Resistenz in E. coli und das Gen für die Aminosäure Leucin (Leu2), welches den Leucin auxotrophen Hefen erlaubt auf Leucin freiem Medium zu wachsen (Abb. 10) und der weiteren Selektion dient.

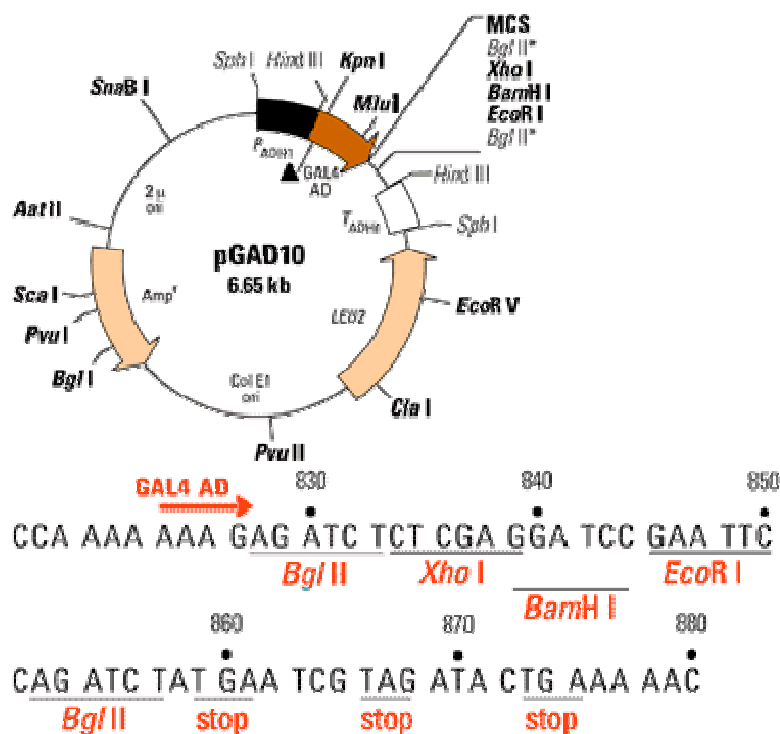


Abb. 10:

Plasmid-Karte und Übersicht der multiplen Klonierungsstellen von pGAD10, es wird für die Konstruktion eines Hybridproteins mit der GAL4-AD (AS 768-881) genutzt. BamH-I, EcoR-I, EcoR-I etc. kennzeichnen die Schnittstellen für diese Restriktionsendonucleasen, Amp^r = Gen für die Ampicillin-Resistenz, GAL4-AD = GAL4-Aktivierungsdomäne, LEU2 = Gen für Leucin, MCS = multiple Klonierungsstellen [Clontech].

Die Co-Transformation von Y190-Hefezellen mit pAS2-1 und pGAD10 wurde mit der modifizierten Clontech Standard-LiAc-Transformation durchgeführt. (siehe 3.5.2.1). Das

Medium zur Kultivierung der transformierten Hefezellen enthielt weder Histidin noch Leucin, noch Tryptophan. Somit konnten nur Zellen wachsen, welche beide Plasmide enthielten. Das His3-Gen führt bei Fehlen von Histidin im Medium zur weiteren Selektion positiver Klone mit Proteininteraktion. Mit dem Filterlift Essay (siehe 3.5.2.2) wurden die 5 Tage gewachsenen Kolonien auf eine Proteininteraktion getestet. Positive Kolonien färben sich durch Bildung von β -Galaktosidase blau und wurden einer zusätzlichen Selektion durch Cycloheximid unterzogen. Der Hefestamm Y190 ist durch das CYHr2-Gen resistent gegen Cycloheximid. Diese Eigenschaft wird zur Segregation des Köderplasmids genutzt. Das dominante Wildtyp-CYHs2-Gen in pAS2-1 führt zu einer Cycloheximid-Sensibilität der transformierten Hefezellen. Durch den Selektionsdruck wird das Köder-Plasmid spontan eliminiert. Die Isolation der Plasmide erfolgte wie unter 3.5.2.3 beschrieben. Anschließend wurden die Plasmide in den E.coli Stamm HB101, welcher durch die LeuB6-Mutation Leucin auxotroph ist, transformiert (siehe 3.14). Ein Wachstum auf Leucin freiem Medium war somit nur für die HB101 möglich, welche die sogenannten Beuteplasmide (pGAD10) mit dem Leucin-Gen enthielten. Die Plasmidisolation aus den Bakterien erfolgte wie unter 3.16 beschrieben. Anschließend wurde der Restriktionsverdau mit EcoRI durchgeführt (siehe 3.10) und die Klone mit Insert per Agarosegelelektrophorese (siehe 3.12) identifiziert. Die positiven Klone wurden in DH5 α transformiert (3.15) und nach Plasmidisolation sequenziert (siehe 3.5.2.4).

3.5.2.1 Modifizierte LiAc-Transformation der Plasmide in Hefezellen

Für eine Übernachtskultur wurden 1-2 Kolonien (> 2mm) des Hefestammes Y190 in 50 ml YPD mit 100 μ l Ampicillin bei 200 U/min und 30°C kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in 300 ml YPD (+600 μ l Ampicillin) überführt und unter den genannten Bedingungen für 3-4 Stunden bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Verteilt in 50 ml Falcon-Röhrchen wurde zweimal bei Raumtemperatur (RT) und 2000 U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurden die Zellen in je 1,5 ml TE/LiAc resuspendiert und wieder 5min zentrifugiert (2000 U/min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 6ml TE/LiAc resuspendiert. Je 500 μ l DNA-BD, DNA-AD und 500 μ l (5mg) Hering Sperma wurden in einen 500 ml Glaskolben gegeben. 6 ml TE/LiAc-Zellsuspension wurde in den Kolben überführt, mit 36 ml PEG/LiAc-Lösung vermischt und für 30 min bei 200 U/min und 30°C inkubiert. Anschließend wurden 700 μ l DMSO hinzugefügt und für 15 min bei 42 °C im Wasserbad der Hitzeschock durchgeführt. Nach Abkühlen auf Eis für 5 min und Überführung der Lösung in 50

ml Falcon-Röhrchen sowie Zentrifugation (13000 U/min, 20 sec) wurden die entstandenen Zellpellets in 1,5 ml 1xTE resuspendiert. Die Ausplattierung von je 100µl Zellsuspension erfolgte auf eine 15cm² große SD/His-/Leu-/Trp-/AT3-Agarplatte (Agar⁽⁻⁾). Die Inkubation wurde für 4 Tage bei 30 °C durchgeführt. Das Filterliftverfahren erfolgte bei adäquatem Koloniewachstum.

3.5.2.2 Koloniefilterliftverfahren

Die Agarplatten sollten möglichst vereinzelte Kolonien mit einer Größe von 2-3 mm Durchmesser aufweisen. Die sauberen trockenen Filter wurden vorsichtig aufgedrückt und zur späteren Orientierung und Identifizierung der positiven Kolonien an drei Seiten mit Nadelstichen markiert (Abb. 11). Mit einer Pinzette wurde der Filter mit den anhaftenden Kolonien vorsichtig geliftet und für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, wodurch die Hefekolonien auf dem Filterpapier fixiert und gleichzeitig permeabilisiert wurden. Die luftgetrockneten Filter wurden dann in Schalen mit der Kolonieseite nach unten auf einen mit 4ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten sterilen Whatman Filter gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass eine vollständige Benetzung ohne Luftblasen stattfand. Die Inkubation bei 30°C erfolgte für maximal 8 Stunden bzw. bis zum Entstehen von blauen Kolonien (Abb. 11). Die Filter wurden getrocknet, die positiven Klone identifiziert und mit einer sterilen Öse von den Platten gepickt. Die gewonnenen Klone wurden in Medium überführt und weiter kultiviert.

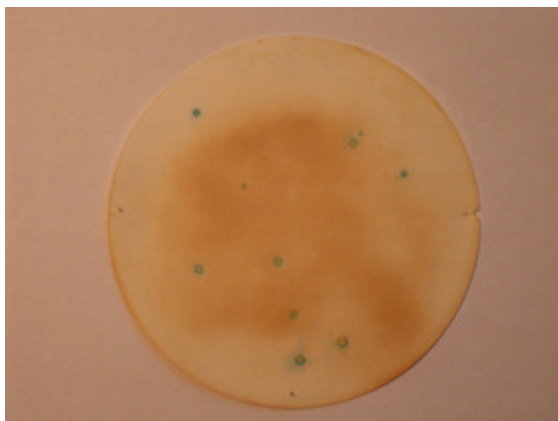


Abb. 11

Koloniefilterliftverfahren, blaue Kolonien zeigen die Aktivierung des LacZ-Reportergens und somit eine Bindung der Hybridproteine an. Bei 3, 6 und 9 Uhr finden sich die Stichmarkierungen am Filter, welche mit denen der Agarplatte korrespondieren.

3.5.2.3 Plasmidisolierung aus Hefezellen

Gut isolierte positive Klone wurden in je 5 ml Selektivmedium (SD/-Leu/-Trp/-His/+2 mM 3AT) inokuliert. Die Übernachtskultur (250 U/min, 30°C) wurde anschließend zentrifugiert (1000 x g, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet im verbliebenen Medium resuspendiert. In einem 1,5 ml Eppendorf Probebehälter wurde die Zellsuspension mit 0,2 ml Hefezellen-Lyse-Lösung, 0,2 ml Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1) sowie 0,3 g säuregewaschenen Glaskügelchen gegeben und jedes Röhrchen gevortext (2 min). Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte nach Zentrifugation (13000 U/min, 10 min) aus dem Überstand. Die Proben wurden in 500 µl 96%igen Ethanol für 30 min bei -20°C abgekühlt und noch einmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl 0,1 M Tris-Puffer aufgenommen.

3.5.2.4 Sequenzierung

Die Beuteproteine aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden mit dem „BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Abiprism, Perkin Elmer) anhand der Empfehlungen des Herstellers und in Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft von Priv.-Doz. Dr. med. Martin Bergmann sequenziert.

3.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium unter Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin. Anschließend wurden diese auf Agarplatten, welche im Abstand von 6 Wochen überimpft wurden, gehalten. In LB-Medium mit 10% Glycerin wurden die Bakterien zur Langzeitlagerung mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Bezeichnung „Kompetente Bakterien“ beruht auf ihrer Eigenschaft kleine Mengen Plasmid-DNA aufzunehmen. Sie wurden nach der Methode von Chung und Miller [94] hergestellt. Für eine Übernachtskultur sind 50 ml LB-Medium mit Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,02 beimpft worden. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C inkubiert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000

x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 25 ml eiskaltem TSS-Puffer aufgenommen. Nach 10 min Lagerung auf Eis wurden die Bakterien in 100 µl-Aliquots durch Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die so vorbehandelten Zellen konnten zur Transformation verwendet werden.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die *in vitro* Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) eingesetzt (Mullis, 1983). Hierfür wurde die hitzestabile Taq-Polymerase verwendet, welche ursprünglich aus dem thermophilen in heißen Quellen lebenden gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* („Taq“) stammt. Die Länge der synthetisierten DNA-Abschnitte beträgt hier bis zu 10 kbp, was erheblich kürzer als die chromosomale DNA einer eukaryonten Zelle ist, aber für die hier benötigten DNA-Längen ausreicht. Die codierende Sequenz von p27^{KIP1} hat z.B. eine Länge von 600bp. Durch die Nutzung der bei den Zyklen entstehenden DNA-Kopien (cDNA) erfolgt eine exponentielle Vermehrung der cDNA. Nach 22 PCR-Zyklen liegen 2²² cDNA-Moleküle vor. Neben der zu vervielfältigenden DNA und der Taq-Polymerase wurden zwei sogenannte Primer benötigt. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, welche den Startpunkt der DNA-Synthese sowohl vom 5'-Ende in „sense“-Orientierung (komplementär zur codierten Sequenz) als auch vom 3'-Ende in „antisense“-Orientierung (revers komplementär) definieren. Die Primer sind in der Regel ca. 20 Nukleotiden lang und sollten einen GC-Anteil (Guanin-Cytosin) von 50 bis max. 60% sowie eine ähnliche Schmelztemperatur haben. Die Primer wurden u.a. von der Firma BioTeZ GmbH in Berlin-Buch geordert. Weiterhin wurden Desoxynukleotide (dNTPs) als Bausteine der DNA benötigt. Ein typischer Ansatz von 50 µl bestand aus 2 µl Original-DNA (variabel 10 – 100 ng/µl), 5 µl 10-fach konzentriertem cDNA-Reaktionspuffer, je 1 µl 3'- und 5'-Primer (10 µM), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 µl „Advantage[®] cDNA Polymerase Mix“ (Clontech) und 39 µl sterilem pyrogenfreien PCR-geeigneten bidestillierten H₂O. Im PCR-Thermocycler (Mastercycler EP Realplex, Eppendorf) erfolgte zunächst die Denaturierung der DNA bzw. das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen auf 94°C für 30 sec. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur abhängig vom Primer (ca. 5°C unter der Schmelztemperatur) für 30 sec. auf z.B. 60°C zur Anlagerung derselben („annealing“) an die DNA-Einzelstränge gesenkt. Es folgte die Synthese der cDNA durch die thermostabile Taq-Polymerase („extension“) beim

Temperaturoptimum von 68°C für 5 min. Diese Schritte wurden 22 mal wiederholt und abschließend erfolgte die Kühlung auf 4°C.

Die Analyse der DNA erfolgte anschließend mit der im Folgenden beschriebenen Agarosegelelektrophorese.

3.9 Quantitative PCR gekoppelt mit Reverser Transcription

Die mRNA-Analyse wurde nach den Anwendungsprotokollen unter Einsatz der RT-PCR (Superscript III, Invitrogen) und der „real time PCR“ (SYBR Green, Qiagen) auf einem Mastercycler EP Realplex (Eppendorf) durchgeführt. Hierfür wurde pro Reaktion 1µg totale RNA von isolierten kultivierten Kardiomyozyten bzw. vom linken Ventrikel (Apex) von drei Mäusen mit dem gleichen Genotyp und den gleichen experimentellen Konditionen verwendet.

Die Isolation der RNA erfolgte nach der Bedienungsanleitung des TRIzol-Reagenz (Invitrogen).

Es wurden folgende Primer verwendet: ANF sense: 5'-CATCACCCCTGGGCTTCTTCCT-3',

ANF antisense: 5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'; BNP sense: 5'-GCGGCATGGATCTCCTGAAGG-3', BNP antisense: 5'-CCCAGGCAG

AGTCAGAAACTG-3'; α -MHC sense: 5'-CCAATGAGTACCGCGTGAA-3',

α -MHC antisense: 5'-ACAGTCATGCCGGGATGAT-3', β -MHC sense: 5'-ATGTGCCGGACCTTGAA-3', β -MHC antisense: 5'-CCTCGGG

TTAGCTGAGAGATCA-3'; GAPDH sense: 5'-ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3',

GAPDH antisense: 5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3'.

Die quantitative mRNA-Expression von CK2 α' und p27 in RNA-Interferenz transduzierten Kardiomyozyten wurde mit den folgenden Primern bestimmt: CK2 α' sense: 5'-CACACCATCTTCCCTCCATT-3', CK2 α' antisense: 5'-ACTTCTTTGCCATCGCATTC-3'. p27 sense: 5'-AGGAGAGCTTGGA TGTCAGC-3', p27 antisense: 5'-TCTGACGAGTCAGGCATTTG-3'.

3.10 Plasmid-DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen. Das sind Enzyme, welche ursprünglich unter anderem aus Bakterien, Bakteriophagen oder Viren stammen und als Schutzmechanismus gegen fremde DNA wirken, in dem sie spezifische Nukleotidsequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und schneiden. Dabei entstehen entweder glatte Enden („blunt

ends“) oder überhängende 5'-Phosphat- bzw. 3'-Hydroxyl-Enden („sticky ends“). Die Durchführung erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers (New England BioLabs). Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37°C. Die termoinstabilen Restriktionsendonukleasen wurden abschließend durch Inkubation bei 65°C für 20 min inaktiviert. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte zur Analyse der Agarosegelelektrophorese zugeführt.

3.11 Ligation von cDNA in Vektor-Plasmide

Für die Ligation von cDNA in Vektor-Plasmide wurde die T4-DNA-Ligase (Promega) verwendet. Diese katalysiert die Verbindung von zwei DNA-Strängen zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxyl-Gruppe. Hierbei können sowohl glatte als auch überhängende komplementäre Enden ligiert werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und bei 4°C über Nacht. An der cDNA-Fragmentgröße („insert“) orientierend wurde diese in relativem Überschuss zur Größe des Plasmids zugegeben. Ein typischer Ligationsansatz enthielt 2 µl (100 ng) Vektor-Plasmid, 4 µl (50 ng) Insert, 2 µl Ligase 10fach Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und 11 µl bidestilliertes nukleasefreies H₂O.

3.12 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von linearen DNA-Fragmenten zwischen 0,25 und 25 kb (Kilobasen) kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese erfolgen. Hierbei wandern die Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell im angelegten Gleichspannungsfeld. Es wurden entsprechend der Fragmentgröße Gele zwischen 0,8 % (w/v, große DNA) und 2 % (kleine DNA) verwendet. Hierfür wurden die Agarose (10g/l für ein 1%iges Gel) in 1xTAE Puffer durch Kochen gelöst und nach dem Abkühlen auf 50° C in Gelkammern gegossen. Die Geltaschenausparung erfolgte mit einem entsprechenden Kamm während des Abkühlens. Die Elektrophoresekammern wurden nach dem Erstarren der Gele mit 1xTAE Puffer gefüllt. Die Spannung wurde der Gelgröße angepasst (10 V/cm) und lag zwischen 70 und 90 Volt. In der Regel wurden 5 µl Probe mit 2 µl Orange-G pro Geltasche pipettiert. Ein Molekulargewichtsmarker (1 kb „DNA Ladder“, Gibco) wurde zur Größenbestimmung ebenfalls aufgetragen. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) auf einem UV-Transilluminator (Carl Roth) bei $\lambda = 366\text{nm}$. Das Ethidiumbromid

interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. Das E.A.S.Y-System von Herolabs wurde als Geldokumentationssystem verwendet.

3.13 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Nach der Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell knapp aus dem Gel geschnitten, in ein Eppendorf Probehälter verbracht und mit dem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die Gel-Stücke wurden 1:3 (100 mg Gel = 300 µl Puffer) in Puffer QG aufgenommen und 10 min, bzw. bis das Gel vollständig gelöst war, bei 50° C inkubiert. Hierbei sollte die Farbe der Lösung als Indikator für den richtigen pH-Wert gelb sein. Grundlegend ist die Bindung der DNA an eine Silicagel-Membran unter Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die Verunreinigungen binden nicht und werden durch Waschen mit ethanolhaltigem Puffer PE entfernt. Die DNA wird anschließend in sterilem H₂O bidest eluiert.

3.14 Transformation von kompetenten E.coli HB 101 mit Hefepiasmid

100 µl kompetente E.coli HB101 und 20 µl Plasmid-DNA wurden für 3 h unter wiederholtem Mischen durch vorsichtiges Fingertippen auf Eis inkubiert, anschließend für 60 sec im heißen Wasserbad (42°C) erhitzt und erneut für 5 min auf Eis gekühlt. Die Ausplattierung auf HB101-Selektivagar erfolgte nach Zugabe von 400 µl 10%igem 10x SD -Leu Medium mit 5% Glucose und Inkubation für 1 h bei 220 U/min und 37°C.

3.15 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

In auf Eis stehenden Eppendorf Probehältern (1,5 ml) wurden 1 - 2 µl (1 µg/µl) Plasmid-DNA mit je 100 µl kompetenten E.coli (z.B. DH5α) versetzt und für 30 min unter mehrmaligem Vermischen durch vorsichtiges Fingertippen inkubiert und anschließend für 1,15 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt und die Probenbehälter erneut für 5 min auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 900µl LB-Medium ohne Ampicillin und Inkubation für 1 h bei 200 U/min und 37°C wurden nach Pelletbildung durch Zentrifugation 800µl Überstand abgenommen, das Pellet im Rest der Flüssigkeit resuspendiert und auf 9 cm LB+Ampicillin-Platten ausplattiert.

3.16 Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das MaxiPrep-Kit der Firma Qiagen genutzt. Hierbei wurden 200 ml einer Übernachtskultur von plasmidhaltigen Bakterien auf Eis abgekühlt, bei 4000 U/min in einem JA14-Rotor sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte in 10 ml Puffer P2 für 5 min bei RT durch vorsichtiges Invertieren. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und die Bakterien 20 min auf Eis inkubiert. Die Trennung des klaren plasmidhaltigen Überstandes vom Detritus erfolgte für 30 min bei 4°C und 14500 U/min in einem JA17-Rotor. Der Überstand wurde mit 60 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, in Ethanol (70%) gewaschen und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Ausbeute lag bei durchschnittlich 300 bis 400 µg.

3.17 Spektralphotometrische Messung

Reinheit und Konzentration von DNA-Lösungen wurden in einem Spektralphotometer (Beckman DU-600) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (DNA, RNA) sowie $\lambda = 280$ nm (Protein) bestimmt. Die Quarzküvetten hatten eine Schichtdicke von 1 cm. Eine OD₂₆₀-Einheit (= A₂₆₀, Menge die in 1 ml Wasser gelöst einen Absorbationswert von 1,0 erzeugt) entspricht 30 bis 35 µg einer ssDNA (ss = „single strand“, Einzelstrang), 50 µg einer dsDNA („double strand“, Doppelstrang) oder 40 µg ssRNA. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.18 Zielgerichtete Mutagenese

3.18.1 Herstellung rekombinanter Proteine

Die cDNAs von CK2 α' , CK2 β und der kinaseinaktiven Mutante kd.CK2 α' wurden freundlicherweise von Prof. David Litchfield (University of Western Ontario, Canada) zu Verfügung gestellt. Bei der gesetzlichen Überwachung von gentechnischen Arbeiten (§25 Gentechnikgesetz) werden Escherichia coli-Stämme (E.coli) sogenannten Sicherheitsstämmen zugeordnet. Pathogene E.coli Stämme gehören der Risikogruppe 2 an. B-Stämme wurden als

Sicherheitsstämme anerkannt und der Risikogruppe 1 zugeordnet. Neben dem E.coli-B-Wildtyp gehören dazu die Expressionsstämme BL21 und BL21(DE3)pLysS, welche häufig in der Forschung Verwendung finden. Der Protease defiziente (OmpT-, Lon-Proteasen) BL21(DE3)pLysS (Promega) wird für die induzierte Proteinüberexpression mit Vektoren, welche unter der Kontrolle des T7-Promotors (z.B. pRSET) stehen, verwendet. Der Stamm enthält das Gen 1 des T7-Bacteriophagen (λ -Phage DE), welches für die T7-RNA-Polymerase codiert und durch den lacUV5-Promotor kontrolliert wird. Weiterhin wird das T7-Lysozym (pLysS) in normalen Mengen exprimiert, welches an die T7-RNA-Polymerase bindet und diese inhibiert. Das hilft die Hintergrundexpression der Zielgene zu unterdrücken. Die Zugabe von IPTG, welches für die Bakterien ein nichtmetabolisierbares synthetisches Lactose-Analogon ist und den LacR-Repressor inaktiviert, löst eine Überexpression des Gens aus und hebt damit effizient die Inhibition durch T7-Lysozym auf.

Die zellfreie Herstellung von Proteinen durch *in vitro* Translation wurde mit dem TNT[®] T7-gekoppelten Retikulozyten-Lysat-System („TNT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“, Promega) nach den Maßgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 2 μ l DNA im Vector pcDNA3.1/pTrc eingesetzt. Für die radioaktive Markierung der Proteine wurden 2 μ l [β -³⁵S]-Methionin (37 TBq/mmol) eingesetzt. Aliquote wurden einer SDS-PAGE zugeführt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und autoradiographiert. Die Menge der inkorporierten radioaktiven Markierung wurde mit einem Phosphorimager-Lesegerät detektiert und mit der Software TINA (Raytest) quantifiziert.

Die Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte durch Transformation von kompetenten E.coli BL21 oder BL21(DE3)pLysS (Promega) mit pGEX-2 λ T (GE Healthcare), für die Generierung von N-terminalen GST-Fusionsproteinen, oder pRSET-C (Gabe von Manfred Gossen, MDC Berlin) für die Erzeugung von Proteinen fusioniert mit N-terminalem Hexahistidin-Etikett („His₍₆₎-tag“), welche für wt.CK2 α ’, CK2 β , wt.p27 bzw. die verschiedenen Mutanten von p27 codierten. Die genannten N-terminalen Etiketten („tags“) erlauben die Aufreinigung und Detektion der so erzeugten Proteine. Die Expression der Proteine im pGEX-2 λ T-Vektor erfolgte als Fusionsprotein mit der 26 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST). Das GST-Gen unterliegt der Kontrolle des tac-Promotors. Dieser ist ein Hybridpromotor aus dem E.coli trp-Promotor und dem lac-Promotor, welcher durch Lactose und das nicht metabolisierbare Lactoseanalogon IPTG reguliert werden kann (de Boer, 1983).

Für die Generierung der rekombinanten Proteine wurden 5ml einer Übernachtskultur von transformierten BL21 in 100ml LB-Medium unter Zusatz von 50µl/ml Ampicillin bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 inkubiert und mit 500µl IPTG induziert. Nach Verdreifachung der OD durch weitere Inkubation erfolgte die Zentrifugation mit 3000g bei 4°C für 10min. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Pellets bei 4°C für 20min mit 2ml NETN-Puffer unter Zusatz von 10% (v/v) Glycerol, 1,0 mM DTT, 1,0 mM PMSF, 1,0 mg/ml Lysozym und 50 U/ml Desoxyribonuclease-1 versetzt. Die Aufschließung der Bakterienzellen zur Proteingewinnung durch Ultraschall-Homogenisierung erfolgte mit dem Homogenisator Sonoplus HD70 (Bachhofer, Reutlingen) für 1min bei 4 °C auf Stufe 10 mit einer Stärke von 60%. Die anschließende Zentrifugation wurde mit 18000 x g für 30 min bei 4°C durchgeführt.

Die Mutation der Aminosäuren S83 und oder T187 von p27, welche zur Produktion der p27-Mutanten p27.S83A, p27.T187A, p27.S83A/T187A (genannt p27ΔPi), und der phosphorimmitierenden Mutante p27.S83D/T187D notwendig war, erfolgte anhand des Benutzerhandbuches mit Hilfe des „QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene). Die längenveränderten Mutanten von p27 (Abb. 13c) mit N-terminalem Hexahistidin-Etikett zur Proteinerkennung wurden in pEXP2 (Invitrogen) erzeugt.

Die für RNA-Interferenz resistenten Mutanten von CK2α' und p27 wurden mit dem mit dem zielgerichteten Mutagenese Kit („Site-Directed Mutagenesis Kit“, Stratagene) und den folgenden Oligonucleotide-Sequenzen generiert:

SR.CK2α' sense: 5'-AATACAGTCCTGTCTAGCGGC-3'

SR.CK2α' antisense: 5'-GCCGCTAGACAGGACTGTATT-3',

SR.p27ΔPi sense: 5'-ACTGATCATCCAAATCCCTCA-3',

SR.p27ΔPi antisense: 5'-TGAGGGATTTGGATGATCAGT-3'.

3.18.2 Herstellung der TAT-Fusionsproteine

Für die effiziente Proteintransduktion, also die selbstständige Aufnahme von rekombinanten Proteinen durch die Zelle, wurden die TAT-konjugierten Proteine CK2α', kd.CK2α', wt.p27, p27.S83D/T187D, p27.S83A/T187A und p27ΔC im auf pRSET basierenden pTAT-Vektor (Gabe von S. Dowdy, Howard Hughes Medical Institute, La Jolla, USA), welcher die N-terminale HIV-1-TAT Proteintransduktionsdomäne sowie ein Histidin-Etikett enthält, generiert [100]. Mit Hilfe von TAT-Fusionsproteinen können 100% der interessierenden Zellen

konzentrationsabhängig, aber unabhängig von Rezeptoren und Transporter transduziert werden [122]. Im Gegensatz zur viralen Überexpression kann auf diese Weise die Menge der transduzierten Proteine genau kontrolliert werden.

Für die zytoplasmatische Lokalisierung von TAT-CK2 α' und TAT-p27 wurde zwischen dem N-terminalen TAT und der entsprechenden cDNA das starke nukleäre Exportsignal (NES „nuclear export sequence“) des HIV1-Retrovirus (LPPLERLTL), wie beschrieben, eingeschoben [101]. Hierfür wurden die folgenden PCR-Primer verwendet (die „NES“ ist unterstrichen):

CK2 α' sense: 5'-CGCGGTACCCTGCCCCCTGGAAAG

ACTGACCCTGATGCCCGGCCCGCCGCGGGCAGCAGGGCCC-3',

CK2 α' antisense: 5'-CCGGCATGCTCATCGTGCTGCCGTGAGACCACTGGAA-3'

p27 sense: 5'-CGCCTCGAGCTGCCCCCTGGAAA

GACTGACCCTGATGTCAAACGTGCGAGTGTCTAACGGGAGCCC-3',

p27 antisense: 5'-CCGGCATGCTTACGTTTGACGTCTTCTGAGGCC-3'.

TAT.p27 Δ C antisense: 5'-CGGGCATGCTTACTCGGGCAAGCTGCCCTTCTCCACCTC-3'.

Das C-terminale nukleäre Lokalisierungssignal in den TAT-p27-Konstrukten wurde nach Bedienungsanleitung mit dem zielgerichteten Mutagenese Kit („Site-Directed Mutagenesis Kit“) von Stratagene und den folgenden Oligonucleotiden mutiert (R166A) [121]:

sense (komplementär):

5'-GACGATTCTTCTACTCAAACAAA(G/A)GAGCCAACAGAACAGAA-3',

antisense (reverse komplementär):

5'-TTCTGTTCTGTTGGCTC(C/T)TTTGTTTTGAGTAGAAGAATCGTC-3'.

Nach Transfektion und Induktion (s.o.) von E.coli BL21(DE3)pLysS (Promega) wurden die durch Zentrifugation (2000 U/min, 5 min, RT) gewonnenen Pellets (Nassgewicht von 30 – 40g) einer 5 Liter Übernachtskultur in 8 M Urea-Puffer (100ml), 10 mM PMSF, 15 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 8.0 lysiert und anschließend 6 mal für 60 s auf Eis sonifiziert (Polytron Homogenisierer). Nach Zentrifugation (12000 U/min) wurde der klare Überstand zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie auf Ni-NTA-Säulen (12ml, GE Healthcare) gegeben, welche an eine FLPC (ÄKTA, GE Healthcare, RT) angeschlossen war. Die mit dem Hexahistidin-Etikett versehenen Proteine binden an das im Chelatkomplex Nitrilotriacetat (NTA) fixierte Nickel-Ion und können auf diese Weise aus der Lösung gebunden werden. Die TAT-Fusionsproteine wurden dann mit Z-Buffer (enthält 500 mM Imidazol) gelöst und zur weiteren Separation einer Ionenaustauschchromatographie zugeführt. Dabei wurden für die TAT-p27-Proteine Mono R 5/10 Säulen (GE Healthcare) und für TAT-CK2 α' und TAT-kd.CK2 α' Mono

Q Säulen (GE Healthcare) verwendet. Die gereinigten TAT-Fusionsproteine wurden anschließend einmal mit 2 M NaCl gelöst und entsalzt (G-25 Säule, GE Healthcare) in Zellkulturmedium (für *in vitro* Experimente) oder in Salzlösung mit 10% (v/v) Glycerol aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

3.19 Lentivirale RNA-Konstrukte und RNA-Interferenz

Lentiviren sind eine Gattung von Retroviren mit deren Hilfe virale Vektoren für die Transfektion von Zellen konstruiert werden können. In dieser Arbeit wurden lentivirale Konstrukte für die RNA-Interferenz („Silencing“) geschaffen. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Unterdrückung der Genexpression auf RNA-Ebene. Die mRNA der Zielgene wird durch kleine RNA-Fragmente von ca. 21 - 28 Nucleotiden (siRNA = „small interfering RNA“) komplementär an den RISC-Proteinkomplex („RNA-Induced-Silencing-Complex“) gebunden, durch dessen Helicase entwunden sowie Nuklease gespalten und durch intracelluläre Nukleasen abgebaut.

Somit wird die Expression des Zielproteins unterdrückt. Auch doppelsträngige shRNA („short hairpin RNA“), welche eine einseitige Schleife zwischen sense- und antisense-Strang aufweisen, wurden verwendet. Diese werden intrazellulär durch das Enzym Dicer in siRNA gespalten.

Die siRNA-Konstrukte wurden mit Hilfe der siRNA-Suchmaschinen auf den Webseiten von Ambion (www.ambion.com) und Dharmacon (www.dharmacon.com) entwickelt.

Um sicherzustellen, dass die ausgewählte siRNA nur das gewünschte Zielgen ausschalten und eine Überlappung der nichtinterferierenden Kontroll-shRNA auszuschließen, wurden alle Sequenzen mit der Suchmaschine „BLAST“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) gegen das Genom von Ratte und Maus geprüft.

