

Aus dem Institut der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

RACK1 - ein neuer Interaktionspartner von p27^{KIP1}
in normoxischen und hypoxischen Kardiomyozyten

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Ninette Pustkowski

aus Lauchhammer/ Senftenberg

Gutachter: 1. Priv.- Doz. Dr. med. M. W. Bergmann
2. Prof. Dr. P. Dr. med. Ruiz- Noppinger
3. Prof. Dr. med. N. Frey

Datum der Promotion: 03.09.2010

1	Einleitung	6
1.1	Die Ischämische Herzerkrankung - Epidemiologie und ihre gesellschaftliche Bedeutung	6
1.2	Pathophysiologie des Herzinfarktes	8
1.2.1	Anatomie	8
1.2.2	Zelluläre Prozesse	10
1.2.2.1	Der Zellzyklusarrest in Kardiomyozyten	11
1.2.2.2	Steuerung des Zellzyklus	12
1.2.2.2.1	Der cdk-Inhibitor p21 ^{WAF1}	14
1.2.2.2.2	Der cdk-Inhibitor p27 ^{KIP1}	15
2	Ziele und Fragestellungen	18
3	Methoden	19
3.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	19
3.1.1	Modifizierte LiAc-Transformation	21
3.1.2	Koloniefilterliftverfahren	21
3.1.3	Plasmidisolation aus Hefezellen	22
3.1.4	Transformation von kompetenten E.coli HB 101 mit Hefepiasmid	22
3.1.5	Transformation von kompetenten E.coli DH5 α mit Plasmid.....	22
3.1.6	β -Galaktose-Flüssigkeits-Assay.....	23
3.2	Sequenzierung	23
3.3	GST-Fusions-Assay	23
3.3.1.1	Produktion der GST-Fusions-Proteine	23
3.3.1.2	Bindungsreaktion	24
3.3.1.3	Elution	25
3.4	Kinase-Assay	25
3.5	Proteinsynthesenachweis	25
3.6	<i>In-vitro</i>-Translation und -Transformation	25
3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	26
3.8	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	26
3.9	Westernblot	26
3.10	Immunoblot	27
3.11	Immunpräzipitation	27
3.12	Polymerasekettenreaktion	28
3.13	Agarosegelelektrophorese	28
3.14	Vektorklonierung	29

3.15	Restriktionsanalysen	29
3.16	Transfektion mit Adenoviren	29
3.17	Erzeugung von Punktmutationen	29
3.18	Isolation der primären Rattenherzmuskelzellen	30
3.18.1	Passagieren	30
3.18.2	Herstellung der Zellextrakte	31
4	Materialien	32
4.1	Chemikalien	32
4.2	Filter und Trägermaterialien	33
4.3	Geräte	33
4.4	Kits	34
4.5	cDNA-Bibliothek	35
4.6	Vektoren	35
4.7	Bakterienstämme	35
4.8	Hefestämme	35
4.9	Tiere	36
4.10	Enzyme	36
4.11	Lösungen und Medien	36
4.11.1	Hefe-Zwei-Hybrid-System	36
4.11.2	GST-Fusions-Assay	38
4.11.3	SDS-PAGE	39
4.11.4	Westernblot	40
4.11.5	Immunoblot	40
4.11.6	Isolation der Primären Ratten Herzmuskelzellen	41
4.11.7	Kinaseassay	41
4.11.8	Immunpräzipitation	41
4.11.9	Proteinsynthese	41
4.11.10	Polymerasekettenreaktion	42
4.12	Antikörper	42
4.13	Primer	42
5	Ergebnisse	44
5.1	Normoxie	44
5.1.1	Interaktion von p27 ^{KIP1} mit PKC und RACK1	44
5.1.1.1	p27 ^{KIP1} interagiert mit RACK1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System	44
5.1.1.2	<i>In-vitro</i> -Assoziation von p27 ^{KIP1} und RACK1	46
5.1.1.3	Charakterisierung der Bindungsdomänen von p27 ^{KIP1} und RACK1	47
5.1.1.4	<i>In-vitro</i> -Assoziation von p27 ^{KIP1} und PKCβ2	48

5.1.1.5	Charakterisierung der Bindungsdomänen von p27 ^{KIP1} und PKCβ2.....	48
5.1.1.6	Endogenes p27 ^{KIP1} und RACK1 sind assoziiert in Kardiomyozyten.....	50
5.1.1.7	Endogenes p27 ^{KIP1} liegt in Kardiomyozyten assoziiert an PKCβ2 vor	52
5.1.2	Funktionelle Bedeutung der Interaktion von PKCβ2 und p27 ^{KIP1}	54
5.1.2.1	p27 ^{KIP1} wird <i>in vitro</i> an Thr187 von PKCβ2 phosphoryliert	54
5.1.2.2	p27 ^{KIP1} wird <i>in vivo</i> an Thr187 von PKCβ2 phosphoryliert	54
5.1.2.3	p27 ^{KIP1} inhibiert PKCβ2.....	56
5.1.3	Funktionelle Bedeutung der Interaktion von p27 ^{KIP1} und RACK1	57
5.1.3.1	Phosphorylierung von p27 ^{KIP1} an Thr187 verhindert seine Interaktion mit RACK1 <i>in vitro</i>	57
5.1.3.2	PKCβ2 abhängige Phosphorylierung von p27 ^{KIP1} an Thr187 wird <i>in vivo</i> durch RACK1 verhindert	57
5.2	Hypoxie.....	59
5.2.1	Die Rolle von RACK1 in akut ischämisch induziertem Zelltod.....	59
5.2.1.1	RACK1 verhindert die Downregulation von p27 ^{KIP1}	59
5.2.1.2	Funktionelle Rolle der PKCβ2 und von RACK1 im Zusammenhang mit p27 ^{KIP1} in hypoxischen Kardiomyozyten.....	61
6	Diskussion	63
6.1	Die Interaktion von RACK1 und p27^{KIP1}	64
6.1.1	RACK1.....	64
6.1.2	RACK1 inhibiert die Degradation von p27 ^{KIP1}	64
6.2	Die Interaktion von p27^{KIP1} und PKCβ2.....	65
6.2.1	Die Gruppe der Proteinkinasen C	65
6.2.2	PKCβ2 in Kardiomyozyten.....	68
6.2.3	Die Wechselwirkung zwischen p27 ^{KIP1} und PKCβ2	69
6.3	Der p27^{KIP1}-RACK1-PKCβ2-Komplex	70
6.4	Der Einfluss von Hypoxie auf den p27^{KIP1}-RACK1-PKCβ2-Komplex	72
6.5	Ausblick.....	73
7	Zusammenfassung.....	75
8	Akürzungsverzeichnis.....	77
9	Literaturverzeichnis.....	81
10	Lebenslauf.....	88
11	Danksagung	89
12	Eidesstattliche Versicherung.....	90

1 Einleitung

1.1 Die Ischämische Herzerkrankung - Epidemiologie und ihre gesellschaftliche Bedeutung

In westlichen Industrienationen führen Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit einem Anteil von ca. 50% die Todesursachenstatistik an [1]. Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen arterieller Hypertonus, Atherosklerose sowie eine Vielzahl atherosklerotisch bedingter Folgeerkrankungen, u.a. akute und chronische ischämische Herzerkrankungen, zerebrovaskuläre Insulte und andere erworbene oder angeborene Erkrankungen.

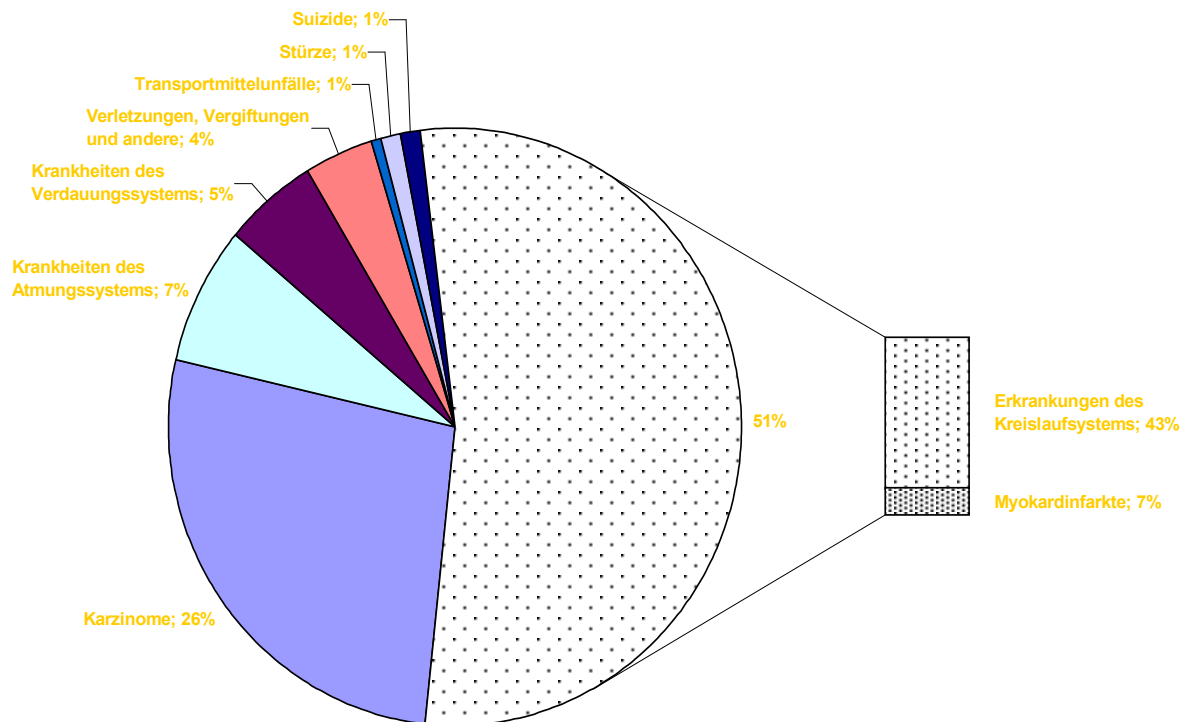


Abbildung 1-1. Amtlich gemeldete Sterbefälle in Deutschland 2007:

Todesursachenstatistik im Jahr 2007 in Deutschland von insgesamt 827 155 Personen (Statistisches Bundesamt, Destatis). 51% der gemeldeten Sterbefälle sind verursacht durch kardiovaskuläre Erkrankungen [1].

Die ischämischen Herzerkrankungen sind die Manifestation der Artherosklerose an den Herzkranzarterien und werden deshalb als koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet. Durch Lipideinlagerung in die Gefäßwand entsteht eine Lumeneinengung, die mit zunehmendem Grad zu

einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot im Herzmuskel führt. Man unterscheidet die latente asymptomatische von der manifesten symptomatischen KHK. Ab einer kritischen Stenose von etwa 75% zeigen sich zumeist erste Symptome in Form einer Angina pectoris.

In Deutschland, wie die MONICA-Daten der Region Augsburg belegen, sterben 30% der Herzinfarktpatienten, bevor sie das Krankenhaus erreichen und moderne Therapieverfahren in Anspruch nehmen können (so genannter „out of hospital death“) [2]. Nach Erreichen des Krankenhauses beträgt die Mortalität dank therapeutischer Fortschritte in der Akutbehandlung und Sekundärprävention zwischen 8 und 12%. Jedoch hat die koronare Herzkrankheit mit rund 300 000 tödlichen und nicht tödlichen Fällen im Jahr und einer Lebenszeitprävalenz für Männer von 30% und für Frauen von 15% weiterhin epidemischen Charakter. Die Prävalenz für das Auftreten eines Herzinfarktes beträgt 3,3% bei Männern [3] und 1,7% bei Frauen [4].

In Anbetracht dieser Zahlen wurde in den letzten Jahrzehnten der Primärprävention viel Aufmerksamkeit gewidmet. Viele Studien untersuchten die Risikofaktoren. Mit der INTERHEART-Studie, einer Fall-Kontroll-Studie, die Patienten mit akutem Myokardinfarkt in 52 Ländern erfasste, wurden neun Risikofaktoren identifiziert, die mit 90% des Risikos für einen akuten Myokardinfarkt assoziiert sind. Einfluss hatten Rauchen, eine Vorgeschichte von Bluthochdruck oder Diabetes, das Fettverteilungsmuster (so genannte „waist to hip ratio“), Ernährungsmuster, die physische Aktivität, Alkoholkonsum, die Blutfettwerte und psychosoziale Faktoren. Dies gilt für alle Regionen, Geschlechter und Altersgruppen weltweit [5]. Gleiches konnte in der Framingham-Studie ermittelt werden. Von untergeordneter Bedeutung sind weitere Faktoren wie Lipoprotein-A-Erhöhung, Hyperfibrinämie, Homocysteinämie, Anti-Phospholipid-Antikörper, genetisch bedingte t-PA-Defekte und Bewegungsmangel. Die genannten Hauptfaktoren lassen sich durch Änderung von Lebensgewohnheiten und medikamentöse Behandlung beeinflussen, was über multiple Programme und Aufklärung im Rahmen der Primärprävention in vielen Industrieländern versucht wird. Unbeeinflussbare Risikofaktoren bilden familiäre Disposition, männliches Geschlecht und Lebensalter.

Ein großer Anteil der Infarktpatienten stirbt nicht an den unmittelbaren Folgen des Akutereignisses, sondern an den längerfristigen funktionellen Auswirkungen des Gewebsunterganges von Arealen des Herzmuskels oder erneuten Ereignissen im Rahmen der KHK. Der Herzinfarkt gilt als eine der Hauptursachen für die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz. Trotz medikamentöser Behandlung ist die Prognose der durch eine koronare Herzkrankheit verursachten Herzinsuffizienz schlecht und mit dem Verlauf vieler Karzinome vergleichbar. Dies bedeutet

einerseits eine weiterhin verminderte Lebensdauer mit eingeschränkter Lebensqualität für den Patienten und andererseits steigende Kosten im Gesundheitswesen. Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen bereits die Krankheitskostenstatistik an und verursachen in Abhängigkeit vom Lebensalter mit ca. 17% bis 30% die meisten Krankenhausaufenthalte in Deutschland. Durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems entstehen die höchsten vermeidbaren Verluste an Lebensjahren und ein Verlust an Erwerbstätigkeitsjahren von 5% bei Frauen und 10% bei Männern in Deutschland. Dies zeigt, wie bedeutsam die Verbesserung der sekundären Prävention und die Vermeidung von Spätfolgen nach Infarkt für jeden Patienten, aber auch für die Gesellschaft ist.

1.2 Pathophysiologie des Herzinfarktes

Unter den klinischen Manifestationen nimmt der Herzinfarkt, also der komplette Verschluss eines Gefäßes, als prognostisch entscheidendes Ereignis durch seine hohe Mortalität eine bedeutende Stellung ein. Hierfür sind zwei Faktoren von entscheidender Bedeutung:

1.2.1 Anatomie

Zum einen stellen die das Herz versorgenden Koronargefäße Endarterien dar. Der Verschluss eines dieser Gefäße führt zur Unterversorgung bzw. Ischämie bis hin zum Absterben des distal liegenden Organgewebes. Je zentraler der Verschluss, desto größer ist das geschädigte Gebiet. Während des Herzinfarktes entsteht durch akuten Sauerstoffmangel eine Gewebsazidose. ATP wird hydrolysiert, setzt so Wasserstoffprotonen frei, was zur Absenkung des intrazellulären pH-Wertes führt. Überschreitet die Dauer des Sauerstoffmangels die Ischämiezeit des Herzmuskelgewebes, führt dies zum Absterben der Zellen. Es existieren zwei Arten des Zelltodes, Nekrose und Apoptose.

Als Nekrose wird der ungeordnete oder zufällige Zelltod bezeichnet. Ausgelöst durch akuten unphysiologischen Stress (Ischämie, Störung der intrazellulären ATP-Produktion, Zerstörung der Zellmembran durch Gifte), betrifft dieser Vorgang meist größere Zellverbände und verursacht eine irreversible Schädigung des gesamten Gewebes. Zelleigene Strukturen wie der Zellkern oder Mitochondrien gehen zu Grunde, die Zelle schwillt an. Schließlich kommt es zum Reißen der Zellmembran. Intrazelluläre Bestandteile, wie lysosomale Enzyme gelangen in den extrazellulären Raum und lösen im umgebenden Gewebe eine Entzündungsreaktion aus.

Im Zusammenhang mit einem Herzinfarkt ist der Hauptmechanismus des Zelltodes die Apoptose [6]. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver physiologischer Prozess,

der sich auf einzelne Zellen beschränkt. Notwendig für die normale Entwicklung eines eukaryontischen Organismus sorgt sie für eine Homöostase zwischen Zelluntergang und Zellerneuerung in regenerierenden Geweben und die Möglichkeit der Eliminierung von geschädigten (Krebszellen, Virusbefall) oder unerwünschten Zellen (Embryonalentwicklung, ausgediente Immunzellen). Die Induktion des programmierten Zelltodes kann über physiologische Signalstoffe, wie TNF und APO1, Liganden der Apoptose-auslösenden-Rezeptoren, aber auch über Stimuli, wie Gamma- oder UV-Strahlen, Chemotherapeutika, freie Radikale und Wasserstoffperoxid, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA erfolgen. Die Zellen schrumpfen, das Chromatin verdichtet sich und der Zellkern schrumpft. An der Zytoplasmamembran bilden sich charakteristische Ausstülpungen und Bläschen, welche schließlich durch Abschnürung mit Zellresten gefüllte Vesikel, sogenannte apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“), bilden. Diese werden von ortständigen Makrophagen ohne Entzündungsreaktion phagozytiert. Im Zellkern werden spezifische Calcium- und Magnesium-abhängige DNasen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke zerschneiden, da sie nur an bestimmten Stellen angreifen können. Diese kann man mit der TUNEL-Methode (engl.: terminal dUTP nick end labeling) nachweisen [7].

Entsprechend der Größe und Lage des betroffenen Areals reichen die Folgen vom plötzlichen Herztod (durch Insuffizienz, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, Ventrikelruptur oder elektro-mechanische Entkopplung) über den zeitnahen Tod (meist durch ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, Herzwandaneurysma) bis hin zu Spätfolgen durch die Narbenbildung wie Kinetikstörungen oder Herzinsuffizienz. Ein segmentaler Verlust von Myokard löst Regeneration und Hypertrophie aus, welche zusammen zur Formierung neuer Muskelmasse in der Infarktregion und einer Randzone führen. Die ablaufenden Anpassungsvorgänge werden unter dem Begriff Remodeling zusammengefasst. Der betroffene Bereich verliert seine Kontraktionsfähigkeit und wird durch den weiter bestehenden Druck im Ventrikel ausgedehnt. Dabei rücken Kardiomyozyten aus dem umliegenden Gewebe nach, werden extrem gedehnt oder sogar zerrissen. Durch die verminderte Auswurfleistung steigt die Volumenbelastung des Ventrikels. Er dilatiert [8]. Folge ist eine erhöhte Wandspannung, welche zu Ausschüttung von Noradrenalin und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems führt. Beides bewirkt eine Erhöhung des peripheren Widerstandes. AngiotensinII und Aldosteron stimulieren Fibrose und Apoptose. Intrazellulär wird die Sarkoplasmatische-Endoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) herunterreguliert [9]. Sie stellt freies Calcium für die Erregungsleitung und Kontraktionsregulierung in Kardiomyozyten zur Verfügung. Dies ist nun vermindert, was zu weiterer Absenkung der Kontraktilität mit Dilatation und kompensatorischer Hypertrophie des intakten Herzmuskelgewebes führt. Aktivie-

nung von Makrophagen, Fibroblasten und damit verbundene Zytokinausschüttung führt zu erhöhter Kollagensynthese und –einlagerung im gesamten Herzen. Somit betrifft das Remodeling nicht nur die geschädigte Region im Sinne einer Narbenbildung, sondern verändert die Struktur und Funktionalität des gesamten Herzens.

1.2.2 Zelluläre Prozesse

Einen weiteren limitierenden Faktor im Rahmen ischämischer Herzerkrankungen stellt die fehlende bzw. stark eingeschränkte Regenerationsfähigkeit geschädigten oder abgestorbenen Herzmuskelgewebes dar. Adulte Kardiomyozyten sind nicht mehr zur vollständigen Teilung fähig. Die allgemeine Wachstumsrate von Kardiomyozyten sinkt graduell in den späteren Stadien der Emryonalentwicklung. Kurz nach der Geburt wandelt sich das hyperplastische Wachstum in ein hypertrophes Wachstum der Zellen. So beginnen Rattenkardiomyozyten bereits zwischen dem dritten und vierten postnatalen Tag die Fähigkeit zur vollständigen Zellteilung zu verlieren [10, 11]. Morphologisch ist dies charakterisiert durch erhöhte Dichte der Muskelfibrillen, intercalated Discs und die Entstehung von binukleären Zellen. Nach sieben Tagen zeigen bereits 50% der Zellen und nach drei Wochen nahezu 90% eine Binukleation [12].

Tierexperimentelle Studien detektierten eine DNA-Neusyntheserate von 0,0005% bzw. 0,0008% in gesunden und geschädigten adulten Herzen [13]. In dekompenzierten alten oder kranken Herzen im Sinne einer langen oder wiederholten Stressinduktion z. Bsp. durch Ischämie konnte eine Reinitiierung von DNA-Synthese beobachtet werden, die aber nur zur Binukleation und Hypertrophie, aber nicht zur Teilung der Zelle führte [14, 15].

Betrachtet man eine proliferierende eukaryotische Zelle, so teilt sich diese in ca. 18-24h. Nach einer erfolgten Mitose befindet sich die Zelle in der G1-Phase (G von englisch gap: Lücke), in der RNA und Proteine, jedoch keine DNA synthetisiert werden. In der späten G1-Phase liegt der Restriktionspunkt. Bis zu diesem Zeitpunkt wächst die Zelle mitogenabhängig. Die Anwesenheit von Mitogenen führt zum Eintritt in die Synthese-Phase (S-Phase), die mit dem Einsetzen der DNA-Replikation beginnt und mit der abgeschlossenen Verdopplung des diploiden Chromosomensatzes endet. Den nun folgenden Zeitraum bis zur Mitose bezeichnet man als G2-Phase. In ihr wird die Teilung vorbereitet und die replizierte DNA kondensiert zu Chromosomen. Die anschließende Mitose, in der die Kern- und Zellteilung abläuft, ist mit ca. einer Stunde Dauer die kürzeste Zellzyklusphase. G1-, S- und G2-Phase werden auch als Interphase (Phase zwischen zwei Mitosen) zusammengefasst. Proliferierende Zellen treten danach wieder in die G1-Phase ein. Das Fehlen mitogener Einflüsse führt zum Eintritt in einen G1 ähnlichen Ruhezustand. Man

nennt diesen Zustand G0. Ein Wiedereintreten in den Zellzyklus ist solchen Zellen nur nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren möglich [16].

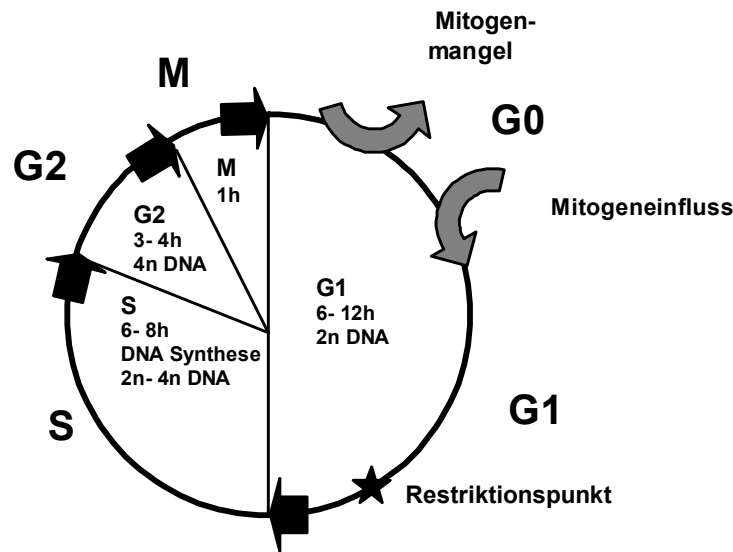


Abbildung 1-2. Schematischer Ablauf des Zellzyklus in Eukaryoten.

Übersicht Zellzyklusphasen, modifiziert nach Lewin [16]. Unter Mitogeneinfluss fällt in G1 die Entscheidung zum Eintritt in die Synthesephase mit Verdopplung des Chromosomensatzes. Nach Vorbereitung in G2 erfolgt die Zellteilung, die Mitose. Danach folgt erneut die G1-Phase. Ohne Einfluss von Mitogenen verlässt die Zelle den Zellzyklus und verharrt in der G0-Phase bis zur erneuten Stimulation durch Wachstumsfaktoren.