Für die Herstellung von shRNA-Lentiviren wurde das pLenti6/Block-iTTM-DEST RNAi Gateway[®] Kit (Invitrogen) nach Bedienungsanleitung verwendet. Die folgenden Oligonucleotidsequenzen der Ratte in sense-Orientierung wurden eingesetzt:

p27 (Genbank D86924): 5'-ACCGAGCACCCCAAGCCTT-3';

CK2 α' (L15618): 5'-AACACCGTGCTTCCAGTGGT-3';

siControl (Kontrolle ohne Ziel-RNA): 5'-AGACACACGCACTCGTCTC-3'.

Für die homologe Rekombination wurden HEK293FT-Zellen (Invitrogen) verwendet und nach Bedienungsanleitung kultiviert. Die lentiviralen Überstände wurden durch PEG-Prezipitation (20% w/v Polyethylenglykol 6000 in PBS) 100-fach konzentriert. Der Virustiter wurde durch

indirekte Immunfluoreszenz der Humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 (CCL-121, Firma ATCC, Manassas, USA) mit dem Anti-HIV-1 p24 Antikörper (Abcam) bestimmt. Die Kardiomyozyten wurden sequentiell 12 h und 24 h nach Isolierung lentiviral (100 pfu/Zelle, „plaque-forming unit“) in Gegenwart von 4µg/ml PolybreneTM (Sigma), welches als Polykation die Bindung zwischen pseudoviralem Capsid und der Zellmembran verstärkt, transduziert.

3.20 Kultivierung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden nach der leicht modifizierten Methode von Simpson und Mitarbeitern isoliert [95]. Es wurden alle Richtlinien zur experimentellen Arbeit mit Tieren eingehalten.

Drei Tage alte neonatale Wistar-Ratten wurden mit der scharfen chirurgischen Schere dekapitiert. Der Brustkorb wurde leicht rechts paramedian aufgeschnitten, während die Tiere mit dem Rücken nach unten und den Vorderläufen nach hinten, zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert wurden. Auf diese Weise und mit leichtem Mittelfinger-Druck auf den Rücken trat das Herz aus dem Brustkorb hervor und konnte mit der Pinzette entnommen werden. Es folgte der Transfer in 20 ml eiskalte autoclavierte PBS-Lösung mit 5 mM sterilfiltrierter Glucose. Von hier an wurde die Präparation auf Eis durchgeführt. Mit Pinzette und Skalpell wurden nun die Vorhöfe von den Kammern getrennt und verworfen. Die Ventrikel wurden anschließend mehrfach mit frischer PBS-Glucose-Lösung gewaschen und mit dem Skalpell fein zerkleinert. Das so vorbereitete Gewebe wurde in ein autoclaviertes Zentrifugenglas mit Rührstäbchen überführt und mit 20 ml (< 50 Herzen) bzw. 30 ml (> 50 Herzen) Verdauungspuffer bei 37°C mit 300 U/min für 5 min inkubiert.

Nach Sedimentierung wurde der Überstand zunächst verworfen und der Verdau mindestens dreimal für jeweils 10 min wiederholt, bis nur noch helles Gewebe übrig blieb. Um den Verdau zu stoppen, wurden die Überstände mit eiskaltem FCS (10% v/v) abgestoppt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die gewonnenen Zellen in Kardiomyozytenmedium mit FCS (10% v/v) aufgenommen. Zur selektiven Anreicherung von Kardiomyozyten folgte die zweimalige sogenannte Voraussaat für jeweils 1 Stunde in Zellkulturschalen im Inkubator. Da sich diese langsamer als andere Zelltypen an der Kulturschale fixieren, können die kardiomyozytenreichen Überstände separiert werden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (330 x g, 5 min, 4°C) wurden sie gezählt, in Kardiomyozytenmedium aufgenommen und auf vorbehandelte 10 cm

Zellkulturschalen ausgesät ($5 - 6 \times 10^4$ Zellen pro cm^2). Für Immunfluoreszenz wurden runde Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser und $3 - 4 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 eingesetzt. Die Kulturschalen wurden zuvor viermal mit Kollagen-I Lösung besprüht. Nach jeder Beschichtung wurde die Trocknung abgewartet. Die beschichteten Zellkulturschalen wurden anschließend 20 min unter UV-Bestrahlung sterilisiert. Nach der Voraussaat wurden die Kardiomyozyten zur Inhibition des Wachstums von Nichtkardiomyozyten für 36 Stunden in Gegenwart von $25 \mu\text{M}$ Arabinosyl-Cytosin (Ara-C) und 5% (v/v) Pferdeserum inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in einem Begasungsbrutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 bei 37°C .

3.21 Morphometrische Untersuchungen der Herzen, Immunhistochemie und Apoptose-Nachweis

Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte in Kulturmedium ohne BSA mit Angiotensin II. Weiterhin wurden männliche alterssynchronisierte wt-C57BL/6- und $p27^{-/-}$ -Mäuse (5-8 Wochen alt, 18-22 g) für die Hypertrophie-Studien genutzt. Angiotensin wurde hierfür 14 Tage lang kontinuierlich subcutan in einer Konzentration von $1,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ pro Minute über eine osmotische Alzet[®]-Pumpe infundiert. Einige Tiere wurden 9 Tage nach Beginn der Angiotensin-Infusion zusätzlich für 5 Tage mit 5-Bromo-2-Desoxyuridine (BrdU) behandelt. Die BrdU-Gabe erfolgte durch intraperitoneale Injections (i.p.) mit einer Dosis von $50 \text{ mg}/\text{kg}$. Die TAT-Proteine ($10 \text{ mg}/\text{kg}$ KG) wurden einmal täglich für 14 Tage i.p. injiziert. Die Einengung der thorakalen Aorta („thoracic aortic banding“, TAB) und die Druckgradientenmessungen erfolgten wie beschrieben [109]. Die Mäuse wurden mit 1% Isofluran in 70% N_2O and 30% O_2 mittels eines üblichen Verdampfers anästhesiert. Die Körpertemperatur wurde durch einen temperaturkontrollierten Operationstisch bei 37°C gehalten. Bei zufällig ausgewählten Tieren wurde die rechte Femoralarterie mit einem PE10-Katheter für die Blutdruck- und Herzfrequenz-Messung sondiert. Die Applikation von Angiotensin steigerte den systolischen Blutdruck nicht.

Die echokardiographischen Untersuchungen der anästhesierten Mäuse wurden mit einem 12-MHz-Ultraschallkopf der Firma Acuson im zweidimensionalen Bild erstellt. M-Mode-Darstellungen wurden zur Bestimmung der linksventrikulären enddiastolischen (LVEDD) und der linksventrikulären endsystolischen (LVESD) Durchmesser sowie der Dicke des interventrikulären Septums in der Diastole (IVSD) und der Hinterwand in der Diastole (PWD) durchgeführt. Die Verkürzung des Herzens (FS „fractional shortening“) während des

Pumpvorganges wurde nach der folgenden Gleichung berechnet: $[(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$. Alle M-Mode-Darstellungen wurden durch einen Untersucher aufgenommen und analysiert, welcher die Zuordnung der Versuchstiere nicht kannte (sogenannte „verblindete“ Analyse).

Für die Gewinnung der Herzen erhielten die Mäuse 15 min vor Anästhesie 1000 IE Heparin intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Anästhesie wurde Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (5 mg/kg KG) i.p. appliziert. Der Thorax wurde geöffnet und der linke Ventrikel mit einem 23G-Butterfly (Becton Dickinson) punktiert. Die Herzen wurden durch Injektion von 0.15 ml Cadmiumchlorid (100 mM) in der Diastole zum Stillstand gebracht. Die Vena cava inferior wurde für die Drainage geöffnet.

Die Mäuse wurden manuell mit PBS und zur Fixierung mit 4%iger Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Die Herzen wurden exzidiert, Aorta und Vorhöfe entfernt und das Herzgewicht bestimmt. Die Lagerung erfolgte über Nacht in der gleichen Fixierlösung bei 4°C und bis zur weiteren Verarbeitung zur Zytoprotektion in 30%iger Saccharose-Lösung.

Transversale Querschnitte von 3 µm Dicke wurden mit Masson-Färbung für kardiale Muskelzellen gefärbt. Für die Querschnittsmessungen erfolgte die Färbung mit FITC-konjugiertem Weizenkeim Agglutinin (Sigma). Die myokardiale Fläche wurde durch Umfahrung der Außenlinie eines Kardiomyozyten und Bestimmung mittels ImageJ-Software ermittelt. Insgesamt wurden 300 Kardiomyozyten pro Schnitt für jedes Herz analysiert.

Für die BrdU-Immunohistochemie wurde die DNA durch Inkubation der Schnitte in 2N HCL für 30 min bei Raumtemperatur in Einzelstränge hydrolysiert. Die Schnitte wurden für 1 Stunde in 10%igem Ziegerserum mit 1% Triton X-100 geblockt und im Folgenden mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen BrdU (7,5 mg/ml) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen GATA4 (20µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von S-Phase-Kernen mit FITC- und die Visualisierung von GATA4 positiven Kardiomyozyten mit TRITC-kunjugierten sekundären Antikörpern. Nukleäre genomische DNA wurde mit dem Hoechst-33342-Antikörper gefärbt. Der *in situ* Nachweis von fragmentierter genomischer DNA erfolgte durch den äußerst sensitiven TUNEL-Test (engl. „*in situ* terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling“). Grundlage dieses Tests ist die Markierung der während der Apoptose in hoher Zahl entstehenden DNA-3'-OH-Enden mit Fluorescein-markiertem dUTP. Dieses ermöglicht die Detektion apoptotischer Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop oder durchflusszytometrisch (FACS). Die Anwendung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers Roche. Die proteolytische Aktivität von Caspase 3 in linksventrikulären Gewebeextrakten (20 - 30 µg Protein) wurde in Essay Puffer (50 mM HEPES

pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 20 mM DTT, 1mM EDTA, 10% Glycerol) mit Ac-DEVD-pNA als Substrat (0,2 mM), dem Caspase 3 Inhibitor Ac-DEVD-CHO (0.1 μ M) und rekombinanter Caspase 3 (30 Einheiten) mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmt. Der Umsatz des Substrats Ac-DEVD-pNA wurde über einen Reaktionszeitraum von 90 min bei OD_{405nm} gegen die Reaktionszeit in 5 min Intervallen aufgetragen. Der lineare Teil der Kurve wurde für die Berechnung der Steilheit herangezogen.

3.22 Protein-Analyse

3.22.1 Zellfraktionierung und Präparation von Zellextrakten

Für die Präparation der subzellulären Fraktionen wurde das Kit „NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Reagents assay kit“ (Pierce) unter Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren (1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 10 mM β -Glycerophosphat) und Protease- (0.6 μ M Aprotinin, 4 μ M Leupeptin, 3 μ M Pepstain, 2 mM Pefabloc) entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Komplette Zellextrakte wurden mit Zell-Lyse-Puffer (Cell Signaling) und dem Protease Inhibitor Cocktail (Roche) hergestellt. Das Herzgewebe wurde in HEPES-Puffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (20 mM HEPES pH 7.2, 25 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.2 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 10 mM β -Glycerophosphat, 1 mM NaP₂O₇, 0.1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail) und auf Eis stehend mechanisch mit dem Hand-Homogenisator aufgeschlossen, sonifiziert und bei 4°C für eine Stunde zentrifugiert (14000 x g). Der Überstand wurde mit 10% Glycerol in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.22.2 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten

Der Proteingehalt wurde mit dem „Bradford Protein Assay“ von Pierce (nach Bradford, 1976) bestimmt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet in saurer Lösung an aromatische und basische Aminosäuren (z.B. Arginin). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes wird dadurch von 465 nm auf 595 nm verschoben. Anhand von Eichkurven lassen sich so in Flüssigkeiten Proteinkonzentrationen von wenigen mg bestimmen. Als Eichkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA) in HP-Puffer dreifach bestimmt. Die jeweiligen Proteinproben wurden zweifach analysiert. In eine 96er Mikrotiterplatte wurden je Vertiefung 10 μ l verdünnte

Probe und 200 µl Reagenz pipettiert. Der Leerwert wurde durch Ersetzen der Probe mit 10 µl HP-Puffer ermittelt. Alle Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in einem automatischen Mikrotiterplattenleser bei OD_{595nm} gemessen und anschließend analysiert.

3.23 GST-Affinitätsassay

Die physischen Interaktion zwischen CK2 α' und p27 wurde *in vitro* durch ein sogenanntes „GST pull down Affinitätsassay“ verifiziert. Hierfür wurde bakterienproduziertes, also rekombinantes wt. CK2 α' , welches ein N-terminales Hexa-Histidin-Etikett („His(6)-tag“) trug, mit rekombinantem wt.p27, dass mit Glutathion-S-Transferase (GST) konjugiert war und an Glutathion-Sepharose-Kugeln immobilisiert wurde, inkubiert. Die Herstellung rekombinanter Proteine wird im Abschnitt 3.18.1 beschrieben.

Die Glutathion-Sepharose-Kugeln (100 µl je 1,5 ml Eppendorf Probenbehälter) wurden bei 4°C für 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der 20%ige Ethanol-Überstand wurde abgenommen und dann erfolgte die Reinigung mit 1ml NETN unter Zugabe von 0,5% Milchpulver und 1,0 mM PMSF sowie die erneute Zentrifugierung. Dieser Schritt wurde 3x durchgeführt. Die anschließende Lagerung konnte für 1 Woche in 100 µl NETN mit 20 µl PMSF bei 4°C erfolgen. Auf 50 µl der auf diese Weise vorbereiteten Glutathion-Sepharose-Kugeln wurde je 1ml Bakterienzellysate gegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt ausschließlich Glutathion-Sepharose-Kugeln. Alle Ansätze wurden 3x mit 1 ml NETN und 20 µl PMSF gewaschen. Der erste Überstand wurde bei –80°C gelagert, der letzte mit der Hamiltonspritze aufgenommen. Translationsansatz und gebundene GST-Fusionsproteine wurden zusammen mit 250 µl NETN-Bindungspuffer über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Das Waschen wurde 3x mit 4°C kaltem 1ml NETN und 20 µl PMSF durchgeführt. Die Lösung der GST-Fusionsproteine von den Kugeln kann mit reduziertem Glutathion erfolgen, welches das oxidierte Glutathion durch seine höhere Affinität vom Enzym (GST) verdrängt. Um die p27-assoziierte CK2 α' zu erhalten, wurde die gebundenen Proteine durch Erhitzen für 5min auf 94°C in 30 µl NETN und 20 µl PMSF gelöst, mittels SDS-PAGE separiert und per Elektro-Blot (Western-Blot) auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit primärem Anti-His-Antikörper und HRP-konjugierten („horseradish peroxidase“ engl., Meerrettichperoxidase) sekundären Anti-Maus-Antikörpern durch das Chemilumineszenz-Verfahren.

3.24 Immunpräzipitation und Immunkomplex-Essays

3.24.1 Erzeugung von anti-CK2 α' - und anti-Phosphor-p27-Antikörpern

Für die Herstellung von polyklonalen anti-Phosphor-p27-Antikörpern in Kaninchen wurden die folgenden synthetischen phosphorylierten Peptide als Immunogene verwendet: an S83 phosphoryliertes p27: ERGSpLPEFYR (Aminosäuren 80-90 von p27 der Ratte bzw. Maus) sowie an T187 phosphoryliertes p27: TVEQTPKKPGLR (Aminosäuren 183-194 von p27 der Ratte bzw. Maus). Die Antiseren von derartig immunisierten Kaninchen wurden per Affinitätschromatographie auf Phosphor-Peptid-Säulen positiv selektioniert, wieder gelöst und anschließend mit unphosphorylierten Peptidsäulen negativ selektioniert. Die im letzten Schritt ungebunden gebliebene Fraktion wurde in den Untersuchungen verwendet. Die polyklonalen anti-CK2 α' -Antikörper wurden in Kaninchen mit der Peptidsequenz: KEQSQPCAENTVLSSG (Aminosäuren 330-345 von CK2 α' der Ratte bzw. Maus) generiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Zu Beginn wurden Antikörper gegen CK2 α/β verwendet, welche freundlicherweise Prof. David Litchfield (London Ontario, Canada) zur Verfügung gestellt hat.

3.24.2 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden 50 μ l Protein-A Agarose Kügelchen mit 1% (w/v) BSA in NP40 Puffer gegen unspezifische Bindungen geblockt und anschließend mit NP40 Puffer gewaschen. Nach Abzentrifugieren der Agarose-Kügelchen (2000 U/min, 2 min, 4°C) wurden sie mit einer 50 μ l Hamilton-Spritze trockengelegt und mit den zellulären Extrakten (1 - 2 mg Gesamtprotein) sowie mit den entsprechenden Antikörpern (5 - 12 μ g/ml) über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Hierbei binden die Antikörper ihre Antigene und der Antigen-Antikörper-Komplex bindet über den Antikörper an die Protein-A Agarose.

Für die Co-Immunopräzipitation erfolgte die Trennung der Immunkomplexe in 25 μ l NP40 Puffer, welcher 1% (w/v) SDS enthielt. Der NP40 Puffer wurde bis zu einer Konzentration von 0.1% (w/v) SDS hinzugefügt und der Überstand mit 50 μ l Protein-A Agarose Kügelchen für 2 - 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand auf frische Protein-A Agarose Kügelchen transferiert und für 2 h bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden normale Kaninchen-IgG oder Maus-IgG (sc-2027, sc-2025, SantaCruz) hinzugefügt. Die

Immunkomplexe wurden dreimal mit NP40 Puffer gewaschen und in 80 μ l SDS-Proben-Puffer aufgenommen. Aliquote von 20 μ l wurden für 90 sec bei 100°C denaturiert und durch SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert (siehe 3.29).

3.24.3 Immunkomplex-Kinase-Essay

Für die Immunkomplex-Kinase-Essays wurden 500 μ l Zellextrakt (1 - 2 mg Gesamtprotein) mit anti-CK2 α' (5 μ g) oder anti-CDK2 (15 μ g), welche kovalent an Protein-A Agarose Kügelchen gebunden waren, für 3 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Negativkontrollen enthielten entweder Anti-Kaninchen-IgG, keine Antikörper, DMAT (1 μ M; CK2 α') den pharmakologischen Inhibitor von CK2, das Purinanalogen Roscovitin (2 μ M; CDK2; Calbiochem, ein selektiver Inhibitor von CDK2) oder keinerlei Zellextrakt. Die Positivkontrollen enthielten 200 ng rekombinante gereinigte CK2 α'/β oder mit einem Hexa-Histidin-Etikett („His₍₆₎-tag“) versehene Cyclin-E-CDK2 (14-475; Upstate). Bei Präsenz von aktiven Kinasen wird Histone H1 im Kinase Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 mM β -Glycerophosphat, 30 μ M ATP, 5 μ Ci [γ -³²P]-ATP (10 mCi/ml), 5 μ g Histone H1; bei CDK2 ohne 150 mM NaCl) phosphoryliert und dabei mit γ -³²P markiert. p27 und CK2 α' Proteine wurden zuvor für 15 min auf Eis inkubiert. Die Immunkomplexe wurden viermal mit eiskaltem Lyse Puffer und einmal mit Kinase Puffer (ohne [γ -³²P]-ATP) gewaschen. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 μ l Kinase Puffer gestartet und für 30 min bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Für die *in vitro* CK2 α' Kinase Essays wurden 100 ng p27-Isoformen mit 30 ng CK2 α' genutzt. Die Reaktion wurde mit 30 μ l SDS-Proben-Puffer abgestoppt. Die Proben wurden für 90 sec bei 100°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert. Aliquote von 20 μ l wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (15% homogen) und zum Nachweis gleicher Proteinkonzentration mit der Standard-Coomassie-Färbung (siehe 3.28) gefärbt. Es folgte die Trocknung der Gele und die Auflage auf Phosphorimager-Platten. Die von den Histonen durch Phosphorylierung mit γ -³²P aufgenommene Radioaktivität wurde mit einem Phosphorimager-Lesegerät digitalisiert und mit der Software TINA (Raytest) quantifiziert. Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden im Radioaktivitätssicherheitstrakt des Max-Delbrück-Zentrum durchgeführt.

3.25 Die *in vitro* Phosphorylierung von p27 durch CK2 α'

Die Kinase Reaktionen der p27-Isotypen wurden mit 1 μ g N-terminal Hexa-Histidin-Etikett („His₍₆₎-tag“) markiertem wt.p27 oder den unterschiedlichen Phosphorylierungsstellenmutanten von p27 und 200 ng aktiver rekombinanter Hexa-Histidin-Etikett („His₍₆₎-tag“) markierter CK2 α' / β für 1 h bei 30°C und in 50 μ l Kinase Puffer durchgeführt, wobei hier 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP verwandt wurden. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von CK2 α' / β gestartet. Für die *in vitro* Bindungssays wurden rekombinantes, gereinigtes, Hexa-Histidin-Etikett markiertes wt.p27, p27.S83A, p27.T187A und p27 Δ pi (2.5 μ g) durch Inkubation in Kinase Puffer (1 mM ATP) für 3 h bei 30°C mit 400 ng rekombinanter aktiver Hexa-Histidin-Etikett markierter CK2 α' / β phosphoryliert. CK2 α' / β wurde durch Erhitzung der Proben auf 100°C (5 min) inaktiviert und damit die Reaktion gestoppt. CK2 α' wurde durch zweimalige Immundepletion mit anti-CK2 α' -Antikörpern, welche kovalent an Protein-A Agarose gebunden waren, aus dem Ansatz entfernt.

3.26 Immunoprecipitation von p27 in Gegenwart von Cycloheximid

Für die Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von p27 erfolgte die radioaktive Markierung durch Applikation von [β -³⁵S]-Methionin/Cystein (1000 Ci/mmol) in Medium ohne Methionin und ohne Cystein (DME, ICN) für 2h. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem Medium in Anwesenheit von Methionin/Cystein (0.1 mg/ml) und Cycloheximid (100 μ g/ml) gesammelt, um die Proteinsynthese zum gewünschten Zeitpunkt zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend trypsinisiert und lysiert. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit kovalent an Protein-A-Agarose gebundenem anti-p27-Antikörper. Aliquote wurden einer SDS-PAGE zugeführt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und autoradiographiert. Die Menge der inkorporierten radioaktiven Markierung wurde mit einem Phosphorimager-Lesegerät detektiert und mit der Software TINA (Raytest) quantifiziert. Der Abbau von p27 ($t_{1/2}$) über die Zeit wurde durch eine lineare Regressionsanalyse quantifiziert. Die Menge der Proteinexpression wurde als Prozentwert der Menge bei 0 min (= 100%) angegeben. Der Graph wurde als verbliebene Menge Protein in Prozent gegen die Zeit in Stunden aufgezeichnet. Die Linearität der erhaltenen IP-Signale wurde durch das ECL-Chemolumineszenz-Verfahren bestätigt. Hierfür wurden Kardiomyozytenextrakte, welche ansteigende Mengen Gesamtprotein enthielten (0, 100, 250, 500, 1000, 1500 und 2000 μ g), mit Lyse Puffer auf 500 μ l eingestellt. Dreifache Proben wurden

im Western Blot mit anti-p27 analysiert. Die Intensität der p27-Banden und der Gesamtproteingehalt standen in linearer Beziehung zueinander.

3.27 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde mit der Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) vertikal durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer auf gleiche Proteinkonzentration justiert, anschließend in 10 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 100°C für 90 sec denaturiert, für 5 min auf Eis abgekühlt und bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert. Das Auftragen der Proben erfolgte nach dem Spülen der Geltaschen und Vorlaufen des Gels für 20 min bei 15 mA und 60 Volt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein entsprechender Molekulargewichtsstandard aufgetragen, welcher durch den Vergleich seiner elektrophoretischen Mobilität mit den Proben auf das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine schließen lässt. Als Trenngel wurden homogene 12 bzw. 15%ige Polyacrylamidgele verwendet, welche frisch in der unter Material angegebenen Gelgießvorrichtung gegossen wurden. Die elektrophoretische Trennung erfolgte unter kontinuierlicher Wasserkühlung bei 20 mA und 80 Volt für 10x10 cm große Gele und 35 mA sowie 125 Volt für 20 x 20 cm Gele. Weiterhin wurden vorgefertigte Gradientengele von 4 - 20% (Pierce) für die SDS-PAGE verwandt.

3.28 Standard-Coomassie-Färbung zur allgemeinen Proteindetektion

Die Fixierung der Elektrophoresegele erfolgte nach Empfehlung von Pharmacia mit 20%iger Trichloressigsäure für 30 min bei RT. Anschließend wurden sie zweimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbelösung wird vor Gebrauch aus Lösung A (0,2% Coomassie R-250/Methanol) und B (20% Trichloressigsäure) im Verhältnis 1:1 hergestellt und ist wegen der Veresterung nur bis zu zwei Tage einsetzbar. Die Färbedauer richtet sich nach der Geldicke und reicht von 30 bis 120 min. Die Entfärbung wurde mit 20% Methanol / 10% Trichloressigsäure durchgeführt, wobei die Lösung mehrmals gewechselt wurde. Im Anschluss wurden die Gele auf Filterpapier gelegt und für 1 h bei 80°C getrocknet.

3.29 Die Western-Blot-Analysen

Die Übertragung der Proteine aus den SDS-PAGE-Gelen erfolgte im sogenannten halbtrockenen („Semi-dry“) Verfahren durch gelelektrophoretischen Transfer auf Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF)-Membranen. Hierfür wurden Filterpapiere in der Größe der Graphitelektroden für 30 bis 60 min so in Transferpuffer gelegt, dass sie sich durch Kapillarwirkung voll saugen. Die hydrophobe PVDF-Membran (0.45 µm Porengröße) wurde auf die Gelgröße zugeschnitten, für 90 sec in Methanol aktiviert, mit destilliertem Wasser abgespült und bis zur Verwendung in Transferpuffer gelegt. Membran und Gel wurden zusammen zwischen je 4 mit Transferpuffer gesättigte Filterpapiere gelegt, so dass die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die PVDF-Membran wandern können. Die Anoden-Graphitplatte wird mit destilliertem Wasser gesättigt, der Blot-Stapel aufgebracht, überschüssige Flüssigkeit mit saugfähigem Papier entfernt und die „Semi-dry“-Transfereinheit zusammengesetzt. Der Transfer wurde bei 150 Volt mit ca. 1 mA/cm² für 1 h durchgeführt. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte durch einen sogenannten Regenbogen-Molekulargewichtsstandard („rainbow-marker“), bei dem jedes dargestellte Molekulargewicht mit einem bestimmten Farbstoff markiert ist.

Für die Analyse der Phosphorylierung von p27 wurden vor der Western-Blot-Analyse phosphorylierungsstellenspezifische p27 Proben (50 µg) mit 10 Einheiten Intestinaler Kalbsphosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert.

3.30 Chemolumineszenz-Verfahren

Die Immundetektion von elektrotransferierten Proteinen auf der PVDF-Membran erfolgte durch das ECL-Chemolumineszenz-Verfahren (ECL, „enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemolumineszenz). Die schnelle Durchführbarkeit und die hohe Sensitivität dieses Verfahren sowie der Verzicht auf radioaktive Substanzen erweisen sich dabei als besonderer Vorteil. Hierbei wird die Membran zunächst mit einem primären Antikörper gegen das interessierende elektrotransferierte Protein inkubiert und die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran mit einem an das Enzym Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP) gekoppelten sekundären Antikörper, welcher spezifisch für den primären Antikörper ist, detektiert. Die verstärkte Chemolumineszenz erfolgt unter alkalischen Bedingungen mittels Oxidation des zyklischen Diazylhydrazids Luminolin (LumiGlo[®]) in Gegenwart von Phenol als Reaktionsverstärker durch die HRP. In Folge der Oxidation wird das Luminol in einen

angeregten Zustand versetzt, welchen es durch Lichtemission wieder verlässt. Die elektromagnetische Strahlung hat ein Maximum bei $\lambda = 428 \text{ nm}$ und kann durch Exposition eines blauempfindlichen Filmes („ECL Hyperfilm“) autoradiographisch detektiert werden. Im ersten Schritt wurden durch Inkubation der Membran für 1 h bei RT in TBST (20 mM Tris-HCL pH 7.6, 0.1% Tween-20) mit 5% (w/v) Magermilchpulver zunächst unspezifische Bindungsstellen geblockt. Es folgte das zweimalige Waschen der Membran mit TBST für 5 min bei RT. Anschließend wurden 0.1 bis 0.2 $\mu\text{g/ml}$ des entsprechenden Primärantikörpers in TBST mit 5% (w/v) BSA Fraktion V (Sigma) für 3 h bei 4°C unter behutsamem Schütteln inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch viermaliges Waschen der Membran mit TBST für 5 min bei RT entfernt. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte entsprechend der Herkunft des primären Antikörpers durch Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Cell Signaling, 1:5000 verdünnt in TBST mit 5% (w/v) BSA) für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Membranen zweimal in TBST und zweimal in TBS für 5 min bei RT gewaschen. Die Chemolumineszenz mit LumiGlo[®] wurde nach den Angaben des Herstellers (Cell Signaling) durchgeführt. Für die korrekte Zuordnung des Autoradiogramms wurde ein Längenmarker auf die Membran geklebt. Die Belichtung des Films (ECL Hyperfilm, GE Healthcar) wurde anhand der Menge des untersuchten Proteins zwischen 20 sec und 10 min gewählt. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Entwicklergerät. Unter Zuhilfenahme des Längenmarkers und eines gefärbten Molekulargewichtsmarkers wurde das Molekulargewicht der detektierten Proteine abgeschätzt und die Signale zugeordnet.

3.31 Statistische Analysen

Die Überprüfung des faktoriellen Designs der Experimente und der Unterschiede zwischen den Messwerten erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse ANOVA („analysis of variance“) bzw. des Stichproben t-Tests. Signifikante ANOVA-Werte wurden mit der „simple main effects“ Analyse oder der Tukey Post-Hoc-Analyse überprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0.005$ (Kardiomyozyten in Kultur) bzw. bei $p < 0.05$ (*in vivo* Studien) festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 CK2 α' interagiert *in vitro* und in differenzierten Kardiomyozyten mit p27

Eine cDNA-Bibliothek „Adultes-Humanes-Herz“ wurde mit dem Gal4-Reportergen basierenden Hefe-Zwei-Hybrid-System („Yeast Two Hybrid System“) systematisch auf Bindungspartner durchsucht, um cDNAs zu identifizieren, welche für Proteine kodieren, die mit p27 interagieren. Als sogenannter Köder („bait“) wurde das vollständige Wildtyp-p27-Protein (wt.p27) in korrekter Position („in frame“) mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne von pAS2-1 fusioniert (Abb. 9). Als sogenannte Beute („prey“) wurde die cDNA-Bibliothek „Adultes-Humanes-Herz“ mit der Gal4-Aktivierungsdomäne von pGAD10 fusioniert (Abb. 10). Y190-Hefezellen wurden mit beiden Plasmiden co-transformiert.

Von 5.1×10^6 durchsuchten Kolonien wurden 24 positive Klone identifiziert (Abb. 11) und das cDNA-Insert mit dem „ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Perkin Elmer) nach der Anleitung des Herstellers sequenziert. Einer dieser Klone enthielt die carboxy-terminalen Aminosäuren 167 - 350 von CK2 α' (Abb. 12).

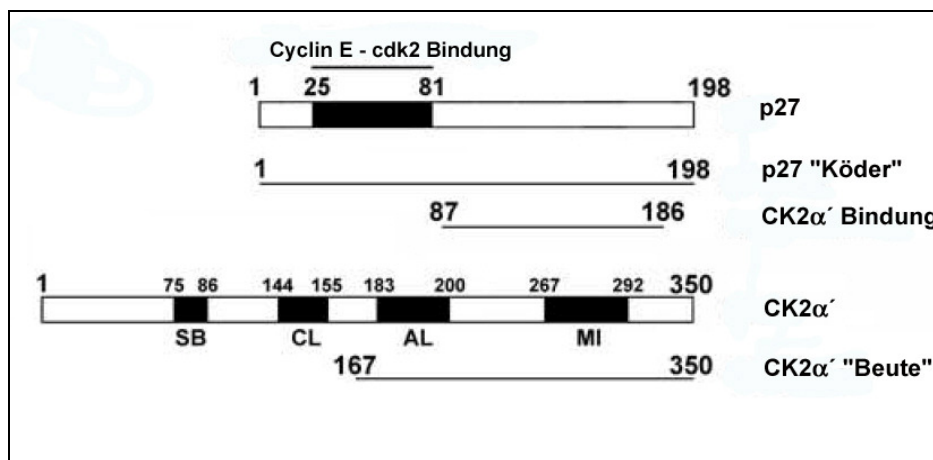


Abb. 12: Aminosäuresequenz von p27 und CK2 α' im "Yeast Two Hybrid Screening"

Die Zahlenwerte stehen für Aminosäurepositionen in den Proteinen. CK2 α' = Casein Kinase alpha prime („prey“ bzw. Beute), p27 („bait“ bzw. Köder) ist der Cyklinkinaseinhibitor p27

Die Casein Kinase 2 (CK2) ist eine ubiquitäre Serin/Threonin-Kinase [97, 98] (wt.CK2 α') und führte durch die Bindung mit wt.p27 zur Wiederherstellung der Gal4-Aktivierungsdomäne und somit zur Transkription des β -Galaktosidase-Promotors als Reporter-Gen. Weder das leere pGAD10-Plasmid mit der Aktivierungsdomäne (ohne wt.CK α'), noch das leere pAS2-1 (ohne wt.p27) konnten eine Transkription bewirken. Die einzelnen Plasmide, welche für die Domänen

und die zugehörige cDNA (wt.CK2 α' oder wt.p27) codierten, zeigten ebenso keine Aktivierung des Reportergens (Abb. 13a).

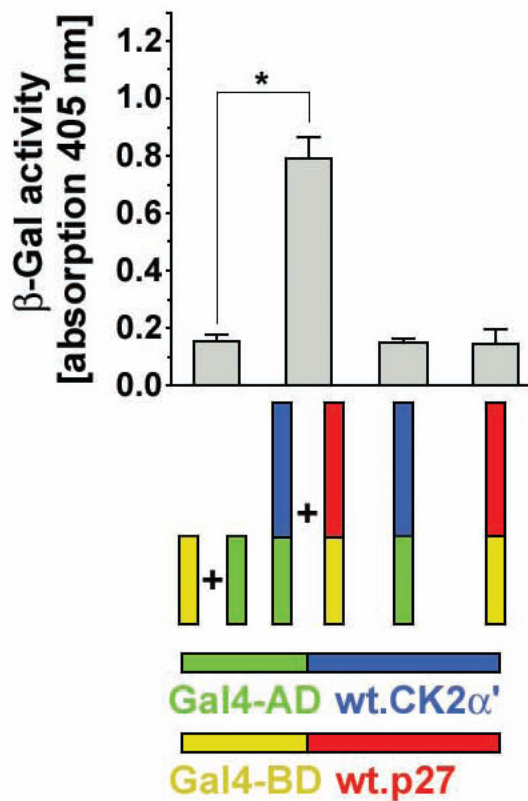


Abb. 13a: Die Interaktion zwischen CK2 α' und p27 führt zur funktionellen Wiederherstellung des β -Galaktosidase-Promotors als Reportergen im Hefe-Zwei-Hybrid-System („Yeast Two Hybrid“). Eine Aktivierung durch die einzelnen Komponenten erfolgte nicht. β -Gal activity = β -Galaktosidase Aktivität, Gal4-AD = Gal4 – Aktivierungsdomäne (grün), Gal4-BD = Gal4 – Bindungsdomäne (gelb), wt.CK2 α' = Wildtyp Casein Kinase alpha prime (blau), wt.p27 = Wildtyp Cyklinkinaseinhibitor p27 (rot); „absorption“ Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$; n = 4, *P < 0,005

Die physische Interaktion zwischen CK2 α' und p27 wurde *in vitro* durch ein sogenanntes „GST pull down Affinitätsassay“ verifiziert. Hierfür wurde bakterienproduziertes, also rekombinantes wt.CK2 α' , welches ein N-terminales Hexa-Histidin-Etikett („His₆-tag“) trug, mit rekombinantem wt.p27, das mit Glutathion-S-Transferase (GST) konjugiert war und an Glutathion-Sepharose-Kugeln immobilisiert wurde, inkubiert. Um die p27-assoziierte CK2 α' zu erhalten, wurde das gebundene Material gelöst, mittels SDS-PAGE separiert und per Elektrophoretogram (Western-Blot) auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit primärem Anti-His-Antikörper und HRP-konjugierten („horseradish peroxidase“ Meerrettichperoxidase) sekundären Anti-Maus-Antikörpern durch das Chemilumineszenz-Verfahren. Tatsächlich konnte das immobilisierte wt.p27 das rekombinante wt.CK2 α' binden (Abb. 13b).

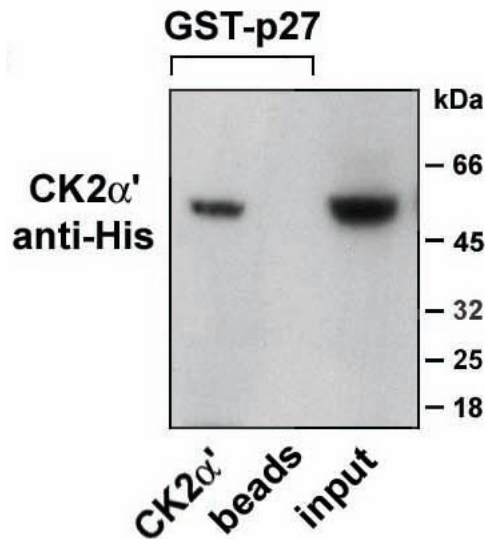


Abb.13b: CK2 α' und p27 interagieren als rekombinante Proteine *in vitro*. GST-p27 = Glutathion-S-Transferase konjugiertes p27, CK2 α' = Casein Kinase alpha prime hier mit N-terminalem Hexahistidin-Etikett („His₆-tag“), CK2 α' anti-His = Detektion mit primärem Anti-Histidin-Antikörper der Maus und sekundärem HRP-kunjugiertem Anti-Maus-Antikörper durch Chemilumineszenz, HRP = „horseradish peroxidase“ Meerrettichperoxidase, beads = Glutathion-Sepharose-Kugeln, input = Einsatz, kDa = relatives Molekulargewicht in Kilodalton

Diese Ergebnisse weisen zusätzlich darauf hin, dass die Interaktion von CK2 α' und p27 unabhängig von der regulatorischen CK2 β Untereinheit ist. Als nächster Schritt wurde die CK2 α' -Bindungsstelle von p27 analysiert. Dies geschah durch Testung von verschiedenen p27-Mutanten mit N-terminalem Hexa-Histidin-Etikett sowie GST konjugierter und immobilisierter wt.CK2 α' . Das Vorhandensein von p27 als Wildtyp oder Mutante und damit die Bindung an wt.CK2 α' wurde auf die im vorhergehenden Schritt beschriebene Art und Weise durch Immunoblot und Anti-His-Antikörper bestätigt. Für die physische Interaktion mit wt.CK2 α' sind die C-terminalen Aminosäuren 87 - 186 verantwortlich (Abb. 13c).

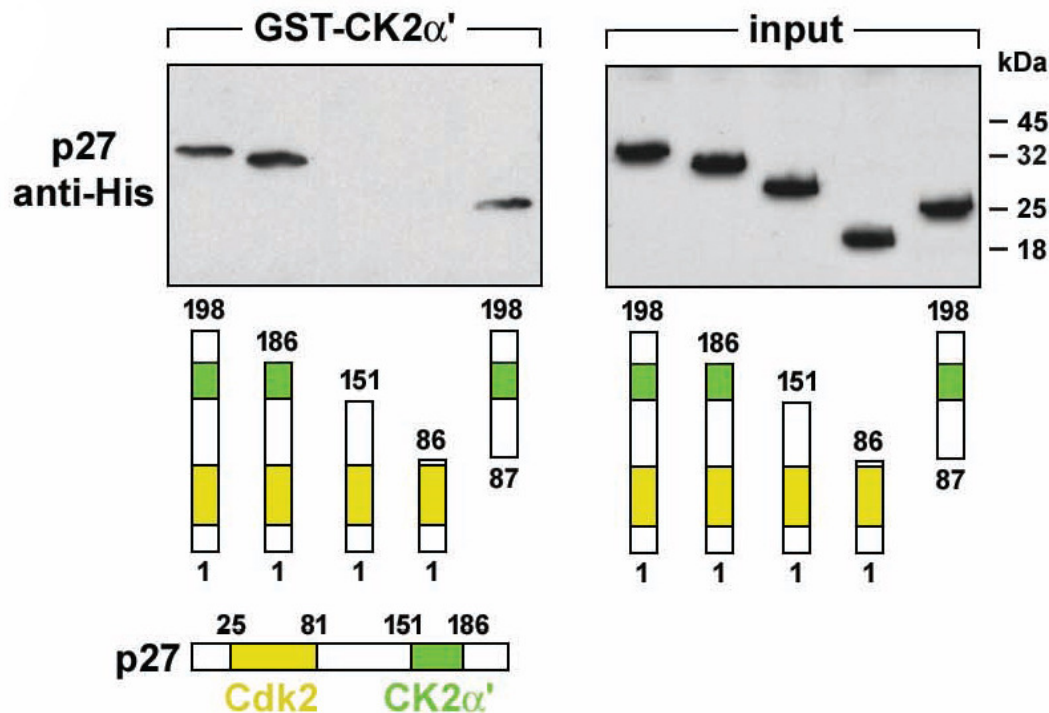


Abb. 13c: Die Cyclin-E-CDK2-Bindungsstelle in p27 ist nicht für die Interaktion mit CK2 α' notwendig. Im Immunoblot wurden verschiedene *in vitro* translationierte p27-Mutanten (untere farbige Reihe) auf Bindung mit immobilisierter CK2 α' (GST-CK2 α') untersucht. Die Nummern kennzeichnen die zugehörige Aminosäuresequenz der His₆-etikettierten p27 Mutanten. His = Histidin, GST = Glutathion-S-Transferase, Gelb = Cyclin-E-CDK2-Bindungsstelle, Grün = CK2 α' Bindungsstelle, Input = Einsatz an wt.p27 und Mutanten im „GST pull down Essay“, CDK2 = „Cyclin Dependent Kinase“ (Cyclin abhängige Kinase), kDa = relatives Molekulargewicht in Kilodalton

Diese Epitop-Kartographierung demonstriert, dass für die Bindung von p27 mit CK2 α' die CDK2-Bindungsstelle (AS 25 – 81) von p27 nicht benötigt wird und spricht für nichtüberlappende p27-Epitope für CDK2 und CK2 α' .

Das subzelluläre Verteilungsmuster von endogener CK2 α' und p27 in Kardiomyozyten wurde durch immunzytochemische Untersuchungen beleuchtet. Immobilisierte ventrikuläre Kardiomyozyten von Ratten auf Kollagen beschichteten Deckgläschen wurden hierzu verwandt. Nach Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen CK2 α' und p27 sowie Cy5- (CK2 α' , grün) und Cy3-konjugierte (p27, rot) sekundäre Antikörper. Es zeigte sich eine Co-Lokalisierung von CK2 α' und p27 im Zytoplasma dieser Zellen (Abb. 13d). Als nächstes wurde die Kompartimentierung von endogener CK2 α' und p27 in Kardiomyozyten nach Hinzufügen von Angiotensin II (Ang 100 nmol), einem potenten Induktor der Hypertrophie von Kardiomyozyten [96] analysiert. Die Wachstumsstimulation der Kardiomyozyten bewirkte eine Abnahme der Protein-Expression von zytoplasmatischem p27, während die von CK2 α' im Wesentlichen unverändert blieb (Abb. 13d).

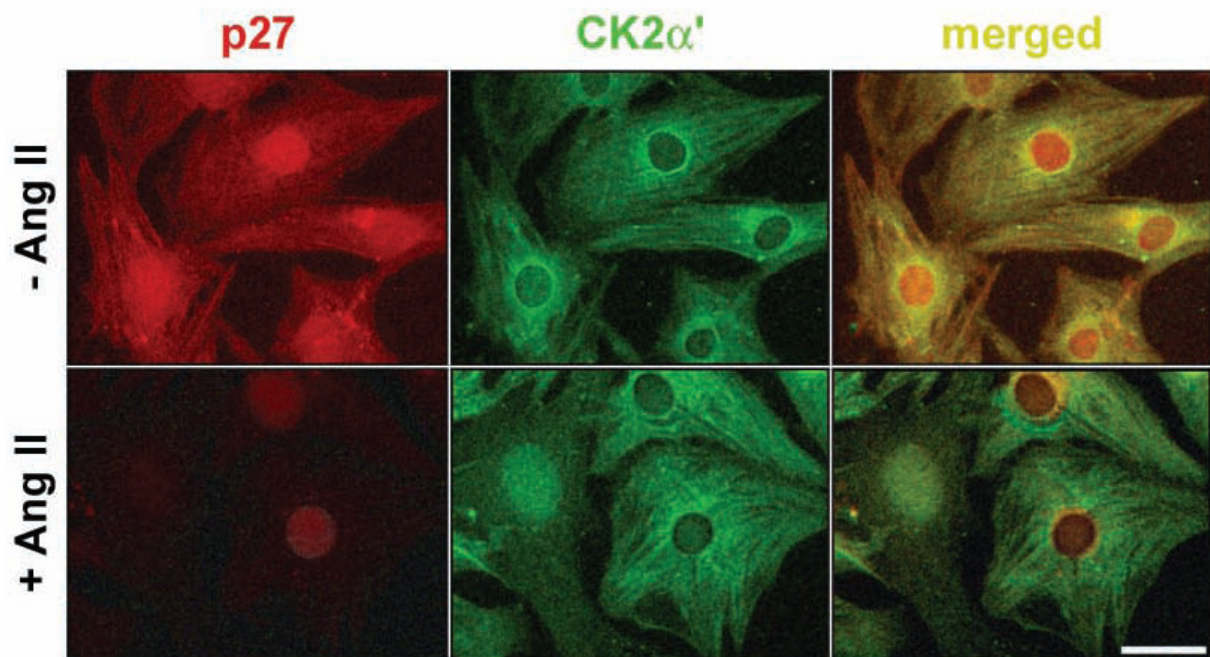


Abb. 13d: Endogene CK2 α' (grün) und p27 (rot) co-lokalisieren („merged“ = zusammen) in der Immunfluoreszenz im Zytoplasma von isolierten ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten. Die obere Reihe zeigt unbehandelte Zellen, die untere Kardiomyozyten nach Stimulation mit 100 nmol Angiotensin II (Ang II) für 12h, einem Induktor für hypertrophes Wachstum, hier kommt es zur Abnahme der Protein-Expression von zytoplasmatischem p27. Skalierung 20 μ m

Durch Co-Immunopräzipitationsanalysen zytoplasmatischer Extrakte (Proteingehalt 500 μ g) von zwei Tage alten, neugeborenen Ratten, welche durch biochemische Fraktionierung von isolierten nicht stimulierten ventrikulären Kardiomyozyten hergestellt wurden, konnte die *in vivo* Protein-Interaktion zwischen endogener CK2 α' und p27 bewiesen werden. Hierfür wurden die Extrakte durch kovalent an Protein-A-Agarose gebundene spezifische Antikörper gegen p27 und CK2 α' immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE sowie Western-Blot konnte p27 in Anti-CK2 α' -Immunpräzipitaten (Abb. 14a) und CK2 α' in Anti-p27-Immunpräzipitaten co-präzipitiert werden (Abb. 14b).

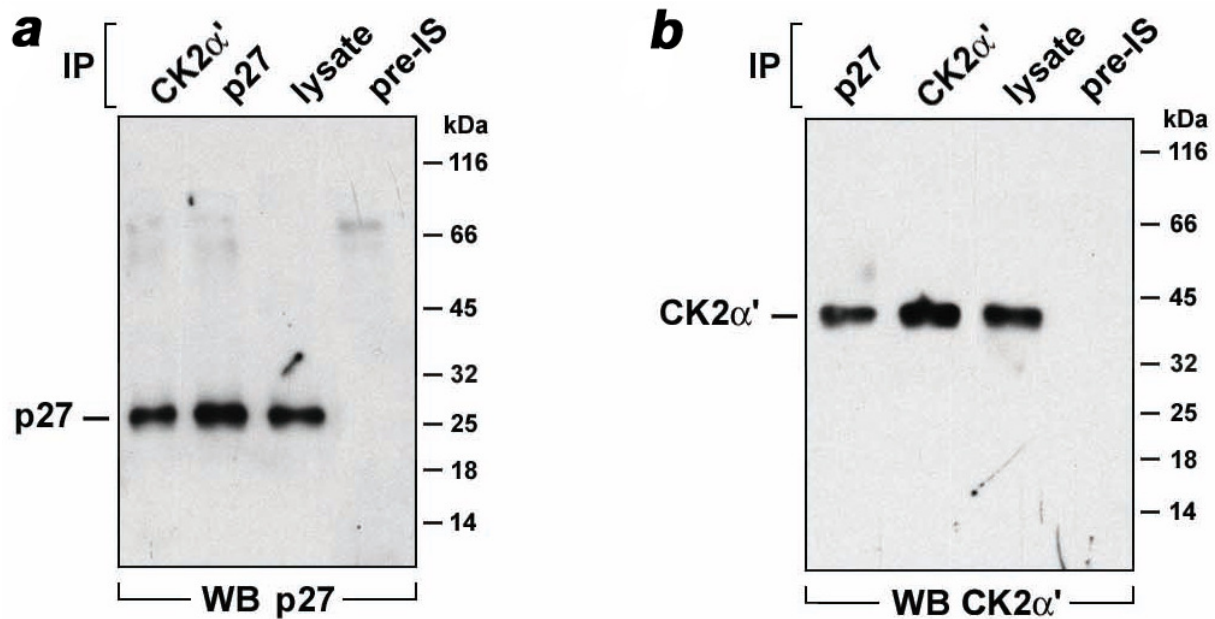


Abb. 14: Endogene zytoplasmatische CK2 α' und p27 binden in ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten aneinander. Biochemisch fraktionierte Extrakte, entsprechend 1.5×10^6 Zellen pro Bahn, wurden mit spezifischen Antikörpern (oben) an Protein-A-Agarose immunopräzipitiert (IP) und nach Westernblot wurden durch Anti-p27 (a) bzw. Anti-CK2 α' (b) die entsprechenden Proteine als Co-Präzipitat nachgewiesen. WB = Western Blot, pre-IS = Prä-Immunsereum, lysate = Lysat, kDa = relatives Molekulargewicht in Kilodalton

Die Co-Lokalisierung und Co-Immunopräzipitation von endogener CK2 α' und p27 im zytoplasmatischen Extrakt bestätigt unsere Untersuchungen zur Interaktion beider Proteine.

4.2 CK2 α' phosphoryliert *in vitro* p27 an den Aminosäuren S83 und T187

Die Inspektion der Primärsequenz von p27 mit den Suchmaschinen „Scansite“ (<http://scansite.mit.edu>), welche nach Motiven in Proteinen fahndet, die möglicherweise phosphoryliert werden können und „ELM“ (<http://elm.eu.org>), welche funktionelle Bereiche in eukaryotischen Proteinen prognostiziert, ergab zwei übereinstimmende Phosphorylierungsstellen bzw. Motive für CK2 an den Aminosäuren Serin-83 (S83) und Threonin-187 (T187) von p27. Interessanterweise ist T187 ein suboptimales CK2-Motiv in unmodifiziertem p27. Beide Motive sind in den entsprechenden p27-Homologen von Mensch, Ratte und Maus konserviert. Laut der Suchmaschine „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>), welche Nucleotid- oder Proteinsequenzen vergleicht, ist die S83-Phosphorylierungsstelle von p27 (p27 = p27^{KIP1}) auch im zugehörigen KIP-Familien-Mitglied p57^{KIP2}, aber nicht in p21^{CIP1/WAF1} konserviert. Zum Nachweis, ob p27 von CK2 α' phosphoryliert wird, sind als Substrat

rekombinantes wt.p27 (1µg) sowie verschiedene p27 Mutanten mit Punktmutationen im Bereich der Phosphorylierungsstellen (S83 und T187) mit rekombinanter aktiver CK2α'/β (200ng) in *in vitro* Kinase-Reaktionen mit [γ -³²P]-ATP getestet worden.

Aliquots jeder Reaktion wurden anschließend einer SDS-PAGE zugeführt und auf Nitrozellulose-Membranen elektrotransferiert. Die aufgenommenen Mengen von γ -³²P in p27 wurden mit einem Phosphor-Imager und der Software ImageJ quantifiziert. Die verschiedenen Membranen sind mit anti-CK2α', anti-p27 bzw. spezifischen Antikörper für die jeweilige Phosphorylierungsstelle von p27 getestet worden.

Wt.p27 wurde hier durch die aktive CK2α', aber nicht von der katalytisch inaktiven CK2α'-Mutante (kd.CK2α', engl. „kinase-dead“), welche eine Punktmutation (K69M) in ihrer ATP-Bindungsregion trägt, phosphoryliert (Abb 15a).

Durch den Austausch von Serin bzw. Threonin durch Alanin wurde die Phosphorylierung von p27S83A durch CK2α' um 68% und bei p27T187A um 27% reduziert. Somit scheint die dominante Phosphorylierungsstelle von p27 *in vitro* S83 zu sein. Demgegenüber kann CK2α' die Doppelmutante p27ΔPi, welche sowohl an S83 als auch an T187 Alanin statt der ursprünglichen Aminosäure trägt, nicht phosphorylieren. Daher sind für die Phosphorylierung von p27 durch CK2α' *in vitro* die Phosphorylierungsstellen S83 und T187 notwendig.

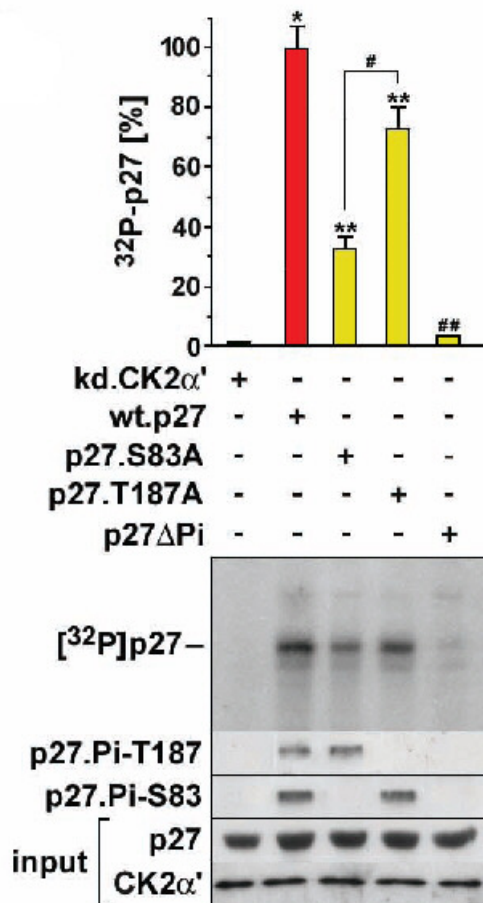


Abb. 15a: Rekombinantes p27 ist *in vitro* ein Substrat von CK2α'. Diese phosphoryliert p27 im Kinase Essay mit radioaktivem [γ-³²P]-ATP im Vergleich stärker an S83 als an T187. Die inaktive Punktmutante von CK2α' (kd.CK2α') kann p27 nicht phosphorylieren. Die genannten Aminosäuren sind für die Phosphorylierung von p27 notwendig, da die Doppelmutante p27ΔPi (Alanin an S83 und T187) nicht phosphoryliert wird. Input = Einsatzmenge (gleichbleibend), ³²P = Phosphor-Isotop, wt.p27 = Wildtyp p27, p27.S83A = Punktmutante mit Alanin statt Serin an Position 83, p27.T187A = Punktmutante mit Alanin statt Threonin an Pos. 187, p27.Pi-T187 = p27 phosphoryliert an T187, p27.Pi-S83 = p27 phosphoryliert an S83, MW +/- SD, n = 3, *P < 0.001 vs. kd.CK2α', **P < 0.05 vs. wt.p27, #P < 0.01 ##P < 0.001 vs. wt.p27

4.3 Phosphorylierung von p27 vermindert die Interaktion mit CK2α' *in vitro*

In proliferierenden Zellen ist p27 nicht nur ein Substrat sondern auch ein Inhibitor von CDK2 [110-112, 123]. Wir testeten die Hypothese, dass eine ähnliche Rückkopplung in postmitotischen Kardiomyozyten zu finden ist. Dazu wurde wt.p27 (100 ng) und rekombinante CK2α'/β (30 ng) in Gegenwart von [γ-³²P]-ATP und dem Substrat Histon-H1 inkubiert. Anschließend wurde eine SDS-PAGE und der Transfer auf Nitrozellulosemembranen durchgeführt um die Menge an inkorporierter Radioaktivität in die Histone durch Phosphor-Imager-Aufnahmen und ImageJ-Software zu quantifizieren.

Analog wurden Essays durchgeführt in denen wt.p27 durch die gleiche Menge der Phosphorylierung simulierenden Mutante p27.S83D/T187D bzw. durch bereits an S86 oder T187 phosphoryliertes p27 (p27.Pi-S86, p27.Pi-T187, p27.Pi-S83/T187) ersetzt wurde. Letztere waren zuvor *in vitro* durch rekombinante CK2 α' / β phosphoryliert worden.

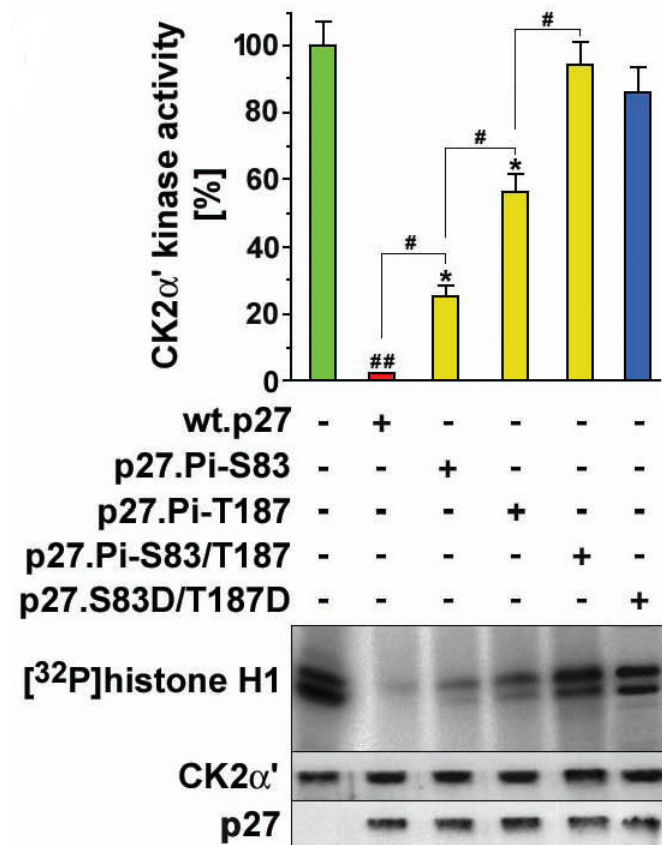


Abb. 15b: p27 ist nicht nur Substrat sondern auch Inhibitor von CK2 α' . Die Phosphorylierung von p27 (gelb), insbesondere an T187 (p27.Pi-T187) vermindert die inhibitorische Wirkung auf CK2 α' *in vitro*. Im Vorfeld durch CK2 α' simultan an S83 und T187 phosphoryliertes p27 (p27.Pi-S83/T187) und die Phosphorylierung imitierende Mutante (p27.S83D/T187D; blau) heben die Wirkung von p27 auf und führen zur zunehmenden Phosphorylierung des Substrates Histone-H1. [32 P]histone H1 = Menge an inkorporiertem 32 P und damit CK2 α' -Kinaseaktivität („kinase activity“), CK2 α' Kontrolle (ohne p27) = 100% Aktivität (grün), der Einsatz CK2 α' - und p27 im Kinase Essay, wurde per Immunoblot mit Hilfe von anti-His-AK auf gleichbleibende Menge überprüft, MW +/- SD, n = 3, *P < 0.01 vs. CK2 α' -Kontrolle, #P < 0.01, ##P < 0.001 vs. CK2 α' -Kontrolle

Es zeigte sich, dass wt.p27 die Aktivität von rekombinanter CK2 α' *in vitro* vollständig inhibiert. Die Zugabe von an S83 (p27.Pi-S86) oder T187 (p27.Pi-T187) phosphoryliertem p27 ergab im Vergleich mit wt.p27 eine schrittweise Verminderung der inhibitorischen Aktivität von p27 in Bezug auf CK2 α' . Es zeigte sich, dass an T187 phosphoryliertes p27 *in vitro* ein schlechter Inhibitor für CK2 α' ist. Die simultan phosphorylierte Variante p27.Pi-S83/T187 und die

Phosphorylierung imitierende Mutante (p27.S83D/T187D) hoben die Fähigkeit CK2 α' zu inhibieren praktisch auf. (Abb. 15b).

Im nächsten Schritt wurde die Frage geklärt, ob dieses Phänomen mit einer verminderten Bindung von p27 an CK2 α' einhergeht. Hierfür wurden die Kinase-Essay-Reaktionsansätze aus dem vorherigen Schritt (Abb. 15b) mit Protein-A-Agarose konjugiertem anti-CK2 α' -AK bzw. in gleicher Weise konjugiertem anti-p27-Antikörper inkubiert. Der Immunblot wurde mit anti-p27, um CK2 α' gebundenes p27 nachzuweisen, bzw. mit anti-CK2 α' für p27 gebundene CK2 α' , durchgeführt. Wiederholt zeigte sich, dass anti-CK2 α' -Immunopräzipitate weniger p27.Pi-S83 und nur sehr wenig p27.Pi-T187 enthielten, wenn man die Menge mit wt.p27 vergleicht. In der Gegenprobe wurde, im Vergleich mit an wt.p27 gebundener CK2 α' , erwartungsgemäß weniger p27.Pi-S83-gebundene CK2 α' in anti-p27-Immunkomplexen nachgewiesen. Die Menge der an p27.Pi-T187 gebundenen CK2 α' war auch hier minimal.

Mit der doppelt phosphorylierten Variante p27.Pi-S83/T187 und der die Phosphorylierung imitierenden Mutante p27.S83D/T187D wurden in beiden Varianten keine signifikanten Bindungen gesehen (Abb. 15c). Daher scheint die Aufhebung der CK2 α' -Inhibition durch phosphoryliertes p27 eine Folge seiner reduzierten CK2 α' -Affinität zu sein.

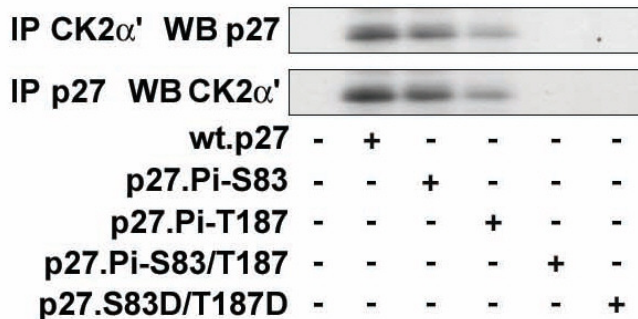


Abb. 15c: Phosphorylierung von p27 hebt die Bindung an CK2 α' auf. Protein-A-Agarose gebundenes anti-CK2 α' (oben) bindet CK2 α' (IP CK2 α') und somit p27 (WB p27) sowie seine Phosphorylierungsvarianten im Immunblot unterschiedlich stark. In gleicher Weise immobilisiertes p27 (IP p27) und seine Phosphorylierungsvarianten binden CK2 α' (WB CK2 α') (2. Reihe). p27.Pi-T187 = an T187 phosphoryliert, p27.Pi-S83 = an S83 phosphoryliert, p27.Pi-S83/T187 = an S83 und T187 phosphoryliertes p27; p27.S83D/T187D = Phosphorylierung imitierende Mutante, IP = Immunopräzipitation

4.4 Angiotensin II induzierte CK2 α' - Aktivität ist mit verminderter p27-Expression in Kardiomyozyten assoziiert

Im Weiteren wurde die Kinetik der CK2 α' -Antwort auf Angiotensin II und seine Verbindung zu Phosphorylierung und Umsatz von p27 untersucht.

Dazu wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten 1 bis 24 Stunden mit Angiotensin II behandelt, biochemisch fraktioniert und anschließend durch Immunblot analysiert. Zytoplasmatische und nukleäre Extrakte sind gleichermaßen untersucht worden. Die Immunkomplex-Kinase-Essays wurden mit Histone H1 als Substrat wie im Vorfeld beschrieben durchgeführt.

Zytoplasmatische CK2 α' -abhängige Kinaseaktivität wurde innerhalb einer Stunde, überlappend mit der Phosphorylierung von p27 an S83/T187, durch Angiotensin II induziert (Abb. 15d).

Eine Phosphorylierung von nukleärem p27 an diesen Aminosäuren wurde unter den Bedingungen zu keinem Zeitpunkt gesehen.