1.2.2.1 Der Zellzyklusarrest in Kardiomyozyten

Der Zellzyklus unterliegt molekularen Kontrollmechanismen, die sicherstellen, dass eine Phase des Zellzyklus erst beginnt, wenn die vorhergehende erfolgreich beendet wurde. Der wichtigste Kontrollpunkt für die Zelle ist der Übergang aus der G1- in die S-Phase. Diesen Punkt nennt man Restriktionspunkt. An ihm wird unter anderem überprüft, ob die Masse der Zelle für eine Teilung ausreicht. Hat die Zelle unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren diesen Teil der G1-Phase durchlaufen, ist der Ablauf der weiteren Zellzyklusphasen unabhängig von extrazellulären mitogenen Signalen [17-19]. Auch in G2 vor Beginn der Mitosephase gibt es einen Kontrollmechanismus, der überprüft, ob die DNA vollständig repliziert wurde, bevor sich die Zelle teilt [20].

In Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass ca. 85% der adulten Herzmuskelzellen in der G1-Phase arretieren. Die restlichen Zellen verharrten am Übergang der G2- zur Mitosephase,

also am G2/M-Übergang [21]. In ventrikulären Kardiomyozyten zeigte sich nach Infarkt eine Verschiebung des Anteils von G1-arretierten Zellen zu G2/M-arretierten Zellen [22]. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass nach Stress-Stimulation der G1-Arrest überwunden werden kann, jedoch nicht der G2/M-Block. Somit wird die S-Phase bis zur Karyogenese durchlaufen, um ein Wachstum der Zelle zu erreichen, aber die mitotische Zellteilung bleibt unterbunden. Die Folge sind vergrößerte Zellen mit zwei Kernen [14, 15, 21].

1996 zeigten Reiss und Cheng, dass erwachsene Kardiomyozyten nach Infarkt ein ähnliches molekulares Programm aufweisen wie neonatale Zellen direkt nach der Geburt [23, 24]. Dies brachte eine Wende in der Forschungslandschaft und die Idee, dass adulte Kardiomyozyten zu einer Art Redifferenzierung in der Lage sein könnten. Gelänge es nun die regulierenden Signalwege und beteiligten Proteine zu identifizieren, welche den Zellzyklusstopp in differenzierten Kardiomyozyten bewirken, so könnten diese medikamentös vielleicht so beeinflusst werden, dass eine Erhöhung der Teilungsrate von Kardiomyozyten die Folge ist [13]. Um die Entstehung dieses Zellzyklusarrestes zu verstehen, ist es notwendig die intrazellulären Regulationsprozesse in den folgenden zwei Abschnitten näher zu betrachten.

1.2.2.2 Steuerung des Zellzyklus

Zentrales Element der Regulation des Zellzyklus sind Proteinkinasen. Sie bestehen aus je einer katalytischen Untereinheit, der Kinase, und einer regulatorischen Untereinheit, einem Zyklin. Die sieben Zyklin abhängigen Kinasen (cdk: aus dem Englischen: Cyclin dependent kinase- Zyklin abhängige Kinase) cdk1-6 können verschiedene Dimere mit den Zyklinen A, B, C, D1-D3, E bilden. Unterschiedliche Kombinationen von cdk und Zyklin ergeben durch Konformationsänderungen an der katalytischen Untereinheit spezifische Funktionen für jedes Paar [25, 26]. Funktionelles Prinzip dabei ist die Phosphorylierung zellzyklusrelevanter Proteine an Serin- und/oder Threoninresten, die dadurch entweder rasch aktiviert oder inaktiviert werden. Auch cdk's unterliegen Regulierungsprozessen. Zur Erlangung ihrer katalytischen Aktivität ist eine Phosphorylierung an Threonin (Thr)160/161 durch CAK (cdk-aktivierende Kinase) nötig [27]. Inaktivierung bewirkt eine Phosphorylierung und an Tyrosin (Tyr)15 durch Wee1-Kinase. Tyr15 (in höheren Eukaryoten auch Thr14) befindet sich im katalytischen Zentrum des Enzyms und verhindert die Anlagerung des Substrates. Dies ist notwendig, um erst eine ausreichende Anzahl an inaktiven Zyklin-cdk-Komplexen im Zytosol anzuhäufen, die zum richtigen Zeitpunkt schnell durch eine Dephosphorylierung durch die Phosphatase Cdc25 aktiviert werden können [25, 28]. In teilenden Zellen löst anhaltende externe Stimulation durch Wachstumsfaktoren in der frühen G1-Phase die Synthese von D-Zyklinen aus. Sie haben eine kurze Halbwertszeit und werden nur

solange synthetisiert, wie der Wachstumsstimulus anhält. Sie bilden Dimere mit cdk 4/6. Ihr spezifisches Substrat ist hypophosphoryliertes pRb (Retinoblastoma Protein). Es gehört zusammen mit p130 und p107 zur Gruppe der Pocket-Proteine (deutsch: Tasche). Hypophosphoryliertes pRb bindet Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und unterdrückt somit die Synthese von S-Phase-Proteinen. Vollständige Phosphorylierung und damit Inaktivierung von pRb erfolgt in der späten G1-Phase durch Zykin E-cdk2-Kinase [25]. Es erfolgt die Freisetzung von E2F, was im Zellkern die Transkription von S-Phase- und Mitose-Genen, wie Zykin A, cdk1 und Histonen, auslöst [29]. Dieses Ereignis definiert den Restriktionspunkt. Zykin E wird degradiert und das freigesetzte cdk2 bildet Komplexe mit Zykin A, das die S-Phase steuert [26]. Die Steuerung der G2-Phase erfolgt durch Zykin B-cdk1-Komplexe. Für die Einleitung der Mitose ist eine Komplexbildung von cdk1 und Zykin A notwendig. Phosphorylierung an den konservierten Tyrosin- und Threoninresten durch Wee1-Kinase und CAK bereiten den Eintritt der Mitose vor [26, 29]. Diese beginnt mit der Dephosphorylierung von Tyr 15 durch CDC25. und endet mit der Degradation von Zykin A und B.

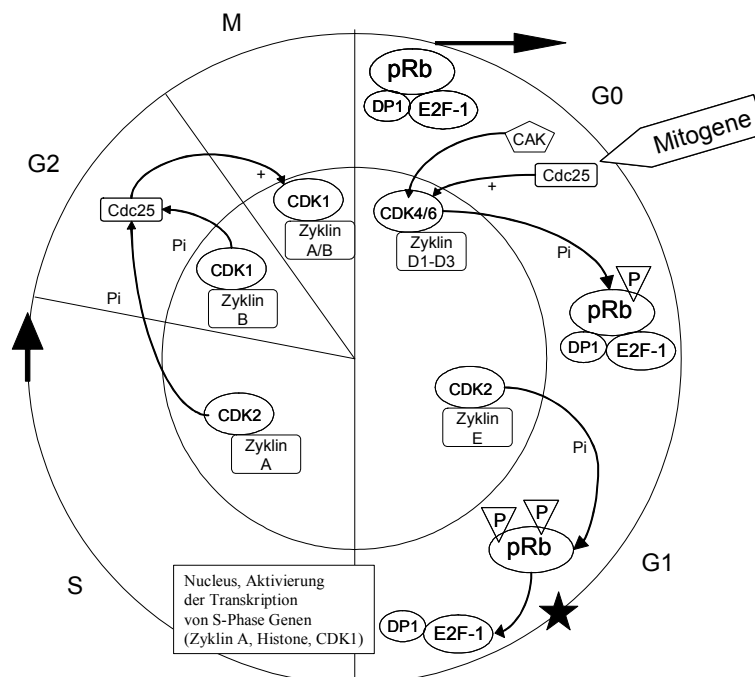


Abbildung 1-3. Steuerung des Zellzyklus durch cdk-Zykin-Komplexe:

Stimulation der Synthese von D-Zyklinen und Assoziation mit cdk4/6. Nach Aktivierung durch CAK und Cdc25 Phosphorylierung von hypophosphoryliertem pRb. Im Nucleus Assoziation von cdk2 und Zykin E und Phosphorylierung von pRb. Hyperphosphoryliertes pRb gibt E2F-1 und DP1 frei, die die Transkription von S-Phase Genen einleiten. Dadurch erfolgt der Übergang in die S-Phase, welche gesteuert durch cdk2-ZykinA-Komplexe jetzt durch extrazelluläre Signale nicht mehr beeinflusst werden kann. Steuerung der G2 und M-Phase durch cdk1-Zykin-Komplexe.

Diese Proteinkinasen stehen unter der Kontrolle von inhibierenden Zellproteinen, den cdk-Inhibitoren. Diese regulieren den Durchlauf der Zelle durch den Zellzyklus.

Die cdk-Inhibitoren unterteilen sich in zwei Hauptgruppen. Die Mitglieder der INK4-Familie, bestehend aus p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, binden spezifisch an cdk4 und 6. Die Bindung an cdk-Monomere verhindert die Assoziation mit Zyklin D, Bindung an Zyklin-cdk-Komplexe bewirkt deren Dissoziation [25, 27].

p18^{INK4} und p19^{INK4} werden nur während der Embryonalentwicklung aktiv und spielen eine Rolle in der terminalen Differenzierung. Allerdings konnten in Herzmuskelzellen bisher keine Mitglieder dieser cdk-Inhibitoren-Familie nachgewiesen werden [30].

Die KIP/CIP-Familie hingegen lässt sich während aller Entwicklungsstadien in Herzmuskelzellen nachweisen [21]. Sie wird gebildet durch p21^{WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}. Diese sind in der Lage, die enzymatische Aktivität aller G1-Zyklin-cdk-Komplexe zu hemmen [25].

1.2.2.2.1 Der cdk-Inhibitor p21^{WAF1}

p21^{WAF1} liegt je nach Zellzyklusphase gebunden in einem Komplex mit PCNA (engl.: proliferating cell nuclear antigen), einer Untereinheit der DNA-Polymerase- δ , und dem entsprechenden cdk und Zyklin vor [27, 31]. PCNA ist an der Steuerung der DNA-Reparatur und -Replikation beteiligt. Durch Bindung kann p21^{WAF1} aber nur die Replikation unterbinden. Die Fähigkeit zur Reparatur bleibt erhalten.

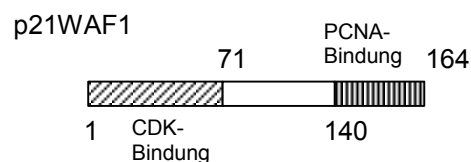


Abbildung 1-4. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von p21^{WAF1}:

Der coarboxyterminale Aminosäurebereich 1-71 vermittelt die Bindung an die entsprechende Zyklin abhängige Kinase und das aminoternale Ende mit dem Aminosäurebereich 140-164 die Interaktion mit PCNA [27].

Der CKI p21^{WAF1} kann die Aktivierung von cdk-Zyklin-Komplexen durch CAK verhindern oder schon aktivierte Komplexe inhibieren [32, 33]. Seine Genexpression wird direkt reguliert über p53, einen Tumorsuppressor [34]. P53 wird induziert durch DNA-Schädigung, z.Bsp. durch Strahlung. Der ansteigende Proteinspiegel von p21^{WAF1} unterbindet die Phosphorylierung von Rb und somit die Freisetzung von E2F. Folge ist ein reversibler G1-Arrest, der es der Zelle ermöglicht, die geschädigte DNA zu reparieren [27]. Ist das Ausmaß des Schadens zu groß und sind wichtige Funktionen gestört, fällt an diesem Punkt die Entscheidung zur Auslösung eines irre-

versiblen Arrests oder zur Einleitung von Apoptose. Der Anteil an freiem p21^{WAF1} fluktuiert während des Zellzyklus. Den höchsten mRNA- und Proteingehalt erreicht eine Zelle beim Austritt aus G0 und am G2/M-Kontrollpunkt. Erhöhte Expression verhindert den Eintritt in die Mitose und führt damit zu einem G2-Arrest oder zur Apoptose [35]. Dies kann die Zelle davor schützen, Tochterzellen mit deformiertem Erbgut zu bilden. Der CKI p21^{WAF1} ist stark exprimiert in ruhenden und differenzierten Zellen, so auch in Herzmuskelzellen. Hier ist die Erhöhung des p21^{WAF1}-Spiegels interessanterweise unabhängig von p53 [36], dessen Proteinspiegel im Herzen ebenfalls stark erhöht ist. Die physiologische Funktion beider Proteine in Herzmuskelzellen ist weitgehend unbekannt.

Der CKI p21^{WAF1} fungiert auch selbst als Tumorsuppressor. So entwickeln p21^{WAF1}-Knock-out-Mäuse nach zunächst normaler Entwicklung im Alter von 16 Monaten vermehrt spontane Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe [37].

1.2.2.2.2 Der cdk-Inhibitor p27^{KIP1}

Der Proteingehalt von p27^{KIP1} ist stark erhöht in ruhenden und kontakthinhibierten Zellen und in Zellen, die mit antiproliferativen Substanzen, wie z. Bsp. TGFβ oder cAMP, behandelt sind oder denen Serum und damit der Mitogeneinfluss entzogen wurde. TGFβ erhöht indirekt die freien inhibitorisch wirksamen p27^{KIP1}-Spiegel, indem es p15^{INK4B} induziert. Der CKI verdrängt p27^{KIP1} aus cdk4/6-Zyclin-Komplexen. Somit bindet p27^{KIP1} cdk2-ZyclinE-Komplexe und führt darüber zum G1-Arrest[38, 39]. Erhöhte cAMP-Spiegel steigern die Syntheserate von p27^{KIP1} und inhibieren simultan die Degradation. p27^{KIP1} verhindert die Aktivierung von cdk4-Zyclin-Komplexen durch CAK, die Zelle arretiert in G1[40].

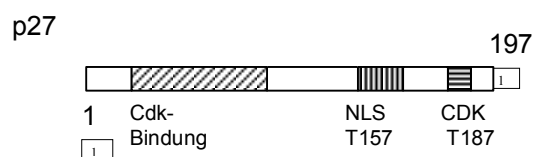


Abbildung 1-5. Schematische Darstellung des cdk-Inhibitors p27^{KIP1}:

Das carboxyterminale Ende vermittelt die Bindung an die entsprechende Zyclin abhängige Kinase; T187 Phosphorylierung durch cdk markiert p27^{KIP1} für die Degradation; T157 Phosphorylierung durch Akt verhindert den Transport in den Zellkern; Abk.: NLS (nucleäre Lokalisationssequenz).

Beim Eintritt der Zelle in die G1-Phase nimmt der p27^{KIP1} Proteingehalt drastisch ab.

Die Regulation des p27^{KIP1} Proteingehaltes der Zelle erfolgt vornehmlich über posttranslationale Prozesse wie Transkription und Degradation durch proteasomale Ubiquitierung [41].

Prinzipiell besteht das Ubiquitin-Proteasom-System aus drei verschiedenen Komponenten, E1-E3. Das Ubiquitin-aktivierende-Enzym E1 bindet und aktiviert Ubiquitin unter Verbrauch von ATP und transportiert es zu E2, dem Ubiquitin-conjugierenden-Enzym. Die dritte Komponente E3, die Ubiquitin-Ligase, sorgt für die Aquirierung des spezifischen Substrates. Die spezifische E3-Ligase für p27^{KIP1} wird gebildet durch den SCF-Komplex, welcher sich neben feststehenden Komponenten, wie Skp1, Cul1 und Rbx1/ROC1, auch aus dem substratspezifischen F-Box-Protein Skp2 zusammensetzt [42]. Während der S-Phase und G2-Phase wird nukleäres p27^{KIP1} durch Zyklin E/A-cdk2-Komplexe an Threonin 187 (T187) phosphoryliert und assoziiert im Nucleus mit Skp2 in einem Komplex [43, 44]. Nach Phosphorylierung an Serin10 durch hKIS (engl.: human kinase interacting stathmin) [45] wird der Komplex aus SCF/Skp2/p27^{KIP1} durch p38^{Jab1} [46] aus dem Kern exportiert und im Zytoplasma der Proteolyse durch Ubiquitin zugeführt [47-49]. Während G0/G1 wird p27^{KIP1} nach mitogener Stimulation in das Zytoplasma exportiert und dort durch die E3-Ligase KPC (engl.: KIP1-ubiquitination-promoting-complex) der Degradation zugeführt [45, 50, 51]. Unabhängig von proteasomalen Abbauvorgängen führen Mitogene zur Synthese und Komplexbildung zwischen D-Zyklinen und cdk4/6. Diese können p27^{KIP1} ohne Aktivitätsverlust binden und sich somit dem freien inhibitorisch wirksamen Pool entziehen [52].

Die Bedeutung von p27^{KIP1} in der Zellzyklus- und Wachstumskontrolle wurde an Knock-out-Mäusen bestätigt. Von Geburt an zeigen p27^{KIP1} defiziente Mäuse eine proportionierte Körpergewichts- und Größenzunahme durch eine exzessiv erhöhte Zellzahl in allen Organen einschließlich des Herzens. Eine überproportionale Vergrößerung entwickelten der Thymus, die Hypophyse, die Nebennieren und die Gonaden. Die weiblichen Tiere waren steril, da die Differenzierung von Granulosa- zu Corpus Luteum-Zellen unterbunden war. Interessanterweise konnte in Thymozyten der p27^{KIP1}-negativen Mäuse durch Stimulation mit TGFβ ein Zellzyklusarrest ausgelöst werden [53].

Die Herzvergrößerung in diesen Tieren lässt sich auf ein prolongiertes hyperplastisches Wachstum zurückführen [21]. Dies wird ermöglicht durch ein verzögertes Einsetzen von Differenzierung und hypertrophischem Wachstum. Adulte Herzen erreichen so die zwei- bis dreifache Zellanzahl im Vergleich mit adulten Wildtyp-p27^{KIP1}-Herzen [54].

Weiterhin entwickelten nullizygote Tiere spontan benigne Tumoren der Hypophyse [53], aber keine Karzinome. Jedoch konnte in Brustkrebszellen die Bedeutung von p27^{KIP1} als Tumorsuppressor nachgewiesen werden. Nach Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Threonin 157 (T157) durch Akt, eine Serin/Threoninkinase, wird der Transport des CKI in den Zellkern unterbunden. Damit verbleibt p27^{KIP1} im Zytoplasma und nucleare cdk2-Zyklus-Komplexe werden nicht inhibiert und damit der Zellzyklus nicht unterbrochen [55]. In vielen Tumoren ist außerdem der p27^{KIP1}-Spiegel durch gesteigerten proteasomalen Abbau zusätzlich erniedrigt [56]. Niedrige p27^{KIP1}-Spiegel sind assoziiert mit der Prognose von Tumoren, je niedriger der Proteinspiegel an freiem p27^{KIP1} und je höher der zytoplasmatische Anteil an p27^{KIP1} in Krebszellen, desto größer die Malignität und desto schlechter die Prognose des Tumors [57, 58].

In Abhängigkeit vom Zelltyp und –status kann p27^{KIP1} pro- oder antiapoptotisch wirksam werden. So führt die Überexpression von p27^{KIP1} unter anderem in Brustkrebszellen zur Induktion von Apoptose [59] und Zellzyklusarrest [56]. In humanen Leukämiezellen hingegen verhindert Überexpression von p27^{KIP1} die Auslösung von Apoptose über die Inhibition der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C [60].

Während der Entwicklung von fetalen zu adulten Kardiomyozyten lässt sich für p21^{WAF1} ein fünf- bis zehnfacher und für p27^{KIP1} ein zweifacher Anstieg der Proteinmenge nachweisen [21]. Gleichzeitig werden die nachweisbaren positiven Zellzyklusregulatoren, wie Zykline und cdk, in der ersten postnatalen Woche herabreguliert [30]. In p27^{KIP1}-negativen Mäusen zeigt sich, wie in 1.2.2.2 beschrieben, eine Hyperplasie aller Organe und auch des Herzens. Die Kardiomyozytenanzahl war gegenüber Zellen von Wildtyp-Mäusen um das 1,2- bis 1,3-fache erhöht [30, 61]. In p21^{WAF1}-Knock-out-Mäusen zeigte sich eine normale Entwicklung der Kardiomyozyten und erst im adulten Entwicklungsstadium eine Störung des Zellzyklus im Sinne einer Tumorentstehung.

p27^{KIP1} nimmt somit eine bedeutende Stellung in der Regulierung des Zellzyklusstopps in Kardiomyozyten ein. Da alle bekannten Interaktionspartner innerhalb der Zyklus-cdk-Gruppe in adulten Herzen herabreguliert sind, könnten für die Regulationsprozesse ganz andere Signalwege zuständig sein. Viele Studien haben gezeigt, dass durch exogene Zufuhr von positiven Zellzyklusregulatoren, wie D-Zyklinen oder E2F-1 in Kardiomyozyten DNA-Synthese und in manchen Fällen sogar komplette Genomduplikation mit Karyogenese im Sinne einer Binucleation mit Hypertrophie auslösen können. Das reicht aber allein nicht aus, erwachsene Herzzellen zur Zellteilung zu bringen. Diese Gründe sprachen für die Auswahl von p27^{KIP1} als Ansatzpunkt für die Entdeckung neuer Signalwege zur Regulation des Zellzyklusarrests in Kardiomyozyten.

2 Ziele und Fragestellungen

Aufgrund des Verharrens adulter Herzmuskelzellen in der G1-Phase des Zellzyklus führt das Absterben eines Gewebeareals, z.Bsp. nach Herzinfarkt, zu einem Verlust an Funktionalität mit existentiellen Folgen für den betroffenen Patienten. Ein bedeutender Regulator des Zellzyklusstopps in eukaryotischen Zellen ist der CKI p27^{KIP1}. Die durch ihn gesteuerten Interaktionspartner sind jedoch in adulten Kardiomyozyten nahezu nicht vorhanden.

Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es, neue Interaktionspartner und Signalwege für das Zellzyklusprotein p27^{KIP1} in Kardiomyozyten zu charakterisieren, die neue Aufschlüsse über die Regulation des G1-Arrestes geben und die Basis für die Entwicklung einer medikamentösen Therapie zur Verhinderung der Spätfolgen nach Infarkt bilden können. Dabei sollen im Einzelnen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Lassen sich *in vivo* im Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren Interaktionspartner von p27^{KIP1} außerhalb der cdk-Signaltransduktionskette identifizieren? Kann eine mögliche Bindungsstelle charakterisiert werden?
2. Welche Wechselwirkungen existieren zwischen p27^{KIP1} und potentiellen neuen Bindungspartnern? Welche Folgen resultieren aus der gefundenen Interaktion für die Funktion von p27^{KIP1} sowie für die der Interaktionspartner?
3. Welche Effekte haben die p27^{KIP1}-Interaktionen in hypoxischen Kardiomyozyten? Lassen sich genaue Funktionen der einzelnen Interaktionspartner in Hypoxie definieren?

3 Methoden

3.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist ein Verfahren zur *in-vivo*-Testung von Protein-Protein-Interaktionen und zur Bestimmung potentieller, bisher unbekannter Bindungspartner von Proteinen durch cDNA-Bankdurchmusterung [62-65]. Das Grundprinzip beruht auf der Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren in Eukaryonten stets aus zwei funktionellen Domänen bestehen, der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und der DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD). Erstere bindet an die stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz des Reportergens. Bindet nun die Aktivierungsdomäne an die Bindungsdomäne, wird die Ablesung des Gens ausgelöst. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System werden die zu untersuchenden Proteine sozusagen dazwischen geschaltet. Man fusioniert die Bindungsdomäne mit dem bekannten bzw. zu untersuchenden Protein (Köder) und die Aktivierungsdomäne mit dem Testprotein bzw. einer cDNA-Gendatenbank (Beute). Die entstandenen Produkte nennt man Hybriden. Diese werden in definierte Transportvektoren geklont und in Hefezellen eingeschleust. Im Falle einer Interaktion beider Proteine im Zellkern wird nach erfolgreicher Bildung des Transkriptionskomplexes [62, 66] ein bestimmtes Gen abgelesen, dessen Produkt in der Hefezelle nachgewiesen werden kann.