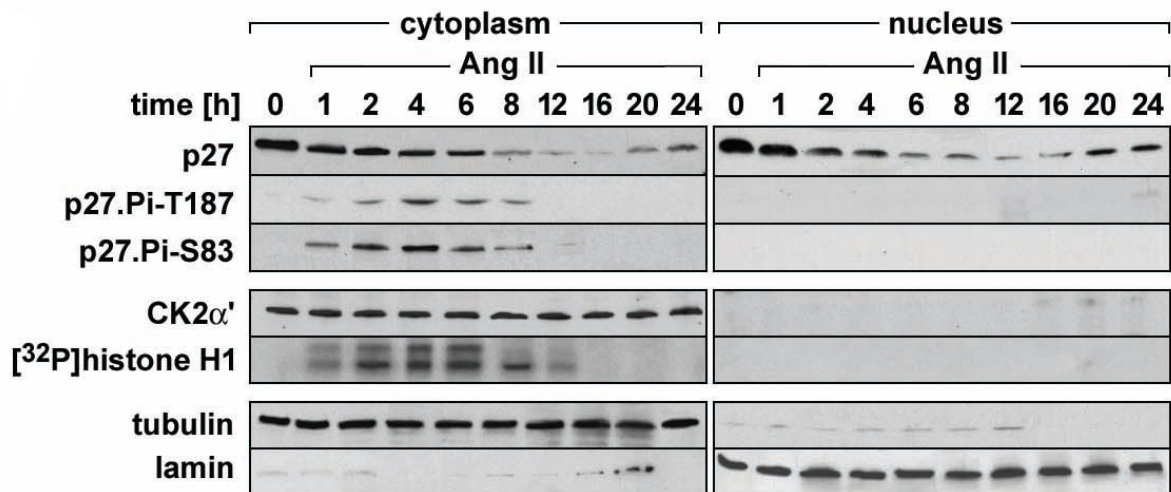


Abb. 15d: Angiotensin II induziert CK2 α' -Kinase-Aktivität, p27-Phosphorylierung und Degradation in Kardiomyozyten. Anti-CK2 α' -Immunkomplex-Kinase-Essay; [³²P]histone H1 = [γ ³²P]-phosphorylierte Histone H1; p27 = wt.p27, p27.Pi-T187 und p27.Pi-S83 = an T187 bzw. S83 phosphoryliertes p27; time = Zeit der Angiotensin (Ang II) Einwirkung in Stunden; biochemisch fraktionierte Extrakte aus 4×10^5 Zellen pro Reihe, cytoplasm = zytoplasmatisch (Tubulin als Marker), nucleus = nukleär (Lamin als Marker), n = 2

Diese Ergebnisse sind schlüssig in Bezug auf das Konzept, dass der inhibierte p27-CK2 α' -Komplex im Zytoplasma eine Angiotensin vermittelte Aktivierung erwartet, und CK2 α' am Abbau von p27 partizipiert.

4.5 Inaktivierung von CK2 α' hebt die Phosphorylierung von p27 in Kardiomyozyten *in vivo* auf

Die Elimination der Funktion von CK2 α' erfolgte durch lentiviral vermittelte Expression von siCK2 α' und RNA-Interferenz („RNA silencing“) (Abb. 15e) , der Expression der Kinase

inaktiven („kinase-dead“) Punktmutante kd.CK2 α' oder durch pharmakologische Inhibition mit DMAT [99]. Die Phosphorylierung von p27 an S83/T187 wurde damit aufgehoben (Abb. 15f).

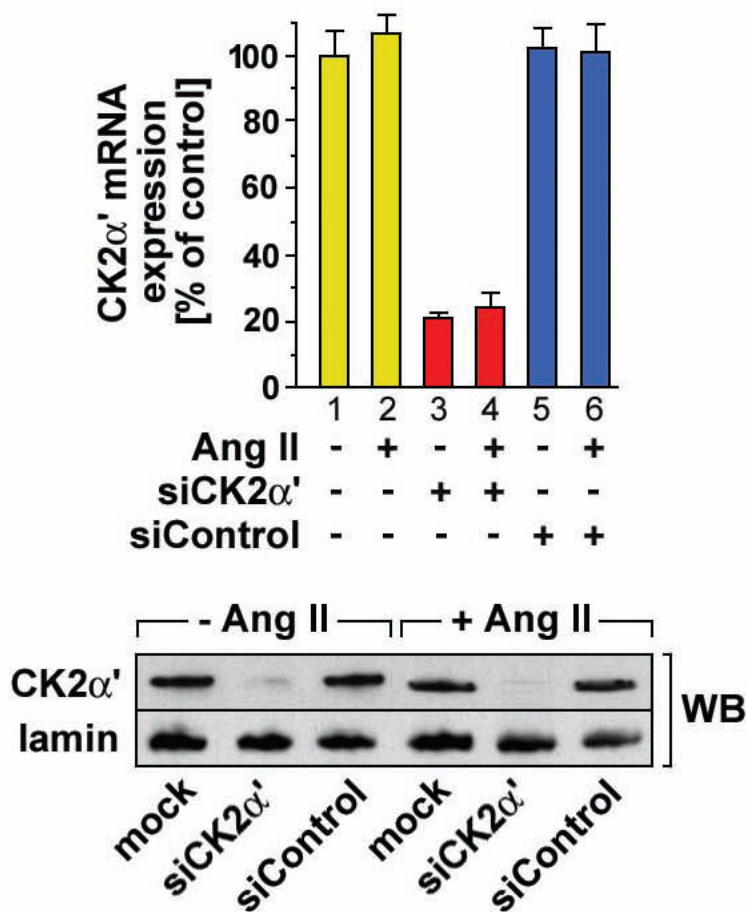


Abb. 15e: RNA-Interferenz (siCK2 α') inhibiert die Proteinexpression von endogener CK2 α' in Kardiomyozyten. Die Zellen wurden vor Angiotensin-Behandlung (6h) für 72h lentiviral mit siCK2 α' oder mit siControl (ohne Ziel-RNA) transduziert. Die Analyse der CK2 α' -mRNA-Mengen (oben) erfolgte durch quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) gekoppelt mit reverser Transkription. Die CK2 α' -Protein-Mengen wurden durch Immunblotanalyse mit anti-CK2 α' untersucht (unten). mock = Transduktion ohne Virus

Hierzu wurden Kardiomyozyten durch einen lentiviralen Vektor mit siCK2 α' , kd.CK2 α' oder siControl (ohne Ziel-RNA) für 72h transduziert oder für 30 min mit dem Inhibitor DMAT (20 μ M) inkubiert. Anschließend erfolgte die Angiotensin-Behandlung für 4 h. Um die Notwendigkeit von CK2 α' bei der p27-Phosphorylierung weiter zu prüfen, wurden 1 h vor Angiotensin-Behandlung siCK2 α' exprimierende Kardiomyozyten mit rekombinanter aktiver CK2 α' (2,5 μ g/ml) retransduziert. Hierzu erfolgte die TAT-vermittelte Protein-Transduktion [100] von CK2 α' in diese Zellen. Um sicherzustellen, dass die transduzierte TAT-konjugierte CK2 α' zytoplasmatisch lokalisiert wird, wurde dieses Konstrukt mit dem starken nukleären Exportsignal (NES „nuclear export sequence“) des HIV1-Retrovirus (LPPLERLTL) [101] an

seinem N-Terminus versehen. Western Blot Analysen wurden mit den Zellextrakten und anti-p27 bzw. anti-Phosphor-p27 durchgeführt. Die Experimente zu Abb. 15d und Abb. 15f wurden zweimal mit den gleichen Ergebnissen durchgeführt.

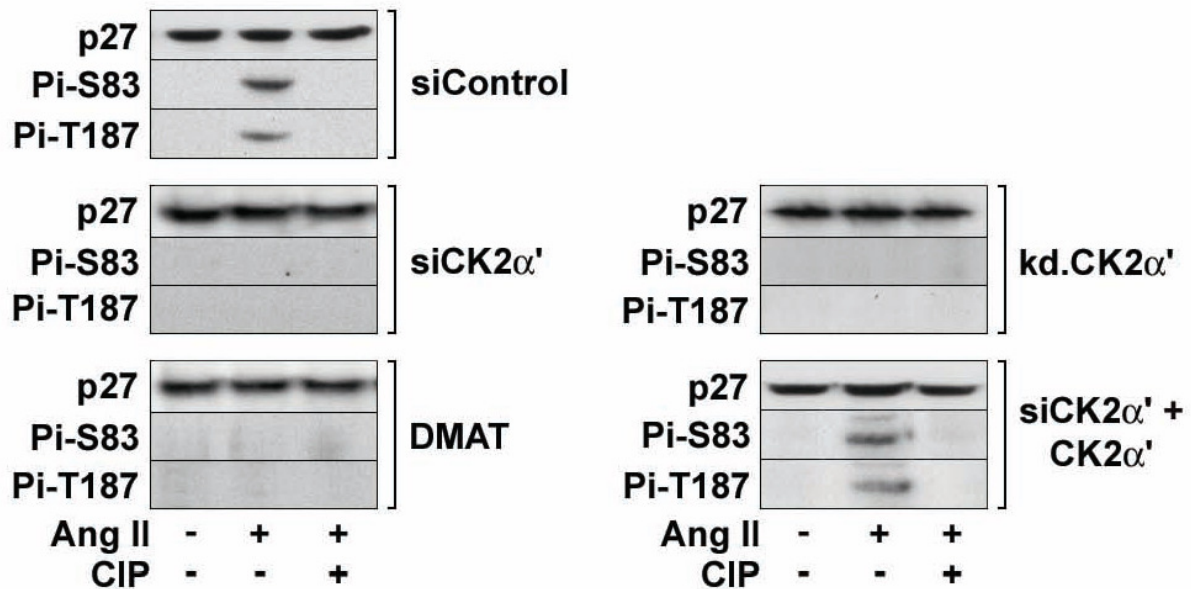


Abb. 15f: Angiotensin induziert die Phosphorylierung von p27 an S83 und T187 durch CK2 α' . Dieser Effekt wird durch Inhibition von CK2 α' aufgehoben. p27.Pi-T187 und p27.Pi-S83 = an T187 bzw. S83 phosphoryliertes p27; durch lentiviralen Vektor transduziert: siCK2 α' = RNA-Interferenz („RNA silencing“), siControl = Kontrolle (RNA-Interferenz ohne Ziel-RNA), kd.CK2 α' = Kinase inaktive („kinase-dead“) Punktmutante, CK2 α' = aktive Kinase (2,5 μ g/ml), Ang II = Angiotensin II, CIP = Intestinale Kalbsphosphatase („calf intestine phosphatase“), DMAT = pharmakologische Inaktivierung von CK2 α' durch DMAT [99]; 50 μ g Zellextrakt pro Reihe, n = 2

Es zeigte sich, dass die Protein-Transduktion von aktiver CK2 α' die negative Wirkung von siCK2 α' auf die Funktion der CK2 α' bei der Phosphorylierung von p27 in mit Angiotensin II behandelten Kardiomyozyten wieder aufheben konnte (Abb. 15f).

Zusammen veranschaulichen diese Ergebnisse, dass die p27-Phosphorylierung auch *in vivo* stark von der CK2 α' -Aktivität abhängig ist.

4.6 Für Phosphorylierung resistentes p27 inhibiert CK2 α' in Kardiomyozyten

Um den Einfluss der Phosphorylierung von p27 auf die CK2 α' -Aktivität in Kardiomyozyten zu untersuchen, erfolgte die Generierung von TAT-konjugierten p27-Konstrukten, welche zur Sicherung der zytoplasmatischen Lokalisierung die bereits im Vorfeld verwendete NES („nuclear export sequence“) trugen.

Die Mutante p27 Δ Pi, welche gegenüber der Phosphorylierung von CK2 α' refraktär ist und somit metabolisch stabil, blockte die durch Angiotensin II induzierte Aktivität von CK2 α' vollständig (Abb. 16a). Transduziertes wt.p27 (2,5 μ g/ml) inhibierte CK2 α' durch die im Vergleich geringere Stabilität weniger effektiv als transduziertes p27 Δ Pi. Die Mutante p27S83D/T187D, welche eine Phosphorylierung an S83 und T187 simulierte, war metabolisch instabil, was den inhibitorischen Effekt auf CK2 α' aufhob.

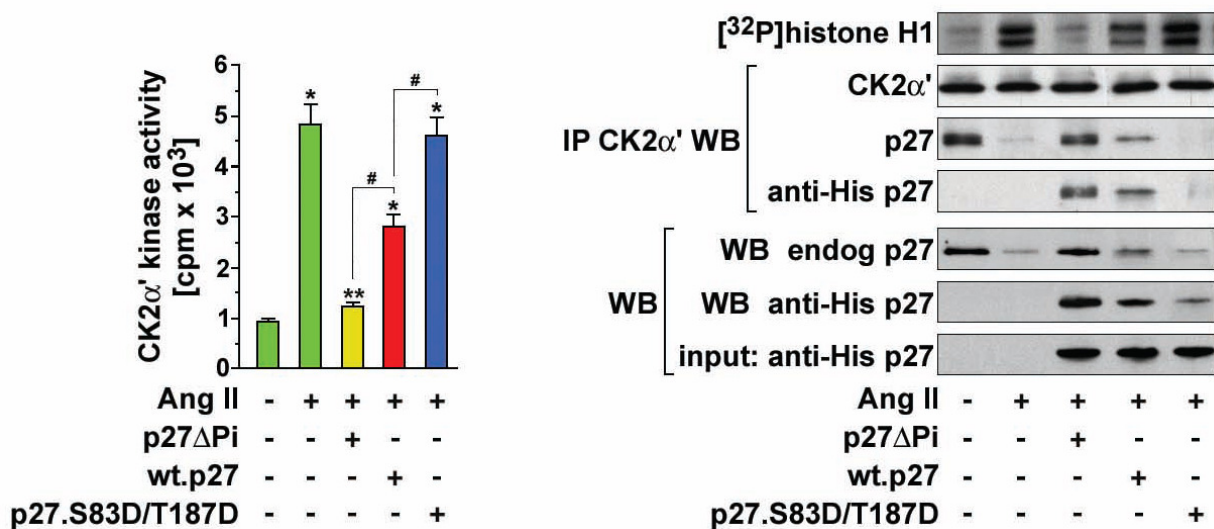


Abb. 16a: Die essentielle Funktion der CK2 α' vermittelten p27-Degradation für die Kardiomyozytenhypertrophie (Teil 1). Mutiertes p27 Δ Pi, welchem beide Phosphorylierungsstellen für CK2 α' fehlen, ist metabolisch stabil und inhibiert CK2 α' in Kardiomyozyten (gelb). Kardiomyozyten wurden 1h vor Angiotensin-II-Zugabe (4 h) mit dem Wildtyp wt.p27 (2,5 μ g/ml, rot), p27 Δ Pi bzw. der Phosphorylierung imitierenden Mutante p27.S83D/T187D (blau) TAT-konjugiert transduziert. Die anti-CK2 α' -Immunkomplex-Kinase-Essays wurden mit Histone H1 (³²P]histone H1) als Substrat durchgeführt. Die eingesetzten Mengen der transduzierten TAT-Fusionsproteine waren vor Angiotensin-Behandlung durch Immunblot des ganzen Zellextrakts analysiert worden. IP = Immunopräzipitation, WB = Western Blot, anti-His = Histidin Antikörper, input = eingesetzte Menge, endog = endogenes p27, „kinase activity“ = Kinase Aktivität, cpm = „counts per minute“ (Impulse pro Minute), MW +/- SD, n = 3, *P < 0.01 vs. unstimulierte Zellen, **P < 0.01 vs. Ang. #P < 0.01

Folglich führt die Phosphorylierung von p27 zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes auf CK2 α' in Kardiomyozyten.

4.7 CK2 α' ist in Kardiomyozyten für den Angiotensin II gesteuerten Abbau von p27 essentiell

Es wird beschrieben, dass für die Ubiquitinisierung und den proteasomalen Abbau von p27 die Phosphorylierung der durch Wachstumsfaktoren aktivierten CDK2 notwendig ist [110, 111]. Unter diesem Aspekt sollte untersucht werden, ob CK2 α' den Umsatz von p27 in Kardiomyozyten reguliert. Der Angiotensin II gesteuerte Abfall des Proteinpegels von p27 ist empfindlich auf die Proteasom-Inhibition durch Lactacystin (Abb. 16b).

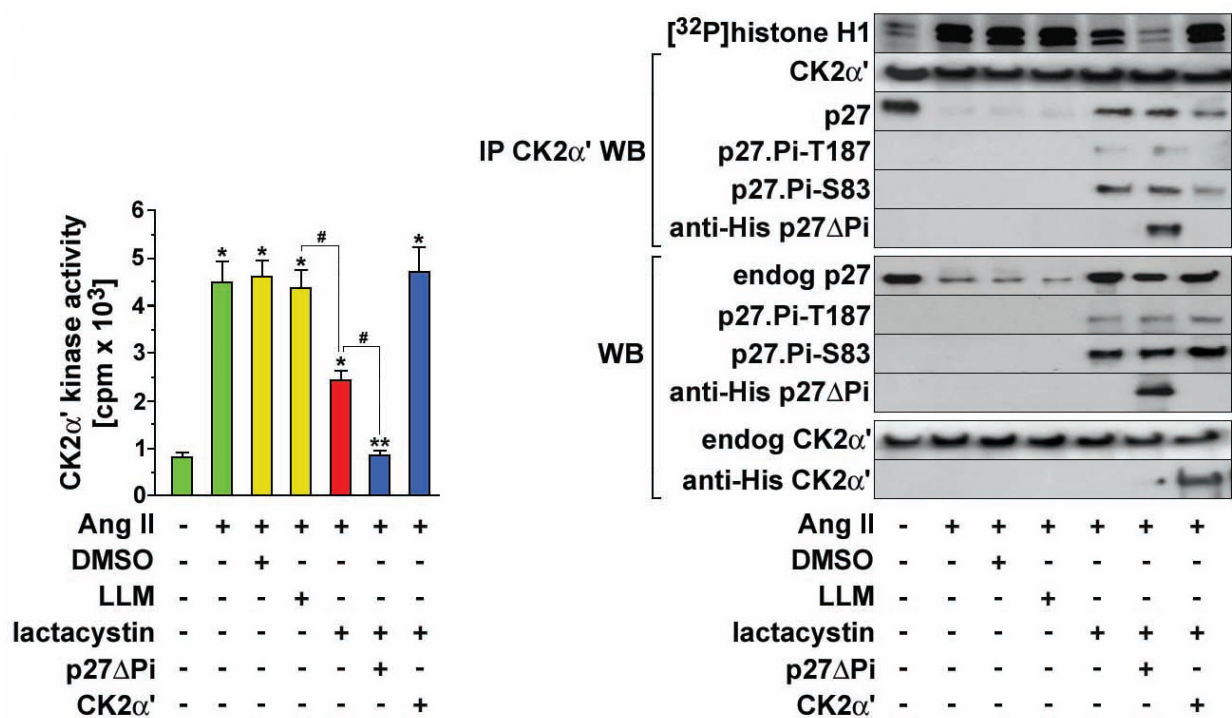


Abb. 16b: Die essentielle Funktion der CK2 α' vermittelten p27-Degradation für die Kardiomyozytenhypertrophie (Teil 2). Die pharmakologische Inhibition des 26S-Proteasoms verhindert den Angiotensin induzierten Abbau von p27. Kardiomyozyten wurden mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin (10 μ M) oder proteasomal inaktivem LLM (50 μ M) für 30 min vorbehandelt, anschließend für 6 h mit Angiotensin II (Ang II) inkubiert und lysiert. Alternativ erfolgte 1 h vor Angiotensin die TAT-konjugierte Transduktion der Lactacystin behandelten Zellen mit CK2 α' oder p27 Δ Pi (2.5 μ g/ml). Die anti-CK2 α' -Immunkomplex-Kinase-Essays wurden mit Histone H1 ([³²P] histone H1) als Substrat durchgeführt. Western Blots (WB) der kompletten Zellextrakte (50 μ g pro Reihe) wurden mit den auf der linken Seite angegebenen Antikörpern durchgeführt. IP = Immunopräzipitation; „kinase activity“ = Kinase Aktivität, cpm = „counts per minute“ (Impulse pro Minute), DMSO = Dimethylsulfoxid, LLM = Leucin-Leucin-Methionin, n = 2, siehe auch Abb. 16a

In diesen Zellen blieb die endogene CK2 α' trotz Akkumulierung von p27 katalytisch aktiv, was die Hypothese untermauert, dass die Phosphorylierung von p27 an S83/T187 die Fähigkeit zur Inhibition von CK2 α' beeinträchtigt.

Die Bestimmung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von p27 in Gegenwart von Cycloheximid, einem Protein-Synthese-Inhibitor, zeigt eine deutlich reduzierte $T_{1/2}$ in Angiotensin behandelten Zellen (Abb. 16c). Die Elimination von CK2 α' durch RNA-Interferenz (siCK2 α') oder die Vorbehandlung der Kardiomyozyten mit DMAT verhinderte die Destabilisierung von p27. Daraus folgt, dass die Integrität der Funktion von CK2 α' ein kritischer Faktor für den Abbau von p27 als Antwort auf Angiotensin-Stimulation in Kardiomyozyten ist.

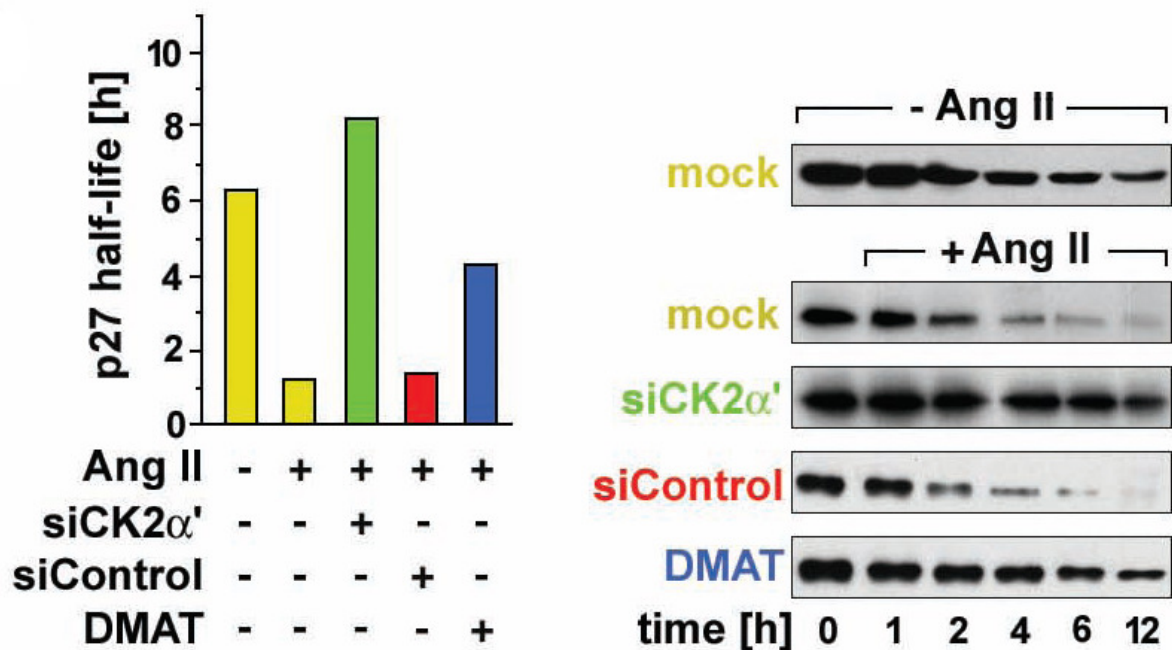


Abb. 16c: Die essentielle Funktion der CK2 α' vermittelten p27-Degradation für die Kardiomyozytenhypertrophie (Teil 3). Inhibition von CK2 α' verhindert den Angiotensin induzierten Abbau von p27. Für die Bestimmung der Halbwertszeit $T_{1/2}$ von p27 („p27 half-life“) wurden Kardiomyozyten für 72h mit lentiviralen Konstrukten infiziert, welche siCK2 α' (RNA Interferenz, grün) oder siControl (Kontrolle, RNA-Interferenz ohne Ziel-RNA, rot) enthielten. Anschließend erfolgte die Applikation von [β - 35 S]-Methionin/Cystein für 2h. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem Methionin in Anwesenheit von Angiotensin (Ang II) und Cycloheximid (100 μ g/ml) gesammelt, um die Proteinsynthese zum jeweiligen Zeitpunkt („time“) zu stoppen. Alternativ wurden die Zellen vor Angiotensin-Stimulation für 30 min mit DMAT (blau) inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit kovalent an Protein-A-Agarose gebundenem anti-p27-Antikörper. Aliquote vom kompletten Zellextrakt wurden einer SDS-PAGE zugeführt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert, autoradiographiert (rechts) und mit der ImageJ-Software (links) quantifiziert. N = 2, mock = Transduktion ohne Virus

4.8 Die RNA-Interferenz vermittelte Ausschaltung von CK2 α' interferiert mit der Angiotensin-Antwort in Kardiomyozyten

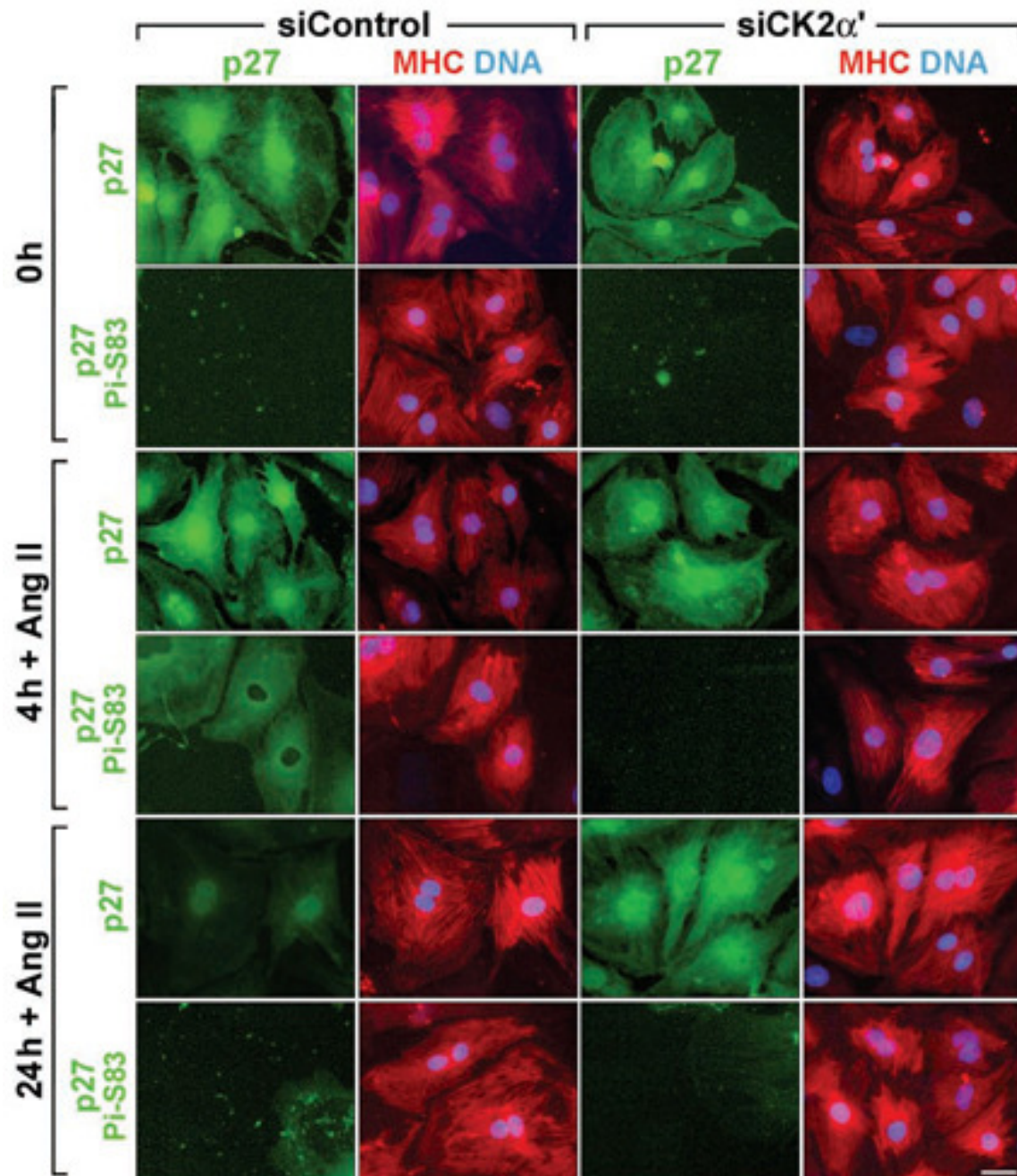


Abb. 16d: Die essentielle Funktion der CK2 α' vermittelten p27-Degradation für die Kardiomyozytenhypertrophie (Teil 4). Subzelluläre Lokalisierung von p27 und an S83 phosphoryliertem p27 in Angiotensin stimulierten Kardiomyozyten. Die Zellen wurden lentiviral mit siCK2 α' (RNA Interferenz) und siControl (Kontrolle, RNA-Interferenz ohne Ziel-RNA) für 72h transduziert und anschließend für die angegebene Zeit mit Angiotensin behandelt. Die fixierten Zellen wurden für die Immunfluoreszenz simultan mit anti-p27 (Hase, polyclonal) oder anti-p27.Pi-S83 (Hase, grün), anti-Tropomyosin (rot; zur Identifizierung von Kardiomyozyten) und Hoechst 33342 (blau) für genomische DNA behandelt. Skalierung 20 μ m. MHC = „myosin heavy chain“ (Myosin schwere Kette)

Um die Funktion von p27 beim hypertrophen Wachstum von Kardiomyozyten zu beleuchten, wurde die Phosphorylierung von p27 an S83 und dessen Einfluss auf die Expression von p27 untersucht. Es zeigte sich, dass in siCK2 α' exprimierenden Kardiomyozyten die Phosphorylierung an S83 und die Abnahme der p27-Protein-Level im Zytoplasma aufgehoben wurden (Abb. 16d).

Das bestätigt, dass beide Ereignisse CK2 α' und Angiotensin benötigen. Beide Effekte zeigten sich spezifisch in den siControl-exprimierenden Zellen, S83-Phosphorylierung von p27 bei 4h und drastisch reduzierte p27-Protein-Mengen bei 24h nach Angiotensin-Behandlung.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob ektope CK2 α' oder sip27 akut Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten auslösen kann.

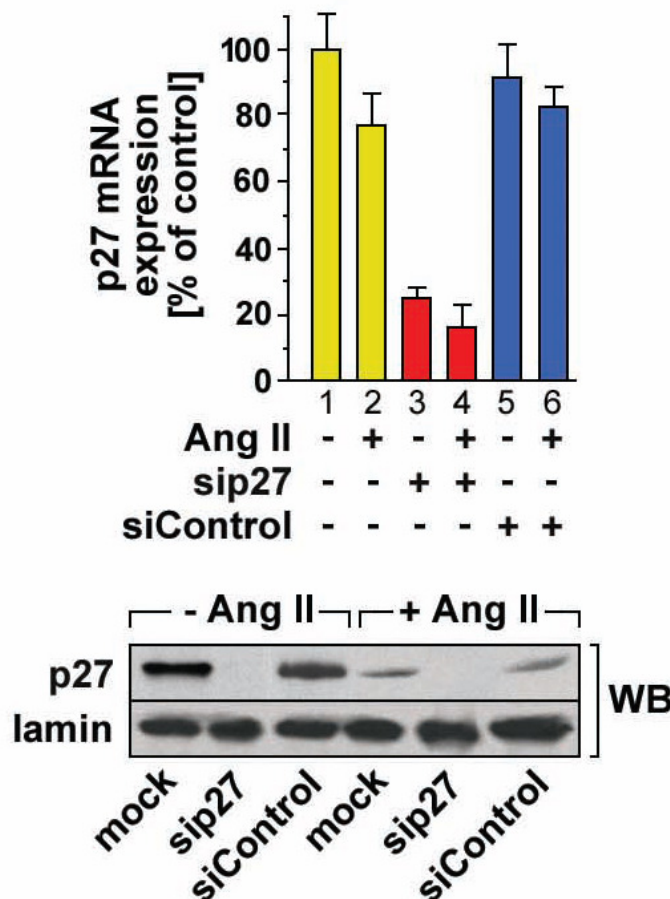


Abb. 16e: RNA-Interferenz durch lentivirale Transduktion von sip27 blockt die Proteinexpression von endogenem p27 in Kardiomyozyten. Die Zellen wurden vor Angiotensin-Stimulation (Ang II, 6h) für 72h mit lentiviral codierter sip27- (rot) oder siControl-RNA (Kontrolle, RNA-Interferenz ohne Ziel-RNA, blau) inkubiert. P27-mRNA Expressionslevels wurden durch qRT-PCR bestimmt (obere Reihe). Die P27-Protein-Expression („p27 mRNA expression“) wurde durch Immunblot-Analyse mit anti-p27 beobachtet (untere Reihe). WB = Western Blot, lamin = Lamin als nukleärer Marker, mock = Transduktion ohne Virus

Die Überexpression von siCK2 α' -resistenter SR.CK2 α' oder die Eliminierung von p27 durch RNA-Interferenz (sip27, Abb. 16e) induzierte hypertrophes Wachstum ohne die Gegenwart von

Angiotensin. Dies wurde durch die mRNA-Expression der Hypertrophie-Marker BNP und ANP sowie die *de novo* Protein-Synthese und die Zellgröße evaluiert (Abb. 16f).