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System der Firma Clontech benutzt den Gal-4-Transkriptionsfaktor in *Sacharomyces cerevisiae*, welcher über die GAL1-Aktivierungssequenz die Ablesung der Reportergene LacZ und HIS3 kontrolliert. Die Aktivierung führt zur Bildung der Transkriptionsprodukte Histidin und β -Galaktosidase, ein Enzym des Galaktosestoffwechsels. Dessen Aktivität wird zum Nachweis der Proteininteraktion bestimmt. Das HIS3-Reportergen liegt bei dem von uns verwendeten Hefestamm Y190 in dem durch die GAL1-Aktivierungssequenz regulierten Gal4-Reportergen. Seine Starterbox ist in zwei Teile aufgeteilt, den TR- und den TC-Teil. Ersterer befindet sich unter Kontrolle der regulierenden GAL1-Aktivierungssequenz und führt somit zur Produktion von Histidin durch die Hefezelle. Eine weitere Eigenschaft, die man sich zur Selektion positiver Clone zunutze macht. Die TC-Box ist jedoch davon unabhängig und bewirkt eine leichte aber stetige Produktion von Histidin. Diese Produktion wird durch die Zugabe von 3-Aminotriazol (3-AT) in allen Wachstumsmedien unterdrückt.

Vor dem Start der Screenings erfolgten Probetransformationen mit jedem der beiden leeren Vektoren, pAS2-1 und pGAD10, zum Ausschluss einer möglichen Autoaktivierung und Beeinflus-

sung des Hefewachstums. Eine Positivkontrolle wurde mit pVA3-1 (DNA-BD und p53 Antigen in pAS2-1) und pTD1 (DNA-AD und SV40 large T-Antigen in pACT2) durchgeführt.

Als Köder erfolgte die Klonierung der Aminosäuren 1-199 der cDNA von p27^{KIP1} als BamHI-Fragment in Leserichtung (N-Terminus) mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne in den Vektor pAS2-1. Dieser trägt die ersten 147 Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne, das Reporter-gen für Tryptophan (TRP1) und das Wildtyp-Cyh^{s2}-Gen.

2 µl einer randomisierten humanen Herz cDNA-Datenbank (HL4013AB), Clontech, lot 51034 gebunden an die GAL4-Aktivierungsdomäne wurde in den Vektor pGAD10 kloniert. Dieses Konstrukt bildete die Beute. Der Vektor trägt außerdem das Reporter-gen für die Aminosäure Leucin (LEU2). Es erfolgte die simultane Kotransfektion beider Plasmide in Zellen des Hefestammes Y190 mit der modifizierten Clontech Standard-LiAc-Transformation. Die Transformanten wurden auf SD-Medium kultiviert, das kein Histidin, Leucin oder Tryptophan enthält. Dies führte zur Selektion solcher Zellen, die beide Plasmide enthielten (positiver Klon). Nach vier bis fünf Tagen wurden die gewachsenen Kolonien mit dem Filterlift-Assay auf die Bildung von β-Galaktosidase getestet. Positive Kolonien färbten sich durch Spaltung blau. Die positiven Klone wurden einer weiteren Selektion durch Cycloheximid unterzogen.

Y190 ist eigentlich durch das Cyh^{f2}-Gen gegen Cycloheximid resistent. Das Plasmid pAS2-1 enthält jedoch das dominante Wildtyp-Cyh^{s2}-Gen, welches zu einer Cycloheximidsensibilität der Hefezellen führt. Der Selektionsdruck führt zum spontanen Verlust (Segregation) der pAS2-1 Köderplasmide.

Zur Eliminierung des bekannten Köderplasmides erfolgte die Isolierung der Plasmide nach der im Clontech Matchmarker Protokoll beschriebenen Methode aus Y190 und die Transformation wie beschrieben nach dem modifizierten Clontech Protokoll für die Standard-LiAc-Transformation in den E.coli-Stamm HB101Leu-. Die Kultivierung auf einem Leucin-Mangelmedium zeigte nun Klone, in denen nach Segregation nur die pGAD10-cDNA-Bank-Plasmide zurückblieben. Diese wurden nach Herstellerangaben mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit extrahiert. Die Analyse erfolgte mittels Restriktionsverdau mit ECOR1 und Anfärbung mit Orange G in einer Gelelektrophorese. Durch Auftrennung und Färbung mit Ehtidiumbromid konnten die Klone, die ein Insert tragen, selektiert werden. Diese wurden in E.coli DH5α transformiert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung jeder einzelnen cDNA.

3.1.1 Modifizierte LiAc-Transformation

Ein bis zwei Hefekolonien des Hefestammes Y190 mit Durchmessern >2mm wurden in 50ml YPD mit 100µl Ampicillin über Nacht bei 30°C und 200Upm kultiviert. Die Übernachtskultur wurde unter Zugabe von 600 µl Ampicillin in 300 ml YPD überführt und danach bei 30 °C und 200 Upm drei bis vier Stunden bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6, gemessen bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$ ($\text{OD}_{600}=0,6$) inkubiert. Nach Aufteilen der Hauptkultur auf sechs 50 ml Falconröhrchen erfolgte die zweimalige Zentrifugation für fünf Minuten bei 2000 Upm bei RT unter Verwerfung des Überstandes. Anschließend wurden die Zellen in je 1,5 ml TE/LiAc resuspendiert, nochmals fünf Minuten zentrifugiert (2000Upm und RT), der Überstand verworfen und die Zellen in 6ml TE/LiAc resuspendiert. In einen 500ml Glaskolben wurden je 500µl DNA-BD, DNA-AD, 500µl (5mg) Hering Sperma gegeben., 6ml TE/LiAc-Zellsuspension in die Kolben überführt, 36 ml PEG/LiAc zugegeben, gemischt und bei 30°C und 200Upm 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 700µl DMSO wurden die Ansätze und für 15min bei 42°C im schüttelnden Wasserbad hitzegeschockt. Es folgte das Abkühlen für fünf Minuten auf Eis. Nach Überführung der Lösung in 50ml Falconröhrchen und Zentrifugation (13 000Upm, 20sec) wurden die entstandenen Zellpellets in 1,5ml 1xTE resuspendiert und je 100µl auf eine 15cm² SD/His-/Leu-/Trp-/AT3-Agarplatte ausplattiert. Diese wurden für vier Tage bei 30°C inkubiert. Bei entsprechendem Koloniewachstum folgte das Filterliftverfahren.

3.1.2 Koloniefilterliftverfahren

Auf die Platten mit den gewachsenen und möglichst vereinzelt Kolonien mit einer Größe von zwei bis drei Millimeter Durchmesser wurden vorsichtig saubere, trockene Filter gedrückt, an drei Seiten auf dem Filter und der Platte markiert, anschliessend mit einer Pinzette abgenommen und für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Hierbei erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der abgenommenen Hefekolonien auf dem Filterpapier. Die Filter wurden luftgetrocknet und anschließend in vorbereitete Schalen mit der Kolonieseite nach unten, ohne eingeschlossene Luftblasen auf den mit Z-Puffer/ X-Gal-Lösung getränkten sterilen Whatman Filter gelegt. Die Schalen wurden bis zum Erscheinen von blauen Kolonien, aber nicht länger als acht Stunden, bei 30°C inkubiert. Nach Trocknen der Filter konnten anhand der Markierung auf Platte und Filter die positiven Klone durch Vergleich identifiziert werden. Sie wurden von den Platten gepickt und in frisches Medium überführt.

3.1.3 Plasmidisolierung aus Hefezellen

Es erfolgte die Inokulation der positiven Klone in je 5ml SD/-Leu/-Trp/-His/ 2mM3AT. Nach Inkubation über Nacht bei 250Upm und 30°C wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 1000Upm unter Verwerfung des Überstandes zentrifugiert und das Zellpellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Nach Überführung in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen erfolgte die Zugabe von 0,2ml Hefezellenlysierungslösung, 0,2ml Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol und 0,3g der säuregewaschenen Glaskügelchen. Jedes Röhrchen wurde anschließend für zwei Minuten gevortext. Die Präzipitation der Plasmide erfolgte aus dem durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 10min gewonnenen Überstand. Nach Zugabe von 500µl Ethanol 96% wurden die Proben für 30min bei -20°C abgekühlt und das nach erneuter Zentrifugation entstandene Pellet in 20µl 0,1M Tris-Puffer aufgenommen.

3.1.4 Transformation von kompetenten E.coli HB 101 mit Hefepiasmid

20µl Plasmid-DNA wurde auf Eis stehend mit je 100µl kompetenten E.coli HB101 versetzt und für drei Stunden unter mehrmaligem Vermischen durch vorsichtiges Fingertippen auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 60 Sekunden im 42°C heißen Wasserbad erhitzt und anschließend erneut für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400µl zehnprozentigem 10xSD-Leu-Medium mit fünf prozentiger Glucose und Inkubation für eine Stunde bei 220Upm und 37°C wurde die Zellsuspension vollständig auf Platten mit HB101-Selektivmedium ausplattiert.

3.1.5 Transformation von kompetenten E.coli DH5α mit Plasmid

1-2µl Plasmid-DNA wurde auf Eis stehend mit je 100µl kompetenten E.coli versetzt und für 30min unter mehrmaligem Vermischen durch vorsichtiges Fingertippen auf Eis inkubiert. Danach erfolgte das Erhitzen des Ansatzes für 1,15min in einem 37°C heißem Wasserbad und erneute Kühlung der Probe für fünf Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 900µl LB-Medium ohne Ampicillin und Inkubation für eine Stunde bei 200Upm und 37°C wurde nach Pelletbildung durch Zentrifugation 800µl Überstand abgenommen, das Pellet im Rest der Flüssigkeit resuspendiert und alles auf 9cm LB+ Ampicillin Platten ausplattiert.

Die Transformation der E.coli beeinflusste das Wachstum des Y190 Stammes nur minimal. Um eine OD von 0,6 zu erreichen, mussten transformierte E.coli ca. 30min länger inkubiert werden.

Ansatz Stunden	Y190 Kultur	Y190 mit p27 ^{KIP1}	Y190 mit p21 ^{WAF1}
0,0	0,36	-	-
1,0	0,49	-	-
2,0	0,51	-	-
2,5	0,62	0,54	0,52
3,0	-	0,62	0,60

I. Tabelle: Der Einfluss von p27^{KIP1} und p21^{WAF1} Expression auf das Hefewachstum; OD bei einer Wellenlänge von 600nm

3.1.6 β -Galaktose-Flüssigkeits-Assay

Die Bestimmung der Bindungsstärke erfolgte mit dem Liquid-Assay von Clontech unter Verwendung von ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) als Substrat. Dazu wurden Hefezellen vom Stamm Y190 mit den jeweiligen Bindungspartnern kotransformiert und jeweils fünf Ansätze nach Anweisungen des Herstellers bei einer Absorption von 450nm analysiert.

3.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Beuteproteine aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System erfolgte durch Josephine Bechstein der Arbeitsgruppe PD M. Bergmann aus dem Max-Delbrück-Zentrum Berlin Buch.

3.3 GST-Fusions-Assay

Für den *in-vitro*-Nachweis der spezifischen Proteinbindung und zur Kennzeichnung der Bindungsstellen wurde das GST-Fusions-Assay verwendet.

Dazu klonen wir die cDNA mit PCR als BamHI-Konstrukt einen der Vektoren pGex-1 λ T, pcDNA3.1 oder pTrcHis. Damit wurden die Protease-negativen Zellen E.coli-BL21 transformiert.

3.3.1.1 Produktion der GST-Fusions-Proteine

5ml einer Übernachtskultur von transformierten E.coli BL21 wurden in 100ml LB-Flüssigmedium mit 50 μ l/ml Ampicillin bei 37°C inkubiert. Bei einer gemessenen OD zwischen

0,4 und 0,6 wurde die Kultur mit 500µl IPTG induziert und nochmals inkubiert, bis sich die OD ungefähr verdreifacht hatte.

IPTG ist ein nicht metabolisierbares Lactoseanalogon und startet somit die Ableitung und Produktion des GST-Fusionsproteins in BL21.

Der Zellextrakt wurde für die Lysierung vorbereitet indem er bei 4°C für 20min in 2,0 ml NETN-Puffer mit 10% (V/V) Glycerol, 1,0 mM DTT, 1,0 mg/ml Lysozym, 50 U/ml Deoxyribonuclease 1 (DNase1) und 1,0 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Ultraschallbehandlung der rohen Zellextrakte für eine Minute und Reinigung durch Zentrifugation für 30min bei 4°C und 18.000g. Die *in-vitro*-Bindungs-Assays erfolgten unter Verwendung von immobilisierten GST-Fusions-Glutathion-Sepharose-Kügelchen. Zur Vorbereitung und Äquilibration wurden je 100µl der in 20-prozentigem Ethanol vorliegenden Kügelchen in ein 1,5ml Eppi pipettiert, für zwei Minuten bei 4°C und 2000UpM zentrifugiert und anschließend dreimalig mit je 1ml NETN+ 0,5% Milchpulver+ PMSF gewaschen. Nach Aufnahme in je 100µl NETN mit 20µl PMSF konnten die Ansätze bei 4°C für eine Woche gelagert werden.

3.3.1.2 Bindungsreaktion

Das Bindungs-Assay kann in einem (direkt) oder zwei Schritten (indirekt) erfolgen. Das direkte Assay ist nur geeignet für sehr starke Proteininteraktionen. In Anbetracht der Unkenntnis über die Bindungsstärke fiel die Wahl auf das Verfahren in zwei Schritten.

Dazu wurden je 0,5 bis 1ml des BL21-Zelllysates mit je 50µl der wie beschrieben vorbereiteten Kügelchen vermischt und die Ansätze für eine Stunde im Kühlraum bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Als Kontrolle fanden Ansätze ohne DNA, also nur mit Kügelchen, Verwendung. Anschließend wurden die Proben dreimalig mit je 1ml NETN+ 20µl PMSF gewaschen. Der erste Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt. Der letzte Überstand wird mit Hilfe einer Hamiltonspritze vollständig entfernt. Der Translationsansatz wurde zu den immobilisierten GST-Fusionsproteinen in 250µl NETN Bindungspuffer gegeben und übernacht bei 4°C in einem Rotationsrad inkubiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen der Zellpellets mit 4°C kaltem NETN Puffer. Die gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen für fünf Minuten bei 94°C in 30µl Probenpuffer herausgelöst.

3.3.1.3 Elution

Während an die Glutathion-Sepharose-Kügelchen oxidiertes Glutathion kovalent gebunden ist, befindet sich im Glutathion-Elutionspuffer reduziertes Glutathion. Das reduzierte Glutathion hat eine höhere Affinität zum katalytischen Zentrum der GST und verdrängt das oxidierte Glutathion und damit das Fusionsprotein von der Matrix.

3.4 Kinase-Assay

Die immunpräzipitierten Zellysate wurden einmal mit je 1ml Kinasepuffer gewaschen. Alle weiteren Schritte fanden im Radioaktivsicherheitstrakt des Max-Delbrück Zentrums statt. Nach sorgfältiger Abnahme des Überstandes wurde jeder Ansatz mit 20µl Kinasepuffer, 5µl Histone H1, 1µl ATP und 1µl 10µCi [γ - 32 P]ATP resuspendiert, für 1,5h bei 37°C inkubiert und anschließend für 3min bei 94°C mit 25µl Probenpuffer denaturiert. Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE mit einem 20%tigen Gel bei max. 40mA. Die vakuumgetrockneten und eingeschweißten Gele wurden mit dem Phosphorimager und dem Tina Software Programm analysiert.

3.5 Proteinsynthesenachweis

Die Proteinsynthese wurde bestimmt über die Inkorporation von L- 35 S]-Methionin. 2 bis 3×10^6 Kardiomyozyten wurden metabolisch mit 500Ci von L- 35 S]-Methionin/ml (1000Ci/mmol) für den jeweils angegebenen Zeitraum inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch radioaktive Immunopräzipitation und Autoradiografie.

3.6 *In-vitro*-Translation und -Transformation

Für die *in-vitro*-Translations- und -Transformationsreaktionen wurde das T7-RNA-Polymerase-abhängige TNT-Retikulozyten-Lysat-System nach Anweisungen des Herstellers benutzt. Hierbei werden in Zellkernlysaten unter der Kontrolle des T7-Promoters beide Schritte der Proteinexpression in einer Reaktion ermöglicht.

Für den Translationsansatz wurden 2µl DNA im Vektor pcDNA3.1/pTrc eingesetzt. Das translatierte Protein wurde mit 2µl L- 35 S]-Methionin (37 TBq/mmol) pro Reaktionsansatz markiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte nach 120 min Inkubation bei 30°C durch Zugabe von je 10µl NETN+ PMSF. Anschließend wurde ein 10 µl Aliquot durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Trocknen des Gels autoradiographisch ausgewertet.

3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit diesem elektrophoretischen Trennverfahren (Laemmli, 1970) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Aufkochen des nativen Proteins mit Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und an SDS gebunden. Dabei wird die native Ladung durch die negative der SDS-Teilchen überdeckt. Die Auftrennung in einem Polyacrylamid Gel erfolgt nach der Größe der Proteine.

Die Anfärbung der 12- bis 15-prozentigen Gele erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blau nach dem Protokoll der Standard Coomassie Färbung für Polyacrylamidgele der Firma Pharmacia. Als Größenstandard verwendeten wir den Hochmolekular-und Niedrigmolekulargewichtskalibrierungskit von Pharmacia nach den Anweisungen des Herstellers. Nach Abtrennung des Sammelgels wurden die Gele auf einem Vakuumtrockner getrocknet und eingeschweißt.

3.8 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford [67] mit dem Coomassie Protein Assay Reagent Kit von Pierce nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Durch Bindung an ein Protein in einem sauren Medium verändert die Coomassie Reagenz ihre Farbe von grünbraun nach blau unter gleichzeitiger Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm nach 595nm. Die Beziehung zwischen Farbänderung und Proteinkonzentration ist nicht linear. Darum ist es notwendig eine Standardkurve zu ermitteln

Dies erfolgte über eine Eichreihe mit definierten BSA-Konzentrationen. Je 5µl Probe oder Standard wurden mit 200µl Coomassie Reagenz versetzt und mit dem Dynatech Revelation 2.0 bei 570nm ausgewertet.

3.9 Westernblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden mit diesem Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hier können die Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das Gel mit den durch die SDS-Beladung negativ geladenen Proteinen wird in ein elektrisches Feld gebracht. Dabei befindet sich die Membran zwischen Gel und Anode. Die Proteine wandern nach Anlegen des Feldes aus dem Gel und bleiben an der Membran hängen. Diese steht für ein Immunoblotting zur Verfügung.

Verwendung fand ein kontinuierliches Puffersystem. Zuerst wurden acht zugeschnittene Filterpapiere mit Transferpuffer in einer Schale durchtränkt und die Anode mit Puffer gesättigt. Auf

die Anodenplatte erfolgte die Schichtung unter Vermeidung von Luftblasen in dieser Reihenfolge: vier Filterpapiere, die Membran, das Gel, nochmals 4 Filterpapiere und die Kathodenplatte. Sodann wurde für eine Stunde Strom (150mA; 18V) angelegt, die Membran entfernt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert.

3.10 Immunoblot

Die Membran wurde dreimal in je 15ml Waschpuffer gewaschen und DNA mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit dem Horse raddish Peroxidase Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3mal mit je 15ml Waschpuffer gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten in der Dunkelkammer. Zur Entwicklung fand eine frisch zubereitete Entwicklerlösung (ECL Entwicklerlösungen von Ashersham Pharmacia Biotech) Verwendung. Die Proteinseite wurde vollständig bedeckt und für eine Minute inkubiert. Die Membran wurde mit einer Pinzette aufgenommen, die Lösung vollständig entfernt und danach luftblasenfrei auf Haushaltsfolie gelegt und durch zügiges Platzieren der Membran mit der Proteinseite nach oben in der Filmkassette eingebracht. Nach Löschen des Lichtes wurde der Film sorgfältig auf die Membran gelegt und die Kassette für 15 Sekunden geschlossen. Der erste Film wurde entfernt und ein zweiter eingelegt. Nach Entwicklung des ersten Films wurde je nach Ergebnis die Expositionszeit für den zweiten Film festgelegt.

3.11 Immunpräzipitation

Zur Aufreinigung des Zelllysates wurden je Ansatz 20µl Protein-A-Agarose-Kügelchen verwendet. Das Blocken erfolgte mit 0,5% BSA in RIPA-Puffer. Nach einmaligem Waschen mit 1ml RIPA-Puffer wurde in jeden Ansatz 0,5ml Zelllysate und 1µl Antikörper gegeben. Es folgte die Inkubation für zwei Stunden bei 4°C auf dem Rotationsrad. Nach Verwerfen des Überstandes schloss sich ein Waschgang mit RIPA-Puffer an. Abschließend wurde der Überstand möglichst vollständig mit einer Hamiltonspritze entfernt. Pro Ansatz erfolgte die Hinzugabe von 50µl Probenpuffer und das Kochen aller Proben für 3min bei 94°C. Nach einer Minute auf Eis wurden die Ansätze für 10min bei 13.000 Upm zentrifugiert und danach mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

3.12 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA mit sequenzspezifischen Primern erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

Diese verläuft in drei Schritten. Nach Denaturierung der Ziel-DNA durch Erhitzen werden Primer an beide DNA-Einzelstränge hybridisiert und die Ablesezone markiert (Annealing). Anschließend erfolgt die Synthese und Zusammenlagerung der Einzelstränge zu Doppelsträngen durch die DNA-Polymerase. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase laufen alle Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz ab.

Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der Angabe des Primer-Herstellers.

Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1µl DNA 100ng/µl

1µl je Primer

1µl dNTP Mix 100 mM

1µl Taq-Polymerase 5U/µl

5µl 10x PCR-Puffer

40µl MilliQ-Wasser

Die PCR-Bedingungen: Denaturieren: 1. 30 Sekunden 94°C

2. 15 Sekunden 92°C

Annealing: 3. 30 Sekunden x°C

Extension: 4. 1 Minute 68-72°C, 39x zurück zu 2.

Kühlung: 5. 4°C

Der Erfolg einer PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.13 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurden Agarosegele von 1-1,5% Agarose in TBE-Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 0,2 Vol. 6x DNA-Probenpuffer (1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 40% Glyce-

rin) versetzt, zusammen mit einem DNA-Längenstandard (1kb „Plus“-DNA-Ladder, Invitrogen) aufgetragen und die Elektrophorese bei 90 V in TBE-Puffer durchgeführt.

3.14 Vektorklonierung

PCR-Fragmente wurden mit dem TOPO-TA-Kloning KIT direkt nach Angaben des Herstellers in die entsprechenden Vektoren kloniert. Die verwendeten Vektoren dieses Systems besitzen einen einzelnen 3'-T-Überhang, an den eine DNA-Topoisomerase-I gebunden ist. Die PCR Produkte enthalten ein einzelnes Adenin am 3'-Ende durch die nicht-Vorlagen-abhängige terminale Transferaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase. Bei Bindung wird die Topoisomerase freigesetzt und das Plasmid in den Vektor ligiert.

3.15 Restriktionsanalysen

Die Behandlung der DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den vom Enzymhersteller angegebenen Bedingungen. Die Analyse der Vektorinserte erfolgte im Doppelverdau. Die Restriktionsansätze von je 20µl wurden zwei Stunden bei 37°C inkubiert. 10µl wurden verworfen und der Verdau durch Zusatz von Orange G gestoppt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Agarosegelelektrophorese.

3.16 Transfektion mit Adenoviren

Die transfizierten Kardiomyozyten wurden von Marlies Grieben und Ludger Hauck der Gruppe Harsdorf des Max Delbrück Zentrums Berlin Buch zur Verfügung gestellt.

3.17 Erzeugung von Punktmutationen

Für die Produktion der Mutanten p27.T187A und dn.PKCβ2 (T500V) fand das GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System nach Angaben des Herstellers Verwendung. Folgende Primer kamen zum Einsatz:

p27.T187A 5'-GCCGGTTCTGTGGAGCAG(A/G)CGCCCAAGAAGCCTGGCCTC-3'

T500V 5'-CACCGGAACCACAAATTCACCGCCCGAAGGCGGTGAATTTGTGGTT-3'

3.18 Isolation der primären Rattenherzmuskelzellen

Neonatalen vier Tage alten Wistar-Ratten wurde der Kopf abgetrennt und nach Längsinzision des Brustkorbes mit einer Pinzette das Herz entfernt und in PBS gespült. Nach mechanischer Zerkleinerung erfolgte die Trypsinierung mit Verdauungspuffer. Danach wurden die Zellen zunächst für zwei Stunden in 10% FKS ausplattiert. Übernacht erfolgte die Kultivierung in 10% Pferdeserum, für weitere 24h mit 5% Pferdeserum und danach für nochmals 24h in 0% Pferdeserum. Um den Anteil nichtkardialer Zellen gering zu halten, wurde das Nährmedium für 48h mit 10µl /L Cytosin Arabisonid angereichert. Die Kulturen enthielten zwischen drei und acht Prozent nicht kardiale Zellen. Den Nachweis wurde routinemäßig mit monoklonalen Antikörpern gegen schwere Myosin-Ketten durch indirekte Immunfluoreszenz geführt. Die verwendeten Kulturschalen wurden mit 10% Kollagen R beschichtet. Für die Zellkultur betrug die Aussaatdichte $1,0 \times 10^5$, für die Immunhistochemie $5,0 \times 10^4$.

3.18.1 Passagieren

Für 4 Kulturflaschen mit U2OS Zellen und Kardiomyozyten.

Nach Ausschluss einer Kontamination (klarer Überstand) der Zellkulturflaschen wurden die Deckel und Ränder von drei 50ml Falconröhrchen abgeflammt. Aus zwei Zellkulturflaschen wurde das Medium in ein Falconröhrchen abgenommen, der Rest verworfen. Nach Entfernen des restlichen Mediums mit einer abgeflamten Pasteurpipette erfolgte die Gabe von 15ml PBS in jede Flasche, was wieder absaugt wurde. In jede Flasche wurden 2ml Trypsin mittig pipettiert und nach Schwenken für drei Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Stellte sich bei der Sichtkontrolle heraus, dass alle Zellen vom Flaschenboden gelöst waren, konnte das Trypsin mit je 10ml „altem“ Medium gestoppt werden. Die Zellsuspension aus allen vier Flaschen wurde nun mit einer 10ml Pipette in ein Falconröhrchen gepoolt und durch dreimaliges Auf-und Abpipettieren gemischt. Abschließend erfolgte die Aufteilung der Zellsuspension auf zwei Falconröhrchen, eines für die Transfektion und eines für die Erhaltung der Kultur. Beide wurden anschließend für drei Minuten bei 12.000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Transfektionsansatz wurde mit 12ml frischem Medium resuspendiert. Nach Zugabe von nochmals 30ml Medium konnte die Suspension auf 14 Kulturplatten mit 6cm Durchmesser, also je Platte 3ml, verteilt werden. In vier neue Kulturflaschen kamen je 20ml frisches Medium und je 2ml aus dem zweiten Falconröhrchen. Die Flaschen und Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt.

3.18.2 Herstellung der Zellextrakte

Die Zellen wurden in einen Puffer aus 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 5.0 mM EDTA, 5.0 mM DTT, 1.0 µg/ml Leupeptin, 2.0 µg/ml Aprotinin, 5.0 mM NaF und 0.1 mM Na₃VO₄ für 30 min auf Eis gelöst und dreimalig für fünf Sekunden mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Zellextrakte für 30 min bei 18.000g und 4°C zentrifugiert und bei -80°C aufbewahrt.

4 Materialien

4.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von den Firmen Sigma oder Merck bezogen und entsprachen sämtlich der Reinheitsnorm „zur Analyse“.

[γ - ³² P]-ATP	NEN
Acrylamid	BIO-RAD
Agarose	Biozym
APS Ammoniumperoxodiulfat	Merck
Bacto-Agar	DIFCO
Bromphenolblau	Roth
DFX	Calbiochem
DMSO	Tianjin Norland Biotech
DNEM/F12	Dulbecco
Fettfreie Trockenmilch	Oxoid, Wesel
L-[³⁵ S]-Methionin	NEN
Lithium Acetat	Roth, Karlsruhe
Methionin-freies Medium	Gibco
N ^o N ^o -Bis-methylen-acrylamid	BIO-RAD
NP40	Roche Molecular Biochemicals
PEG 4000	Roth
Penicillin/Streptomycin Mix	Gibco
Pepton	DIFCO
TEMED	Roth
Thrombin	GE Healthcare

Trizon	Gibco
Trypton	DIFCO
Tween 20	Gibco
X-Gal	Roche Molecular Biochemicals
Yeast Base	DIFCO
Yeast Extrakt	DIFCO
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

4.2 Filter und Trägermaterialien

ECL Hyperfilm	Amersham
Filterpapier	Whatman
Gluthation Sepharose Kügelchen	Pharmingen
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S85	Schleicher und Schüll
Protein A Agarose Kügelchen	Roche Molecular Biochemicals

4.3 Geräte

Agarosegelkammern	BioRad
Hamiltonspritze	Duratec
Kulturschalen, Glaskolben, Glasbehälter	Verschiedene Hersteller
PCR Thermocycler	Eppendorf
Phosphorimager	Fuji
Pipetten	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15ml und 0,5ml	Eppendorf
Röhrchen 10ml, 20ml, 50ml	Falcon
Schüttelbad	Bellco Biotechnology
Sequenzer	Abi prism
Sonicater	IUL S4000

Vakuumgeltrockner	Savant stacked gel dryer SGD 300
Vortex	Heidolph Reax 2000
Zentrifugen	Heraeus, Eppendorf, IEC MicroMax
pH-Meter	Knick
Magnetrührer	Heidolph
Photometer	Pharmacia Biotech
Warmluftschüttler	Infors HT
Zellkulturschalen	Gibco
Petrischalen	Peske Medizintechnik
Präzisionswaage	Sartorius
Drehrad	Herolab
Brutschränke	Memmert
Tiefkühlschränke	Forma Scientific
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf

4.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Adeasy™ Adenoviral Vector System	Stratagene
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Abi Prism
Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce
ECL Western blotting analysis system	Amersham
Eucaryotic TOPO TA Cloning KIT	Invitrogen
GeneEditor <i>in-vitro</i> -Site-Directed Mutagenesis System	Promega
Matchmaker Two-Hybrid-System	Clontech
Multiprime DNA Labeling System	Pharmacia
pTrcHis2 TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

Qiaprep Spin Miniprep Kit

Qiagen

TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems

Promega

4.5 cDNA-Bibliothek

Human Heart MATCHMAKER cDNA Library, CAT.#: HL4013AB, LOT#: 51034

Klonierungsvektor: pGAD10, Klonierungsenzym: *EcoR* I

mRNA Quelle: normal, ganze Herzen gepoolt von sieben männlichen/ weiblichen Kaukasiern, zwischen 14 und 60 Jahre alt, Todesursache: Trauma.

Anzahl unabhängiger Klone: $3,0 \times 10^6$

durchschnittliche Größe der Inserts: 1,7 kb, Insertgröße von-bis: 0,4-5,0 kb

4.6 Vektoren

pGEX1λT

Abi Prism

pGAD10

Clontech

pAS2-1

Clontech

pTrcHis2-TOPO

Invitrogen

pcDNA3.1/V5/His-TOPO

Invitrogen

4.7 Bakterienstämme

Escherichia coli BL21

Pharmacia

Escherichia coli DH5α

Gibco

Escherichia coli HB101, *leuB*

BioRad

Escherichia coli TOP10

Invitrogen

4.8 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae Y190 von Clontech

MATa,ura3-52,his3-200,lys2-801,ade2-101,trp1-901,leu2-3,112,gal4Δ,gal80Δ,cyh^f2,
LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3,URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

4.9 Tiere

Für die durchgeführten Arbeiten lag eine Tötungsanzeige bei der zuständigen Behörde vor. Die Tiere wurden von der Tierzuchtstelle Schönwalde geliefert. Es handelte sich ausschließlich um Wistar-Ratten.

4.10 Enzyme

Restriktionsenzyme	NEB
DNase I	Roche Molecular Biochemicals
Trypsin	Biochrom KG
Kollagenase II	Invitrogen

4.11 Lösungen und Medien

Alle nachfolgenden Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das einer Milli-Q-Anlage von Millipore mit nachgeschaltetem Pyrogenfilter entnommen wurde.

4.11.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

10x Dropout Lösung

Von den L-Aminosäuren wurden je 300mg/l Isoleucin, 1500 mg/l Valin, 200mg/l Adenin hemisulfatiertes Salz, 200mg/l Arginin HCL, 300 Lysin HCL, 200mg/l Methionin, 500mg/l Phenylalanin mit H₂O auf 1000ml aufgefüllt, dann autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

1x TE/LiAc Lösung

Wurde vor Verwendung immer frisch durch Verdünnung aus 10 x Stämmen hergestellt.

10 mg/ml Hering Sperma Transporter DNA

20 min vor Verwendung in den Heizblock bei 94 °C, DNA sofort auf Eis.

PEG/LiAc Lösung

Für 10 ml erfolgte die Zugabe von je 1ml 10xTE und 10xLiAc zu 8ml 50%iger PEG 4000-Lösung.

10x TE Puffer

Für den Puffer wurden 0,1M Tris-HCl und 10mM EDTA angesetzt und auf einen pH=7,5 eingestellt und autoklaviert.

10x LiAc

Die Lösung mit 1M Lithiumacetat wurde mit verdünnter Essigsäure auf einen pH von 7,5 eingestellt und autoklaviert.

Z-Puffer

16,1g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,75g/l KCl und 0,246g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ wurden mit 800ml H_2O aufgefüllt, der pH auf 7,0 eingestellt und dann auf 1000ml aufgefüllt. Nach anschließendem Autoklavieren erfolgte die Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

X-GAL Stammlösung

X-GAL in DMF aufgelöst zu einer Konzentration von 20mg/ml.

Z-Puffer/X-GAL Lösung

Zu 100ml Z-Puffer wurden 0,27ml β -ME und 1,67ml X-GAL zugegeben.

Hefezellenlysisierungslösung

Zu H_2O wurden TritonX 100 zu 1%, SDS zu 2%, NaCl zu 100mM und Tris zu 10mM hinzugegeben. Anschließend erfolgte bei pH 8,0 die Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 1,0mM.

Phenol :Chloroform:Isoamylalkohol

Wurden im Verhältnis 25:24:1 mit neutralisiertem Phenol und einem pH von 7,0 zubereitet, siehe auch Sambrook *et al.* 1989.

YPD-Medium

20g/l Difco Pepton, 10g/l Yeast Extrakt, 15g/l Agar (nur für Platten) wurden mit Wasser auf 950ml aufgefüllt und der pH auf 5,8 eingestellt. Nach 20 minütigem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C erfolgte die Zugabe von 50ml einer sterilen 40% Glucoselösung.

SD-Medium

6,7g/l Difco yeast base ohne Aminosäuren und 15g/l Agar (nur für Platten) wurden mit Wasser auf 850ml aufgefüllt und der pH auf 5.8 eingestellt. Nach 20 minütigem Autoklavieren und Ab-

kühlen auf 55°C erfolgte die Zugabe von 100ml 10x Dropout Lösung, 50ml 40%Glucoselösung, 0,5ml Ampicillin (100mg/ml), 1,0ml Tetrazyklin (5mg/ml) und 25ml 3-AT.

LB-Medium

10g/l Bacto-trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt und 5g/l NaCl wurden auf 1000ml H₂O aufgefüllt, der pH mit 5N NaOH auf 7,0 eingestellt und autoklaviert. Für Platten wurden 15g Bacto-Agar pro Liter hinzugegeben, nochmals autoklaviert und nach Abkühlen auf 50°C 50µl/ml Ampicillin hinzugefügt.

M9 Minimal-Medium

Ein Liter wurde M9 Medium autoklaviert und nach Abkühlen auf 50°C 4ml Prolin 10mg/ml, 1ml Ampicillin 50mg/ml und 1ml 1M Thiamin- HCl hinzugegeben. Für festes Medium erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 20g Bacto-Agar pro Liter.

5x M9 Medium

37,6g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 15g KH₂PO₄, 5g NH₄Cl und 2,5g NaCl wurden mit H₂O auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert.

Agar-Medium

Zu 15g Agar wurden 700ml H₂O hinzugegeben, mit dem Rührfisch aufgelöst und anschließend autoklaviert.

HB101 Selektiv-Medium

200ml 5x M9 Medium und 700ml Agarmedium und 100ml 10x SD -Leu wurden mit 1ml MgSO₄ x 7H₂O einer 1molaren Lösung, 2,5ml von 40%iger D-Glucoselösung, 500µl einer 1%igen Lösung von Thiamin B1, 1ml einer 40mg/ml L-Prolin Lösung und 1,0ml Ampicillin versetzt.

4.11.2 GST-Fusions-Assay

NETN Puffer

Für 0,5l erfolgte das Lösen von 1,211g TRIS (20mM), 0,1461g EDTA (1mM), 4,27g NaCl (100mM) in 0,5l Wasser und die Zugabe von 2,5ml NP40 (0,5%). Anschließend wurde der pH auf 8,0 eingestellt.

4.11.3 SDS-PAGE

Alle Lösungen nach Laemmli.

Acrylamid/Bis-Lösung

146g Acrylamid und 4g N'N'-Bis-methylen-acrylamid wurden auf 500ml mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Nach Filtration bei 4°C für maximal 30 Tage erfolgte die Aufbewahrung unter Lichtabschluss.

Trenngelpuffer (1,5M Tris-HCL, pH 8,8)

54,45g Trisbase wurden mit 150ml Aqua dest. aufgefüllt und mit HCL der pH eingestellt. Danach wurde der Ansatz auf 300ml mit H₂O aufgefüllt.

Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCL, pH6,8)

6g Trisbase wurden mit 60ml H₂O aufgefüllt, der pH mit HCL eingestellt und auf 100ml aufgefüllt.

10% SDS

10g SDS wurde mit Rührfisch in 100ml H₂O aufgelöst.

Probenpuffer

3,8ml H₂O, 1,0ml 0,5M Tris-HCL, 0,80ml Glycerol, 1,6ml 10% SDS, 0,4ml β-Mercaptoethanol und 0,4ml Bromophenolblau 0,05% ergaben eine Stammlösung von 8ml. Jede Probe wurde mindestens im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95°C für vier Minuten erhitzt.

5x Elektrodenpuffer, pH8,3

Für einen Liter Puffer wurden 15g Trisbase, 72g Glycin und 5g SDS in destilliertem Wasser aufgelöst und bei 4°C aufbewahrt. Für eine Elektrophorese wurden 300ml der Stammlösung mit 1200ml destilliertem Wasser verdünnt.

Polyacrylamidgele

Zuerst wurde die Lösung für das Trenngel angesetzt, bis ca 1,5cm unterhalb des Randes zwischen die Glasplatten gegossen und mit 1ml destilliertem Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Wasser abgegossen und die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Anschließend erfolgte das Einsetzen des Kammes möglichst unter Blasenfreiheit.

Nach Auspolymerisation wurde der Kamm entfernt. Jede Geltasche fasste 25µl Volumen. Die Elektrophorese erfolgte bis die blaue Lauffront den Unterrand des Geles erreicht hatte.

Angaben für die Zusammensetzung des Sammelgels nach Laemmli:

12,2ml Aqua dest. 5,0ml Sammelgelpuffer, 0,2ml SDS 10% und 2,6ml Acrylamid/Bis-Lösung wurden vermischt und eine Minute vor dem Giessen mit 100µl APS (Ammoniumperoxodisulfat, täglich frisch zubereitet) und 20µl TEMED (Tetramethylethylen-diamin) induziert.

Angaben für die Zusammensetzung des Trenngels nach Laemmli:

	7,5%	10%	12%	15%	20%
Aqua dest.	48,5ml	40,0ml	33,5ml	23,5ml	6,5ml
Trenngelpuffer	25,0ml	25,0ml	25,0ml	25,0ml	25,0ml
SDS 10%	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Acrylamid/Bis-Lösung	25,0ml	33,5ml	40,0ml	50,0ml	67ml

Die angegebenen Materialien wurden vermischt und eine Minute vor dem Giessen mit 500µl APS und 50µl TEMED induziert.

4.11.4 Westernblot

Transferpuffer

2,93g Glycin, 5,81g Tris Base, 0,375g SDS und 200ml Methanol wurden mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt.

4.11.5 Immunoblot

Blockpuffer

Für 150ml Puffer wurde 15ml 10x TBS zu 135ml destilliertem Wasser gegeben, mit 7,5g Milchpulver gut vermischt und anschließend 20µl Tween-20 (100%) beigegeben.

Waschpuffer

Für 150ml Puffer wurden 15ml 10xTBS und 20µl Tween-20 (100%) vermischt.

10xTBS

24,2g Tris Base und 80g NaCl wurden mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt und mit 1 molarer HCl der pH auf 7,6 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

4.11.6 Isolation der Primären Ratten Herzmuskelzellen

PBS, pH 7,4

0,15g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,06g KH_2PO_4 , 7,00g NaCl , 0,34g KCl und 2,10g NaHCO_3 wurden mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt, autoklaviert und danach 2,5ml einer 2molaren Glucose hinzugegeben.

Verdauungspuffer

20ml 1molarer HEPES-Puffer, 65ml 2molares NaCl , 3ml 1molares KCl und 10ml einer 100mmolaren Lösung von NaH_2PO_4 wurden mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert. Vor der Benutzung wurden auf 50ml, 100 μl 2molare Glucoselösung, 3,0ml Trypsin(2,5%w/v) und 75 μl DNaseA (10mg/ml) hinzugegeben.

Kardiomyozytenmedium

Zu 500ml DNEM7F12 wurden 5ml Penicillin/Streptomycin-Mix, 5ml L-Glutamin, 15ml einer 100mmolaren Natriumpyruvat-Lösung, 0,5ml einer 100mmolaren Ascorbatlösung, je 1,0ml Transferrin, Insulin, Selenit-Mixture und 2,8ml von 35%tigem BSA gegeben. Je nach Versuch wurden Pferdeserum oder fetales Kälberserum (FKS) nach Bedarf hinzugegeben.

4.11.7 Kinaseassay

Kinasepuffer

50mM KCl , 8mM MgCl_2 , 1mM DTT, 3mM ATP, 50mM HEPES wurden mit Wasser vermischt zu einem pH von 7,4.

4.11.8 Immunpräzipitation

Radio-Immuno-Präzipitations-Assay-Puffer (RIPA)

12,8g NaCl , 0,6g Na_2PO_4 , 0,29g EDTA, 5ml 0,1%SDS und 5ml 1%NP40 wurden mit destilliertem Wasser auf 500ml aufgefüllt und vor Gebrauch 1mM DTT, 50mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 1mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin und 5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin hinzugegeben.

4.11.9 Proteinsynthese

500 Ci von L-[^{35}S] Methionin/ml (1000Cmmol-1) wurden in methioninfreiem Medium von Gibco aufgelöst.

4.11.10 Polymerasekettenreaktion

10x PCR-Puffer: 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH=8,3

dNTP-Gemisch: je 100µl 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 1ml H₂O.

4.12 Antikörper

Spezifität	Klon	Spezies	Hersteller
Anti-HA	Y-11	Kaninchen	SantaCruz
pRb	C-15	Kaninchen	Santa Cruz
p16 ^{ink4}	C-20	Kaninchen	Santa Cruz
p21 ^{waf1}	C-19	Kaninchen	Santa Cruz
p27 ^{kip1}	C-19	Kaninchen	Santa Cruz
cdk3	Y-20	Kaninchen	Santa Cruz
cdk2	M2	Kaninchen	Santa Cruz
PKCα	C20	Kaninchen	Santa Cruz
PKCβ2	C18	Kaninchen	Santa Cruz
PKCε	C15	Kaninchen	Santa Cruz
Rack1	poly	Kaninchen	Santa Cruz
HRP		Kaninchen, Maus, Ziege, Esel	Amersham, NEB
p27.Pi-T187	poly	Kaninchen	Santa Cruz

4.13 Primer

Alle Primer wurden selbst designt und von der Bio TeZ Berlin Buch synthetisiert und geliefert.

3'p27m1-18	5'-ACG GCA AGA CAC CTC GTC-3'
3'p27m1-86	5'-CTC GGG CAA GCT GCC CTT CTC C-3'
3'p27m1-102	5'-GGT TTC CAC GGA CGT TCC ACG GC-3'

3'p27m1-151		5'-CGC CTC GTT ACG CGT CCT TAT-3'
3'p27m1-186		5'-CTG CTC CAC ATA ACC GGC-3'
5'p27m87-199		5'-TGC CTG CAA GGT GCC GGC G-3'
5'p27m27-199		5'-GGC CTG CAG GAA ACC TCT TCG GCC C-3'
5'RACK1		5'-ATG ACT GAG CAG ATG ACC C-3'
3'RACK1		5'-CGC ACA CGG TTA CCA CTG G-3'
3'RACKm1	(1-221)	5'-GAG ATC CCA TAA CAT GGC CTG-3'
3'RACKm5	(1-110)	5'-ACT CAG CAC ATC CTT GGT ATG C-3'
3'RACKm6	(1-200)	5'-GAC AGT CAC CGT GTT CAG ATA GC-3'
5'RACKm2	(94-317)	5'-ACG GGC ACC ACC ACG AGG CGA-3'
5'RACKm3	(201-317)	5'-ATG TCT CCA GAT GGA TCC CTC-3'
5'RACKm4	(111-317)	5'-TGT GGC CTT CTC CTC GAC AAC C-3'
3'PKCβ2	(1-673)	5'-TTT TCA AGC ATT TCG CCC ACA AGC-3'
5'PKCβ2	(1-673)	5'-CAG AGC CGG CGC AGG GGA AGC-3'
3'PKCβ2	(1-490)	5'-AAT ACA GCA TGG GGC TCC-3'
3'PKCβ2	(1-370)	5'-ACA GTG TTG GTC TTT TCT TCC-3'
5'PKCβ2	(500-673)	5'-GTT CTT CTT ACA GAG TAA GGG-3'
5'PKCβ2	(600-673)	5'-GGA ACA CAA CGT AGC CAC CC-3'
3'PKCβ2	(600-630)	5'-CCC AGA CGT TTG CCT GGG-3'
PKCε5'		5'-ATG GTA GTG TTC AAT GGC C-3'
PKCε3'		5'-GGG CAT CAG GTC TTC ACC AAA GTA GG-3'

5 Ergebnisse

5.1 Normoxie

5.1.1 Interaktion von p27^{KIP1} mit PKC und RACK1

5.1.1.1 p27^{KIP1} interagiert mit RACK1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Wie schon erwähnt spielt das Protein p27^{KIP1} in vielen Zellen eine Rolle in der Regulation des Zellzyklusstopps. Die, in diesem Zusammenhang bekannten Interaktionspartner, sind jedoch in adulten Kardiomyozyten herunterreguliert. Zur Identifizierung von Proteinen, die mit p27^{KIP1} in Kardiomyozyten interagieren, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Zur Konstruktion des Köders wurde Wildtyp p27^{KIP1} in die Gal4-DNA-BD des Vektors pas2-1 fusioniert.

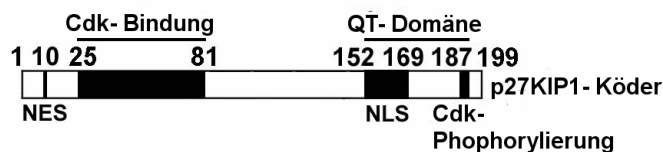


Abbildung 5-1. Schematische Darstellung des p27^{KIP1}-Köder-Proteins:
Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz mit bekannten Interaktionsdomänen; Abk.: NES-nucleäre Exportsequenz; NLS-nucleäre Lokalisationssequenz

Bei der Durchmusterung einer adulten humanen Herzdatenbank wuchsen $3,9 \times 10^6$ Transformanten. Mit diesen Kolonien wurde der β -Galaktosidase-Test durchgeführt. Hier zeigten sich durch Blaufärbung innerhalb zweier Screens insgesamt 295 positive Klone. Alle positiven Klone wurden erneut gepickt und auf eine Platte vereinzelt. Anschließend wurde nochmals das Filterliftverfahren angewandt. 57 Klone wiesen im ersten und zweiten Galaktosidasetest eine mittlere oder starke Blaufärbung auf. 39 Klone färbten sich zunächst schwach blau, aber nach Vereinzlung stark an. Weitere 38 Klone zeigten nach anfänglich nur bläulichem Schimmer nach der Vereinzlung eine starke Blaufärbung. Das normale Beobachtungsintervall für die Anfärbung der Kolonien betrug 0,5 bis 3h. 28 Klone zeigten erst nach 24h im ersten oder zweiten Test eine leichte Blaufärbung. Klone, die im ersten Galaktosidasetest leicht gefärbt waren und im zweiten überhaupt nicht, wurden verworfen. Die 162 positiven Klone wurden zur Auslösung der Segregation der pAS2-1-Köder-Plasmide auf Cycloheximid-Medium kultiviert. Es blieben 93 Klone

übrig, die aus den Hefezellen wie beschrieben isoliert und dann in E.coli HB101/Leu-transformiert wurden. Aus 71 Klonen, die auf Leucinmangelmedium wuchsen, wurden die Plasmide extrahiert und der Restriktionsanalyse unterzogen. Danach verblieben 53 Klone für die Sequenzierung. Nach Aufreinigung der DNA und Sequenzanalyse wurden die Ergebnisse mit dem Programm BLAST auf Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen in verschiedenen Gendatenbanken untersucht. Einer dieser Klone zeigte in der Blastsuche eine 90%ige Sequenzidentität mit RACK1, einem Homolog zur β -Untereinheit des G-Proteins von Rezeptoren und spezifischer Interaktionspartner von aktivierter PKC β 2. Es handelte sich um die carboxyterminalen Aminosäuren 139-317 des Proteins RACK1.