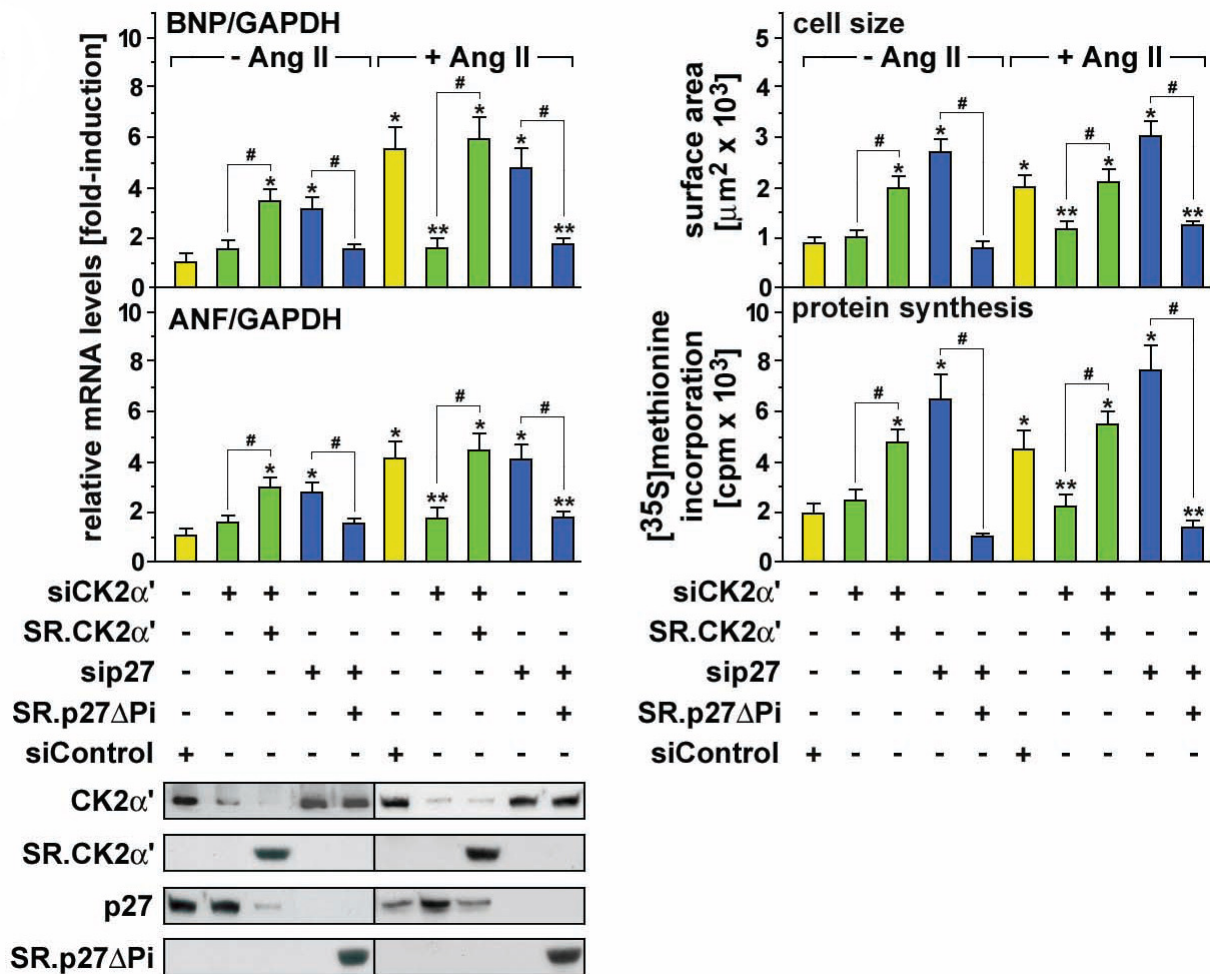


Abb. 16f: Die essentielle Funktion der CK2α' vermittelten p27-Degradation für die Kardiomyozytenhypertrophie (Teil 5). CK2α' ist für die Angiotensin-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten wichtig. Ektopie SR.CK2α' (siCK2α'-resistent) und sip27 (p27 RNA Interferenz) induzieren Hypertrophie in Kardiomyozyten ohne die Anwesenheit von Angiotensin. SR.CK2α' und SR.p27ΔPi sind rekombinante, lentiviral codierte und RNA-Interferenz-resistente cDNAs von CK2α' und p27ΔPi. Die Zellen wurden lentiviral für 72h infiziert in Gegenwart oder Abwesenheit von Angiotensin für 48h. Die mRNA-Mengen („relative mRNA levels“) wurden durch Echtzeit qRT-PCR-Analysen des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP bzw. ANF „atrial natriuretic factor“) und des Cerebralen Natriuretischen Peptids (BNP „brain natriuretic peptide“) als Hypertrophie-Marker normalisiert gegen GAPDH ermittelt (links). Die Bestimmung der *de novo* Proteinsynthese in Kardiomyozyten erfolgte durch die Markierung mit [β -³⁵S]-Methionin (rechts). Die Zellgrößenbestimmung („cell size“) wurde mikroskopisch mittels indirekter Immunfluoreszenz und anti-Tropomyosin sowie ImageJ-Software durchgeführt. Die Expressionsmengen von endogener CK2α' und p27 wurden durch Immunblot des gesamten Zellextrakt mit spezifischen Antikörpern (linksseitig) bestimmt. Ektopie SR.CK2α' und SR.p27ΔPi detektierten anti-His-Antikörper. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, cpm = „counts per minute“ (Impulse pro Minute), MW +/- Standardabweichung, n = 4, *P < 0.005 vs. siControl/-Ang II, **P < 0.005 vs. siControl/+Ang II

Kardiomyozyten welche siCK2α' exprimierten, waren für Angiotensin komplett refraktär. Co-Transduktion von SR.CK2α' reinduzierte das hypertrophe Wachstum in diesen Zellen. Somit

bestätigt sich, dass die Auswirkungen von siCK2 α' auf die Hypertrophie eine Folge der Ausschaltung des Zielobjekts CK2 α' sind. Da Co-Transduktion von SR.p27 Δ Pi und sip27 effektiv die Hypertrophie in Kardiomyozyten verhinderte, vermittelt CK2 α' vermutlich die Angiotensin-Anwort einschließlich der p27-Inaktivierung. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, dass CK2 α' und p27 *in vitro* wichtige Regulatoren der Kardiomyozyten-hypertrophie sind.

4.9 p27^{-/-}- Mäuse entwickeln eine altersabhängige Myokardhypertrophie

Mäuse in denen das p27-Gen ausgeschaltet wurde (p27^{-/-} - „knock-out“ - Mäuse), entwickeln eine kardiale Hyperplasie übereinstimmend mit der Rolle von p27 bei Differenzierung und Proliferation [102 - 104]. Mit einem Alter von 2 Monaten führt der Verlust von p27 im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (wt.p27-Mäuse), zu deutlich kleineren Kardiomyozyten ohne signifikante Unterschiede in Herzmasse und echocardiographischen Parametern (Abb. 17a, 17b und Tab. 3).

	wt			p27 ^{-/-}		
	2 months	4 months	8 months	2 months	4 months	8 months
heart weight [mg]	125 ± 7.4	146 ± 8.8**	169 ± 11.4 ^e	140 ± 9.5	234 ± 31* ^a	298 ± 20* ^b
body weight [g]	25 ± 1.2	28 ± 1.1**	32 ± 1.6 ^e	27 ± 1.2	31 ± 1.1* ^a	37 ± 1.2* ^b
heart rate, bpm	508 ± 11	525 ± 9	545 ± 18	522 ± 8	517 ± 11	512 ± 7
FS, %	42 ± 2.7	41 ± 3.1	40 ± 3.0	41 ± 2.3	32 ± 3.0* ^a	30 ± 2.1* ^a
LVEF, %	74 ± 3.2	76 ± 2.1	78 ± 2.9	75 ± 2.6	80 ± 2.9* ^a	84 ± 3.1* ^a
LVEDD, mm	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.3 ± 0.1* ^a	4.5 ± 0.1* ^d
LVESD, mm	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2
PWD, mm	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1* ^c	1.3 ± 0.1* ^d

Tab. 3: Echokardiographische Messungen von 2, 4 und 8 Monate („months“) alten wt.p27^{-/-} und p27^{-/-}-Mäusen. „heart weight“ = Herzgewicht, „body weight“ = Körpergewicht, „heart rate“ = Herzfrequenz, bpm = „beats per minute“, FS = „fractional shortening“ Verkürzung des Herzens während der Kontraktion = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] x 100; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVESD linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, PWD = posteriore Wand diastolisch, MW +/- Standardabweichung, n = 8 - 12, *P < 0.01 vs. altersentsprechende wt.p27-Maus (wt), **P < 0.05 vs. wt 2 Monate alt, ^aP < 0.01 vs. p27^{-/-} 2 Monate, ^bP < 0.05 vs. p27^{-/-} 4 Monate, ^cP < 0.01 vs. p27^{-/-} 2 Monate, ^dP < 0.05 vs p27^{-/-} 4 Monate, ^eP < 0.05 vs. wt 4 Monate

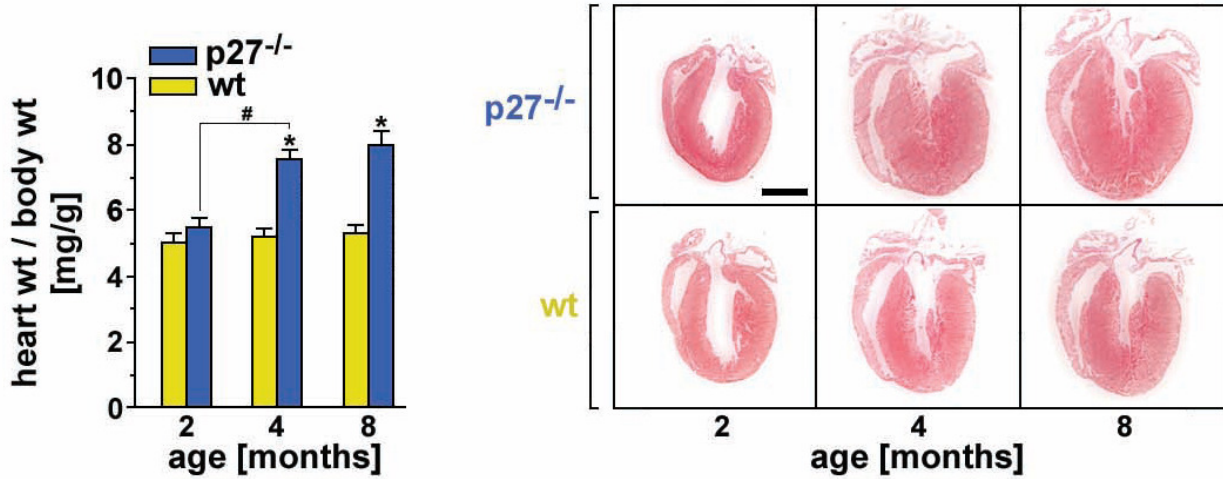


Abb. 17a: p27^{-/-}-Mäuse entwickeln eine altersabhängige kardiale Hypertrophie. Körpergewicht („body wt“) korrigiertes Herzgewicht („heart wt“) (links) und Masson-Färbung des myokardialen Bereichs (rechts). wt = wt.p27-Mäuse, „age“ = Alter in Monaten („months“), MW +/- Standardabweichung, n = 8 – 12, #P < 0.01 vs. sham (Scheinoperation ohne „thoracic aortic banding“ TAB), Skalierung = 2 mm

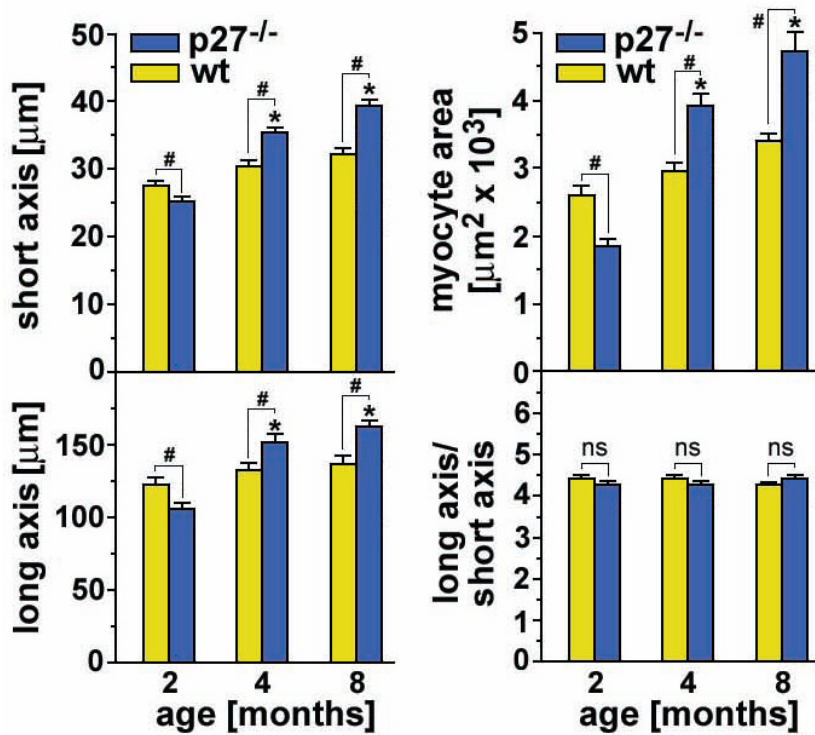


Abb. 17b: p27^{-/-}-Mäuse entwickeln eine altersabhängige kardiale Hypertrophie. Die Zunahme der Zellgröße („myocyte area“) in p27^{-/-}-Mäusen verglichen mit wt.p27-Mäusen (wt). 100 Zellen von 3 verschiedenen Mäusen wurden pro Gruppe untersucht. „short axis“ = kurze Achse, „long axis“ = lange Achse, MW +/- Standardabweichung, #P < 0.01, *P < 0.01 vs. p27^{-/-} / 2 Monate, ns = nicht signifikant

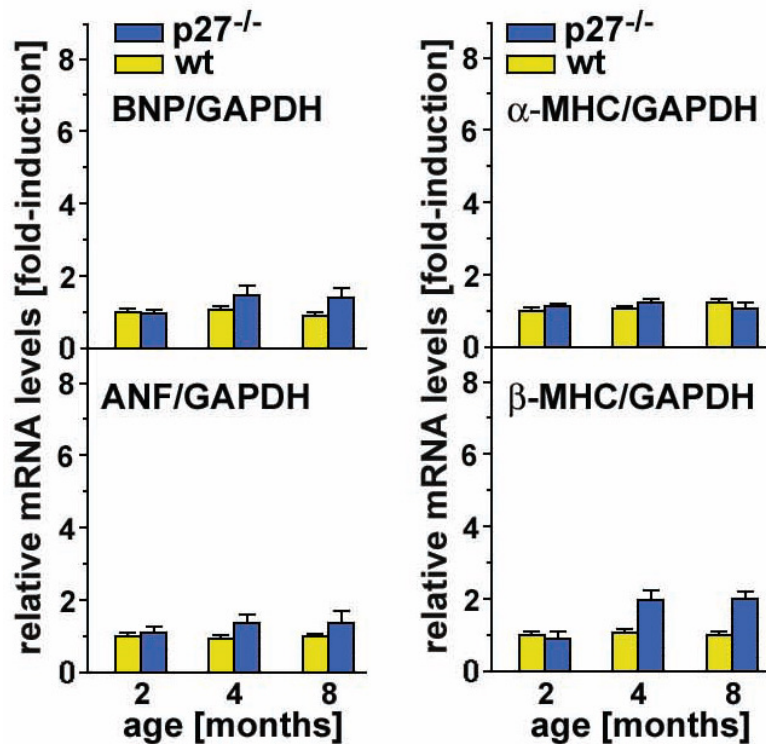


Abb. 17c: p27^{-/-}-Mäuse entwickeln eine altersabhängige kardiale Hypertrophie. Die Bestimmung der mRNA-Mengen („relative mRNA levels“) der Hypertrophie-Indikator-Gene ANF („atrial natriuretic factor“), BNP („brain natriuretic peptide“) und MHC („myosin heavy chain“) erfolgte durch qRT-PCR. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase „fold-induction“ = Vielfaches, MW +/- Standardabweichung, n = 4 - 6

Mit 4 Monaten entwickeln die p27^{-/-}-Mäuse eine kardiale Hypertrophie mit einer durchschnittlichen Steigerung der Herz/Körper-Gewicht-Ratio von 45% und einer deutlichen Zunahme von Länge und Breite der Kardiomyozyten im Vergleich zu den Kontrollen. Die Länge/Breite-Ratio blieb unverändert, was indiziert, dass die Veränderung der Zellgröße vergleichbar mit der bei physiologischer Hypertrophie beobachteten ist [105]. Im Gegensatz dazu ist pathologische Hypertrophie charakterisiert durch die vermehrte Expression von ANP, BNP und β-MHC sowie einer Abnahme von α-MHC [106]. Hier wurden keine Veränderungen in der Expression dieser Hypertrophie-Gene in p27^{-/-}-Mäusen beobachtet (Abb. 17c). Daher führt der Verlust von p27 in älteren Mäusen zur spontanen kardialen Hypertrophie ohne Dekompensation.

4.10 Die Anfälligkeit von p27^{-/-}- Mäusen auf durch Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion

Bei 2 Monate alten Mäusen sind die Herz/Körper-Gewicht-Indizes in p27^{-/-}-Mäusen vergleichbar mit denen von wt.p27-Mäusen (Abb. 17a). Daher wurde analysiert, ob p27^{-/-}-Mäuse wie erwartet, denn p27 supprimiert Hypertrophie-Signale, empfindlicher auf hypertrophe Stimulation nach thorakaler Aorteneinschnürung („thoracic aortic banding“ TAB) reagieren.

Nach 3 Wochen TAB stieg die Herz/Körper-Gewicht-Ratio um 63% im Vergleich mit einer Steigerung von 29% bei wt.p27-Mäusen (Abb. 17d-f). Die Verkürzung des Herzens während der Kontraktion bzw. der Ejektion („fractional shortening“, [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] x 100) war signifikant reduziert in den TAB zugeführten p27^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den TAB-Mäusen mit wt.p27 (Tab. 4). p27^{-/-}-Herzen wiesen eine signifikant größere Dilatation als wt.p27-Herzen auf, wie die ansteigenden Durchmesser der linken Ventrikel in Systole (LVESD) und Diastole (LVEDD) zeigten. Somit bestätigte sich, dass p27 für die Prävention der hochdruckinduzierten Verschlechterung der kardialen Funktion wichtig ist.

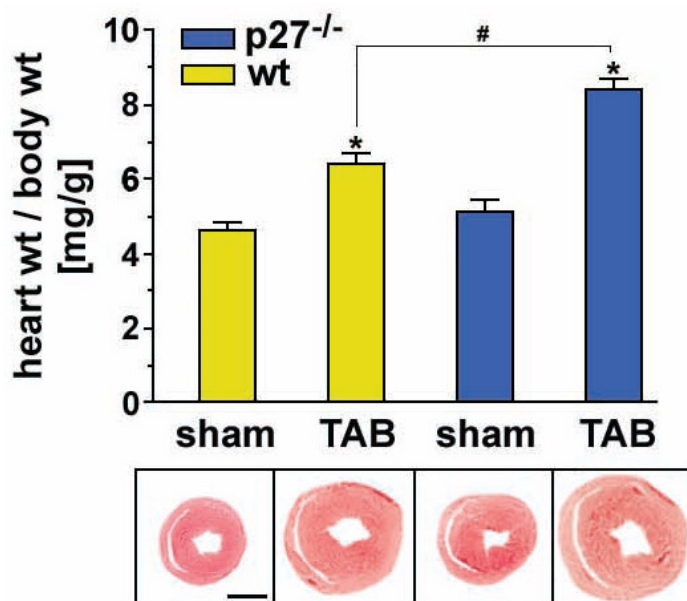


Abb. 17d: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. 6 Wochen alte Mäuse wurden thorakaler Aorteneinschnürung (TAB = „thoracic aortic banding“) bzw. einer Scheinoperation („sham“) unterzogen. Nach 3 Wochen wurde die Herz-/Körper-Gewicht-Ratio („heart wt“ / „body wt“) bestimmt. wt = wt.p27-Mäuse, MW +/- Standardabweichung, n = 8-10, #P < 0.01, *P < 0.01 vs. „sham“.

	wt		p27 ^{-/-}	
	sham	TAB	sham	TAB
heart rate, bpm	498 ± 13	485 ± 17	492 ± 14	479 ± 21
FS, %	45 ± 2.9	36 ± 2.8**	46 ± 2.6	28 ± 2.7*#
LVEF, %	78 ± 2.8	70 ± 2.4**	76 ± 2.5	61 ± 2.9*#
LVEDD, mm	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1**	3.7 ± 0.2	4.3 ± 0.2*#
LVESD, mm	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2**	1.4 ± 0.2	2.5 ± 0.1*#
Gradient, mmHg	–	76 ± 10	–	78 ± 12

Tab. 4: Echokardiographische Messungen von 2 Monate alten wt.p27^{-/-} und p27^{-/-}-Mäusen 3 Wochen nach TAB (s.o.). „heart rate“ = Herzfrequenz, bpm = „beats per minute“, FS = „fractional shortening“ Verkürzung des Herzens während der Kontraktion, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVESD linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, „sham“ = Scheinoperation ohne TAB, Gradient = Druckgradient durch TAB, MW +/- Standardabweichung, n = 8 – 10, *P < 0.01 vs. p27^{-/-} „sham“, #P < 0.01 vs. wt.p27 TAB, **P < 0.01 vs. wt „sham“

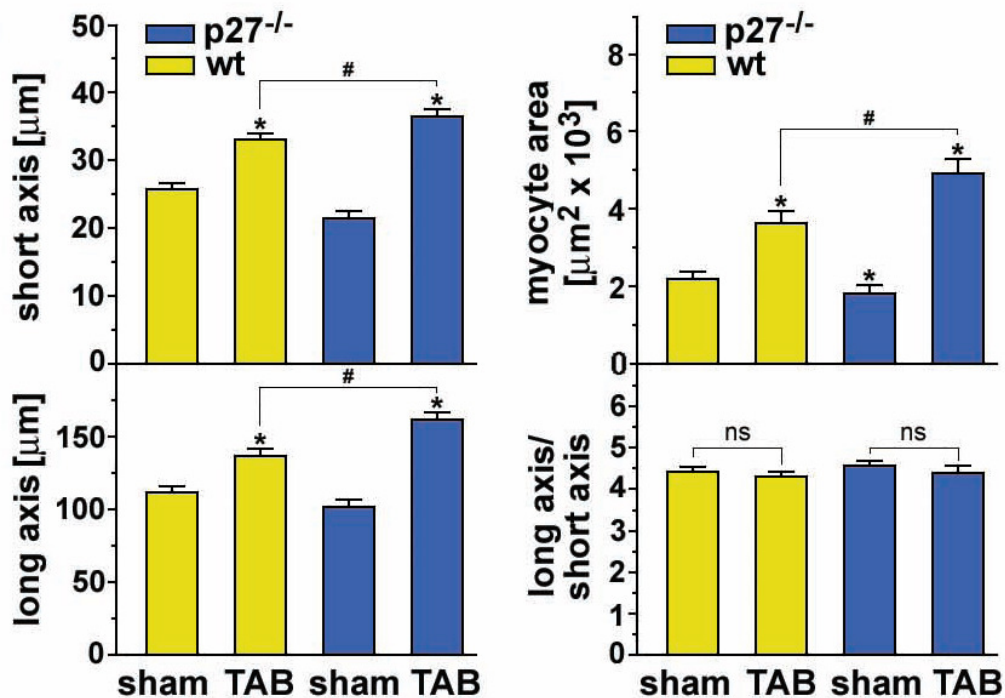


Abb. 17e: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. Morphometrische Analysen der isolierten Kardiomyozyten von 9 Wochen alten TAB oder „sham“ behandelten Mäusen. 100 Zellen von 3 verschiedenen Mäusen wurden aus jeder Gruppe untersucht. „sham“ = Scheinoperation ohne TAB, „short axis“ = kurze Achse, „long axis“ = lange Achse, „myocyte area“ Zellfläche, MW +/- Standardabweichung, #P < 0.01, *P < 0.01 vs. „sham“

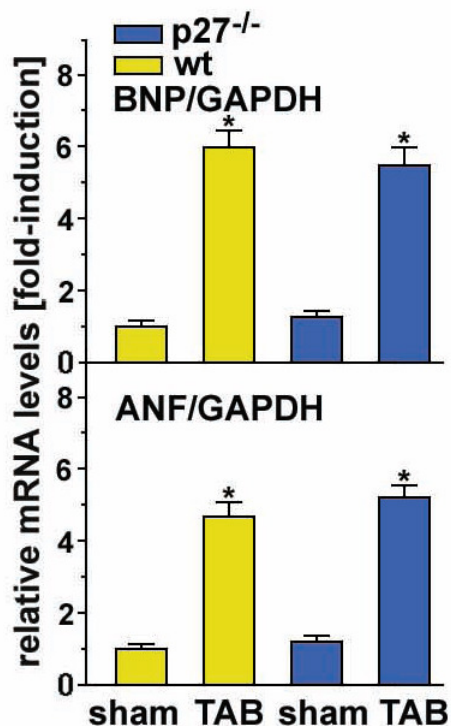


Abb. 17f: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. Die Bestimmung der mRNA-Mengen („relative mRNA levels“) der Hypertrophie-Indikator-Gene ANF („atrial natriuretic factor“) und BNP („brain natriuretic peptide“) erfolgte durch qRT-PCR normalisiert gegen GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, „fold-induction“ = Vielfaches, MW +/- Standardabweichung, n = 4 – 6, *P < 0.01 vs. „sham“

Immunkomplex-Kinase-Essays demonstrierten die hochdruckinduzierte Destabilisierung von CK2 α' und p27 (Abb. 17g). Wegen der zu erwartenden Zunahme absterbender Kardiomyozyten als Ergebnis des kardialen Umbauprozesses wurden die Auswirkungen der p27-Auslöschung auf die TAB-induzierte Apoptose untersucht (Abb. 17h,i). Mit dem sehr sensitiven TUNEL-Test wurden die während der Apoptose durch Nucleasen entstehenden Strangbrüche in der DNA markiert. Im Vergleich mit den wt.p27-TAB-Herzen zeigte sich eine signifikante Steigerung der TUNEL-positiven Kardiomyozyten-Kerne in p27^{-/-}-TAB-Herzen.

Folglich trägt der Verlust von p27 wenigstens teilweise zur Verschlechterung der kardialen Funktion bei. Zusammengefaßt legen die Ergebnisse nahe, dass p27 als Suppressor bei der Signalübermittlung für die kardiale Hypertrophie fungiert.

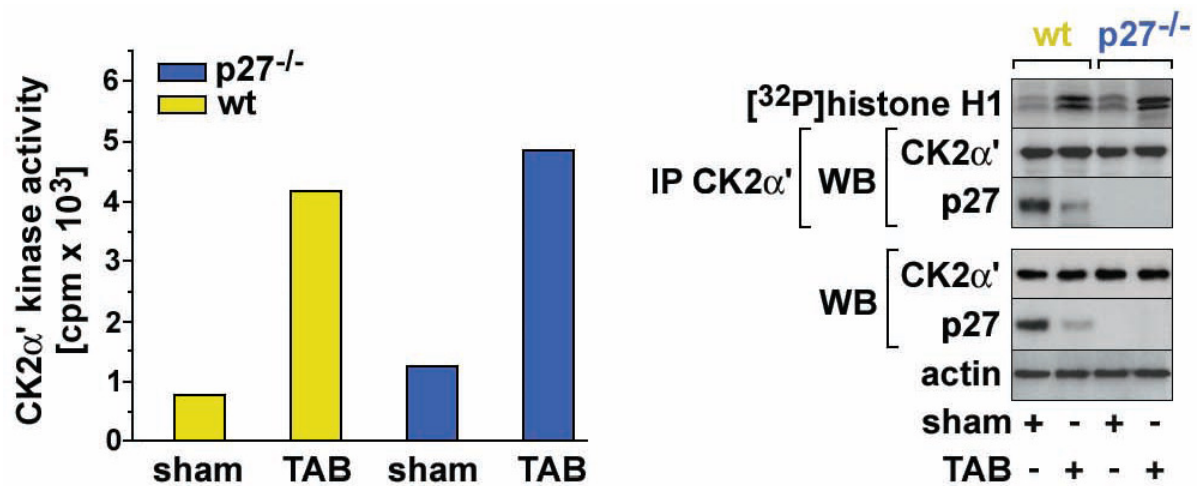


Abb. 17g: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. TAB induziert CK2α'-Kinaseaktivität und Herunterregulation der Proteinexpression von p27. Linksventrikuläre Extrakte (2 - 3 mg) wurden anti-CK2α'-Immunkomplex-Kinase-Essays mit Histone H1 als Substrat zugeführt. Die Höhe der endogenen Proteinmengen wurde aus den vollständigen linksventrikulären Gewebeextrakten (60 µg) durch Immunblot analysiert (WB = Western Blot). IP = Immunopräzipitation, [³²P]-histone H1 = durch CK2α' und [γ-³²P]-ATP phosphoryliertes Substrat, Nachweis durch Phosphor-Imager (rechts, obere Reihe), „sham“ und TAB s.o.

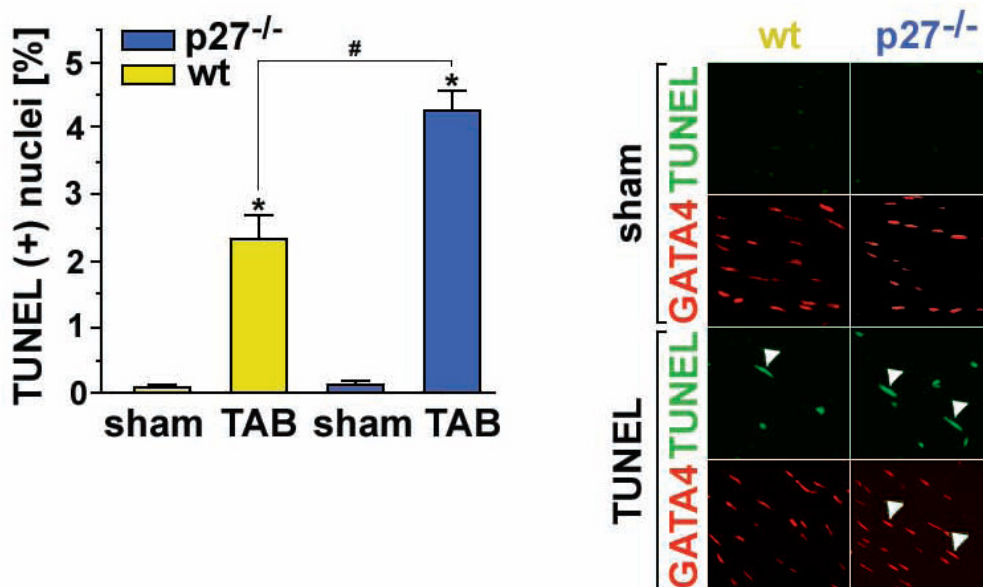


Abb. 17h: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. Quantifizierung von apoptotischen Kardiomyozyten (weiße Pfeile) durch Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) vermittelte *in situ* dUTP-Markierung der freien Enden von DNA-Strangbrüchen als Apoptose-Indikator („Terminal-deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling“ = TUNEL, grün) und durch Kardiomyozyten spezifische GATA4-Immunfluoreszenz-Histochemie von linksventrikulären Zellen (rot). MW +/- Standardabweichung, n = 4, #P < 0.05, *P < 0.01 vs. „sham“ (s.o.)

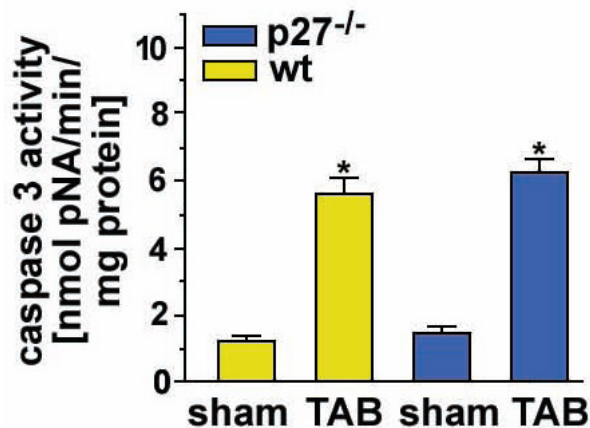


Abb. 17i: Die Anfälligkeit von p27^{-/-}-Mäusen auf Hypertonie (TAB) induzierte kardiale Dysfunktion. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität („caspase 3 activity“) in linksventrikulären Herzgewebeproben. Der Umsatz des Caspase-3-Substrats Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid) bei OD405nm gemessen. wt = wt.p27-Mäuse, pNA/ min /mg Protein = p-Nitroanilid-Detektion pro Minute pro Milligramm Protein, MW +/- Standardabweichung, n = 4, *P < 0.01 vs. „sham“, die Experimente in Abb. 17g –i wurden zweimal mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt.