Abbildung 5-2. Schematische Darstellung des RACK1-Beuteproteins:

Schematische Darstellung des carboxyterminalen Anteils des RACK1-Proteins in einem positiven Klon der mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführten Durchmusterung einer kardialen Gendatenbank mit p27^{KIP1} als Köder.



Abbildung 5-3. Schematische Darstellung des Wildtypproteins von RACK1:

Schematische Darstellung des Wildtypproteins RACK1 mit den WD-40 Wiederholungen.

In einem β -Gal-Liquid-Assay konnte die Spezifität der Bindung zwischen p27^{KIP1} und RACK1 nach Kotransformation von Hefezellen mit Gal4-AD-RACK1 und Gal4-BD-p27^{KIP1} Plasmiden bestätigt werden. Zur Einschätzung der Bindungsstärke zwischen p27^{KIP1} und RACK1 wurde vergleichend die Bindungsstärke der bekannten Interaktion von Wildtyp-p53 und SV40-T-large-Antigen bestimmt.

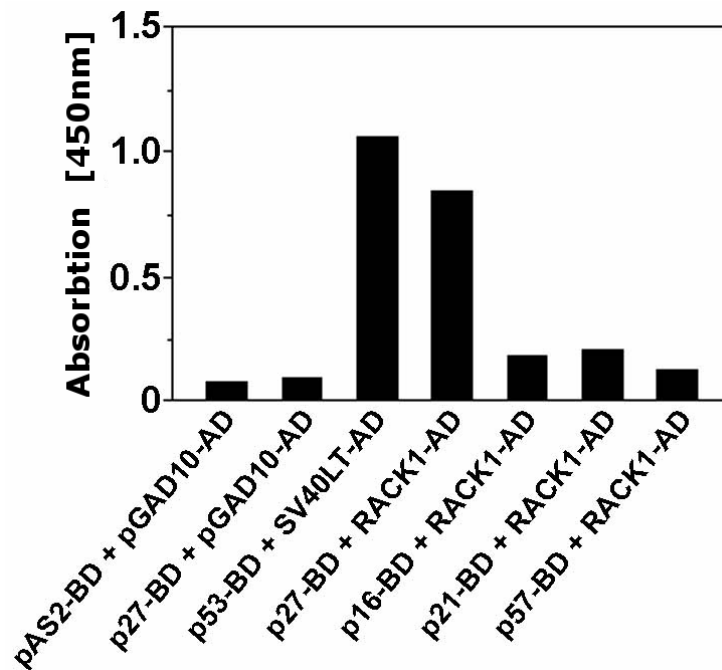


Abbildung 5-4. Spezifität und Stärke der Bindung zwischen p27^{KIP1} und RACK1:

Durch Interaktion zwischen p27^{KIP1} und RACK1 entsteht in den Hefezellen ein GAL4-Aktivator, der zur Expression von β -Galaktosidase im Hefe-Zwei-Hybrid-System führt. Die im β -Galaktose-Flüssigkeits-Assay erreichte Gelbfärbung wurde über Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450nm quantifiziert. Balken 1 und 2: Ausschluss der Selbstaktivierung durch die eingesetzten Vektoren und p27^{KIP1}; Balken 3: Positivkontrolle; Balken 4: p27^{KIP1} und RACK1 Interaktion; Balken 5, 6 und 7: keine Interaktion zwischen RACK1 und p16^{INK4}, p21^{WAF1} oder p57^{KIP2}.

Im Gegensatz dazu waren die CKIs p16^{INK4}, p21^{WAF1} und p57^{KIP2} nicht in der Lage mit RACK1 die Transkription des β -Gal-Promotors auszulösen. Sie erreichten im Flüssigkeits-Test Absorptionswerte unter 0,1. Daraus lässt sich schließen, dass RACK1 nicht mit p16^{INK4}, p21^{WAF1} oder p57^{KIP2} interagiert.

5.1.1.2 *In-vitro*-Assoziation von p27^{KIP1} und RACK1

Die Überprüfung der Spezifität der Bindung zwischen RACK1 und Wildtyp p27^{KIP1} erfolgte mittels eines GST-Bindungs-Assays. RACK1 und *in-vitro*-translatiertes p27^{KIP1} wurden zusammen inkubiert und nach Elution der Überstand mittels Westernblot mit p27^{KIP1}-Antikörpern untersucht. Wie in Abbildung 5-5, Bahn 3 zu erkennen, lässt sich Wildtyp p27^{KIP1} gebunden an RACK1 nachweisen. Gleiches zeigte sich im Umkehrversuch mit GST-markiertem Wildtyp p27^{KIP1} und HA-markiertem RACK1. Hier ließ sich, wie in Abbildung 5-6, Bahn 3 gezeigt, im Westernblot mit HA-Antikörpern RACK1 an p27^{KIP1} gebunden nachweisen.

5.1.1.3 Charakterisierung der Bindungsdomänen von p27^{KIP1} und RACK1

Zur Verifizierung der Bindungsstelle von RACK1 an p27^{KIP1} erfolgte die Herstellung sechs rekombinanter p27^{KIP1}-Mutanten mittels PCR, die unterschiedliche Regionen des gesamten Proteins trugen. Mit diesen wurde ebenfalls ein GST-Bindungs-Assay durchgeführt. Die Westernblotanalyse zeigte, dass nur wildtyp.p27, p27.27-199 und p27.87-199 gebunden an RACK1 ausgefällt werden konnten. Das deutet darauf hin, dass die Aminosäuren 186-199 die Interaktionsregion von p27^{KIP1} mit RACK1 bilden (Abbildung 5-5).

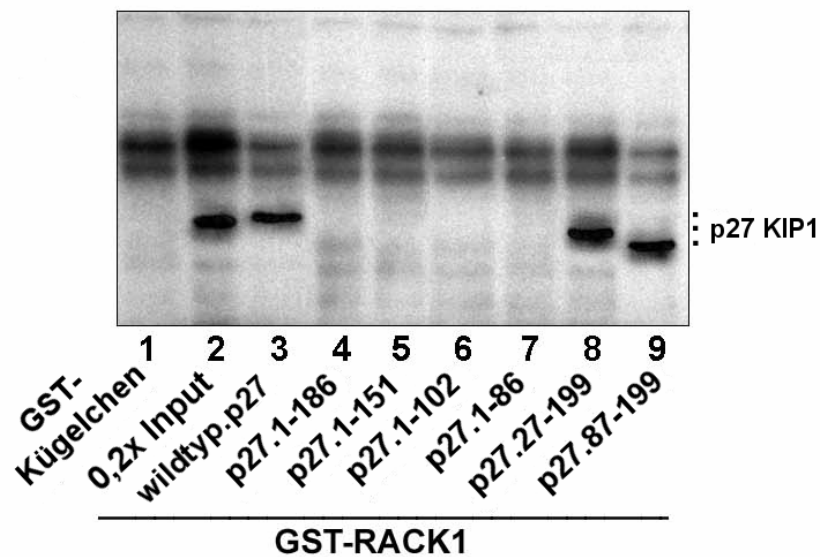


Abbildung 5-5. In-vitro-Verifizierung der Bindungsstelle für RACK1 an p27^{KIP1}:

Der Wildtyp von p27^{KIP1} und die sechs *in-vitro*-translatierten Mutanten wurden mit an GST-gebundenem RACK1 inkubiert und mit Westernblot unter Benutzung von anti-p27^{KIP1} nachgewiesen. Nur die Spalten 2,3,8 und 9 zeigen eine positive Interaktion.

In den darauffolgenden Experimenten sollte die Bindungsdomäne für p27^{KIP1} an RACK1 charakterisiert werden. Die Analyse erfolgte ebenfalls in einem GST-Bindungs-Assay mit Haemagglutinin (HA) markiertem Wildtyp von RACK1 und vier *in-vitro*-translatierten Mutanten. Wie in Abbildung 5-6 dargestellt, konnten wildtyp.RACK1, RACK1.111-317 und RACK1.201-317 mit anti-HA-Antikörpern an GST gebundenem wildtyp.p27^{KIP1} nachgewiesen werden. Die Eluate aus den Reaktionsansätzen mit den Mutanten RACK1.1-100 und RACK1.1-200 zeigten keine Antikörperbindung im Westernblot. Somit gingen diese Mutanten keine Proteinbindung mit wildtyp.p27^{KIP1} ein. Dies bedeutet, dass sich die zuständige Domäne für die Bindung von RACK1 an wildtyp.p27^{KIP1} innerhalb der carboxyterminalen Aminosäuren 201-317 von RACK1 befindet.

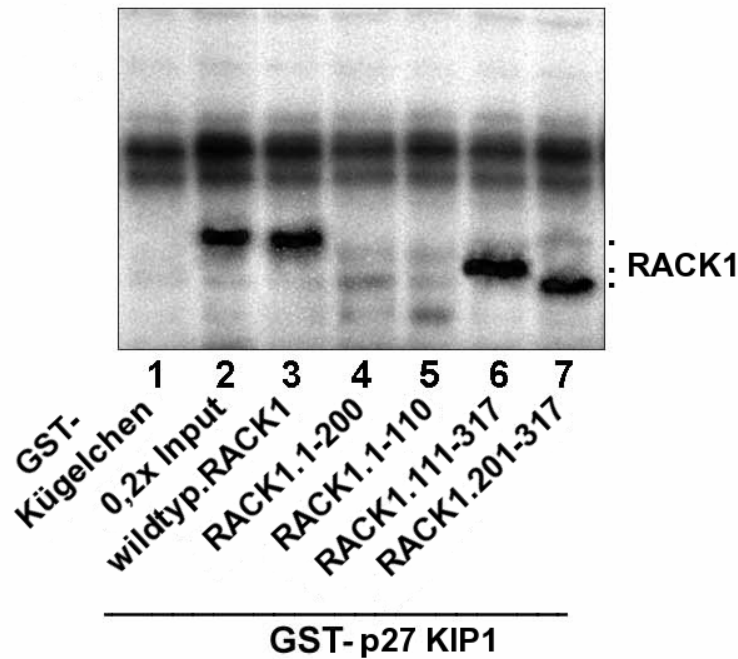


Abbildung 5-6. *In-vitro*-Verifizierung der Bindungsdomäne von p27^{KIP1} an RACK1: Wildtyp RACK1 und die vier *in-vitro*-translatierten Mutanten wurden mit Hämagglutinin markiert, mit GST-markiertem wildtyp.p27 inkubiert und durch Westernblot mit anti-HA-Antikörpern nachgewiesen. Nur die Spalten 2,3,6 und 7 zeigten eine positive Interaktion. Der die Bindungsstelle tragende Mutant ist in Spalte 7 zu sehen.

5.1.1.4 *In-vitro*-Assoziation von p27^{KIP1} und PKC β 2

RACK1 gehört zu den Rezeptoren für aktivierte Proteinkinasen C (PKC) und ist ein spezifisches Anker- und Translokationsprotein für PKC β 2 [68]. Somit stellte sich die Frage, ob p27^{KIP1} auch eine Bindung mit PKC β 2 eingehen kann, und ob diese mit der RACK1-Bindungsdomäne interferiert. Im GST-Bindungs-Assay ließ sich wildtyp.p27 an GST-gebundener PKC β 2 mittels Westernblot nachweisen (Abbildung 5-7, Bahn 3). Somit bindet wildtyp. p27^{KIP1} *in vitro* an PKC β 2. Im Umkehrexperiment bestätigte sich dieses Ergebnis (Abbildung 5-8, Bahn 3).

5.1.1.5 Charakterisierung der Bindungsdomänen von p27^{KIP1} und PKC β 2

Erneut erfolgte ein GST-Bindungs-Assay mit *in-vitro*-translatierten Mutanten von p27^{KIP1} und GST-markierter PKC β 2. Im durchgeführten Westernblotverfahren unter Einsatz von p27^{KIP1}-Antikörpern ließen sich nur Konstrukte, die die cdk-Bindungsdomäne enthalten, also p27.1-86. p27.1-151 und p27.1-102 an PKC β 2 gebunden nachweisen (Abbildung 5-7, Bahn 5-7) Konstrukte ohne intakte cdk2-Bindungsstelle, also p27.27-199 und p27.86-199 wurden nicht durch

PKC β 2 gebunden (Abbildung 5-7, Bahn 8, 9). Somit vermittelt die cdk-Bindungsdomäne von p27^{KIP1} auch die Bindung zu PKC β 2.

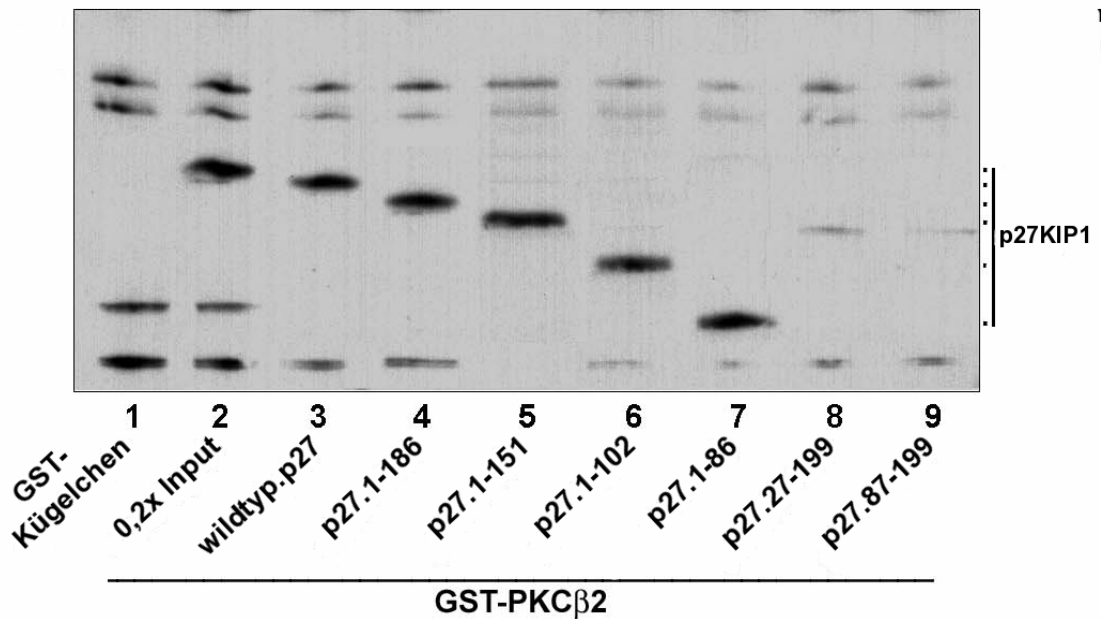


Abbildung 5-7. In-vitro-Verifizierung der Bindungsstelle von PKC β 2 an p27^{KIP1}:
An GST-gebundene PKC β 2 wurde mit wildtyp.p27 und den sechs *in-vitro*-translatierten Mutanten inkubiert und durch Westernblot mit anti-p27^{KIP1} nachgewiesen. Die Spalte sieben zeigt den kürzesten, Bindungsstelle tragenden Mutanten.

Gleichermaßen wurde die p27^{KIP1}-Bindungsstelle an PKC β 2 untersucht. Von fünf *in-vitro*-translatierten, gekürzten und geschnittenen Mutanten von PKC β 2 reagierte im GST-Bindungs-Assay nur wildtyp.PKC β 2, PKC β 2.500-673 und PKC β 2.600-673 mit an GST immobilisiertem wildtyp.p27^{KIP1} (Abbildung 5-8, Bahn 2, 6 und 7). Die Konstrukte PKC β 2.1-490, PKC β 2.1-370 und PKC β 2.600-630 gingen keine Bindung mit p27^{KIP1} ein (Abbildung 5-8, Bahn 4,5 und 8). Daraus folgt, dass die carboxyterminalen Aminosäuren 630-673 von PKC β 2 die Bindung an p27^{KIP1} ermöglichen.

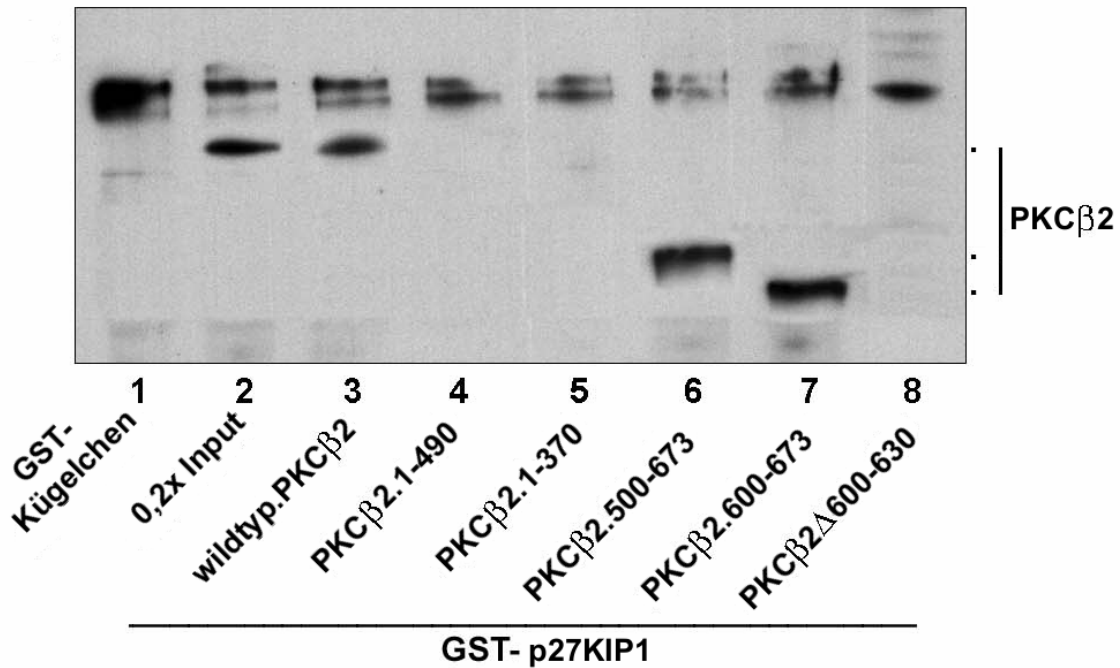


Abbildung 5-8. In-vitro-Verifizierung der Bindungsstelle von p27^{KIP1} an PKCβ2:

An GST-immobilisiertes wildtyp.p27^{KIP1} wurde mit wildtyp.PKCβ2 und den fünf *in-vitro*-translatierten Mutanten inkubiert und im Westernblot mit anti-PKCβ2-Antikörpern nachgewiesen. Die Spalte sieben zeigt den kürzesten, Bindungsstelle tragenden Mutanten.

5.1.1.6 Endogenes p27^{KIP1} und RACK1 sind assoziiert in Kardiomyozyten

Nach gelungenem Nachweis der *in-vitro*-Bindung von p27^{KIP1} und RACK1 stellte sich die Frage, ob beide Proteine in Kardiomyozyten *in vivo* einzeln oder aneinander gebunden vorliegen. Dazu wurden zelluläre Extrakte von isolierten neonatalen ventrikulären Rattenherzmuskelzellen wie in 3.18.2 beschrieben hergestellt. Diese wurden in einem Immunoblot nacheinander mit spezifischen Antikörpern für RACK1 und p27^{KIP1} und, zur Bestätigung der Spezifität, mit Antikörpern für p21^{WAF1} und p16^{INK4} coimmunopräzipitiert. Wie in Abb.5-7, Bahn 3, zu sehen, ließ sich p27^{KIP1} in der Westernblotanalyse mit p27^{KIP1}-Antikörpern in RACK1-Immunopräzipitaten nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten p21^{WAF1} (Bahn 2) und p16^{INK4} (Bahn1) nicht mit den jeweils spezifischen Antikörpern in den RACK1-Immunopräzipitaten detektiert werden. Dies bestärkt die Annahme, dass die Assoziation von p27^{KIP1} und RACK1 spezifisch ist.

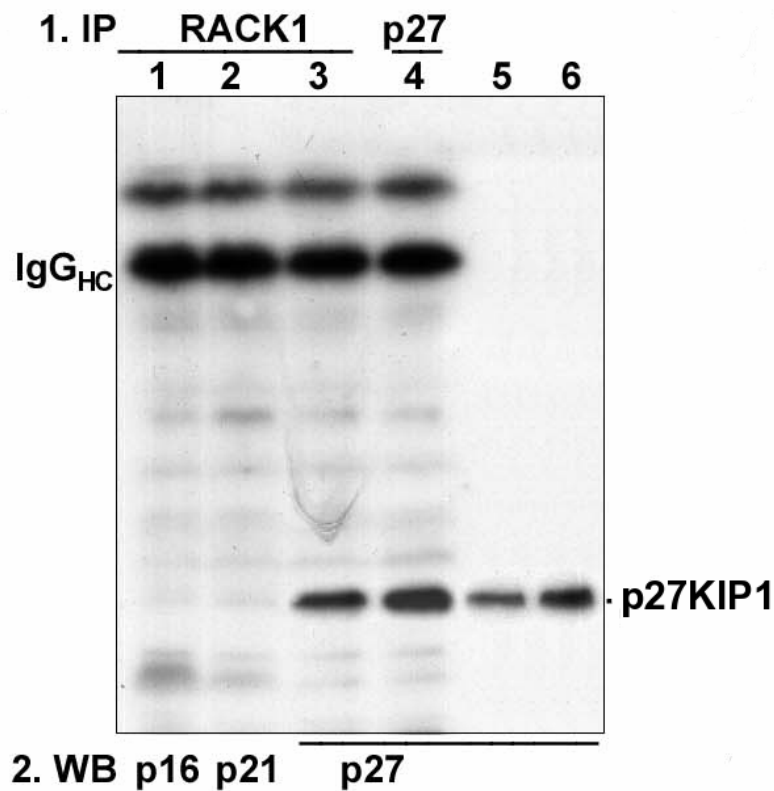


Abbildung 5-9. *In-vivo*-Assoziation von RACK1 und p27^{KIP1}:

Zellextrakte aus isolierten vier Tage alten Wistar-Rattenkardiomyozyten wurden mit RACK1-Antikörpern immunopräzipitiert und anschließend im Westernblotverfahren und Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für p27^{KIP1}, p16^{INK4} und p21^{WAF1} analysiert. Bahn 1,2: p21^{WAF1} und p16^{INK4} können in den RACK1-Immunopräzipitaten nicht nachgewiesen werden. Bahn 3: Nur p27^{KIP1}-Antikörper binden an RACK1-Immunopräzipitate. Bahn 4: p27^{KIP1}-Kontrolle. Bande IgG_{HC}: ungebundene Antikörper; IP-Immunopräzipitation; WB-Westernblot.

Die Assoziation von endogenem p27^{KIP1} und RACK1 konnte in dem Umkehrexperiment (Abbildung 5-10, Bahn 3) bestätigt werden. Auch hier zeigte sich die Assoziation als spezifisch, weil weder p16^{INK4} noch p21^{WAF1} in den Immunopräzipitaten mit p27^{KIP1} nachweisbar waren (Abbildung 5-10, Bahn 1 und 2).