4.11 Der inhibitorische Effekt der katalytisch inaktiven CK2α´ auf die kardiale Hypertrophie ist in p27^{-/-}- Mäusen aufgehoben

Um zu untersuchen, ob der CK2α´-gesteuerte p27-Umsatz *in vivo* eine Rolle spielt, wurden wt.p27-Mäuse und p27^{-/-}-Mäuse chronisch mit Angiotensin infundiert [107] und erhielten intraperitoneal rekombinante TAT-konjugierte CK2α´ und p27-Varianten injiziert. Die Indizes für kardiale Hypertrophie einschließlich Herz/Körper-Gewicht-Ratio, Kardiomyozytengröße und ANP- bzw. BNP-mRNA-Mengen waren in Angiotensin behandelten wt.p27-Mäusen signifikant erhöht, im Vergleich zur gleichen Gruppe, welche katalytisch inaktive kd.CK2α´ oder p27ΔPi injiziert bekommen hatten (Abb. 18a-d). Immunkomplex-Kinase-Essays demonstrierten, dass die Angiotensin induzierte CK2α´-Aktivität durch kd.CK2α´ oder p27ΔPi aufgehoben wurde (Abb. 18e). Diese Mäuse hatten im Vergleich zu den nur mit Angiotensin infundierten normale LVEDD und LVESD (Tab. 5). Keine antihypertrophen Effekte wurden bei mit p27ΔC injizierten Mäusen gesehen, welches CK2α´ nicht binden kann (p27.1-86; Abb. 13c), diese dienten als Negativkontrolle. Bemerkenswerterweise induzierte rekombinante aktive CK2α´ kardiale Hypertrophie ohne Anwesenheit von Angiotensin (Abb. 18a-c). CK2α´-Aktivität und p27-Destabilisierung waren vergleichbar mit den nicht transduzierten Angiotensin behandelten Geschwistern (Abb. 18e). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Herunterregulation von p27 als kausales Ereignis für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie notwendig ist.

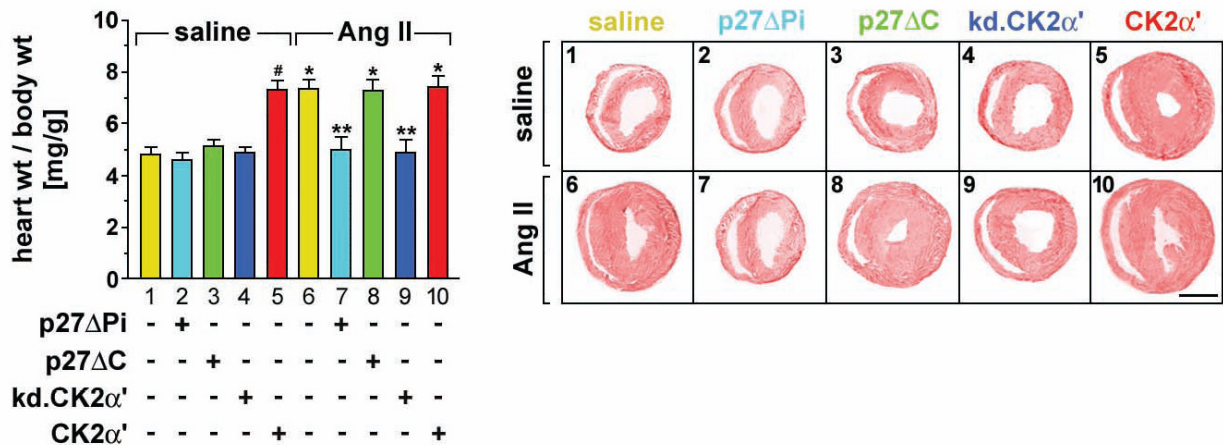


Abb. 18a: CK2 α' ist wichtig für die Angiotensinwirkung *in vivo*. Proteintransduktion von katalytisch inaktiver kd.CK2 α' oder p27 Δ Pi hebt die hypertrophe Wirkung von Angiotensin in wt.p27-Mäusen auf. Die Transduktion von rekombinanter aktiver CK2 α' bewirkt kardiale Hypertrophie ohne Anwesenheit von Angiotensin. Als negative Kontrolle dient p27 Δ C, welches ohne die Fähigkeit CK2 α' zu binden keine antihypertrophen Effekte zeigt. Körpergewicht („body wt“) korrigiertes Herzgewicht („heart wt“) (links) und Masson-Färbung des transversal geschnittenen Myokards (rechts). „saline“ = NaCl-Lösung (0.9%), „sham saline“ = Placeboinfusion mit 0.9% NaCl-Lösung, Ang II = Angiotensin II, p27 Δ C = kann nicht an CK2 α' binden, p27 Δ Pi = metabolisch stabil, MW +/- Standardabweichung, n = 6 – 8, #P < 0.01 vs. „sham saline“, *P < 0.01 vs. „sham saline“, Skalierung 2 mm

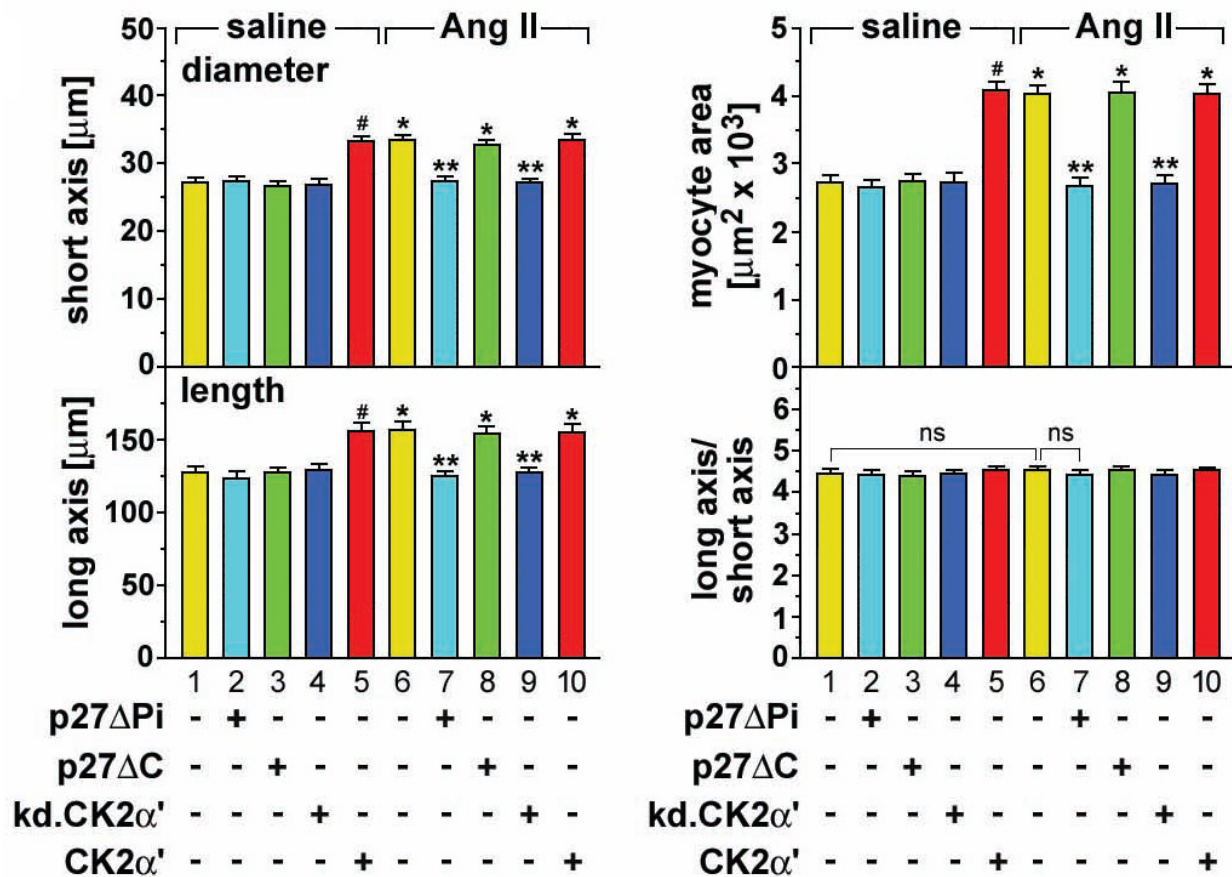


Abb.18b: CK2 α' ist wichtig für die Angiotensinwirkung *in vivo*. Proteintransduktion von katalytisch inaktiver kd.CK2 α' oder p27 Δ Pi hebt die hypertrophe Wirkung von Angiotensin in wt.p27-Mäusen auf. Die Transduktion von rekombinanter aktiver CK2 α' bewirkt kardiale Hypertrophie ohne Anwesenheit von Angiotensin. Zellgrößenanalyse adulter Kardiomyozyten von 8 Wochen alten Mäusen. 100 Zellen von 3 verschiedenen Mäusen wurden pro Gruppe untersucht. „short axis“ = kurze Achse, „long axis“ = lange Achse, „diameter“ = Durchmesser, „length“ = Länge, „myocyte area“ = Myozytenfläche, „saline“ = 0.9% NaCl, „sham saline“ = Placeboinfusion mit 0.9 % NaCl-Lösung, MW +/- Standardabweichung, #P < 0.01 vs. „sham saline“, *P < 0.01 vs. „sham saline“, **P < 0.01 vs. Ang

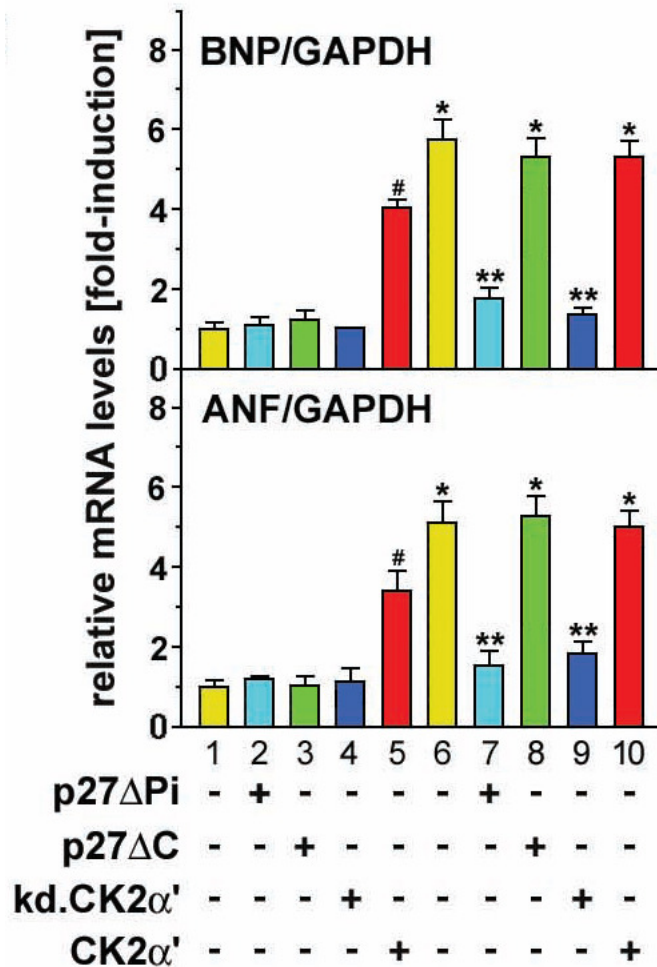


Abb. 18c: CK2 α' ist wichtig für die Angiotensinwirkung *in vivo*. Proteintransduktion von katalytisch inaktiver kd.CK2 α' oder p27 Δ Pi hebt die hypertrophe Wirkung von Angiotensin in wt.p27-Mäusen auf. Die Transduktion von rekombinanter aktiver CK2 α' bewirkt kardiale Hypertrophie ohne Anwesenheit von Angiotensin. Die Bestimmung der mRNA-Mengen („relative mRNA levels“) der Hypertrophie-Indikator-Gene ANF („atrial natriuretic factor“) und BNP („brain natriuretic peptide“) erfolgte durch qRT-PCR normalisiert gegen GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, „fold-induction“ = Vielfaches, MW +/- Standardabweichung, n = 6 – 8, *P < 0.05 vs. „sham saline“, **P < 0.05 vs. Ang, #P < 0.05 vs. „sham saline“

	wt saline	p27 ^{-/-} saline	wt Ang	p27 ^{-/-} Ang
FS, %	39±2.4	41±3.1	50±3.0*	53±2.2*
LVEF, %	72±2.9	75±2.1	80±2.9*	84±3.1*
LVEDD, mm	3.8±0.1	3.6±0.2	3.1±0.2*	2.9±0.1*
LVESD, mm	1.3±0.2	1.4±0.2	2.0±0.1*	2.2±0.2*
PWD, mm	0.7±0.1	0.7±0.1	1.1±0.1*	1.2±0.2*

	wt saline TAT.p27 ^Δ Pi	p27 ^{-/-} saline TAT.p27 ^Δ Pi	wt Ang TAT.p27 ^Δ Pi	p27 ^{-/-} Ang TAT.p27 ^Δ Pi
FS, %	40±2.3	42±2.6	39±2.5**	38±3.4**
LVEF, %	70±2.3	73±2.3	69±2.8**	72±2.5**
LVEDD, mm	3.8±0.2	3.5±0.2	3.9±0.1**	3.6±0.1**
LVESD, mm	1.4±0.2	1.3±0.1	1.3±0.1**	1.3±0.2**
PWD, mm	0.7±0.1	0.7±0.2	0.8±0.1**	0.7±0.1**

	wt saline TAT.p27 ^Δ C	p27 ^{-/-} saline TAT.p27 ^Δ C	wt Ang TAT.p27 ^Δ C	p27 ^{-/-} Ang TAT.p27 ^Δ C
FS, %	41±1.8	42±2.4	54±3.2	56±3.9
LVEF, %	69±2.1	73±2.6	81±3.5	82±3.8
LVEDD, mm	3.6±0.2	3.7±0.2	3.0±0.2	2.8±0.2
LVESD, mm	1.4±0.1	1.3±0.1	2.3±0.1	2.3±0.2
PWD, mm	0.7±0.1	0.6±0.2	1.2±0.2	1.1±0.1

	wt saline TAT.CK2 ^{α'}	p27 ^{-/-} saline TAT.CK2 ^{α'}	wt Ang TAT.CK2 ^{α'}	p27 ^{-/-} Ang TAT.CK2 ^{α'}
FS, %	52±2.0#	n.d.	55±3.9*	n.d.
LVEF, %	83±3.1#	n.d.	82±2.8*	n.d.
LVEDD, mm	3.0±0.2#	n.d.	2.8±0.1*	n.d.
LVESD, mm	2.4±0.2#	n.d.	2.4±0.1*	n.d.
PWD, mm	1.3±0.2#	n.d.	1.3±0.1*	n.d.

	wt saline TAT.dnCK2 ^{α'}	p27 ^{-/-} saline TAT.dnCK2 ^{α'}	wt Ang TAT.dnCK2 ^{α'}	p27 ^{-/-} Ang TAT.dnCK2 ^{α'}
FS, %	40±1.5	39±2.6	38±2.6**	52±1.9*
LVEF, %	71±2.4	69±2.3	71±2.3**	83±2.8*
LVEDD, mm	3.7±0.2	3.8±0.2	3.8±0.2**	2.8±0.1*
LVESD, mm	1.4±0.2	1.3±0.1	1.3±0.1**	2.1±0.2*
PWD, mm	0.7±0.1	0.7±0.2	0.7±0.2**	1.2±0.1*

Tab. 5: Echokardiographische Messungen nach 14 Tagen Infusion von Angiotensin II (Ang) bzw. physiologischer Kochsalzlösung („saline“) bei 8 Wochen alten Wildtyp- (wt) und p27^{-/-}-Mäusen, FS = „fractional shortening“ Verkürzung des Herzens während der Kontraktion, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVESD linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, PWD = posteriore Wand diastolisch, *P < 0.05 vs. Placeboinfusion („sham saline“), **P < 0.05 vs. Angiotensin, #P < 0.05 vs. Placeboinfusion („sham saline“), n.d. = nicht bestimmt („not determined“)

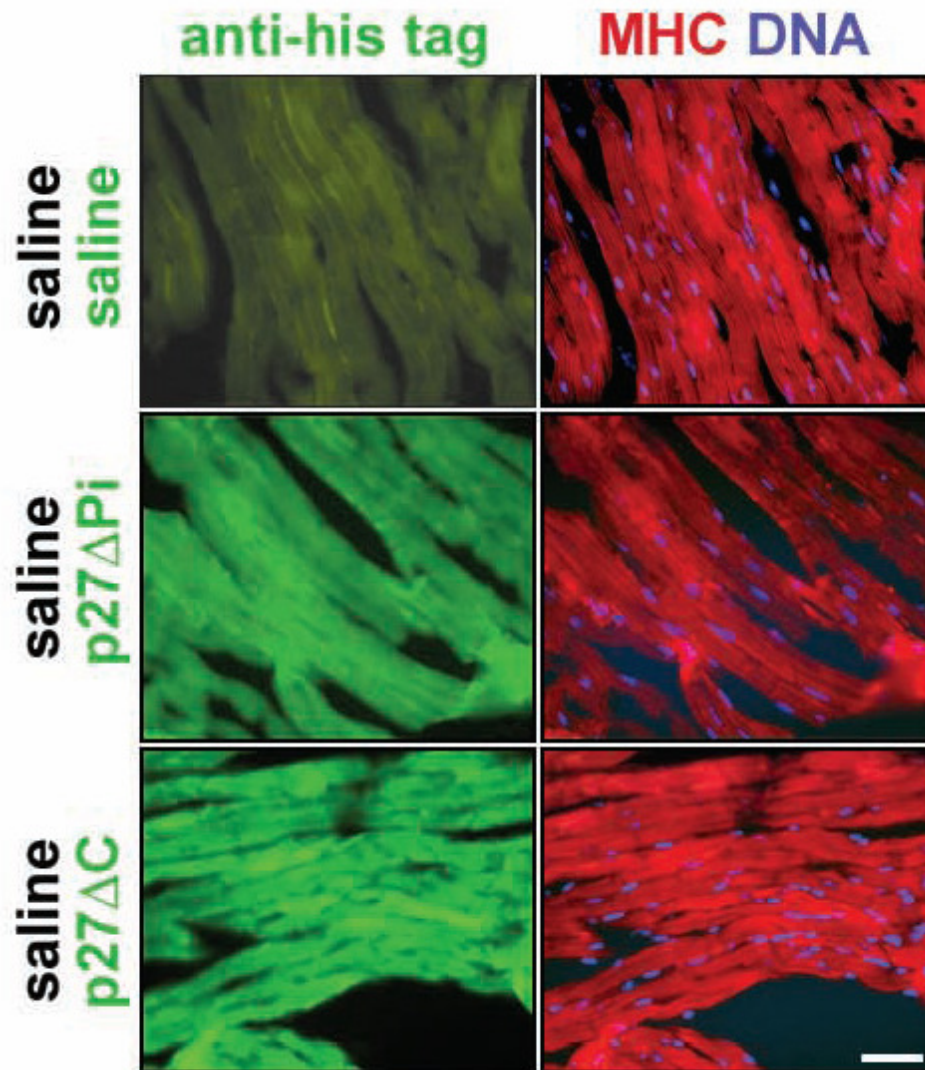


Abb. 18d: Visualisierung von ektoem TAT-konjugiertem p27 Δ Pi (grün) durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mittels anti-His₍₆₎-Etikett-Antikörpern („anti-his-tag“). Hoechst 33342 (blau) für genomische DNA, MHC = „myosin heavy chain“ (Myosin schwere Kette, rot) Skalierung 200 μ m

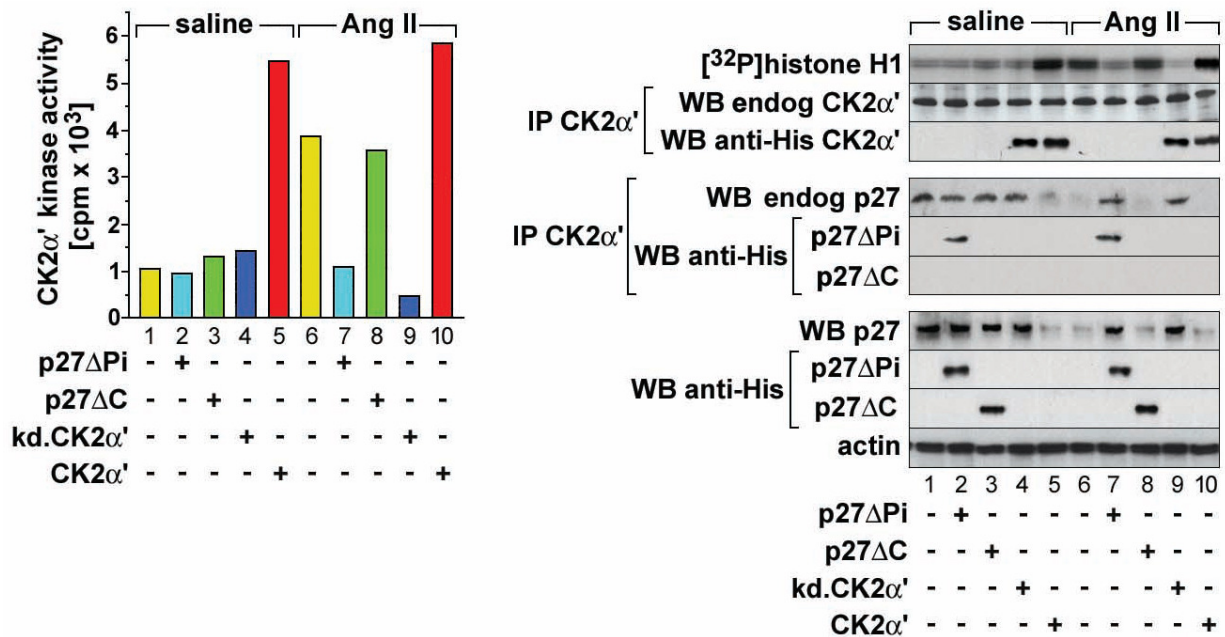


Abb. 18e: CK2α' ist wichtig für die Angiotensinwirkung *in vivo*. Proteintransduktion von katalytisch inaktiver kd.CK2α' oder p27ΔPi hebt die hypertrophe Wirkung von Angiotensin in wt.p27-Mäusen auf. Die Transduktion von rekombinanter aktiver CK2α' bewirkt kardiale Hypertrophie ohne Anwesenheit von Angiotensin. Linksventrikuläre Extrakte (2 - 3 mg) wurden anti-CK2α'-Immunkomplex-Kinase-Essays mit Histone H1 als Substrat zugeführt. Aliquote der Kinase-Reaktionen wurden durch Immunblot mit den jeweiligen Antikörper (oben und mitte) analysiert. Die Höhe der endogenen („endog“) Proteinmengen wurde aus den vollständigen linksventrikulären Gewebeextrakten (60 µg) durch Immunblot analysiert. Die hier aufgeführten Experimente wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. WB = Western Blot. IP = Immunpräzipitation, [³²P]-histone H1 = durch CK2α' und [γ-]³²P-ATP phosphoryliertes Substrat, Nachweis durch Phosphor-Imager (rechts, obere Reihe), „kinase activity“ = Kinase Aktivität, cpm = „counts per minute“ (Impulse pro Minute), „saline“ = NaCl-Lösung

Als nächstes erfolgte die Untersuchung des Effektes transduzierter Proteine auf die Hypertrophie in p27^{-/-}-Mäusen. Die Eliminierung der Funktion des p27-Gens in diesen Tieren hebt die Fähigkeit von kd.CK2α' kardiale Hypertrophie zu blockieren komplett auf (Abb. 19a-d). Im Gegensatz dazu wurde die hypertrophe Antwort auf Angiotensin durch Injektion von p27ΔPi beseitigt. Daher wird die Wiederherstellung der p27-Proteinfülle im Myokard von p27^{-/-}- Mäusen begleitet von der Inhibition der Angiotensinwirkung. Darüber hinaus wurde, verglichen mit den wt.p27-Kontrollen, ein deutlicher Zuwachs an TUNEL-postiven Kardiomyozytenkernen in Angiotensin infundierten p27^{-/-}-Mäusen gesehen (Abb. 19e/f). Interessanterweise inhibiert p27ΔPi Apoptose in diesen Tieren. Dieses stand im direkten Kontrast zum gesehen Effekt durch ektopye kd.CK2α' und steht in Übereinstimmung zu den in der Arbeitsgruppe gezeigten kardioprotektiven Eigenschaften von CK2 [108, 109].

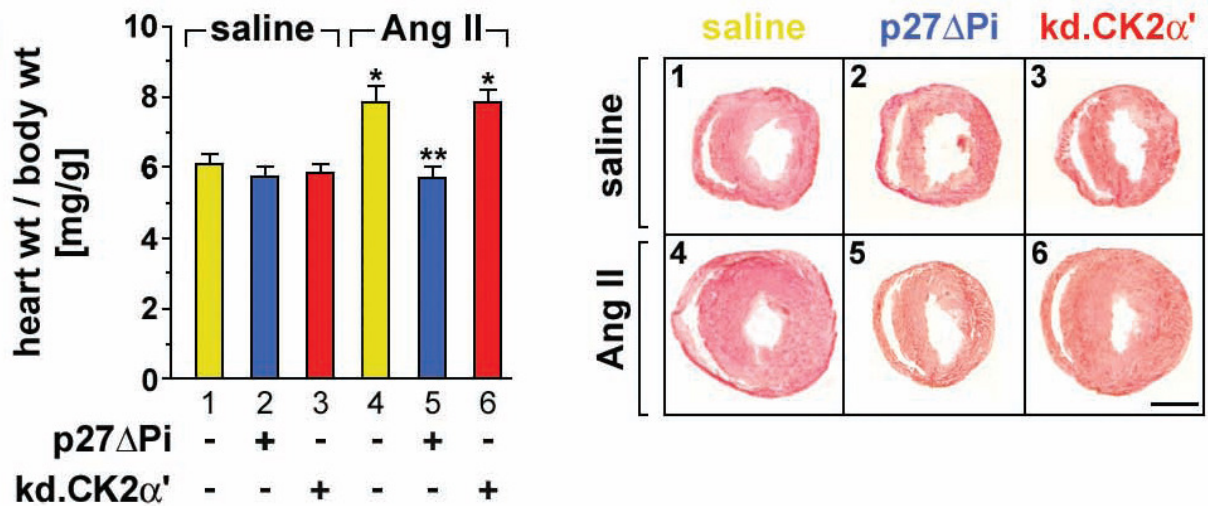


Abb. 19a: Die konstitutiv inaktive kd.CK2 α' kann die kardiale Hypertrophie in p27 $^{-/-}$ -Mäusen nicht inhibieren. Körpergewicht („body wt“), korrigiertes Herzgewicht („heart wt“) (links) und Masson-Färbung des transversal geschnittenen Myokards (rechts), Ang II = Angiotensin II, MW +/- Standardabweichung, n = 6 – 8, *P < 0.01 vs. „sham saline“ (s.o.), **P < 0.01 vs. Ang II, Skalierung 2 mm

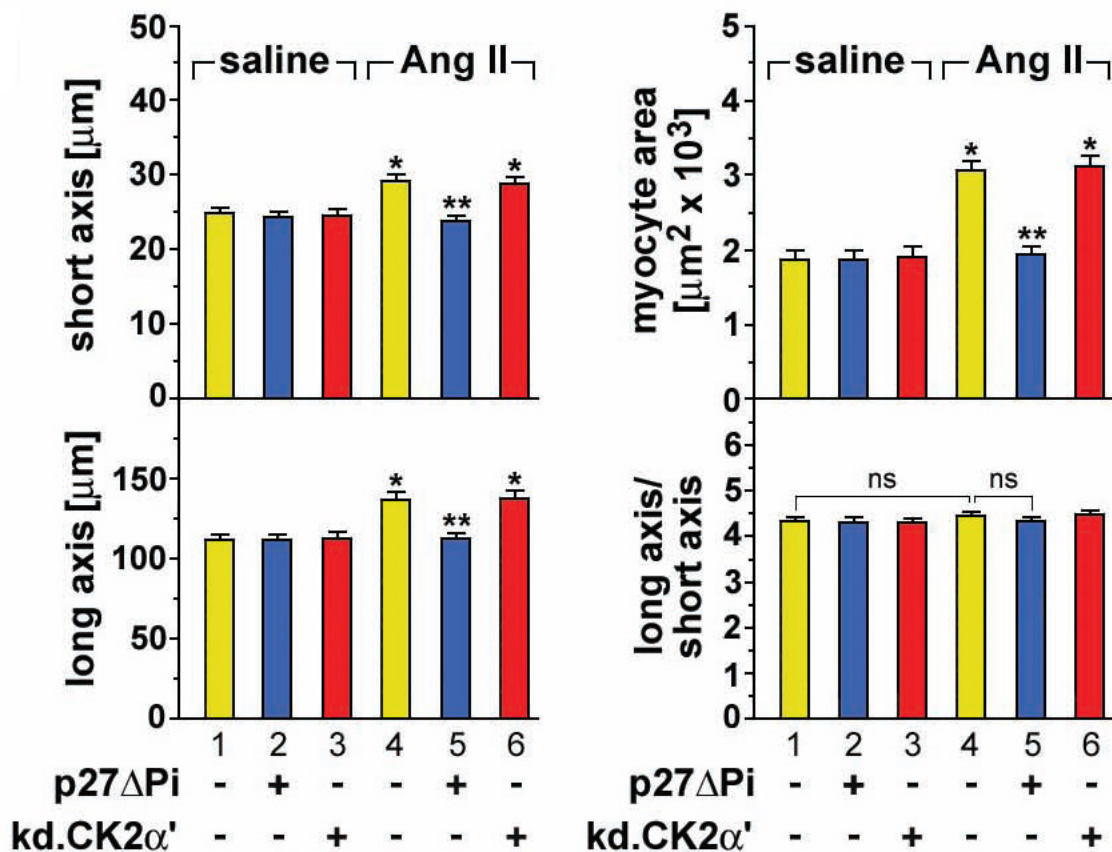


Abb. 19b: Zellgrößenanalyse adulter Kardiomyozyten von 8 Wochen alten Mäusen. 100 Zellen von 3 verschiedenen Mäusen wurden pro Gruppe untersucht. „short axis“ = kurze Achse, „long axis“ = lange Achse, „diameter“ = Durchmesser, „length“ = Länge, „myocyte area“ = Myozytenfläche, „saline“ = Kochsalzlösung, „sham saline“ = Placeboinfusion mit 0.9% NaCl-Lösung, MW +/- Standardabweichung, *P < 0.01 vs. „sham saline“, **P < 0.01 vs. Ang II

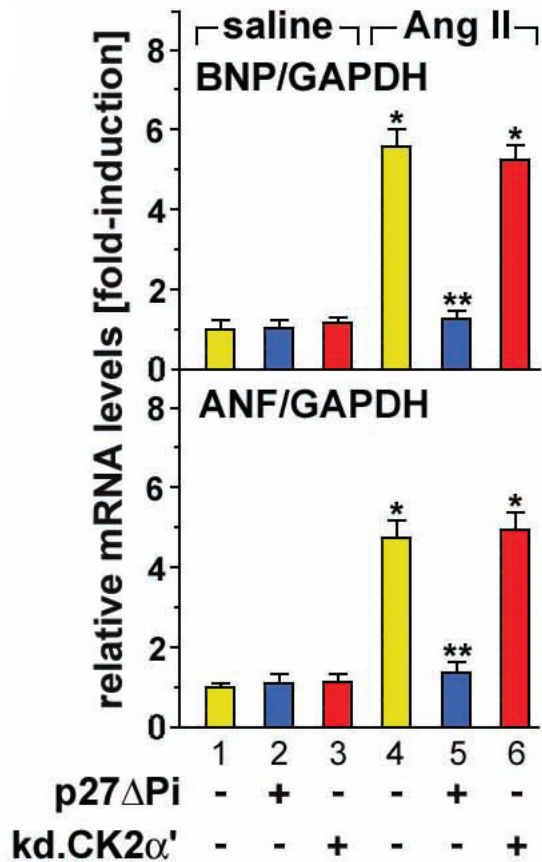


Abb. 19c: Die Bestimmung der mRNA-Mengen („relative mRNA levels“) der Hypertrophie-Indikator-Gene ANF („atrial natriuretic factor“) und BNP („brain natriuretic peptide“) erfolgte durch qRT-PCR. MW \pm Standardabweichung, n = 6 – 8, *P < 0.01 vs. „sham saline“, **P < 0.01 vs. Ang II