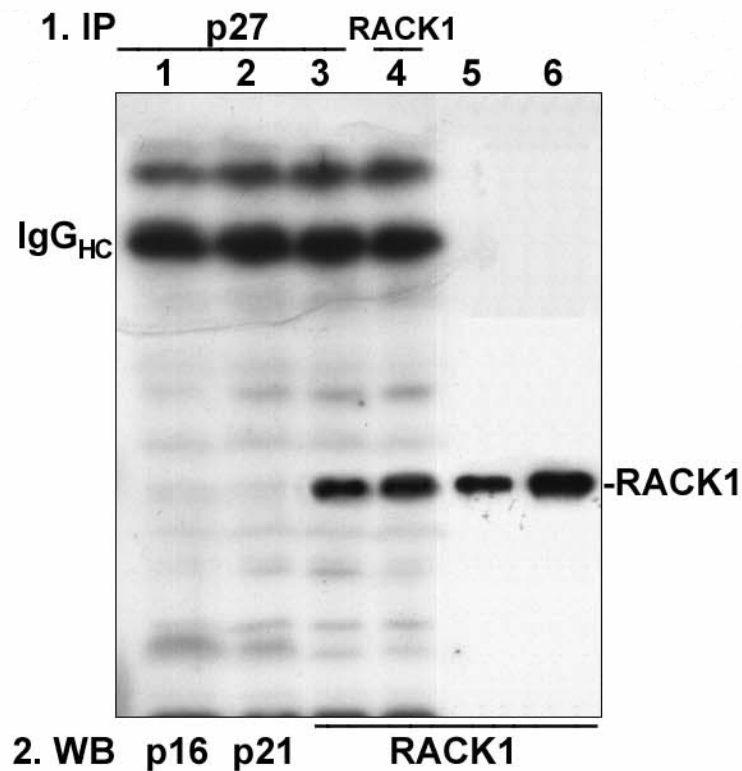


Abbildung 5-10. *In-vivo*-Assoziation von p27^{KIP1} und RACK1:

Zellextrakte aus isolierten vier Tage alten Wistar-Rattenkardiomyozyten wurden mit p27^{KIP1}-Antikörpern immunopräzipitiert, mit dem Westernblotverfahren und anschließend im Immunblot mit jeweils spezifischen Antikörpern für RACK1, p16^{INK4} und p21^{WAF1} analysiert. Bahn 1,2: p21^{WAF1} und p16^{INK4} können in den p27^{KIP1} Immunopräzipitaten nicht nachgewiesen werden. Bahn 3: RACK1-Antikörper binden an p27^{KIP1}-Immunopräzipitate. Bahn 4: RACK1-Kontrolle. Bande IgG_{HC}: ungebundene Antikörper; IP-Immunopräzipitation; WB-Westernblot.

5.1.1.7 Endogenes p27^{KIP1} liegt in Kardiomyozyten assoziiert an PKCβ2 vor

Da RACK1 als Shuttleprotein und Stabilisator für PKCβ2 bekannt ist [69, 70] und wie gezeigt, mit PKCβ2 und p27^{KIP1} interagiert, stellt sich die Frage, ob endogenes p27^{KIP1} in Kardiomyozyten ebenfalls mit PKCβ2 assoziiert ist. Proteinkinasen C (PKC) bilden eine Gruppe von Serin/Threoninkinasen, bestehend aus zehn Isoformen, die in vielen Geweben mit einer zellspezifischen Verteilung vorkommen. Für Mitglieder der Untergruppe der klassischen und der neuen PKC konnte bereits eine Aktivität in neonatalen und adulten Kardiomyozyten nachgewiesen werden [69, 71]. Deshalb erfolgte die Untersuchung stellvertretend für die jeweilige Untergruppe auch an PKCα, einer klassischen PKC, und PKCε, einer neuen PKC. Außerdem besteht eine

geringe Kreuzreaktivität der PKC-Antikörper untereinander, so dass der Nachweis einer anderen PKC als PKC β 2 ausgeschlossen werden kann.

Zu diesem Zweck wurden PKC α , PKC β 2 und PKC ϵ unter Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper aus Zellextrakten vier Tage alter Wistar-Rattenkardiomyozyten immunopräzipitiert. Wie in Abbildung 5-11 ersichtlich, enthielt das PKC β 2 Immunopräzipitat signifikante Mengen von p27^{KIP1}, während in den Versuchen mit Antikörpern spezifisch für PKC α bzw. PKC ϵ unter vergleichbaren Bedingungen p27^{KIP1} nicht mit ausgefällt wurde. Die Assoziation von endogener PKC β 2 mit CKIs ist beschränkt auf p27^{KIP1}, denn p16^{INK4} und p21^{WAF1} konnten in zellulären Extrakten von anti-PKC β 2-Immunopräzipitationen nicht nachgewiesen werden.

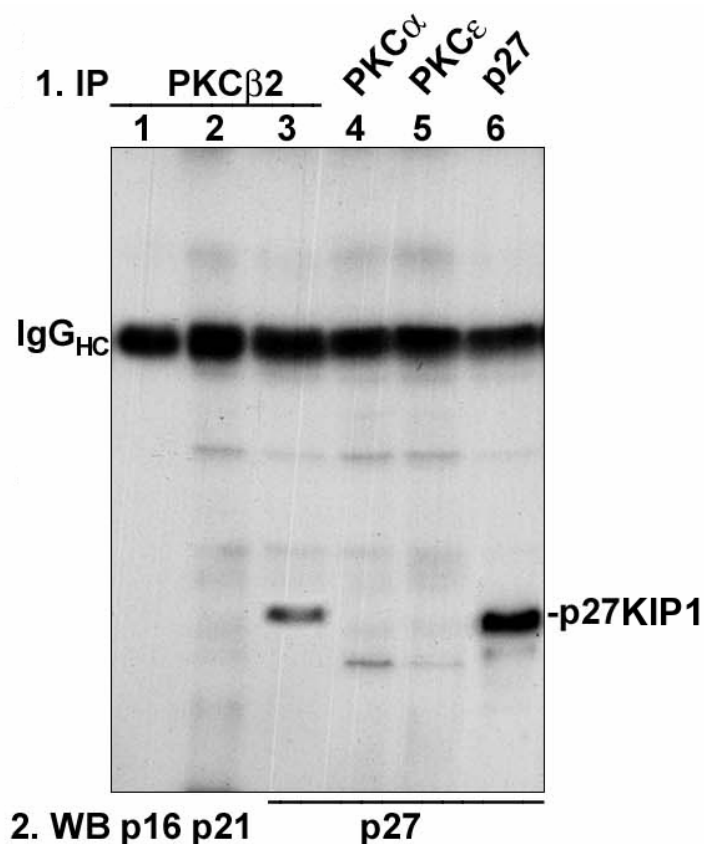


Abbildung 5-11. Endogenes p27^{KIP1} liegt gebunden an PKC β 2 vor:

Zellextrakte von Kardiomyozyten, gewonnen von vier Tage alten neonatalen Wistarratten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen p27^{KIP1} und die PKC-Isoformen, wie in der obersten Zeile angegeben, immunopräzipitiert. Nach Westernblotverfahren und Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern gegen p27^{KIP1}, p21^{WAF1} und p16^{INK4}, ließ sich p27^{KIP1} nur an PKC β 2 gebunden nachweisen. Hingegen liegen p21^{WAF} und p16^{INK4} nicht an PKC β 2 gebunden vor.

5.1.2 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von PKC β 2 und p27^{KIP1}

5.1.2.1 p27^{KIP1} wird *in vitro* an Thr187 von PKC β 2 phosphoryliert

PKC gehören zu den Serin-/Threoninkinasen. In der Literatur als bedeutsame Phosphorylierungsstelle an p27^{KIP1} beschrieben, wurde untersucht, ob p27^{KIP1} durch PKC β 2 an Threonin 187 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung durch Zyklin-cdk-Komplexe führt zur Degradation von p27^{KIP1}. In weiteren Kinaseassays wurde GST-gespaltenes wildtyp.p27^{KIP1} nur von PKC β 2 und wiederum nicht von PKC ϵ phosphoryliert (Abbildung 5-12, Zeile 1). Um herauszufinden, ob diese Phosphorylierung auch an Threonin187 stattfindet, wurde ein Mutant p27.T187A konstruiert, welcher an Stelle 187 statt der Aminosäure Threonin Alanin trägt. Als dieser für wildtyp.p27^{KIP1} in den Kinasereaktionen eingesetzt wurde, zeigte sich das gleiche Ergebnis. Dabei verringerte sich die eingebaute Menge an Radioaktivität auf ein Zwölftel (Abbildung 5-12, Zeile 2). Die Phosphorylierung durch cdk2 hingegen wurde bei Einatz des Mutanten kaum verändert. Dies untermauert die Vermutung, dass Thr187 an p27^{KIP1} eine Hauptphosphorylierungsstelle für PKC β 2 darstellt.

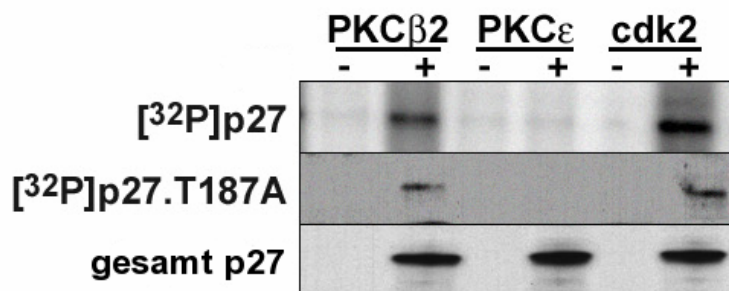


Abbildung 5-12. Thr187 ist eine Hauptphosphorylierungsstelle für PKC β 2 an p27^{KIP1}:

Zeile 1: Anlagerung von radioaktivem Phosphor an wildtyp.p27 im Kinaseassay durch PKC β 2 und durch cdk2, nicht jedoch PKC ϵ . Zeile 2: Verringerung der Anlagerung von radioaktivem Phosphor an den Mutanten mit blockierter Phosphorylierungsstelle an Thr187 im Kinaseassay durch PKC β 2, jedoch kaum Verringerung bei Phosphorylierung durch cdk2, weiterhin keine Phosphorylierung durch PKC ϵ . Zeile 3: Eingesetztes p27^{KIP1}.

5.1.2.2 p27^{KIP1} wird *in vivo* an Thr187 von PKC β 2 phosphoryliert

Wie gezeigt wird p27^{KIP1} *in vitro* durch PKC β 2 phosphoryliert. Die folgenden Untersuchungen sollten offenlegen, ob dies auch *in vivo* der Fall ist. Dazu kam ein Mutant von PKC β 2 zum Einsatz, welcher durch eine Punktmutation keine Kinaseaktivität mehr besitzt. Mit dem Quickchan-

ge Verfahren wurde in dn.PKCβ2 an Stelle 500 die Aminosäure Valin anstatt Threonin eingebaut. Mit dem Mutanten und Wildtyp von PKCβ2 erfolgte die ektopische Expressierung zusammen mit wildtyp.p27^{KIP1} oder p27.T187A in Kardiomyozyten. Die Zellen wurden metabolisch mit [³²P]-ortho-Phosphat markiert, nach 24h gesammelt, lysiert und mit den entsprechenden Antikörpern immunopräzipitiert.

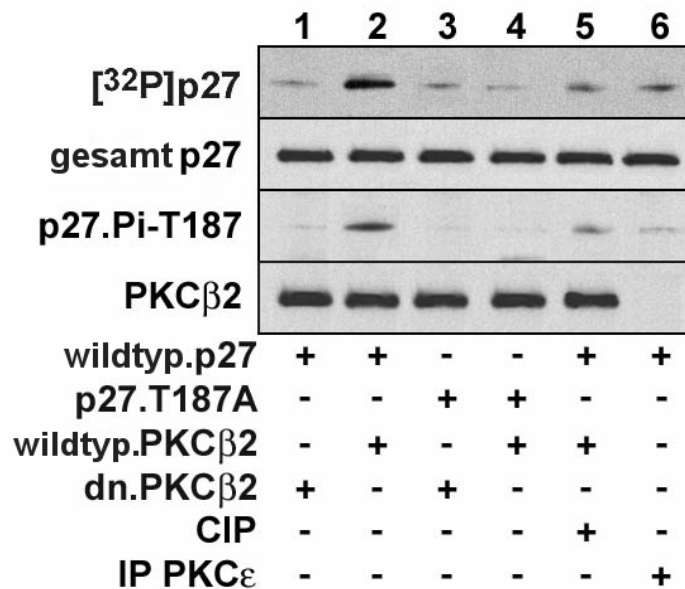


Abbildung 5-13. In-vivo-Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 durch PKCβ2:

Zellextrakte von Kardiomyozyten, gewonnen von vier Tage alten neonatalen Wistarratten, mit den ektopisch exprimierten Mutanten- oder Wildtypformen von PKC und p27^{KIP1} (+) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen p27^{KIP1}, p27.T187A, PKCβ2 und dn.PKCβ2, wie in der linken Spalte angegeben, immunopräzipitiert. Bahn 2: Bei Vorliegen beider Wildtypformen zeigt sich die größte Menge an phosphoryliertem p27^{KIP1} in den Kardiomyozyten. Abk.: IP-Immunopräzipitation.

Der höchste Gehalt an metabolisch markiertem p27^{KIP1} fand sich in Anwesenheit von wildtyp.PKCβ2 und wildtyp.p27^{KIP1} (Abbildung 5-13, Bahn2). Dies bestätigt auch der Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für an Threonin 187 phosphoryliertes p27.Pi-T187. In Anwesenheit von dn.PKCβ2 wurde wildtyp.p27^{KIP1} allgemein und an Threonin187 insbesondere in signifikant geringerem Umfang phosphoryliert (Abbildung 5-13, Bahn 1). Durch Behandlung mit der CIP (englisch: calf intestinal phosphatase), einer alkalischen Phosphatase, wurde p27^{KIP1} wieder dephosphoryliert. Dies beweist die Spezifität der Phosphorylierung durch PKCβ2 (Abbildung 5-13, Bahn5). Die übrigen Versuche mit dem p27^{KIP1}-Mutanten zeigten eine signifikant geringere Menge des metabolisch markierten p27^{KIP1} und keinen Nachweis einer Phosphorylierung an

Threonin 187. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, PKC β 2 phosphoryliert p27^{KIP1} an Threonin 187 in Kardiomyozyten.

5.1.2.3 p27^{KIP1} inhibiert PKC β 2

Der CKI p27^{KIP1} inhibiert die enzymatische Aktivität von G1-cdk-Zyclin-Komplexen. Darum wurde unter Verwendung von je 0,25 μ g wildtyp.p27, p27.1-86 oder p27.87-199 in Anwesenheit von PKC β 2, PKC ϵ oder cdk2 in einem Kinaseassay überprüft, ob dies *in vitro* auch für PKC β 2 zutrifft. Dabei bildete der Reaktionsansatz mit cdk2 als bekannte Interaktion die Positivkontrolle. Wie erwartet inhibiert wildtyp.p27^{KIP1} die Kinaseaktivität von cdk2 (Abbildung 5-14). Auch der Mutant p27.1-86 mit intakter cdk-Bindungsdomäne kann diese Funktion aufrechterhalten. Jedoch bei Einsatz des Mutanten p27.87-198, der die cdk-Bindungsdomäne nicht enthält, steigt die Kinaseaktivität auf nahezu 100% an. PKC β 2 bietet einen vergleichbaren Verlauf. Auch hier inhibieren nur wildtyp.p27 und der Mutant p27.1-86, welcher die PKC-Bindungsdomäne enthält, die Kinaseaktivität. Der Mutant ohne Bindungsdomäne ist hingegen insuffizient (Abbildung 5-14).

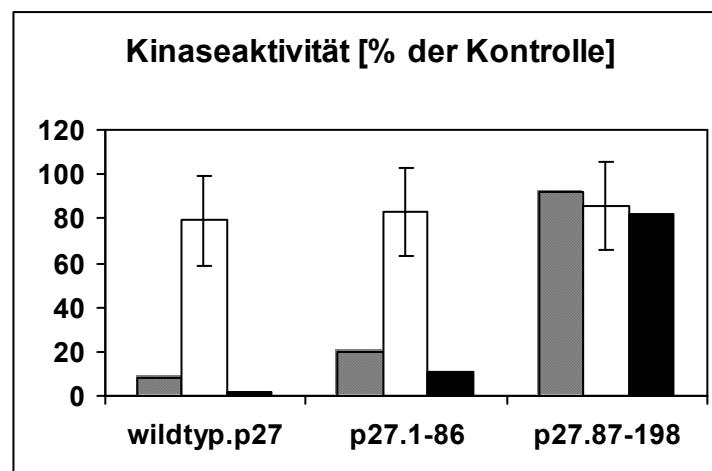


Abbildung 5-14. p27^{KIP1} inhibiert PKC β 2 *in vitro*:

Kinaseassay mit je 25 μ g wildtyp.p27 und den beiden Mutanten unter Anwesenheit von PKC β 2, PKC ϵ und cdk2. Nach Einsatz von wildtyp.p27^{KIP1} ist die Kinaseaktivität von cdk2 und PKC β 2 inhibiert und steigt bei Einsatz des Mutanten p27.87-198 sprunghaft an. Die Kinaseaktivität von PKC ϵ scheint unter allen drei Reaktionbedingungen nahezu unbeeinflusst hoch.

Balkenlegende: grau: PKC β 2, schwarz: cdk2, weiß: PKC ϵ .

Im Gegensatz dazu bleibt die Kinaseaktivität von PKC ϵ unter allen drei Reaktionbedingungen nahezu unbeeinflusst. Damit wurde unter *in-vitro*-Bedingungen gezeigt, dass p27^{KIP1} ein suffizienter und spezifischer Inhibitor der Kinaseaktivität von PKC β 2 ist.

5.1.3 Funktionelle Bedeutung der Interaktion von p27^{KIP1} und RACK1

5.1.3.1 Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 verhindert seine Interaktion mit RACK1 *in vitro*

Da p27^{KIP1} *in vitro* und *in vivo* durch PKC β 2 an Thr 187 phosphoryliert wird, stellt sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Komplexbildung zwischen p27^{KIP1} und RACK1 hat. In einem *in-vitro*-GST-Bindungsassay wurden GST-gebundenes wildtyp.p27^{KIP1}, p27.PiT187 (an Thr187 phosphoryliertes p27^{KIP1}) und p27.T187A auf ihre Fähigkeit an RACK1 zu binden untersucht. Dazu wurden die GST-markierten p27^{KIP1}-Proteine mit Zellextrakten von RACK1-überexprimierenden Kardiomyozyten inkubiert. Der Immunoblot mit RACK1-Antikörpern zeigte, dass RACK1 an wildtyp.p27^{KIP1} und den Mutanten mit inaktiver Phosphorylierungsstelle (Abbildung 5-15, Bahn 2 und 3), nicht aber an phosphoryliertes p27^{KIP1} gebunden vorlag (Abbildung 5-15, Bahn 4). Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 seine Interaktion mit RACK1 *in vitro* verhindert.

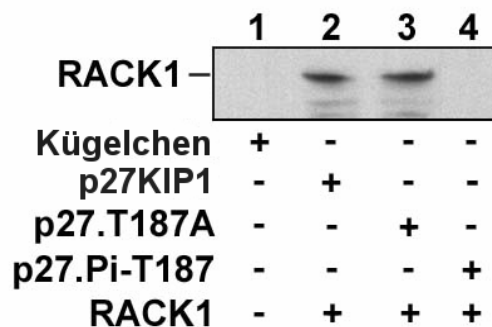


Abbildung 5-15. Phosphorylierung von p27^{KIP1} verhindert die Interaktion mit RACK1:

In einem *in-vitro*-GST-Bindungsassay wurden GST-gebundenes wildtyp.p27^{KIP1}, p27.Pi-T187 und p27.T187A auf ihre Fähigkeit untersucht, an RACK1 zu binden. Dazu erfolgte die Inkubation der GST-markierten p27^{KIP1}-Proteine mit Zellextrakten von RACK1 überexprimierenden Kardiomyozyten. Bahn 2 und 3: Nur nicht-phosphoryliertes p27^{KIP1} und p27.T187A ohne Phosphorylierungsstelle liegt gebunden an RACK1 vor.

5.1.3.2 PKC β 2 abhängige Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 wird *in vivo* durch RACK1 verhindert

Da durch die Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 seine Interaktion mit RACK1 *in vitro* verhindert wird und die Phosphorakzeptorstelle an Thr187 von p27^{KIP1} in der RACK1-Bindungszone liegt, erscheint es möglich, dass RACK1 durch Bindung an p27^{KIP1} die Phosphorylierung von Thr187 beeinflusst. In Coimmunoprecipitaten mit Zellextrakten von drei Tage alten Wistar-Rattenkardiomyozyten fand die Untersuchung auf das Vorliegen von endogenem

RACK1 und PKC β 2 im Komplex mit phosphoryliertem p27^{KIP1} statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Medium mit Phorbol-12-Mistat-134-Azetat (PMA), einem universellen PKC-Aktivator. Deshalb wurde das Zellextrakt zum Vergleich mit spezifischen Antikörpern für PKC ϵ coimmunopräzipitiert. Dies erfolgte mit spezifischen Antikörpern für PKC β 2 bzw. RACK1. Nach Westernblotverfahren und Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für p27.Pi-T187 und wildtyp.p27KIP1 ließ sich sowohl der Wildtyp als auch phosphoryliertes p27^{KIP1} an PKC β 2 gebunden nachweisen (Abbildung 5-16, Bahn 1).

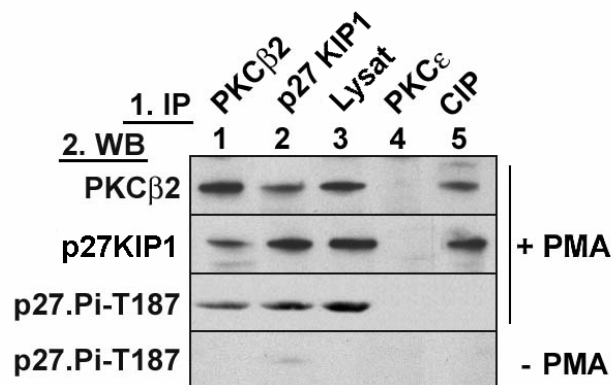


Abbildung 5-16. Phosphorylierungsstatus beeinflusst die PKC β 2-Bindung an p27^{KIP1}:

Immunopräzipitate von Zelllysaten drei Tage alter Rattenardiomyozyten wurden nach Westernblot mit Antikörpern spezifisch für wildtyp.p27^{KIP1} und p27.Pi-T187 versetzt. Bahn 1: p27^{KIP1} liegt nach Aktivierung unabhängig vom Phosphorylierungsstatus an PKC β 2 gebunden vor. Bahn 2: Der p27^{KIP1}-Antikörper immunopräzipitiert wildtyp.p27^{KIP1} und p27Pi-T187 nach PKC-Aktivierung. Bahn 3: Vorliegen beider p27^{KIP1}-Formen im Zelllysate. Bahn 4: Auch nach Aktivierung keine Bindung von p27^{KIP1} an PKC ϵ . Bahn 5: Nach Dephosphorylierung durch CIP fand sich kein phosphoryliertes p27^{KIP1} im Zellextrakt.

Abkürzungen: IP-Immunopräzipitation, WB-Westernblot, PMA: Phorbol-12-Mistat-134-Azetat

An RACK1 hingegen kann nur wildtyp.p27 detektiert werden (Abbildung 5-17, Bahn 1). In Extrakten von Zellkulturen ohne PKC stimulierendes PMA im Medium fand sich kein an Theronin phosphoryliertes p27^{KIP1} (Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17).

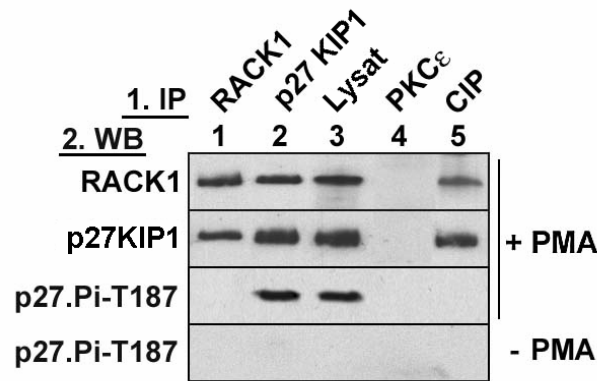


Abbildung 5-17. Phosphorylierungsstatus beeinflusst die RACK1-Bindung an p27^{KIP1}:

Immunopräzipitate von Zelllysaten drei Tage alter Wistar-Rattenskardiomyozyten, vorbehandelt mit PMA oder ohne Vorbehandlung, wurden nach Westernblot mit Antikörpern spezifisch für wildtyp.p27^{KIP1} und p27.Pi-T187 und RACK1 versetzt. Bahn 1: An RACK1 lag p27^{KIP1} nur nach Aktivierung von PKCβ2 gebunden vor, nicht jedoch phosphoryliertes p27.Pi-T187. Bahn 2: Der p27^{KIP1}-Antikörper immunopräzipitiert wildtyp.p27 und p27Pi-T187 nach Aktivierung von PKC. Bahn 3: Vorliegen beider p27^{KIP1}-Formen im Zelllysate. Bahn 4: Weder phosphoryliertes noch unphosphoryliertes p27^{KIP1} lag an PKCε gebunden vor. Bahn 5: Im Versuchsansatz mit dephosphorylierendem CIP findet sich nach PKC-Aktivierung kein phosphoryliertes p27.Pi-T187.