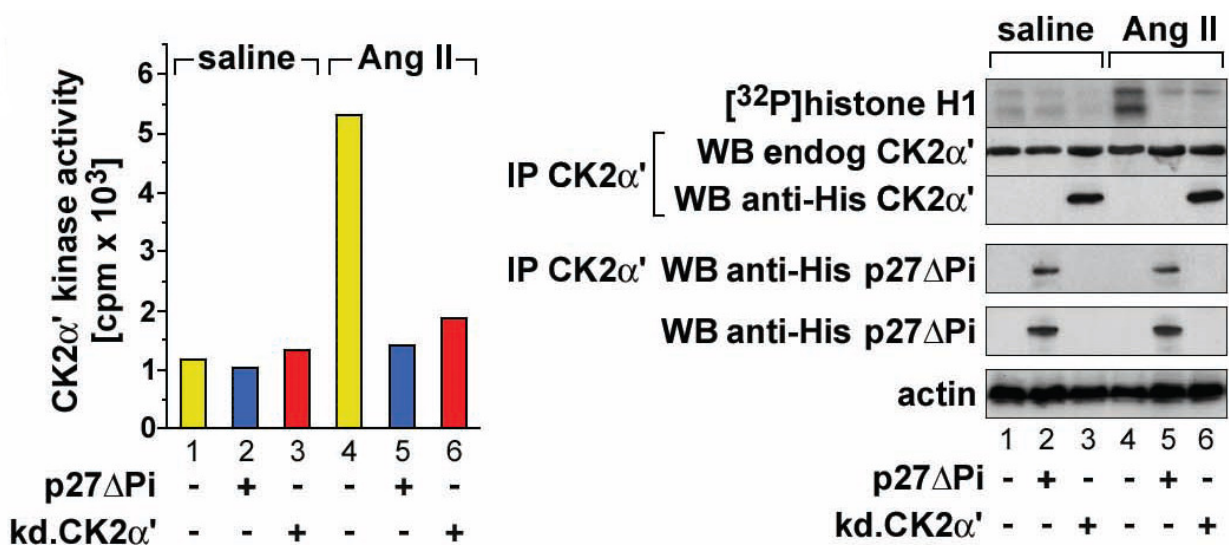


Abb. 19d: Die CK2 α' -abhängige Kinaseaktivität wurde in kompletten linksventrikulären Proben bestimmt. Ein typisches Resultat von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

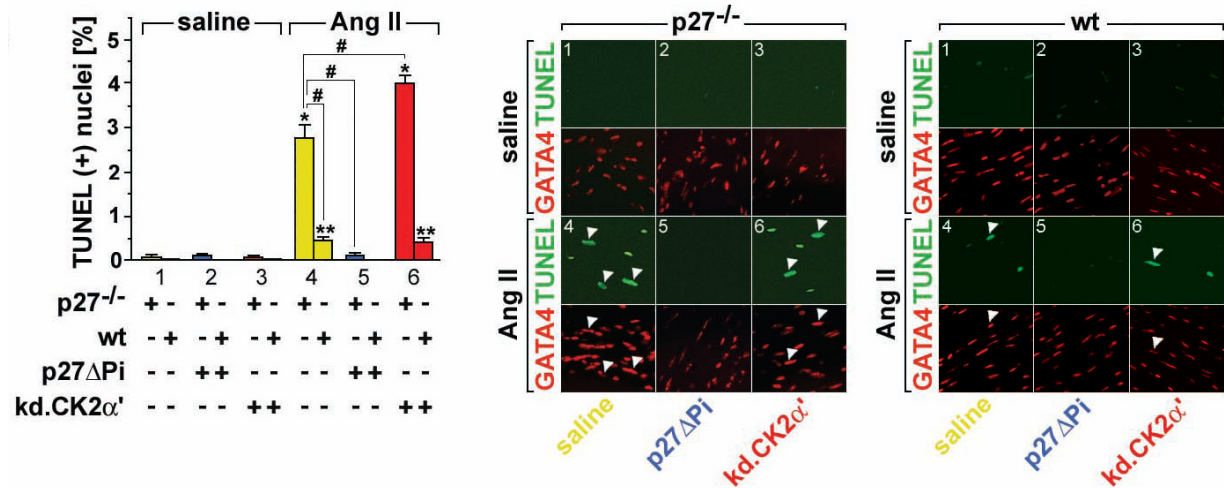


Abb. 19e: Angiotensin induziert Apoptose in p27^{-/-}-Mäusen. Die Quantifizierung von apoptotischen Kardiomyozyten (weiße Pfeile) erfolgte durch *in situ* TUNEL (grün) und GATA4-Immunfluoreszenz-Histochemie (rot) von linksventrikulären Proben. $n = 4$. * $P < 0.01$ vs. „sham saline“, ** $P < 0.05$ vs. „sham saline“, # $P < 0.01$

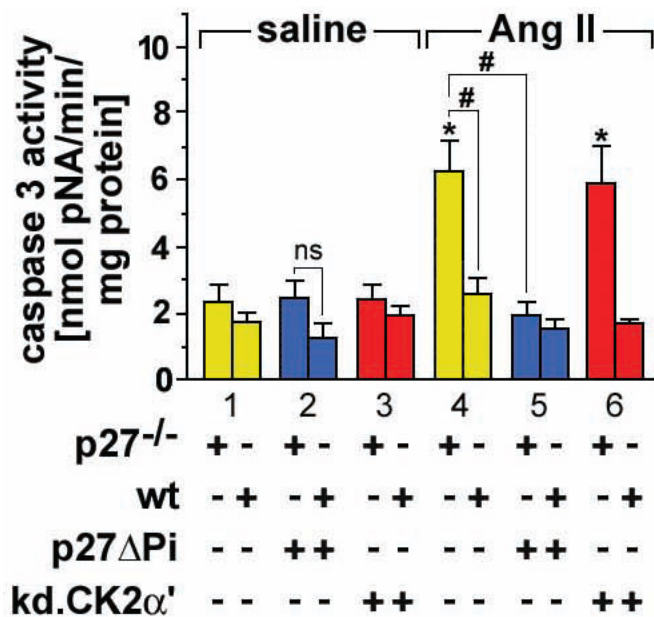


Abb. 19f: Angiotensin induziert Apoptose in p27^{-/-}-Mäusen. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität („caspase 3 activity“) in komplett linksventrikulären Herzgewebeproben. Der Umsatz des Caspase-3-Substrats Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid) wurde bei OD405nm gemessen. wt = wt.p27-Mäuse, pNA/min/mg Protein = p-Nitroanilid-Detektion pro Minute pro Milligramm Protein, MW +/- Standardabweichung, $n = 4$, * $P < 0.05$ vs. „sham saline“, # $P < 0.01$, ns = nicht signifikant

5. Diskussion

Die symptomatische Herzinsuffizienz gehört im reiferen Alter, insbesondere bei der Gruppe der über 65jährigen Patienten zu den häufigsten Todesursachen weltweit [WHO, 2008]. Die Framingham-Herz-Studie spricht von einer mittleren Überlebenszeit von 3,2 Jahren für Frauen und 1,7 Jahren für Männer. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt laut dieser Studie bei 38% für Frauen und bei 25% für Männer. Sowohl die Primärprävention als auch die schnelle Akuttherapie im Falle eines Myokardinfarktes konnten, u.a. durch den Ausbau und die Weiterentwicklung der Kathetertechnik (PTCA, Stents), in den letzten Jahrzehnten das Überleben der Patienten positiv beeinflussen. Auch die Prävention von Folgeschäden sowie die Verbesserung von Lebensqualität und Lebensdauer sind wichtige individuelle und gesellschaftliche Aspekte. Eine kausale Therapie zur Wiederherstellung des Myokards als Sekundärprävention wäre wünschenswert.

Adulte differenzierte Kardiomyozyten haben den Zellzyklus verlassen (G_0) und die Fähigkeit zur Zellteilung verloren, somit ist eine Regeneration über diesen Weg nicht mehr möglich [124].

Ein den Zellzyklus regulierender und anscheinend Hypertrophie-Signale supprimierender Faktor ist der CKI (Cyclin Kinase Inhibitor) $p27^{KIP1}$, welcher in postmitotischen Kardiomyozyten in hoher Konzentration vorliegt und dessen Fehlen in $p27^{-/-}$ -„Knock-out“-Mäusen ein gestörtes Differenzierungsverhalten und Organwachstum mit größerem Körper sowie hypertrophen Organen bewirkt [102 - 104]. Die bisher bekannten Hauptziele von $p27^{KIP1}$, der Komplex aus Cyclin abhängige Kinase („cyclin dependend kinase“) CDK2 und Cyclin-E, sind im differenzierten Herzmuskel nur gering exprimiert.

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems („Yeast Two Hybrid“) wurde eine cDNA-Datenbank des adulten humanen Herzens auf Bindungspartner für $p27^{KIP1}$ ($p27$), durchsucht und nach Selektion positiver Clone sowie Sequenzierung die Proteinkinase $CK2\alpha'$ als noch nicht bekannter Interaktionspartner für $p27$ gefunden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen bis jetzt unbekanntem selbstregulatorischen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen $p27$ und $CK2\alpha'$. Dieser Mechanismus ähnelt der Regulation von CDK2 durch $p27$, weist jedoch in mechanistischer Hinsicht bestimmte Unterschiede auf, worauf im Folgenden näher eingegangen wird. Die $CK2$ -abhängige Regulation von $p27$ stellt eine neue Verbindung zwischen der Signalübertragung von extrazellulären Wachstumsfaktoren und der Kontrolle von $p27$ in kardialen Muskelzellen her. Die *in vivo* Daten

der vorliegenden Arbeit beschreiben eine einzigartige Rolle von p27 in nichtproliferierendem Herzmuskelgewebe, wo es eine wichtige wachstumssupprimierende Funktion ausübt (Abb. 20).

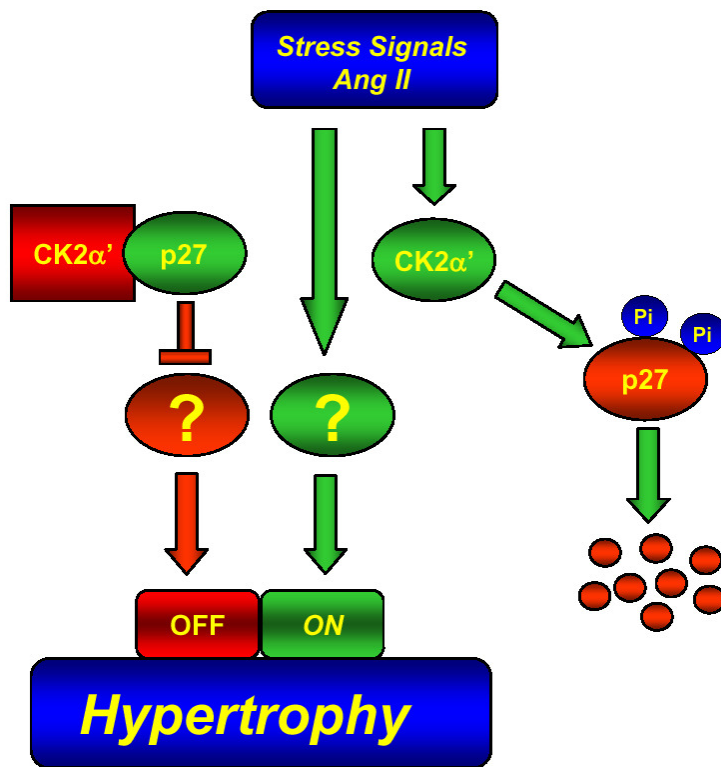


Abb. 20: Modell für die CK2 α' -abhängige Regulation der kardialen Hypertrophie durch Phosphorylierung von p27. Hypertrophie induzierende Signale stimulieren die CK2 α' -Kinase zur Phosphorylierung von p27 an S83 und T187. Die Phosphorylierung von p27 hebt seine Fähigkeit CK2 α' zu binden und dessen Aktivität zu inhibieren auf. Schrittweise wird p27 proteasomal abgebaut und erlaubt dadurch das Fortschreiten hypertrophen Wachstums. Die Hypothese ist, dass p27 kardiales Wachstum verhindert indem es auf eine bisher unbekannt zyttoplasmatische Proteinkinase einwirkt, welche zur Signaltransduktion in der Hypertrophie beiträgt. Stress Signals = Stresssignale z.B. Ang II = Angiotensin II; Hypertrophy = Hypertrophie; ON = An; OFF = Aus;

5.1 Die Proteinkinase CK2

Der Transfer eines Phosphatrestes von ATP auf ein Protein wurde erstmalig von Kennedy und Burnett 1954 beschrieben. Als artifizielles Substrat wurde Casein für die Phosphorylierung eingesetzt. Thornburg und Lindell veröffentlichten 1977, dass sich die Proteinkinase CK2 aus zwei α - und α' -Untereinheiten (38 - 42kDa) sowie zwei β -Untereinheiten zusammensetzt (Abb. 21). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die α - und α' -Untereinheiten die katalytische Domäne und die β -Untereinheiten als Dimer die regulatorische Komponente repräsentieren [125, 126]. Die Proteinkinase CK2 ist ein in unterschiedlichen Spezies

hochkonserviertes und multifunktionelles Enzym, welches ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird, aber im Gegensatz zu den meisten Mitgliedern der Kinase-Familie (z.B. CDK, Cyclin abhängige Kinasen) ist CK2 ein konstitutiv aktives Enzym, dessen katalytische Untereinheiten CK2 α und CK2 α' sich allein oder in Kombination mit CK2 β konstant in einer aktiven Konformation befinden. Aktuell sind mehr als 300 Substrate bekannt, welche von der Serin/Threonin-Kinase CK2 phosphoryliert werden [98]. CK2 ist in die Regulation unterschiedlicher biologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Krebs und Zelltod involviert [116 - 119].

Die Mechanismen, welche die Aktivität von CK2 regulieren, sind bisher noch nicht ausreichend gut definiert worden [97, 98]. Auch die Rolle der CK2 β -Untereinheiten wird dabei ausgiebig diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen. CK2 β stimuliert abhängig vom Substrat anscheinend in den meisten Fällen die Aktivität von CK2 α/α' . Es gibt aber auch Hinweise, dass es die Phosphorylierung durch CK2 ebenso drastisch inhibieren kann [127]. Weiterhin scheint es unabhängig von CK2 α/α' existieren und interagieren zu können [128].

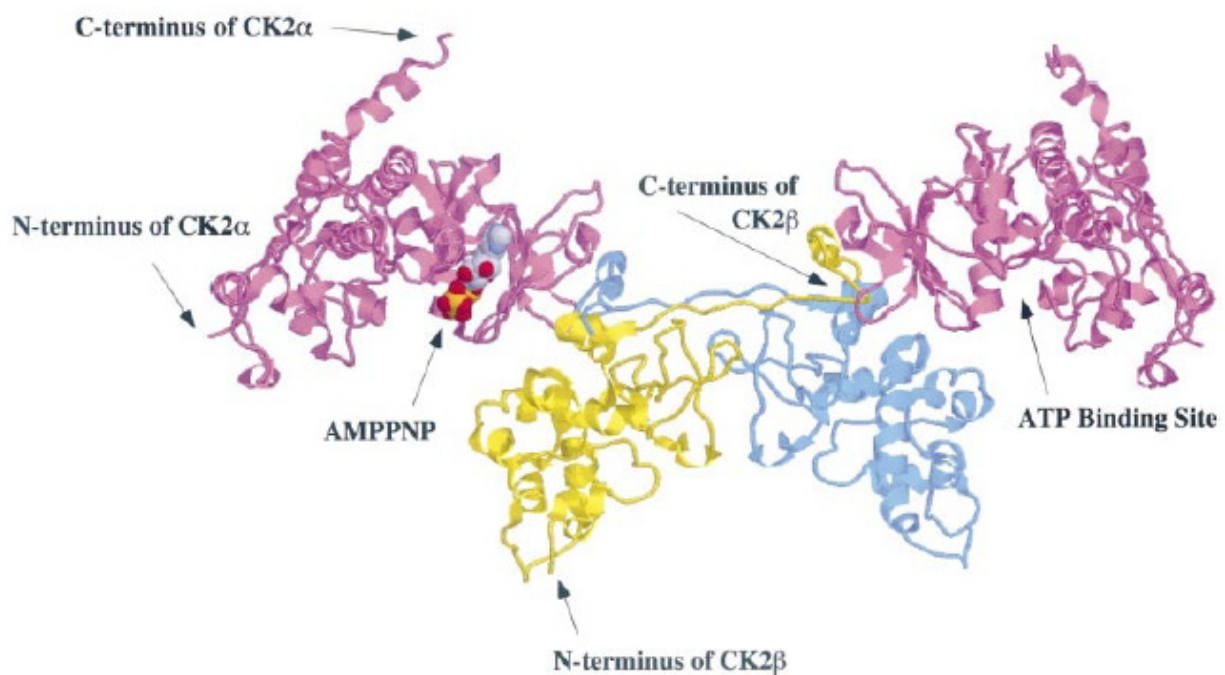


Abb. 21: Hochaufgelöste Struktur des tetrameren CK2-Holoenzym von D.W. Litchfield [97]. In Margenta werden die beiden katalytischen Untereinheiten CK2 α mit der ATP-Bindungsstelle („ATP Binding Site“) dargestellt. Die regulatorischen β -Untereinheiten sind gelb und blau markiert. AMPPNP (Adenosine 5'-[β , γ -imido]triphosphat) ist ein nicht hydrolysierbares ATP-Analogen, welches nur in einer α -Untereinheit präsent ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist nicht geklärt. „N-terminus“ = Amino-Terminus, „C-terminus“ = Carboxy-Terminus

5.2 Die Bindung von CK2 α' und p27

Die Verifizierung der Interaktion von CK2 α' und p27 erfolgte zunächst mit Hilfe des GST-Affinitätsassays (Abb. 13b) und zeigte, dass für die Bindung von p27 die regulatorische β -Untereinheit von CK2 nicht notwendig ist. Für die weitere Analyse der Bindungsstelle wurden Längenfragmente von p27 (p27-Mutanten) mit auf die gleiche Weise immobilisierter CK2 α' analysiert. Die CK2 α' -Bindungsstelle wurde zwischen den Aminosäuren 87 und 186 am carboxyterminalen Ende (C-Terminus) von p27 identifiziert. Die CDK2-Bindung erfolgt zwischen den Aminosäuren (AS) 25 und 81 am aminoterminalen Ende (N-Terminus) von p27.

Auch die verkürzte p27-Mutante AS 87 – 198 konnte ohne den N-Terminus die Proteinkinase CK2 α' binden. Die p27-Mutante aus den Aminosäuren 1 - 86 jedoch nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass die Epitope von CDK2 und CK2 α' nicht überlappen und die CDK2-Bindungsstelle nicht für die Bindung von CK2 α' an p27 benötigt wird (Abb. 13c). Mittels Co-Lokalisierung von p27 und CK2 durch Immunfluoreszenz im Zytoplasma von isolierten ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten sowie Co-Immunopräzipitation von endogener CK2 α' und endogenem p27 konnte die tatsächliche Bindung nachgewiesen werden (Abb. 13d).

5.3 Phosphorylierung und Abbau von p27

5.3.1 Phosphorylierung von p27 durch CK2 α'

Wachstumsfaktoren aktivieren Cyclin-E-CDK2-Komplexe, welche daraufhin p27 an T187 [112] phosphorylieren und somit die Ubiquitinisierung und den proteasomalen Abbau fördern [110, 111]. Es ist bisher schwierig gewesen, auf mechanistischer Ebene zu erklären, wie CDK2-gebundenes p27 an Threonin-187 phosphoryliert werden kann, obwohl G₀-Phase-p27-CDK2-Komplexe katalytisch inaktiv sind. Neuere Studien haben eine Tyrosin-Phosphorylierung von p27 als einen Mechanismus zur Aktivierung von p27-CDK2-Komplexen identifiziert [113, 114]. Die rezeptorunabhängige Tyrosin-Kinase Lyn und die konstitutiv aktive Tyrosin-Kinase Bcr-Abl können p27 an Tyrosin-88 (Y88) phosphorylieren [113]. Die cSrc-Tyrosin-Kinase vermittelte Phosphorylierung von p27 an Tyrosin-74 (Y74) und Tyrosin-88 (Y88) führt ebenfalls zur Reduktion der p27-abhängigen CDK2-Inhibition [114]. Das an Tyrosin phosphorylierte p27 kann zwar immer noch an CDK2 binden, es besitzt jedoch eine deutlich verringerte

inhibitorische Aktivität auf diese Kinase. Folglich können diese tyrosinphosphorylierten Übergangsformen von p27 durch nun partiell aktivierte CDK2 auch an Threonin-187 (T187) phosphoryliert und für die Skp2-gesteuerte p27-Proteolyse („S-phase kinase-associated protein 2“) und somit zum Abbau markiert werden [113, 114].

Nach Analyse der Primärsequenz von p27 mit Hilfe der Suchmaschine „Scansite“ (<http://scansite.mit.edu>), welche auf mögliche Phosphorylierungsstellen in Proteinen prüft, konnte mittels *in vitro* Kinase-Reaktionen mit radioaktivem [γ -³²P]-ATP die Phosphorylierung von p27 durch CK2 α' untersucht werden. Identifiziert wurden die Aminosäuren Serin-83 (S83) und Threonin-187 (T187). Hierfür wurden Punktmutanten von p27 eingesetzt, in welchen entweder Serin-83 (p27S83A) bzw. Threonin-187 (p27T187A) oder beide Aminosäuren durch Alanin (p27 Δ Pi) ausgetauscht wurden. Die Phosphorylierung konnte mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden und war auf die genannten Aminosäuren beschränkt. Die Doppelmutante p27 Δ Pi wurde nicht durch CK2 α' phosphoryliert. Die katalytisch inaktive Punktmutante kd.CK2 α' , welche durch Austausch von Lysin durch Methionin an Position 69 (K69M) die Fähigkeit zur Übertragung eines Phosphatrests verloren hatte, konnte den Wildtyp von p27 wie erwartet *in vitro* nicht phosphorylieren (Abb. 15a).

Der Nachweis der Phosphorylierung von p27 durch CK2 α' *in vivo* gelang durch Überexpression der kinaseinaktiven Mutante (kd.CK2 α') anhand pharmakologischer Inhibition der Proteinkinase mittels DMAT [99] und durch die Methode der RNA-Interferenz, bei welcher die endogene Expression des Zielproteins unterdrückt wird (siCK2 α' , Abb.15e). Sowohl die Transduktion durch einen lentiviralen Vektor mit siCK2 α' als auch die anderen genannten Ansätze konnten die Phosphorylierung von p27 durch CK2 α' in Angiotensin-II behandelten Kardiomyozyten verhindern (Abb. 15f). Im Gegenzug wurde dieser Effekt durch zusätzliche Transduktion von rekombinanter CK2 α' wieder aufgehoben. Somit gelang es die aufgestellte Hypothese weiter zu untermauern.

5.3.2 CK2 α' vermittelter Abbau von p27

Der Angiotensin II gesteuerte Abfall des Proteinpegels von p27 konnte durch die Inhibition des 26S-Proteasoms mittels Lactacystin aufgehoben werden (Abb. 16b). Die Halbwertszeit von p27 war in Gegenwart des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid zur Unterdrückung der *de novo* Synthese in mit Angiotensin behandelten Kardiomyozyten deutlich reduziert (Abb. 16c).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten, in denen die Funktion von endogener CK2 α' durch RNA-Interferenz (siCK2 α') ausgeschaltet wurde, die Phosphorylierung und die Abnahme von p27 im Zytoplasma aufgehoben war (Abb. 16c/d). In den ohne Ziel-RNA transduzierten Kontrollkulturen (siControl) erfolgte die erwartete Phosphorylierung und die Eliminierung von p27 (Abb. 16c/d).

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte demonstriert werden, dass p27 in Kardiomyozyten nicht durch CDK2 sondern durch CK2 α' -abhängige Mechanismen eliminiert wird. Die CK2 α' vermittelte Phosphorylierung von p27 an Serin-83 (S83) und Threonin-187 (T187) wirkt der Inhibition von CK2 α' durch p27 entgegen und überführt sie in einen aktiven Zustand (Abb. 15), vergleichbar der hierarchischen Phosphorylierung, welche eine bekannte Eigenschaft von CK2 ist [97, 98]. Die hier erarbeiteten Ergebnisse führen zu der Vorstellung, dass eine Hauptaufgabe von CK2 darin besteht, p27 für dessen Abbau durch Phosphorylierung zu kennzeichnen. Eine Reihe von Tyrosinkinasen werden während der kardialen Hypertrophie aktiviert [115], deshalb wäre es interessant in anschließenden Studien zu untersuchen, ob es weitere nicht mit CK2 α' verwandte Kinasen gibt, welche p27 phosphorylieren und dadurch zur Kontrolle des Herzwachstums beitragen.

Die CK2 α' -spezifische S83-Phosphorylierungsstelle in p27 ist evolutionär konserviert und auch in humanem p27 enthalten. Somit spielt die Phosphorylierung dieser Stelle möglicherweise eine Rolle bei der frühen Wachstumskontrolle einer sich entwickelnden kardialen Hypertrophie im Menschen.

5.4 Die Inhibition von CK2 α' durch p27

Da in proliferierenden Zellen p27 nicht nur Substrat sondern auch Inhibitor von CDK2 ist, war es von Interesse zu analysieren, ob ein ähnlicher Mechanismus in der Interaktion von p27 und CK2 besteht. Der Einfluss des Phosphorylierungsstatus von p27 auf die Aktivität von CK2 konnte durch Kinase-Essays in Anwesenheit von [γ - 32 P]-ATP mit dem Wildtyp von p27, verschiedenen phosphorylierten p27 Varianten und einer die Phosphorylierung imitierenden p27-Mutante (p27.S83D/T87D) sowie rekombinanter CK2 α'/β *in vitro* nachgewiesen werden. Die vorphosphorylierten p27-Varianten wurden im Vorfeld an Serin-83 (p27.Pi-S83), Threonin-187 (p27.Pi-T187) oder an beiden Aminosäuren (p27.Pi-S83/T187) mit einem Phosphatrest versehen. Der Nachweis der geringeren Bindung von phosphoryliertem p27 an CK2 gelang mittels Immunopräzipitation. Hierfür wurden die Kinase-Essay-Reaktionsansätze aus dem vorherigen

Schritt mit Protein-A-Agarose konjugiertem anti-CK2 α' -AK bzw. in gleicher Weise konjugiertem anti-p27-Antikörper inkubiert. Der Immunblot wurde mit anti-p27, um CK2 α' gebundenes p27 nachzuweisen bzw. mit anti-CK2 α' für p27 gebundene CK2 α' , durchgeführt. CK2 α' war im Komplex mit p27.Pi-S83 vergleichsweise weniger aktiv als CK2 α' , welche mit p27.Pi-T187 (Abb. 15b) assoziiert war. Weiterhin konnten im Gegensatz zu p27.Pi-S83 nur geringe Mengen von p27.Pi-T187, das an CK2 α' gebunden war, in der Westernblotanalyse nachgewiesen werden (Abb. 15c). Dieses Ergebnis legt ein Modellsystem nahe, in dem p27 durch CK2 α' schrittweise zunächst an S83 und danach an T187 phosphoryliert wird. Diese Interpretation wirft sofort die Frage auf, welche Funktion ein derartiger schrittweiser Mechanismus in der myokardialen Wachstumsregulation ausüben könnte. Zur Beantwortung könnte man sich folgendes Szenario vorstellen. Wenn die Phosphorylierung von p27 an einer einzelnen CK2 α' -Phosphorylierungsstelle ausreichend wäre für dessen Degradation, dann wären auch kleine Änderungen im p27-Proteinspiegel genügend, die wachstumshemmende Aktivität von p27 zu neutralisieren. Das wäre wiederum ausreichend, einen kardialen Phenotyp hervorzurufen, wie zum Beispiel pathologische Hypertrophie, was anhand verschiedener Mausmodelle, die in dieser Arbeit analysiert wurden, gezeigt werden konnte (Abb. 17). Für die Degradation von p27 in Kardiomyozyten ist jedoch offensichtlich dessen Phosphorylierung an zwei Positionen erforderlich (Abb. 16). Hieraus ergibt sich vermutlich eine stabile Kontrolle über die p27-Proteinstabilität und somit über das Herzwachstum unter normalen Wachstumsbedingungen.

5.6 CK2 α' und p27 sind Regulatoren der kardialen Hypertrophie

Durch Nachweis der mRNA-Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP, der *de novo* Proteinsynthese und durch Messung der Zellgröße (Abb. 16f) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression von RNA-Interferenz resistenter CK2 α' (SR.CK2 α') als auch die Eliminierung von p27 durch RNA-Interferenz (sip27, Abb. 16e) in der Lage ist ohne Anwesenheit von Angiotensin hypertrophes Wachstum zu induzieren. Andernteils zeigten sich Kardiomyozyten, welche siCK2 α' exprimierten und somit ohne intakte CK2 α' waren, für Angiotensin komplett refraktär. Die Co-Transduktion von SR.CK2 α' reinduzierte das hypertrophe Wachstum in diesen Zellen. Somit konnte die Hypothese, dass die Auswirkungen von siCK2 α' auf die Hypertrophie eine Folge der Ausschaltung des Zielobjekts CK2 α' sind,

bestätigt werden. Da Co-Transduktion von SR.p27 Δ Pi und sip27 effektiv die Hypertrophie in Kardiomyozyten verhinderte, vermittelt CK2 α' anscheinend die Angiotensin-Anwort, einschließlich der p27-Inaktivierung. Diese *in vitro* Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, dass CK2 α' und p27 wichtige Regulatoren der Kardiomyozyten-Hypertrophie sind.

Wird in Mäusen das p27-Gen ausgeschaltet (p27^{-/-}-, „knock-out-Mäuse“), entwickelt sich in Übereinstimmung mit der Rolle von p27 bei Differenzierung und Proliferation mit einem Alter von ca. 4 Monaten eine kardiale Hypertrophie [102 - 104]. Mit einem Alter von 2 Monaten führt der Verlust von p27 im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (wt.p27-Mäuse) zunächst zu deutlich kleineren Kardiomyozyten ohne signifikante Unterschiede in Herzmasse und echocardiographischen Parametern (Abb. 17a, 17b und Tab. 3). In diesem Stadium wurde die Empfindlichkeit der p27^{-/-}-Mäuse auf hypertrophe Stimulation durch thorakale Aorteneinschnürung („thoracic aortic banding“ TAB) untersucht und es konnte gezeigt werden, dass p27 für die Eindämmung bzw. Prävention der hochdruckinduzierten Verschlechterung der kardialen Funktion essentiell ist (Abb. 17d/e, Tab. 4). Die Bestimmung der bereits oben genannten Hypertrophiemarker untermauerte diese Aussage weiter (Abb. 17f/g). Die erwartete höhere Apoptoserate in TAB- p27^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu TAB-wt.p27 konnte mit Hilfe des TUNEL-Test gezeigt werden (Abb. 17h/i).

Durch die Ausschaltung der CK2 α' -Aktivität in chronisch mit Angiotensin infundierten wt.p27-Mäusen mittels intraperitoneal injizierter TAT-konjugierter inaktiver kd.CK2 α' bzw. von metabolisch stabilem p27 (p27 Δ Pi) wurde die Aktivität von CK2 α' sowie die Eliminierung von p27 gehemmt und die Angiotensin induzierten hypertrophen Effekte *in vivo* aufgehoben (Abb. 18a-d, Tab. 5). Die Negativkontrolle p27 Δ C (p27 AS1-86) ohne CK2 α' -Bindungsstelle (Abb. 13c) zeigte keine antihypertrophen Effekte. Interessanterweise wurde durch die transduzierte aktive CK2 α' in den mit 0.9% NaCl (Placebo) infundierten Tieren ebenfalls eine Hypertrophie ausgelöst ohne dass die Hypertrophiemarker ANP und BNP anstiegen, wie es auch bei der physiologischen Hypertrophie der Fall ist [105]. Wie bereits erwähnt ist im Gegensatz dazu die pathologische Hypertrophie durch die vermehrte Expression von ANP, BNP und β -MHC sowie einer Abnahme von α -MHC charakterisiert [106]. Wahrscheinlich führt die Überexpression im Fall der Placebogruppe zu einer von Angiotensin unabhängigen Aktivität von CK2 α' . In p27^{-/-}-Mäusen konnte kd.CK2 α' unter diesen Bedingungen keine antihypertrophen Effekte zeigen. Die Injektion von p27 Δ Pi verhinderte jedoch auch hier die Hypertrophie (Abb. 19 a-d). Somit wird

die Wiederherstellung von p27 in p27^{-/-}-Mäusen begleitet von der Inhibition der Angiotensinwirkung.

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zur Aktivierung von CK2 α' zusammen, lässt sich mit Bestimmtheit nur folgende Aussage machen. Die Signaltransduktionswege während der pathophysiologischen Hypertrophie und vermutlich auch während der physiologischen Hypertrophie führen zur Aktivierung von CK2 α' . Die Identität dieses Mechanismus bedarf weiterer molekularbiologischer und zellbiologischer Untersuchungen.

Die Proteinspiegel von p27 sind sowohl in der akuten als auch in der Endphase der Herzinsuffizienz beim Menschen erheblich reduziert [120], das legt nahe, dass der selektive Druck, der dem zytostatischen Effekt von p27 entgegen wirkt, während fehladaptierten kardialen Wachstum hoch ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Phenotypanalysen von p27-gendefizienten (p27^{-/-})-Mäusen zeigt, dass p27 die Fähigkeit besitzt, sowohl bei der physiologischen Hypertrophie in älteren erwachsenen Herzen als auch beim pathologischen hypertrophen Wachstum als Antwort auf Drucküberlastung, als Suppressor zu fungieren (Abb. 17). Die durchgeführten Untersuchungen lassen die Signaltransduktionswege, die kardiales hypertrophes Wachstum regulieren, sensitiv gegenüber der inhibitorischen Funktion von p27 auf CK2 α' erscheinen.

Zusammen demonstriert die überschießende kardiale Hypertrophie in (p27^{-/-})-Mäusen (Abb. 17-19), die Blockade kardialer Hypertrophie durch Proteintransduktion von p27 und der fehlende inhibitorischer Effekt ektopter dominant negativer CK2 α' auf das hypertrophe Wachstum in (p27^{-/-})-Mäusen, dass die Entwicklung kardialen hypertrophen Wachstums die CK2 α' abhängige Inaktivierung von p27 erfordert. Die vorliegende Arbeit unterstützt deshalb die Hypothese, dass p27-CK2 α' -Komplexe wichtiger Bestandteil eines zytoplasmatischen Signalwegs sind, der in der Lage ist, das hypertrophe Wachstumsprogramm effektiv zu unterdrücken.

Wie bereits beschrieben konnte katalytisch-inaktives CK2 α' -Protein die kardiale Hypertrophie in p27-gendefizienten Mäusen nicht blockieren (Abb. 19). Eine Möglichkeit, diesen Befund zu interpretieren, besteht darin, die Hauptaufgabe von CK2 α' in Herzmuskelzellen darin zu sehen, p27 für dessen Abbau zu markieren. Unter diesem Aspekt erscheint es sehr wohl wahrscheinlich, dass p27 andere zelluläre Faktoren reguliert, die mit CK2 α' nicht verwandt sind. Da p27 normalerweise ein potenter Inhibitor von Proteinkinasen ist, wäre es wichtig, eine solche Kinase, in weitergehenden Analysen zu identifizieren. Ein prognostisches Merkmal einer potentiellen

p27-regulierten Kinase wäre, dass sie ein positiver stimulierender Faktor der myokardialen Hypertrophie sein müsste.

5.7 Ausblick

Es bleibt zunächst zu hoffen, dass durch die Manipulation der p27-Protein-Menge ein möglicher therapeutischer Nutzen bei der Behandlung der Herzinsuffizienz erzielt werden kann. Aber auch bei der Prävention im Hochrisikokollektiv wäre ein Benefit vorstellbar, wenn damit die Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie verhindert wird.

Die zunehmende Zahl an Untersuchungen zum Thema Stammzelltherapie, z.B. in Form der autologen Zelltherapie mit kardialen Vorläuferzellen aus adulten Individuen lässt ebenso Hoffnung für eine regenerative Therapie des geschädigten Herzmuskels aufkommen. Die klinische Anwendung wird jedoch durch die schlechte Verfügbarkeit und die aufwändige Isolation erschwert. Sie sollte parallel erfolgen und nicht davon abbringen, die Regulationsprozesse im Myokard weiter untersuchen und verstehen zu wollen. Dieses Verständnis könnte zur Entwicklung zielgerichteter Therapien (engl. „targeted therapy“) führen, wie sie z.B. in Form der Thyrosinkinaseinhibitoren bereits erfolgreich in der Onkologie eingesetzt werden. Eine einzelne wirksame Therapie wäre das Ideal. Die Erfahrung hat jedoch bisher gelehrt, dass es einer Fülle an synergistischen Ansätzen bedarf, um derart komplexe Vorgänge erfolgreich beeinflussen zu können. Das Ziel sollte in jedem Fall die Weiterentwicklung der therapeutischen Möglichkeiten und somit die Verbesserung der Lebensqualität sowie die Senkung von Morbidität und Mortalität sein. Mit jedem gefundenen Puzzleteil rückt dieses Ziel ein Stück näher.

6. Zusammenfassung

Adulte Kardiomyozyten haben den Zellzyklus verlassen und die Fähigkeit zur Regeneration verloren [124]. Somit kann sich das Herz nach einer Schädigung nicht spontan regenerieren und es kommt in der Folge zu weiteren pathologischen Veränderungen wie Hypertrophie und Herzinsuffizienz, welche mit erhöhter Morbidität und Mortalität vergesellschaftet sind.

Der Cyclinkinaseinhibitor p27^{KIP1} (p27) blockiert die Zellproliferation durch Inhibition der Cyclin-abhängigen-Kinase 2 (CDK2) [123]. Trotz der hohen Expressionsrate von p27 in Kardiomyozyten ist wenig über seine Funktion und Regulation in diesen und anderen

nichtproliferierenden Geweben, wo die Expression seines Hauptziels Cyclin E – CDK2 sehr gering ist, bekannt [34, 102]. In dieser Arbeit wurde eine cDNA-Sammlung aus dem adulten humanen Herzen („human heart cDNA library“) mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems („Yeast Two Hybrid“) systematisch nach Bindungspartnern untersucht und eine Interaktion von p27 und der Proteinkinase Casein Kinase 2 (CK2) gefunden. In den weiterführenden Experimenten konnte die Bedeutung der Interaktion dieser Proteine weiter beleuchtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass der kardiale Wachstumsfaktor Angiotensin II den proteasomalen Abbau von p27 durch CK2 α' vermittelte Phosphorylierung induziert. CK2 α' ist eine katalytische Untereinheit von CK2. Andererseits fungiert unphosphoryliertes p27 als starker Inhibitor von CK2 α' . Daher scheint die Interaktion von p27 und CK2 α' von hypertrophen Signalen gesteuert zu werden und repräsentiert gleichzeitig eine regulatorische Rückkopplung in differenzierten Kardiomyozyten, welche ähnlich des p27-CDK2-Komplexes das Zellwachstum von proliferierenden Zellen beeinflusst. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von p27 durch CK2 α' von entscheidender Bedeutung für das hypertrophe Wachstum in Kardiomyozyten ist und somit eine funktionelle Verbindung zwischen extrazellulären Wachstumsfaktorsignalen und der Regulation der Stabilität von p27 in postmitotischen Zellen darstellt. Es wäre wünschenswert, dass eine mögliche pharmakologische Beeinflussung dieser Regulation die Hypertrophie und die damit verbundene Morbidität und Mortalität positiv beeinflussen kann.

7. Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
A	Aminosäurecode für Alanin
A	Adenin, Nukleinbase der DNA
Ac-DEVD-pNA	Acetyl-Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat-p-Nitroanilid
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AD	Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase B
Ang	Angiotensin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid = ANF „atrial natriuretic factor“ (engl.)
APS	Ammoniumpersulfat bzw. Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AT-1	Angiotensin-II Subtyp 1 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BD	DNA-Bindungsdomäne
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“ Suchmaschine www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi
BNP	B-Typ-Natriuretisches Peptid, „brain natriuretic peptide“ (engl.)
BSA	Bovines Serumalbumin
β-MHC	β-Myosin-Schwerketten, „myosin heavy chain“ (engl.)
C	Cytosin, Nukleinbase der DNA
CAK	Zyclin aktivierende Kinase, „cyclin activating kinase“ (engl.)
CDK	Zyclin abhängige Kinase, „cyclin dependent kinase“ (engl.)
Ci	Curie, radioaktive Einheit
CK2	Casein Kinase 2
CK2α′	Casein Kinase 2 „alpha prime“ (engl.)
cDNA	Komplementäre DNA, „complementary DNA“ (engl.)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat

CKI	Zyclin-Kinase-Inhibitor, „cyclin kinase inhibitor“ (eng.)
CPM	Impulse pro Minute, „counts per minute“ (engl.)
Cyh	Cycloheximid
D	Aminosäurecode für Aspartat
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-Tetrabromo-1H-Benzimidazol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Aminosäurecode für Glutamat
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazellulärsignal regulierte Kinasen
FACS	Durchflusszytometrie, „fluorescence activated cell sorting“ (engl.)
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	Form der Flüssigkeits-Chromatographie „Fast Protein, Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography“ (engl.)
FS	„Fractional Shortening“ (engl.)
G	Gauge, Kanüledurchmesser
G	Guanin, Nukleinbase der DNA
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
G ₀ , G ₁ , G ₂	Lücke, Gap (engl.), Zellzyklusphase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSK-3 β	Glycogen-Synthase-Kinase-3 β
GST	Glutathion S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HRP	„Horseradish Peroxidase“ englisch für Meerrettichperoxidase
IGF	„insulin-like growth factor“, engl., Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
K	Aminosäurecode für Lysin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton, Molekulargewicht
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm, SI-Einheit der Masse
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIP	Kinase inhibierendes Protein
LB	„lysogeny broth“ (engl.)
L	Aminosäurecode für Leucin
Leu	Aminosäurecode für Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LPPLERLTL	Aminosäuresequenz der NES des HIV-Virus
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
μ l	Mikroliter
M	Aminosäurecode für Methionin
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogenaktivierte-Protein-Kinase-Kinase
MHC	β -Myosin-Schwerketten, „myosin heavy chain“ (engl.)
min	Minute
mol	Mol, SI-Einheit der Stoffmenge
mRNA	Boten-RNA, „messenger RNA“ (engl.)
MW +/- SD	Mittelwert +/- Standardabweichung
n	Menge
NES	Nucleäre Exportsequenz, „nuclear export sequence“ (engl.)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
P	Aminosäurecode für Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, „phosphate buffered saline“ (engl.)
PCR	Polymerasekettenreaktion, „polymerase chain reaction“ (engl.)
PEG	Polyethylenglycol
PFU	Kolonie bildende Einheit, „plaque-forming unit“ (engl.)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanilid
pRb	Retinoblastoma Protein
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit PCR, „quantitative real time PCR“
R	Aminosäurecode für Arginin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
Ras	„Rat sarcoma“ (engl.)
Raf	„rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma“ (engl.)
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rt-PA	Rekombinanter Gewebespezifischer Plasminogenaktivator, „recombinant tissue-type plasminogen activator“ (engl.)
S	Aminosäurecode für Serin
SD	Synthetisches Selektionsmedium, „synthetic dropout“ (engl.)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA	Sarcoplasmatische-Endoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase
Ser	Aminosäurecode für Serin
Sham	englisch für Imitation (Operation ohne TAB bzw. Placeboinfusion)
T	Thymin, Nukleinbase der DNA
T	Aminosäurecode für Threonin
TAB	Thorakale Aorteneinschnürung, „thoracic aortic banding“ (engl.)
tag	englisch für Etikett
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBq	Terra-Bequerel, Bq = 1 s ⁻¹ , SI-Einheit der Radioaktivität
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA

TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Aminosäurecode für Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TUNEL	“Terminale-Desoxyribosyl-Transferase-mediated-dUTP-Nick-End-Labeling” (engl.)
U/min	Umdrehungen pro Minute, 1 min^{-1}
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
vs	versus, im Vergleich zu
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galaktopyranosid
YPD	Hefewachstumsmedium

8. Literaturverzeichnis

1. Cowie M., Mosterd A., Wood D., Deckers J., Poole-Wilson P., Shotton G., Grobbee D., *The epidemiology of heart failure.*, Eur. Heart J., 1997. **18**, S. 208-225.
2. Davies R.C. et al, *ABC of heart failure. History and epidemiology.*, BMJ, 2000. **320**, S. 39-42.
3. Lip GYH, Gibbs CR, Beevers DG., *ABC of heart failure. Aetiology.*, BMJ, 2000. **320**, S. 104-107.
4. McMurray J., McDonagh T., Morrison C.E., Dargie H.J., *Trends in hospitalization for heart failure in Scotland 1980–1990.*, Eur Heart J., 1993. **14**, S. 1158-1162.
5. Cleland J.G., Gemmell I., Khand A., Boddy A., *Is the prognosis of heart failure improving?*, Eur J Heart Fail., 1999. **1**, S. 229-241.
6. Jessup M., Brozena S., *Heart failure.*, NEJM, 2003. **348**, S. 2007-2018.
7. Arai M., Alpert N., MacLennan D., Barton P., Periasamy M., *Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure.* Circ. Res., 1993. **72**, S. 463-469.
8. Boheler K.R., Schwarz K., *Gene expression in cardiac hypertrophy.*, Trends Cardiovasc Med., 1992. **5**, S. 176-182.
9. Van Bilsen M., Chien K.R., *Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression.*, Cardiovasc Res., 1993. **27**, S. 1140-1149.
10. Grajek S., Lesiak M., Pyda M., Zajac M., Paradowski S., Kaczmarek E., *Hypertrophy or hyperplasia in cardiac muscle. Post-mortem human morphometric study.*, Eur Heart J., 1993. **14**, S. 40-47.
11. Schaub M.C., Hefti M.A., Harder B.A., Eppenberger H.M., *Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes.*, J Mol Med, 1997. **75**, S. 901-920.
12. Pardee A. B., *G1 events and regulation of cell proliferation.*, Science, 1989. **246**, S. 603-608.
13. Sherr C. J., *G1 phase progression: cycling on cue.*, Cell, 1994. **79**, S. 551-555.
14. Nurse P., *Universal control mechanism regulating onset of M-phase.*, Nature, 1990. **344**, S. 503-508.
15. Pines J., *Regulation of the G2 to M transition.*, Results Probl Cell Differ., 1998. **22**, S. 57-78.
16. Nurse P., *A long twentieth century of the cell cycle and beyond.*, Cell, 2000. **100**, S. 71-78.
17. Elledge S. J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.*, Science, 1996. **274** S. 1664-1672.
18. Hunter T., Pines J., *Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age.*, Cell, 1994. **79**, S. 573-582.
19. Morgan D.O., *Principles of CDK regulation.*, Nature, 1995. **374**, S. 131-134.
20. Solomon M.J., Kaldis P., *Regulation of CDKs by phosphorylation.*, Results Probl Cell Differ., 1998. **22**, S. 79-109.
21. Soos T.J., Park M., Kiyokawa H., Koff A., *Regulation of the cell cycle by CDK inhibitors.*, Results Probl Cell Differ., 1998. **22**, S. 111-131.
22. Serrano M., Hannon G.J., Beach D., *A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.*, Nature, 1993. **366**, S. 704-707.
23. Hannon G.J., Beach D., *p15 INK4b is a potential effector of TGF β -induced cell cycle arrest.* Nature, 1994. **371**, S. 257-261.
24. Hirai H., Roussel M.F., Kato J., Ashmun R.S., Sherr C.J., *Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6.*, Moll Cell Biol., 1995. **15**, S.2672-2682.

25. Guan K.-L., Jenkins C.W., Li Y., Nichols M.A., Wu X., O'Keefe C.L., Matera A.G., Xiong Y., *Growth suppression by p18, a p16 INK4/MTS1 - and p15 INK4b/MTS2 - related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.*, Genes & Dev., 1994. **8**, S. 2939-2953.
26. Chan F.K.M., Zhang J., Chen L., Shapiro D.N., Winoto A., *Identification of human/mouse p19, a novel CDK4/CDK6 inhibitor with homology to p16 ink4.*, Mol Cell Biol., 1995. **15**, S. 2682–2688.
27. Gu Y., Turek C.W., Morgan D.O., *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit.* Nature, 1993. **366**, S. 707-710.
28. Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.* Nature, 1993. **366**, S. 701-704.
29. Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereira-Smith O.M., Smith J.R., *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen.* Exp Cell Res., 1994. **211**, S. 90-98.
30. Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J., Reed S.I., *p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest.*, Cell, 1994. **76**, S. 1013-1023.
31. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer E., Kinzler K.W., Vogelstein B., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.*, Cell, 1993. **75**, S 817-825.
32. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J., *The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.*, Cell, 1993. **75**, S. 805-816.
33. Toyoshima H., Hunter T., *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin/cdk protein kinase activity, is related to p21.*, Cell, 1994. **78**, S. 67-74.
34. Polyak K., Lee M.-H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., Massagué J., *Cloning of p27 Kip1 a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.*, Cell, 1994. **78**, S. 59-66.
35. Lee M.H., Reynisdottir I., Massagué J., *Cloning of p57 Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution.*, Genes & Dev., 1995. **9**, S. 639-649.
36. Matsuoka S., Edwards M., Bai C., Parker S., Zhang P., Baldini A., Harper J.W., Elledge S.J., *p57 KIP2, a structurally distinct member of the p21 CIP1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene.*, Genes & Dev., 1995. **9**, S. 650-662.
37. Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W., Dutta A., *Separate domains of p21 involved in the inhibition of cdk kinase and PCNA.*, Nature, 1995. **374**, S. 386–388.
38. Chen J., Saha P., Kornbluth S., Dynlacht B.D., Dutta A., *Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21 Cip1.*, Mol Cell Biol., 1996. **16**, S. 4673–4682.
39. Russo A.A., Jeffrey P.D., Patten A.K., J. Massagué, Pavletich N.P., *Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-cdk2 complex.*, Nature, 1996. **382**, S. 325–331.
40. Nakanishi M., Robetorge R.S., Adami G.R., Pereira-Smith O.M., Smith J.R., *Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21 Sdi1/CIP1/WAF1.*, EMBO Journal, 1995. **14**, S. 555-563.
41. Kaldis P., *The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals.*, Cell Mol Life Sci., 1999. **55**, S.284-296.
42. Koepp D.M., Harper J.W., Elledge S.J., *How the Cyclin became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle.*, Cell, 1999. **97**, S. 431-434.

43. Mangeng Ch., Paul O., Diehl J.A., Fero M., Roussel M.F., Roberts J.M., Sherr Ch.J., *The p21 and p27 CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblast.*, EMBO Journal, 1999. **18**, S. 1571-1583.
44. Filmus J., Robles J.A., Shi W., Wong M.J., Colombo L.L., Conti C.J., *Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras.*, Oncogene, 1994. **9**, S. 3627-3633.
45. Winston J.T., Coats S.R., Wang Y.Z., Pledger W.J., *Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras.*, Oncogene, 1996. **12**, S. 127-134.
46. Weber J.D., Raben D.M., Phillips P.J., Baldassare J.J., *Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase.*, Biochem. J., 1997. **326**, S. 61-68.
47. Kerkhoff E., Rapp U.R., *Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1.*, Mol. Cell. Biol., 1997. **17**, S. 2576–2586.
48. Aktas H., Cai H., Cooper G.M., *Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the cdk inhibitor p27 Kip1.*, Mol. Cell. Biol., 1997. **17**, S. 3850–3857.
49. Cheng M., Sexl V., Sherr C.J., Roussel M.F., *Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27 Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1).*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1998. **95**, 1091-1096.
50. Peeper D.S., Upton T.M., Ladha M.H., Neuman E., Zalvide J., Bernards R., DeCaprio J.A., Ewen M.E., *Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein.*, Nature, 1997. **386**, 177–181.
51. Matsushime H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J., Kato J.-Y., *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells.*, Mol. Cell. Biol., 1994. **14**, 2066-2076.
52. Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J., *Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.* Genes & Dev., 1998. **12**, S. 192–229.
53. Meyerson M., Harlow E., *Identification of a G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner.*, Mol. Cell. Biol., 1994. **14**, S. 2077-2086.
54. Taya Y., *RB kinases and RB-binding proteins: New points of view.*, Trends Biochem. Sci., 1997. **22**, S. 14–17.
55. Lundberg A.S., Weinberg R.A., *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-CDK complexes.*, Mol. Cell. Biol., 1998. **18**, S. 753-761.
56. Ezhevsky S.A., Nagahara H., Vocero-Akbani A.M., Gius D.R., Wei M.C., Dowdy S.F., *Hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D-Cdk4/6 complexes results in active pRb.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1997. **94**, S. 10699-10704.
57. Alpert N.A., Mulieri L.A., *Functional consequences of altered cardiac myosin isoenzymes.*, Med Sci Sports Exerc, 1986. **18**, S. 309-313.
58. Swinghedauw B., *Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles.*, Physiol Rev, 1986. **66**, S. 710-771.
59. Cohn J.N., *Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response.*, Clin. Cardiol., 1995. **18**, Suppl. IV, IV4–IV12.
60. Cohn J.N., *Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition.*, Circulation, 1995. **91**, S. 2504-2507.
61. Multizenterstudie A *clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. "GUSTO IIb"*, NEJM, 1997. **336**, S. 1621-1628.
62. Schömig A., Kastrati A., Dirschinger J., Mehilli J., Schricke U., Pache J., Martinoff S., Neumann F.-J., Schwaiger M., *Coronary stenting plus Platelet Glycoprotein IIb/IIIa*

- blockade compared with Tissue Plasminogen Activator in acute myocardial infarction. "STOPAMI", NEJM, 2000. 343, S. 385-391.*
63. Brunner-La Rocca H., Vaddadi G., Esler M., *Recent insight into therapy of congestive heart failure: Focus on ACE inhibition and Angiotensin II antagonism., JACC, 1999. 33, S. 1163-1173.*
 64. Cohn J., Johnson G., Ziesche S., Cobb F. et al., *A comparison of Enalapril with Hydralazine Isorbide Dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure., NEJM, 1991. 325, S. 303-310.*
 65. Nakashima Y., Fouad F., Tarazi R., *Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril., Am J Cardiol, 1984. 53, S. 1044-1049.*
 66. The CONSENSUS Trial Study Group, *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). NEJM, 1987. 316, S. 1429-35.*
 67. The SOLVD Investigators, *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. NEJM, 1991. 325, S. 293-302.*
 68. The SOLVD Investigators, *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions., NEJM, 1992. 327, S. 685-691.*
 69. Baylis J., Norell N., Canepa-Anson R., Sutton G., Poole-Wilson P., *Untreated heart-failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics., Br Heart J, 1987. 57, S. 17-22.*
 70. Pitt B., Poole-Wilson P.A., Segal R., Martinez F.A., Dickstein K., Camm A.J., Konstam M.A., Riegger G., Klinger G.H., Neaton J., Sharma D., Thyagarajan B., *Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial - the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II., Lancet, 2000. 355, S. 1582-1587.*
 71. Channer K.S., McLean K.A., Lawson-Matthew P., Richardson M., *Combination diuretic treatment in severe heart failure: a randomised controlled trial., Br Heart J, 1994. 71, S. 146-150.*
 72. Cohn J., Johnson G., Ziesche S., Cobb F. et al., *A comparison of enalapril with Hydralazine Isorbide Dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure., NEJM, 1991. 325, S. 303-310.*
 73. Cohn J., Archibald D., Ziesche S. et al., *Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic heart failure., NEJM, 1986. 314, S. 1547-1552.*
 74. The Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators, *The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure., NEJM, 1999. 341, S. 709-717.*
 75. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, *Effects of an Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients., NEJM, 2000. 342, S. 145-153.*
 76. The Digitalis Investigation Group, *The Effect of Digoxin on Mortality and Morbidity in Patients with Heart Failure., NEJM, 1997. 336, S. 525-533.*
 77. Heilbrunn S., Shah P., Bristow M. et al., *Increased beta-receptor-density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term Metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy., Circ, 1988. 78, S. 1373-1381.*
 78. No authors listed (anonym), *Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF), Lancet, 1999. 353, S. 2001-2007.*
 79. No authors listed (anonym), *The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial., Lancet, 1999. 353, S. 9-13.*

80. Packer M., Coats A.J., Fowler M.B., Katus H.A., Krum H., Mohacsi P., Rouleau J.L., Tendera M., Castaigne A., Roecker E.B., Schultz M.K., DeMets D.L., *Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure.*, NEJM, 2001. **344**, S. 1651-1658.
81. BREATHING NOT PROPERLY MULTINATIONAL STUDY INVESTIGATORS, *Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure.*, NEJM, 2002. **347**, S. 161-167.
82. Bristow M.R., Minobe W., Rasmussen R., Larrabee P., *Neurohormonal receptors in the failing heart.*, J Clin Invest, 1992. **89**, S. 803–815.
83. Assayag P., Carré F., Chevalier B., Delcayre C., Mansier P., Swynghedauw B., *Compensated cardiac hypertrophy. Arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. Part 1: Fibrosis*, Cardiovasc. Res., 1997. **34**, S. 439–444.
84. Jalil J.E., Doering C.W., Janicki J.S., Pick R., Shroff S.G., Weber K.T., *Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle.*, Circ. Res., 1989. **64**, S. 1041-1050.
85. Carlyle, W.C., Toher C.A., Vandervelde J.R., MC-Donald K.M., Homans D.C., Cohn J.N., *Changes in β -actin-mRNA expression in remodeling canine myocardium.*, J. Mol. Cell. Cardiol., 1996. **28**, S. 53-63.
86. Weber K.T., Sun Y., Katwa L.C., Cleutjens J.P.M., *Tissue repair and angiotensin II generated at sites of healing.*, Basic Res. Cardiol., 1997. **92**, S. 75-78.
87. Collins J.F., Pawlowski-Dahm C., Davis M.G., Ball N., Dorn G.W. II, Walsh R.A., *The role of cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure.*, J. Mol. Cell. Cardiol., 1996. **28**, S. 1435–1443.
88. Morano I., Hadicke K., Grom S., Koch A., Schwinger R.H., Bohm M., Bartel S., Erdmann E., Krause E. G., *Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart.*, J. Mol. Cell. Cardiol., 1994. **26**, S. 361-368.
89. Schaper J., Froede T.A., Hein S., Buck A., Hashizume H., Speiser B., Friedl A., Bleese N., *Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy.*, Circulation, 1991. **83**, S. 504-514.
90. Ludlow J.W., Shon J., Pipas J.M., Livingston D.M., De-Caprio J.A., *The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T.*, Cell, 1990. **60**, S. 387-396.
91. Ludlow J.W., Glendening C.L., Livingston D.M., De-Caprio J.A., *Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein.*, Mol. Cell. Biol., 1993. **13**, S. 367-372.
92. Dyson N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins.*, Genes & Dev., 1998. **12**, S. 2245-2262.
93. Nevins J.R., *Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families.*, Cell Growth Differ., 1998. **9**, S. 585-593.
94. Chung C.T. and Miller R.H., *A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells.*, Nucl. Acid. Res., 1988. **16**, S. 3580.
95. Simpson P., McGrath A., Savion S., *Myocyte in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines.*, Circ Res., 1982. **51**, S. 787-801.
96. Sadoshima J., Xu Y., Slayter H.S. und Izumo S., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro.*, Cell, 1993. **75**, S. 977-984.
97. Litchfield D.W., *Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death.*, Biochem. J., 2003. **369**, S. 1-15.
98. Meggio F. & Pinna L.A., *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?*, FASEB J., 2003. **17**, S. 349-368.

99. Pagano M.A., Meggio F., Ruzzene M., Andrzejewska M., Kazimierczuk Z., Pinna L.A., *2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**, S. 1040-1044.
100. Nagahara H. et al., *Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TATKip1 induces cell migration.*, *Nat. Med.*, 1998. **4**, S. 1449-1452.
101. Lindeman G.J., Gaubatz S., Livingston D.M. & Ginsberg D., *The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent.*, *Proc. Natl. Acad.*, 1997. **94**, S. 5095-5100.
102. Fero M.L. et al., *A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice.*, *Cell*, 1996. **85**, S. 733-744.
103. Kiyokawa H. et al., *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1).*, *Cell*, 1996. **85**, S. 721-732.
104. Nakayama K. et al., *Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors.*, *Cell*, 1996. **85**, S. 702-720.
105. Hunter J.J. & Chien K.R., *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.*, *NEJM*, 1999. **341**, 1276-1283.
106. Hirota H. et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress.*, *Cell*, 1999. **97**, S. 189-198.
107. Satoh M. et al., *Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006. **103**, S. 7432-7437.
108. Li P.F. et al., *Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC.*, *Mol. Cell*, 2002. **10**, S. 247-258.
109. Donath S. et al., *Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress.*, *Circulation*, 2006. **113**, S. 1203-1212.
110. Carrano A.C., Eytan E., Hershko A. & Pagano M., *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27.*, *Nat. Cell Biol.*, 1999. **1**, S. 193-199.
111. Montagnoli A. et al., *Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation.*, *Genes Dev.*, 1999. **13**, S. 1181-1189.
112. Sheaff R.J. et al., *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1.*, *Genes Dev.*, 1997. **11**, S. 1464-1478.
113. Grimmler M. et al., *Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases.*, *Cell*, 2007. **128**, S. 269-280.
114. Chu I. et al., *p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2.* *Cell*, 2007. **128**, S. 281-294.
115. Chien K.R. & Olson E.N., *Converging pathways and principles in heart development and disease.*, *Cell*, 2002. **110**, S. 153-162.
116. Seldin D.C. & Leder P., *Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle.*, *Science*, 1995. **267**, S. 894-897.
117. Xu X., Toselli P.A., Russell L.D. & Seldin D.C., *Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit.*, *Nat. Genet.*, 1999. **23**, S. 118-121.
118. Kato T. Jr., Delhase M., Hoffmann A. & Karin M., *CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response.*, *Mol. Cell*, 2003. **12**, S. 829-839.
119. Scaglioni P.P. et al., *A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor.*, *Cell*, 2006. **126**, S. 269-283.
120. Burton P.B., Yacoub M.H. & Barton P.J., *Cyclin-dependent kinase inhibitor expression in human heart failure. A comparison with fetal development.*, *Eur. Heart J.*, 1999. **20**, S. 604-611.

121. Zeng Y., Hirano K., Hirano M., Nishimura J. und Kanaide H., *Minimal requirements for the nuclear localization of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. **274**, S. 37-42.
122. Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A. und Dowdy S.F., *In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse.*, Science, 1999. **285**, S. 1569-1572.
123. Kato J.Y. et al., *Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation.*, Cell, 1994. **79**, S. 487-496.
124. McGill C.J. and Brooks G., *Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth.*, Cardiovasc Res, 1995. **30**, S. 557-569.
125. Thornburg W. and Lindell T.J., *Purification of rat liver nuclear protein kinase NII.*, J. Biol. Chem., 1977. **252**, S. 6660-6665.
126. Cochet C. and Chambaz E.M., *Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments.*, J. Biol. Chem., 1983. **258**, S. 1403-1406.
127. Rodriguez F.A., Contreras C., Bolanos-Garcia V. and Allende J.E., *Protein kinase CK2 as an ectokinase: the role of the regulatory CK2beta subunit.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2008. **105**, S. 5693-5698.
128. Arrigoni G., Pagano M.A., Sarno S., Cesaro L., James P. and Pinna L.A., *Mass spectrometry analysis of a protein kinase CK2beta subunit interactome isolated from mouse brain by affinity chromatography.*, J. Proteome Res., 2008. **7**, S. 990-1000.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsverzeichnis

Hauck L., Harms C., An J., Rohne J., Gertz K., Dietz R., Endres M., von Harsdorf R.
Protein kinase CK2 links extracellular growth factor signaling with the control of p27(Kip1) stability in the heart., Nat Med., 2008. **14**, S.315-24.

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger von Harsdorf (Universität von Toronto, Robert McEwen Chair, Toronto General Research Institut) für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Bergmann (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Asklepios-Klinik St. Georg Hamburg) ganz herzlich für die freundliche Übernahme der Doktorvaterschaft und die Betreuung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Ludger Hauck (Universität von Toronto, Robert McEwen Chair, Toronto General Research Institut) für die inspirierende, geduldige und außerordentlich liebenswerte Unterstützung und Anleitung meiner Arbeit. Er hatte jeder Zeit ein offenes Ohr für große und kleine Probleme und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ich danke Marlies Grieben, Felix Engel und Josephine Bechstein für das nette Miteinander im Labor und für viele wertvolle Tipps.

Ich danke Prof. David Litchfield (Universität von Western Ontario, Canada) für die Bereitstellung der CK2-cDNA.

Ich danke Dr. Manfred Gossen (Max Delbrück Center für Molekulare Medizin, Berlin) für den pRSET-C-Vektor.

Ich danke Dr. Steven Dowdy (Howard Hughes Medical Institute, La Jolla, USA) für pTAT.

Ich danke Dr. rer. nat. Ludger Hauck, Dr. Christian Harms und Dr. Matthias Endres für Ang/TAB. Ich danke Dr. Jungfeng An und Dr. Ludger Hauck für die TAT-Proteine. Ich danke Daniela Grothe für die siRNA-Expressionvektoren.

Ich danke Dr. med. Ninette Pustkowski für viele Stunden netter Laboratmosphäre, konstruktiver Diskussionen und gegenseitiger Motivation.

Meiner Frau Jana Rohne danke ich für ihr umfassendes Verständnis, ihre liebevolle Zuwendung und die wichtige moralische Unterstützung.

Meinen Kindern Emil und Frieda Rohne danke ich für die Zeit, welche sie mir für diese Arbeit von ihrer Spielzeit mit ihrem Papa geschenkt haben.

Meinen Eltern Erika und Dieter Rohne danke ich für die andauernde Unterstützung und ihr Vertrauen in meinen Weg.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Jens-Olaf Rohne, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift zum Thema „Die CK2 vermittelte Signalübertragung extrazellulärer Wachstumsfaktoren in der Hypertrophie von Kardiomyozyten durch Kontrolle von p27^{KIP1}“ selbstständig und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter angefertigt habe. Diese Arbeit stellt nicht, auch nicht in Teilen, eine Kopie anderer Arbeiten dar. Das Yeast-Two-Hybrid, die in-vitro-Studien und die in-vivo-Studien unter Verwendung kultivierter Kardiomyozyten wurden selbstständig durchgeführt. Die an den weiteren in-vivo Studien Beteiligten werden in der Danksagung aufgeführt. Alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sind vollständig angegeben.

Berlin, den 23.04.2012