Abkürzungen: IP-Immunopräzipitation, WB-Westernblot, PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Azetat

In beiden Versuchsreihen zeigte sich erneut die Spezifität der Interaktion, da an PKCε auch nach Stimulation mit PMA, weder p27^{KIP1} noch p27.Pi-T187 gebunden nachweisbar war. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass RACK1 die Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Threonin 187 *in vivo* inhibiert.

5.2 Hypoxie

5.2.1 Die Rolle von RACK1 in akut ischämisch induziertem Zelltod

5.2.1.1 RACK1 verhindert die Downregulation von p27^{KIP1}

Als anerkanntes Modell zur Induktion von Hypoxie in Kardiomyozyten gilt der Einsatz von Desferrioxamin (DFX). Die hypoxieinduzierten Faktoren HIF 1-3, verantwortliche Transkriptionsfaktoren für die sauerstoffabhängige Genregulation, werden unter normoxischen Bedingungen durch Prolylhydroxylasen degradiert. Diese arbeiten sauerstoffabhängig. Unter Hypoxie kann keine Degradation der HIF erfolgen. Ein essentieller Cofaktor der Hydroxylasen ist Eisen. Ferro-

chelatbildner, wie DFX können durch Bindung des Eisens die Hydroxylasen inhibieren. Dadurch wird die zelluläre Reaktion auf Hypoxie simuliert [72, 73].

Drei Tage alte Wistar-Rattenkardiomyozyten wurden über Adenovirus mit wildtyp.RACK1 und den Mutanten RACK1.1-200 und RACK1.201-317 transfiziert und in Kardiomyozytenmedium mit DFX induziert. Alle vier Stunden wurde ein Teil der Zellen entnommen und wie in 3.18.2 beschrieben zu Zellextrakten verarbeitet. Als Kontrolle kamen untransfizierte Kulturen zur Anwendung. Diese wurden mit Antikörpern spezifisch für p27^{KIP1} bzw. RACK1 immunopräzipitiert. Hier zeigte sich: Sowohl der p27^{KIP1} - als auch der RACK1-Proteingehalt nimmt ab einem Zeitpunkt zwischen vier und acht Stunden nach Einsetzen der Hypoxie stetig ab (Abbildung 5-18, Zeile 1 und 5). Gleiches gilt für den p27^{KIP1}-Proteingehalt in Zellen, die mit RACK1.1-200 transfiziert wurden (Abbildung 5-18, Zeile 2). Jedoch bei Überexprimierung von wildtyp.RACK1 oder dem Mutanten RACK1.201-317 bleibt der Proteingehalt von p27^{KIP1} bis 24 Stunden Hypoxiedauer konstant (Abbildung 5-18, Zeile 3 und 4). Daraus folgt: Unter Hypoxie nimmt der p27^{KIP1}-Gehalt in Kardiomyozyten ab. Dieser Vorgang kann durch RACK1 verhindert werden.

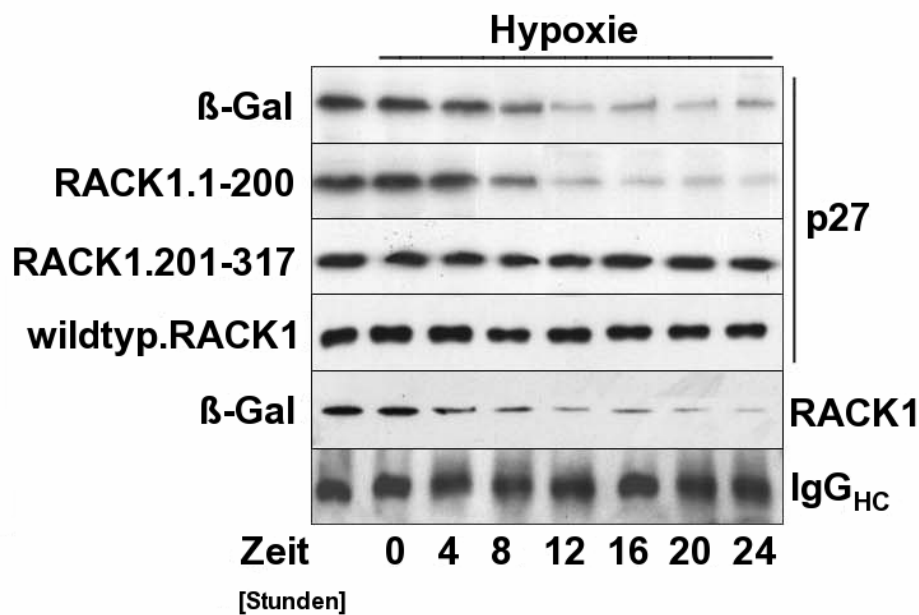


Abbildung 5-18. RACK1 verhindert die hypoxieinduzierte Abnahme von p27^{KIP1}:
 Zellextrakte von transfizierten mit DFX induzierten Wistar-Rattenkardiomyozyten wurden mit spezifischen Antikörpern wie links angegeben immunopräzipitiert: Zeile 1 und 5: Untransfizierte Kontrollansätze nach Immunopräzipitation mit den spezifischen Antikörpern für p27^{KIP1} und RACK1 zeigen einen Abfall an Proteingehalt über 24h. Zeile 2: RACK1-Mutant ohne p27^{KIP1}-Bindungsstelle kann Abfall nicht verhindern. Zeile 3 und 4: Mutant mit intakter Bindungsstelle und wildtyp.RACK1 stabilisiert p27^{KIP1}.
 Bande IgG_{HC}: ungebundene Antikörper

Die Regulation der Expression eines Proteins in der Zelle kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. So existiert eine prä- und/oder posttranslationale Kontrolle. Hypoxische Kardiomyozyten, die in Anwesenheit von [³⁵S] Methionin und den verschiedenen RACK1-Mutanten inkubiert wurden, zeigten in p27^{KIP1}-Immunopräzipitaten eine unveränderte p27^{KIP1}-Syntheserate (Abbildung 5-19).

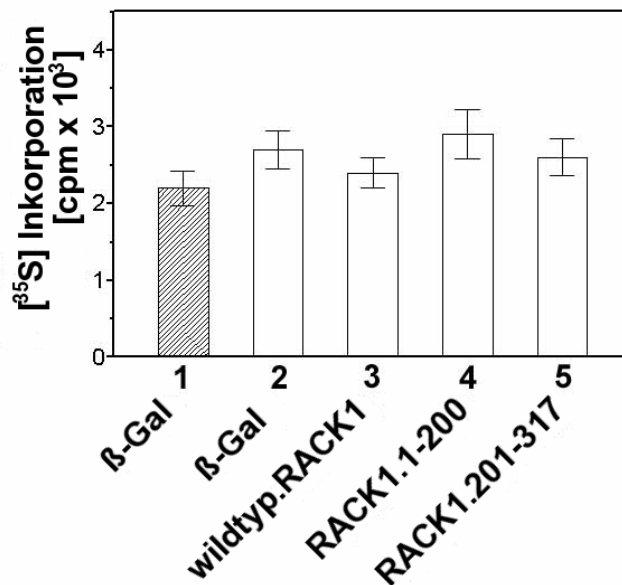


Abbildung 5-19. Einfluss von RACK1 auf die Syntheserate von p27^{KIP1} in Hypoxie:

Mit den RACK1-Mutanten, wie in der Spaltenbeschriftung angegeben, transfizierte Kardiomyozyten wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin inkubiert. Nach Hypoxieinduktion mit DFX wurden die Zellextrakte mit p27^{KIP1}-Antikörpern immunopräzipitiert und autoradiographiert. Balken 1: Untransfizierte Kontrolle in Normoxie. Balken 2: Untransfizierte Kontrolle in Hypoxie. Balken 3,4 und 5: wildtyp.RACK1, RACK1.1-200 und RACK1.201-317 haben keinen Einfluss auf die [³⁵S]-Methionin-Inkorporation bzw. die p27^{KIP1}-Syntheserate.

Daraus folgt: Die Abnahme des p27^{KIP1}-Proteingehaltes wird nicht durch Hemmung der Synthese erreicht.

5.2.1.2 Funktionelle Rolle der PKCβ2 und von RACK1 im Zusammenhang mit p27^{KIP1} in hypoxischen Kardiomyozyten

Eine durch einen Myokardinfarkt erzeugte Hypoxie in Kardiomyozyten führt unter anderem zu einer Aktivierung von cdk2 [24]. Zur Aufklärung der Frage, ob RACK1 auch eine Rolle in der Regulation von cdk2/3 spielt, untersuchten wir den Einfluss von wildtyp.RACK1 und den Mutanten auf die Expression und Phosphotransferaseaktivität von cdk2/3 in hypoxischen Kardio-

myozyten. Exogen expressierte wildtyp.RACK1 und RACK1-Mutanten mit intakter Bindungsstelle für p27^{KIP1} inhibieren suffizient die Induktion der Kinaseaktivität, gemessen in anti-cdk2/3 Immunkomplexen (Abbildung 5-20).

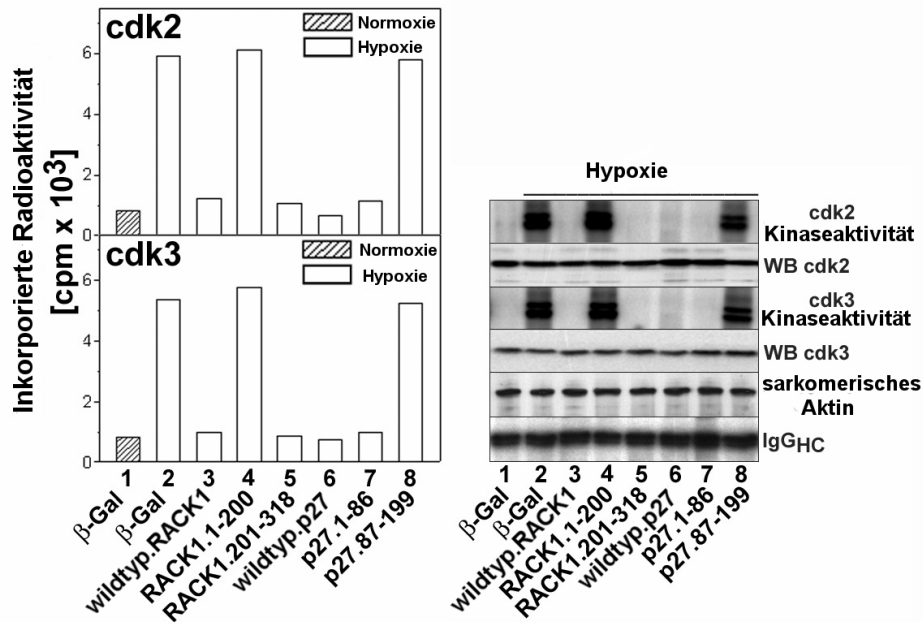


Abbildung 5-20. RACK1 inhibiert cdk2 und cdk3 in Kardiomyozyten:

Drei Tage alte Wistar-Rattenkardiomyozyten, die RACK1 und Mutanten exprimierten wurden nach Exposition mit DFX lysiert und der totale Proteingehalt extrahiert. Die Zellextrakte wurden anschließend in einem Kinase-Assay, gefolgt von einem Westernblot mit spezifischen Antikörpern für cdk2 und cdk3 analysiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde nach SDS-PAGE mit einem Phosphoimager bestimmt. Diagramm und Gelfoto: wildtyp.RACK1 und RACK1.201-318 mit intakter p27^{KIP1}-Bindungsstelle sowie wildtyp.p27^{KIP1} und p27.1-86 mit intakter cdk-Domäne inhibieren signifikant die Kinaseaktivität von cdk2 und cdk3. Diagramm und Gelfoto Balken/Spalte 4 und 8: RACK1-Mutant ohne p27- Bindungsstelle und p27.87-199 ohne cdk-Domäne zeigen keinen Effekt im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Balken/Spalte 2), Balken/Spalte 1 untransfizierte Zellen in Normoxie, keine Aktivität von cdk2 und cdk3.

Bedeutend war: Unter Einsatz von Koimmunopräzipitation konnte keine Bindung von RACK1 an cdk2/3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass der inhibitorische Einfluss von RACK1 auf die Aktivierung cdk2/3 auf dem stabilisierenden Effekt von RACK1 auf den p27^{KIP1}-Protein-Umsatz beruht. Dieser Blickwinkel konnte in vorliegenden Versuchen durch die Tatsache weiter untermauert werden, dass p27.1-86 ohne RACK1-Bindungsstelle, die durch DFX induzierte cdk2/3 Aktivität inhibierte.

6 Diskussion

Die hohe Mortalität und Folgemorbidität nach Herzinfarkt führte in den letzten 20 Jahren zu einer Intensivierung der Bemühungen in der Primärprävention und Akutbehandlung. Doch auch die Bedeutung der Sekundärprävention zur Vermeidung von Spätfolgen, mit Wirkung auf die Lebenszeit und -qualität des Patienten und ihre Auswirkung auf die Gesellschaft insgesamt, rückt zunehmend in den Mittelpunkt des Bewusstseins. Eine denkbare Möglichkeit des Eingreifens besteht in der Beeinflussung der Regenerationsprozesse im Herzmuskelgewebe nach Infarkt. Die Stimulation adulter Kardiomyozyten zur Teilung soll nach Infarkt zum Ersatz des entstandenen Gewebsdefektes mit voll funktionsfähigem Herzmuskelgewebe führen. cdk-Inhibitor p27^{KIP1} steuert in vielen Zellgeweben unter anderem die Regulation des Zellzyklusstopps in der G1-Phase. Im adulten Herzen sind cdk herunterreguliert und bisher keine anderen Bindungspartner für p27^{KIP1} bekannt.

In dieser Arbeit wurde mit RACK1 ein neuer Interaktionspartner von p27^{KIP1} in Herzmuskelzellen außerhalb der Gruppe der cdk gefunden.

Das Screening einer humanen Herzgendatenbank mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System mit p27^{KIP1} als Köder erbrachte 53 positive Klone. Einer der Klone stellte sich nach Sequenzierung im NCBI Blast als ein 178 Aminosäuren langer carboxyterminaler Anteil von RACK1 dar.



Abbildung 6-1. Schema des RACK1-Beuteproteins

Schematische Darstellung des carboxyterminalen Anteils des RACK1-Proteins in einem positiven Klon der mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführten Durchmusterung einer kardialen Gendatenbank mit p27^{KIP1} als Köder.

Wildtyp RACK1 ist 317 Aminosäuren lang und ~36kDa groß. Erstmals wurde RACK1 1994 an aktivierter Proteinkinase C (PKC) isoliert [74]. RACKs (**R**ezeptoren für **a**ktivier**e**te Protei**n**ki**n**ase **C**) sind Anker- und Translokationsproteine für aktivierte Proteinkinasen C. RACK1 ist spezifisch für die klassische PKC β 2, RACK2 für PKC ϵ [75].

6.1 Die Interaktion von RACK1 und p27^{KIP1}

Bisher ist eine Interaktion zwischen RACK1 und p27^{KIP1} in der Literatur noch nicht beschrieben. Doch konnte hier in einem β -Gal-Flüssigkeits-Assay nicht nur die Wahrhaftigkeit der Bindung zwischen p27^{KIP1} und RACK1 bestätigt werden, sondern es zeigte sich auch, dass die Bindungsstärke vergleichbar ist mit jener der bekannten Interaktion zwischen p53 und SV40T-large Antigen. Auch *in vitro*, nachgewiesen mit einem GST-Bindungsassay, banden p27^{KIP1} und RACK1 aneinander. Erstmals konnte, wie in 5.1.1.6 gezeigt, in neonatalen Kardiomyozyten RACK1 als Bindungspartner von p27^{KIP1} ausgemacht werden. Doch welche Funktion erfüllt diese neue Interaktion?

6.1.1 RACK1

Strukturell gehört RACK1 zur Gruppe der WD40-Proteine und ist ein Homolog der β -Untereinheit des Guanin-Nukleotid-Bindungsproteins (G-Protein). Es enthält sieben WD40-Wiederholungen [74]. Diese spielen in Proteinen mit den unterschiedlichsten Funktionen eine wichtige Rolle in der Realisierung von Protein-Protein-Interaktionen [76]. RACK1 ist das spezifische Anker- und Translokationsprotein für die aktivierte klassische PKC β 2 [75, 77]. Dabei ist RACK1 weder Substrat noch Inhibitor von PKC β 2, bindet sie aber in direkter Proteininteraktion in Anwesenheit der notwendigen Aktivatoren. Es stabilisiert und erhöht durch Bindung an PKC β 2 ihre Aktivität [69, 70]. Die Stimulation von PKC führt nach Colokalisation mit dem spezifischen RACK zu einer Umverteilung in ein anderes Zellkompartiment, dort erfolgt die Komplexbildung mit dem Substrat und die Phosphorylierung desselben [68].

Im Verlauf entdeckte man weitere Interaktionspartner, die in Signalwegen eine Rolle spielen. Dabei fungiert RACK1 nicht nur als Adaptorprotein, wie für die Phosphodiesterase PDE4D5 [78] oder den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I-Rezeptor (IGF-I-Rezeptor) [79], sondern ist Bindungspartner, Substrat und Inhibitor von Src - einer Tyrosinkinase. Nach Stimulation mit Serum oder PDGF colokalisiert RACK1 in NIH-3T3-Zellen mit Src an der Plasmamembran. Die Bindung an RACK1 vermindert die Src-Kinaseaktivität *in vitro*. Src reguliert die transkriptionelle Aktivierung von Myc, Cyclin D1 und damit den G1/S Übergang. Eine Überexpression von RACK1 inhibiert *in vivo* zum Teil das Zellwachstum durch Verlängerung der G1/G0 Phase [80].

6.1.2 RACK1 inhibiert die Degradation von p27^{KIP1}

Mit einem GST-Bindungsassay und unter Einsatz von deletierten Mutanten wurde die Bindungsstelle für p27^{KIP1} an RACK1 identifiziert. Sie befindet sich innerhalb der AS 201 bis 317. Die

Bindungsdomäne von p27^{KIP1} befindet sich somit im VI. WD40-Motiv. Im gleichen Bereich findet auch die Vermittlung der Bindung zu PKC β 2 [74] und Src [80] statt. *In vitro* erhöhte sich die Aktivität von RACK1 zur Inhibition von Src durch Phosphorylierung im VI. WD40-Motiv. Vermutlich bewirkt dies eine Konformationsänderung an RACK1, die die Bindungsaffinität beeinflusst. Damit stellt sich eine weitere Frage: Wird RACK1 durch p27^{KIP1} phosphoryliert und, wenn ja, wie ändert sich dann seine Funktion oder sein Bindungsverhalten gegenüber PKC β 2?

RACK1 bindet p27^{KIP1} im Bereich der AS 87-199. Wie schon erwähnt befindet sich in diesem Bereich eine wichtige Phosphorylierungsstelle für die Degradation von p27^{KIP1}. In gezeigten Versuchen wurde in Kardiomyozyten nur unphosphoryliertes p27^{KIP1} durch RACK1 gebunden. Dies deutet darauf hin, dass RACK1 *in vivo* die Phosphorylierung von p27^{KIP1} an Thr187 und dadurch dessen Abbau verhindert.

Im Einklang hiermit stehen die Beobachtungen von Hermanto et al. zur Interaktion von RACK1 und IGF-1 Rezeptor und Mamidipudi et al. zu Src in NIH-3T3-Zellen. Nach Überexprimierung von RACK1 zeigte sich eine Verzögerung des G1/S-Überganges in Korrelation mit Rb-Hypophosphorylierung und einem ansteigenden Proteingehalt von p27^{KIP1} [79, 80]. Neben molekularen, für das untersuchte Protein typischen Veränderungen, könnte man die beobachtete Zellzyklusverlangsamung mit p27^{KIP1}-Anstieg in beiden Versuchen auf eine Inhibition der p27^{KIP1}-Degradation durch Überexprimierung von RACK1 zurückführen.

6.2 Die Interaktion von p27^{KIP1} und PKC β 2

Verfolgt man den Gedanken der klassischen Funktion von RACK1 als Adaptorprotein für PKC β 2, so wäre es denkbar, dass p27^{KIP1} in Kardiomyozyten ein Substrat von PKC β 2 ist.

6.2.1 Die Gruppe der Proteinkinasen C

Die Familie der Proteinkinasen C (PKC) umfasst derzeit eine Gruppe von 10 Serin/Threoninkinasen, welche in vielen Geweben mit einer zellspezifischen Verteilung vorkommen. Die klassischen Isoformen (cPKC), zu denen PKC α , PKC β 1, PKC β 2 gehören sowie PKC γ werden über den Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP)-Signalweg aktiviert. Phospholipase C führt zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3), Calcium und (DAG), was zur Aktivierung führt. Die klassischen PKC bestehen aus vier hochkonservierten Abschnitten (C1-C4) und fünf Variablen Teilen V1-V5. Die zweite Gruppe der neuen PKC (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ) unterscheidet sich durch Fehlen der C2 Region und benötigt daher kein Calcium zur Aktivierung. Die dritte Untergruppe der atypischen PKC (PKC ζ , PKC λ) hat strukturell und in ihren

Aktivierungswegen nichts mit den anderen beiden Untergruppen gemein [81]. Einige Autoren zählen zwei weitere Kinasen, die Proteinkinase C-verwandten Kinasen PKR1 und PKR2 als Untergruppe zu den PKC. Diese werden aktiviert durch RhoA GTPase [82].

PKC β 2 als klassische PKC besteht aus zwei funktionellen Domänen. Das aminoterminele Ende beherbergt die regulatorische Domäne, bestehend aus C1 und C2. Das in der C1-Domäne gelegene Zinkfingermotiv vermittelt die Bindung an Aktivatoren und Cofaktoren wie DAG und Phorbol ester. Eingeschlossen in diesem Bereich findet sich die Pseudosubstratregion. Der Aktivator Calcium sowie RACK [83] und Phosphatidylserin binden an die C2 Domäne [70, 82].

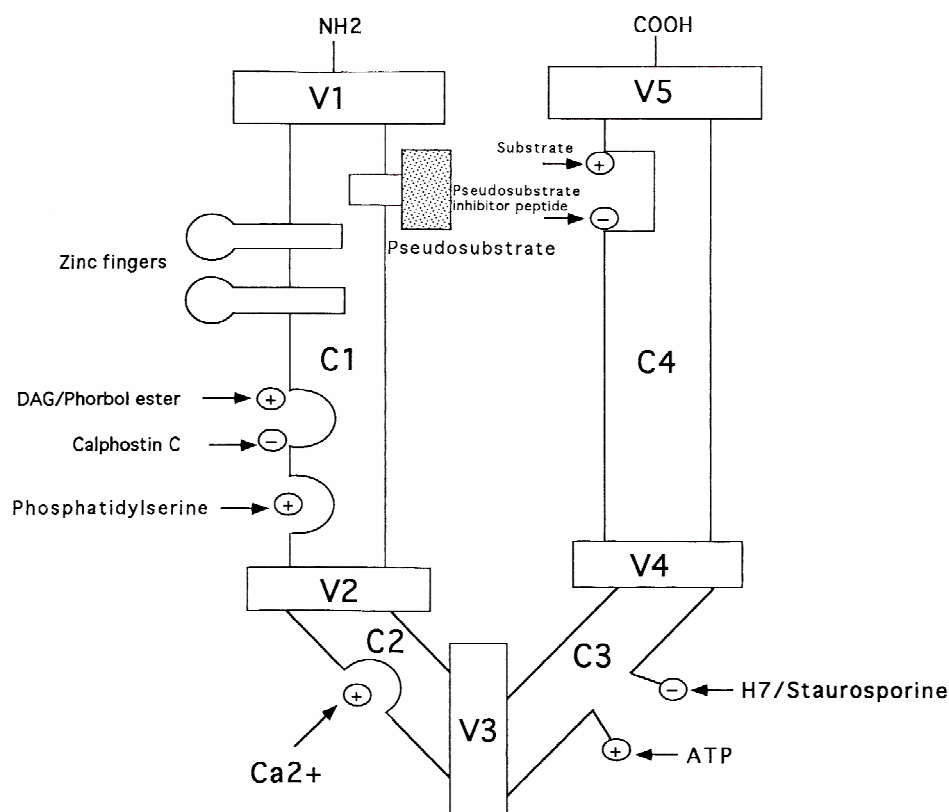


Abbildung 6-2. Struktur der klassischen PKC (nach Kanashiro und Khalil [81]):

Die klassische PKC besteht aus zwei funktionellen Domänen: 1. Die regulatorische Domäne bestehend aus C1 und C2. Die C1-Domäne mit Zinkfingermotiv vermittelt die Bindung an Aktivatoren und Cofaktoren wie DAG und Phorbol ester und beherbergt die Pseudosubstratregion. Der Aktivator Calcium (Ca^{2+}) sowie RACK und Phosphatidylserin (PS) binden an die C2-Domäne. 2. Die katalytische Einheit. Innerhalb der C3-Domäne binden Antagonisten wie H7 und Stauroporin sowie der Aktivator ATP. Die C4-Domäne bildet das katalytische Zentrum, den Ort der Substratbindung. Carboxyterminal befindet sich die V5-Region.

Das carboxyterminale Ende der klassischen PKC bildet die katalytische Einheit. Ebenfalls zweigeteilt, binden innerhalb der C3-Domäne Antagonisten, wie H7 und Stauroporin sowie der Aktivator ATP. Die C4-Domäne bildet das katalytische Zentrum, den Ort der Substratbindung

vator ATP. Die C4-Domäne bildet das katalytische Zentrum, den Ort der Substratbindung [70]. Carboxyterminal befindet sich die V5-Region. Ihr wird eine zentrale Rolle in der intrazellulären Lokalisation der PKC nach Aktivierung zugeschrieben. So unterscheiden sich PKC β 1 und 2 nur durch Unterschiede in dieser Region, translozieren aber nach Aktivierung zu verschiedenen Zellkompartimenten [82]. Stebbins und Rosen konnten nachweisen, dass in diesem Abschnitt ein weiterer Bindungsort für RACK1 liegt, was die Spezifität für PKC β 2 untermauert [77].

Die klassischen PKC verfügen über die Möglichkeit der Autoregulation durch Konformationsänderung. In inaktiviertem Zustand besetzt die Pseudo-RACK-Region die RACK-Bindungsstelle und die Pseudosubstratregion an C1 deckt das katalytische Zentrum ab. Im Rahmen der Aktivierung, z.Bsp. durch Bindung von DAG, Calcium und PS, werden beide Domänen freigegeben [70]. Die entstandene Konformation wird durch Bindung von RACK1 stabilisiert.

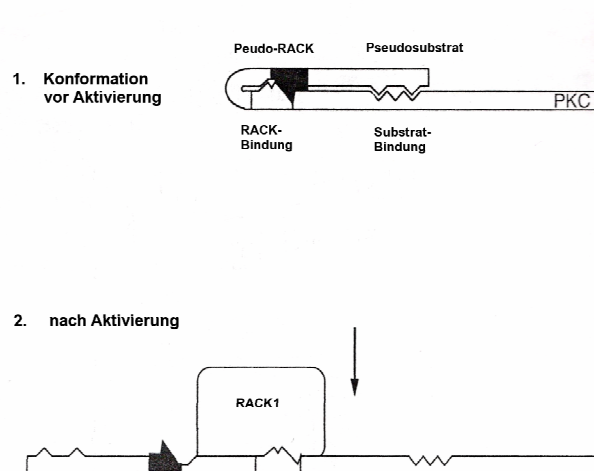


Abbildung 6-3. Aktivierung von klassischen PKC (nach Mochly-Rosen [70]):

Autoregulation der klassischen PKC durch Konformationsänderung. In inaktiviertem Zustand besetzt die Pseudo-RACK-Region die RACK-Bindungsstelle und die Pseudosubstratregion an C1 deckt das katalytische Zentrum ab. Nach Aktivierung werden beide Domänen freigegeben. Die entstandene Konformation wird durch Bindung von RACK1 stabilisiert.

Viele Studien in Krebszellen und mit Überexprimierung einzelner Isoformen zeigen, dass PKC in Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund Zellwachstum fördern oder hemmen können [84]. Erstmals wurde die bedeutende Rolle in der Signaltransduktion in Blutplättchen 1983 durch Kai-buchi K et al. gezeigt [85]. Im weiteren Verlauf entdeckte man die Beteiligung in Signalwegen von Wachstumsfaktoren. PKC aktivieren den MAP-(Mitogen aktivierte Protein)-Kinase-Signalweg und können so direkt und indirekt zytoplasmatische und nucleäre Effektoren, darunter Transkriptionsfaktoren erreichen. Aber auch eine Translokation von PKC in den Nucleus wurde

bereits beobachtet. Dabei besteht noch Unklarheit über den Transportmechanismus, da PKC keine NLS besitzen [84]. Gowdy et al. zeigten, dass PKC β 2 im Nucleus während des G₂/M-Überganges aktiviert ist und eine Rolle in der Depolarisation der Kernmembran und beim Eintritt der Zelle in die Mitosephase spielt [86].

Abnormale Aktivität führt zu vermehrtem Zellwachstum oder zu maligner Transformation. PKC können als Tumorpromotor wirken [70]. So sind Phorbolester, wie PMA/TPA starke Aktivatoren von PKC und bekannt dafür, Hauttumoren in der Maus auszulösen. Andererseits werden PKC in Colonicarcinomen sowohl im Rattenmodell als auch im Menschen herabreguliert [82]. Dies verdeutlicht nochmals die zelltyp- und isoformspezifische Funktion von PKC im Organismus.

6.2.2 PKC β 2 in Kardiomyozyten

Mehrere PKC Isoenzyme sind im Herzen präsent. Viele Gruppen fanden α , δ und ϵ Isoformen in neonatalen und adulten Kardiomyozyten. Uneinigkeit besteht über das Vorkommen der PKC β - Isoformen. Beide Genprodukte wurden in neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Andere Studien konnten PKC β nicht detektieren [69]. Prinzipiell dominieren die klassischen PKC in neonatalen und die nPKC in adulten Kardiomyozyten das Bild [71, 87]. Die Aktivität der klassischen PKC und speziell von PKC β 1 und 2 ist signifikant erhöht in humanen Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz [87], diabetischer Kardiomyopathie und kardialer Dysfunktion verschiedenster Ursachen [69].

In Kardiomyozyten der Maus führen hypertrophe Stimuli, z.Bsp. über α 1-adrenerge und G-Protein-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Dehnungsreize, zu ausgeprägter Hypertrophie der Myozyten. Gleiche Auswirkungen können in transgenen Mäusen, die PKC β 2 überexprimieren sowie nach Dauerstimulation mit Phorbolestern beobachtet werden [88]. Hiermit assoziiert ist außerdem die Inhibition der Genexpression der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), gezeigt in neonatalen Rattenkardiomyozyten, gefolgt von einer verminderten Calciumwiederaufnahme nach Ablauf eines Aktionspotentials [89] und dadurch Abnahme der Inotropie [90]. Für eine Beteiligung von PKC β 2 an Signalwegen zur Auslösung von Hypertrophie spricht auch die Expression von fetalen Genen wie β -MHC, alpha-Actin und ANF (Atrium natriuretischer Faktor) [71, 91, 92]. Diese Form der Hypertrophie wird mit pathologischen kardialen Prozessen in Zusammenhang gebracht, jedoch nicht mit physiologischen Anpassungsvorgängen im Herzen [93].

PKC β ist ebenso erhöht in Rattenkardiomyozyten nach Infarktinduktion [90]. Hierbei findet sich das gleiche Muster der Expression von fetalen Genen. Es zeigen sich aber Unterschiede in der Lokalisation von PKC β nach Aktivierung. In normoxischen Kardiomyozyten ist PKC β 2 assoziiert mit fibrillären Strukturen und nach Aktivierung erfolgt die Translokation zu perinukleären Membranstrukturen und in die Zellperipherie. Dabei steigt der PKC-Gehalt vornehmlich in der partikulierten Fraktion [69, 94]. In Kardiomyozyten nach Ischämieinduktion zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der PKC β sowohl im korpuskulären als auch im Zytosol des linken Ventrikels [90]. Dies könnte bedeuten, dass PKC β in normoxischen Zellen eine andere Funktion erfüllt als in der Akutphase der reaktiven Prozesse nach einem Infarktgeschehen.

6.2.3 Die Wechselwirkung zwischen p27^{KIP1} und PKC β 2

Eine Interaktion zwischen einer PKC und p27^{KIP1} ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Deshalb erfolgt zunächst die Betrachtung der strukturellen Bedingungen.

Die Bindungsstelle für p27^{KIP1} liegt, wie in 5.1.1.5 gezeigt, innerhalb der carboxyterminalen AS 630-673 von PKC β 2, also innerhalb des katalytischen Zentrums von PKC β 2. Proteinkinasen C phosphorylieren ihre Substrate. Während des Literaturstudiums erschließt sich Threonin 187 als bedeutende Phosphorylierungsstelle an p27^{KIP1}. Phosphorylierung an Thr187 ist eine Voraussetzung für die Degradation von p27^{KIP1}. Im Zellkern phosphorylieren cdk2/ZyklusinE-Komplexe in Vorbereitung des G1/S-Überganges den CKI an Thr187 und Serin10 [44, 49]. Im Zytoplasma beginnt der Abbau von p27^{KIP1} bereits am G0/G1-Übergang[95].

Wenn also p27^{KIP1} ein Substrat von PKC β 2 ist, könnte Thr187 eine potentielle Phosphorylierungsstelle an p27^{KIP1} für PKC β 2 sein. In den durchgeführten Kinaseassays konnte mit Hilfe des p27.T187A-Mutanten gezeigt werden, dass *in vitro* Thr187 eine Hauptphosphorylierungsstelle für PKC β 2 an p27^{KIP1} darstellt. In den wie in 5.1.2.2 beschriebenen Versuchen unter Einsatz von inaktivierter PKC β 2 und p27.T187A konnte dies auch *in vivo* in Kardiomyozyten bestätigt werden. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass PKC β 2 beteiligt ist an der Vorbereitung der Degradation von p27^{KIP1}. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse einer Arbeit mit Tamoxifen in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Dieser PKC-Inhibitor führt über den Anstieg von p27^{KIP1} zu einem Wachstumsarrest am G1/S Übergang [96]. Dies könnte bedeuten, dass durch Inhibition von PKC β 2 p27^{KIP1} nicht degradiert wurde. Allerdings ist Tamoxifen ein universeller PKC-Inhibitor. Somit könnte diese Wirkung auch im Zusammenspiel mit anderen PKC erzielt worden sein.

In vitro bindet p27^{KIP1}, wie in 5.1.1.5 gezeigt, PKCβ2 im Bereich seiner cdk-Bindungsdomäne, innerhalb der AS 1-86. Andere PKC, wie PKCα oder PKCε, waren nicht in solchen Komplexen nachweisbar. Dies warf die Frage auf, ob die Bindung an p27^{KIP1} die Funktion von PKCβ2 ähnlich beeinflusst wie die von cdk. Die Untersuchung der *in-vitro*-Kinaseaktivität von PKCβ2 unter Einsatz von verschiedenen p27^{KIP1}-Mutanten im Vergleich zu cdk2 zeigte, dass die Kinaseaktivität von PKCβ2 durch p27^{KIP1}-Mutanten mit intakter cdk-Bindungsstelle nahezu komplett inhibiert wird (siehe 5.1.2.3). Dies könnte bedeuten, p27^{KIP1} schützt sich durch Inhibition der Kinaseaktivität von PKCβ2 vor Phosphorylierung durch dieselbe.

Proteinkinasen C spielen eine Rolle in der Differenzierung von Kardiomyozyten. Dafür spricht der Fakt, dass die Gesamt-PKC-Aktivität, insbesondere von PKCβ, in der physiologischen Entwicklung zu adulten Kardiomyozyten herunterreguliert wird [97]. Zhou et al. beobachteten die Entwicklung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten. Der Grad der Differenzierung wurde charakterisiert durch das Vorliegen schlagender Anteile (Embryonic bodies). In den schlagenden Zellen war PKCβ komplett herunterreguliert. In Zellen, die mit einem PKC-Antagonisten behandelt wurden, gab es signifikant früher und häufiger schlagende Bezirke in den Zellen, als in der Kontrollgruppe [98]. In diesem Zusammenhang ließe sich die Interaktion von p27^{KIP1} und PKCβ2 als Schritt auf dem Weg zur Differenzierung der Kardiomyozyten deuten. Die hier verwendeten Kardiomyozyten stammen von vier Tage alten Ratten, d.h., dass davon auszugehen ist, dass bereits in einem Teil der Zellen die Differenzierungsprozesse begonnen haben.

6.3 Der p27^{KIP1}-RACK1-PKCβ2-Komplex

In den durchgeführten Immunpräzipitaten lag endogenes p27^{KIP1} aus neonatalen Rattenkardiomyozyten an PKCβ2 und RACK1 gebunden vor. Dies führte, ausgehend von der These RACK1 sorgt für die Koordination zwischen PKCβ2 und Substrat unter Bildung eines trimolekularen Komplexes [69, 70], zu dem Schluss, dass p27^{KIP1}, RACK1 und PKCβ2 in Kardiomyozyten in einem Komplex vorliegen.

Den gesammelten Aussagen zufolge könnte die Komplexierung zwei synergistische Funktionen abbilden. Durch Bindung von p27^{KIP1} wird die Kinaseaktivität von PKC gehemmt und damit die Differenzierung ermöglicht. Andererseits wird durch RACK1 die gleichzeitige Degradation von p27^{KIP1} durch PKCβ2 verhindert.

Da RACK1 und PKC hauptsächlich im Zytoplasma vorliegen, muss davon ausgegangen werden, dass sie hauptsächlich mit zytoplasmatischem p27^{KIP1} interagieren. PKC β 2 liegt in unstimulierten Kardiomyozyten an Elementen des Zytoskeletts und im Zytoplasma vor. Nach Stimulation befindet sich die Proteinkinase in der Zellperipherie und im perinucleären Raum [94]. Im Zytoplasma bindet p27^{KIP1} hauptsächlich an cdk4 und cdk6 und scheint hier essentiell notwendig für das Zusammentreten von Zyklin D und cdk-Kinasen. Dies belegen Beobachtungen in p27^{KIP1}/p21^{WAF1}-negativen Mausfibroblasten. Die untersuchten Zellen bildeten keine Zyklin-cdk-Komplexe und weniger Zyklin D [99]. Weiterhin waren diese p27^{KIP1}/p21^{WAF1}-negativen Fibroblasten nicht in der Lage Zyklin D, das normalerweise während G1 im Nucleus akkumuliert, aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu bringen. Da Zyklin D selbst keine NLS besitzt, könnte die Assoziation mit Mitgliedern der KIP-Familie dafür notwendig sein. Alle diese Effekte wurden durch exogen zugeführtes p27^{KIP1} und p21^{WAF1} aufgehoben [99].

In der Vorstellung verschiedener Autoren titrieren p21^{WAF1} und p27^{KIP1} ZyklinD-cdk-Komplexe und die freien Anteile setzen den inhibitorischen Reiz. Dissoziiert p27^{KIP1} von zytoplasmatischem cdk4 an nucleäres cdk2 wird der Zellzyklus angehalten. Wie schon erwähnt vermittelt die cdk-Bindungsdomäne von p27^{KIP1} auch die Interaktion mit PKC β 2. Dies könnte bedeuten, dass die Interaktion mit cdk nicht mehr möglich ist. Weiterhin bindet RACK1 p27^{KIP1} im Bereich der AS 97-186. Hier befindet sich neben T157 auch die NLS von p27^{KIP1}, deren Blockierung zur Verhinderung des Transportes in den Zellkern führen könnte. Damit könnte auch das Zusammentreten von Zyklin-cdk-Komplexen und der Transport von Zyklin D in den Zellkern unterbunden sein. Die Folge wäre ein Zellzyklusarrest. Andererseits könnte dies auch bedeuten, dass p27^{KIP1} nicht in den Kern gelangen kann, wo es cdk2/ZyklinE-Komplexe hemmt, um den Zellzyklus anzuhalten. Vielleicht stellt diese Interaktion eine Möglichkeit dar, die Teilung in neonatalen Zellen noch zu ermöglichen. Da in unseren Versuchen 4 Tage alte Rattenkardiomyozyten verwendet wurden, findet man in den Zellkulturen ein Mosaik aus unterschiedlich weit differenzierten Kardiomyozyten. Zur Klärung des Sachverhaltes wären vergleichende Versuche an frisch neonatalen und adulten Zellen notwendig.

Zusammenfassend konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass p27^{KIP1} *in vitro* und *in vivo* in neonatalen Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen in einem trimolekularen Komplex mit RACK1 und PKC β 2 vorliegt. Damit ist eine Verbindung zwischen Zellzykluskontrolle und der Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen nachgewiesen. Durch Bindung an RACK1 wird die Degradation von p27^{KIP1} verhindert. Dadurch kann p27^{KIP1} PKC β 2 inhibieren und könnte somit die Differenzierung von neonatalen Kardiomyozyten ermöglichen.

6.4 Der Einfluss von Hypoxie auf den p27^{KIP1}-RACK1-PKCβ2-Komplex

Während ischämischer Ereignisse verändern sich die molekularen Bedingungen in der Herzmuskelzelle. Durch Hydrolyse von ATP werden Wasserstoffionen freigesetzt. Der bestehende Sauerstoffmangel führt zu einer anaeroben Stoffwechsellage, CO₂ und Lactat kumuliert. Daraus folgt eine Azidose, welche letztendlich zu Apoptose im Infarktgebiet führt. Diese Apoptose erfolgt unabhängig vom p53/p21^{WAF1} Signalweg, wie in p53 Knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte. Sie betrifft nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch inflammatorische Zellen, wie Makrophagen und Leukozyten, Myofibroblasten und Endothelzellen im Infarktgebiet. Die Ausschüttung von Zytokinen und Proteasen, die Blutdruckerhöhung über Angiotensin II Freisetzung und die verminderte Gefäßversorgung führen in einer konzertierten Aktion zu Apoptose [100]. Dieser folgt weitgehend Nekrose. Kurz nach dem ischämischen Ereignis findet man in Kardiomyozyten zu 80% Apoptose und 20% Necrose [101].

Es konnte hier gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten der Proteingehalt von RACK1 und p27^{KIP1} unter hypoxischen Bedingungen nach 4 bis 8 Stunden abnimmt. Die Überexprimierung von Wildtyp RACK1 oder des Mutanten mit intakter p27^{KIP1} Bindungsstelle konnte diesen Effekt verhindern und hielt den Proteingehalt von p27^{KIP1} über die gesamte Beobachtungsdauer von 24h konstant. Eine durch einen Myokardinfarkt erzeugte Hypoxie in Kardiomyozyten führt unter anderem zu einer Aktivierung von cdk2 [23]. Ausgelöst wird dieser Vorgang durch die Herabregulation von p27^{KIP1}. Dadurch werden cdk2/3-Zyclin-Komplexe in die Lage versetzt über Aktivierung von pRb und Freisetzung von E2F1 proapoptotische Gene zu aktivieren [102]. Agah und Kishenbaum zeigten, dass exogen eingebrachtes E2F in adulten Kardiomyozyten zur Induktion von cdk4 und cdc2, gefolgt von DNA-Synthese, aber im gleichen Atemzug zu Apoptose führt [103].

Interessanterweise beeinflusst RACK1 die Expression und Phosphotransferaseaktivität von cdk2/3 in hypoxischen Kardiomyozyten. Wie gezeigt inhibiert exogen expressiertes wt.RACK1 und mt.RACK1 mit intakter Bindungsstelle für p27^{KIP1} suffizient die Induktion der Kinaseaktivität, gemessen in anti-cdk2/3-Immunkomplexen. Eine direkte Bindung RACK1 an cdk2/3 konnte in Koimmunopräzipitationen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In zwei weiteren aktuellen Studien zu RACK1 kann eine Beziehung zur Apoptoseregulation hergestellt werden. So inhibierte RACK1 in T-Zellen Apoptose nach verschiedensten Stimuli [104] und in Ovarial- und Brustkrebszellen sogar über die Regulation der Degradation von Bim EL [105]. Dies unterstützt die These, dass RACK1 über Stabilisierung von p27^{KIP1} zur Inhibition von Apoptose in hypoxischen Kardiomyozyten führen kann.

Dies steht im Einklang mit der Notwendigkeit das Herz wegen seiner geringen Regenerationsfähigkeit vor zu schnell eintretenden oder zahlreichen Zellverlusten zu schützen. Aufgrund der Lokalisation von RACK1 und PKC β 2 ist wie erwähnt anzunehmen, dass sich diese Interaktion mit zytoplasmatischem p27^{KIP1} abspielt und somit keinen Rückschluss auf die Funktion nucleärer Anteile des cdk-Inhibitors zulässt. Dies erfordert weitere Untersuchungen. So geben diese Untersuchungen jedoch Anlass zytoplasmatischem p27^{KIP1} eine separate Funktion unabhängig von der Zellzyklusregulation zuzuordnen. Ähnliches erschloss sich Ishi und Fujishiro bei Untersuchungen an Zellen eines Adenocarcinoms der Lunge. Hier findet sich p27^{KIP1} hauptsächlich im Zytoplasma. Überexpression von p27^{KIP1} führte zu Inhibition von Zellwachstum und schützte die Zelle vor Apoptose. Die Neutralisation von endogenem p27^{KIP1} führte zu Zelluntergang ohne den Zellzyklusstatus zu verändern. Die Autoren schlussfolgerten, dass durch Verbleiben von p27^{KIP1} im Zytoplasma der inhibitorische Effekt im Nucleus verhindert wird und dies eine neue antiapoptotische Funktion ermöglicht [106]. Inwieweit diese antiapoptotische Funktion wirklich unabhängig von nucleärem p27^{KIP1} ist, bleibt fraglich, bilden doch die nucleären und zytoplasmatischen Anteile von p27^{KIP1} *in vivo* ein zusammenhängendes System. Die hier durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit Ganzzellextrakten neonataler Rattenkardiomyozyten. Aufschluss über diese Frage kann nur eine erneute Durchführung der Versuche in Zytoplasma- und Zellkernextrakten geben.

Ebenfalls fügen sich die Ergebnisse der Arbeit von Bowmann und Steinberg in neonatalen Kardiomyozyten in transgenen Mäusen in das Bild einer Komplexbildung von RACK1, p27^{KIP1} und PKC β 2. Überexpression von PKC β führte in neonatalen Zellen zu plötzlichem Zelltod [107]. So könnte dies bedeuten, dass PKC β durch Degradation von p27^{KIP1} zu Apoptose führt.

6.5 Ausblick

In Kardiomyozyten scheint der p27^{KIP1}-PKC β 2-RACK1-Komplex nach hypoxischer Schädigung der Zelle eine neue Schaltstelle zwischen Zellhypertrophie und Apoptose zu bilden. Eine Überwindung des G1-Arrestes und damit die Auslösung von Synthese, gefolgt von vollständiger Zellteilung, kann über diesen Weg nicht erreicht werden.

Therapeutisch bietet sich hiermit aber ein Ansatzpunkt zur Verhinderung, bzw. Eindämmung des Verlustes an Kardiomyozyten nach Infarkt durch Apoptose. Möglichkeiten zum Einsatz sind vorstellbar in der medikamentösen Intervention direkt nach Infarkt. Auch eine Verlängerung der Ischämiezeit, z. Bsp. bis zum Einsatz eines Herzkatheters, könnte so erreicht werden. Durch In-

hibition der PKC β 2 könnte Remodeling und Hypertrophie eingedämmt und so Langzeitfolgen, insbesondere zunehmende Herzinsuffizienz, verringert oder verhindert werden. Eine ganz praktische Ansatzstelle ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass sowohl im Herzinfarkt, als auch bei Überexpression von PKC β eine Absenkung der Inotropie durch Inhibition der SERCA entsteht. Dieser Prozess kann durch RACK1 und p27^{KIP1} vielleicht hinausgezögert, wenn nicht sogar verhindert werden. So könnte medikamentös eine akute Herzinsuffizienz stabilisiert werden. Bei Hochrisikopatienten wäre sogar eine prophylaktische Anwendung denkbar.

Durch die Ubiquität beider Kinasen im menschlichen Körper steht jedoch immer die Frage der Realisierbarkeit einer organspezifischen Wirkung von Medikamenten. Gefordert ist eine herzspezifische Therapie, welche entweder lokal oder durch eine entsprechend „verschlüsselte“ orale Darreichungsform appliziert werden kann, um lebenswichtige Funktionen anderer Organe nicht zu beeinflussen.

7 Zusammenfassung

Die mangelnde Regenerationsfähigkeit des Herzens ist der Grund dafür, dass trotz Erfolgen in der Primärprävention und Akutbehandlung des Herzinfarktes die Lebensdauer und –qualität eines großen Teils betroffener Patienten stark eingeschränkt ist. Die Stimulation adulter Kardiomyozyten zur Teilung könnte zum Ersatz des entstandenen Gewebsdefektes mit voll funktionstüchtigem Herzmuskelgewebe führen. In vielen Zellgeweben steuert p27^{KIP1} als cdk-Inhibitor unter anderem die Regulation des Zellzyklusstopps in der G1-Phase. Da cdk im adulten Herzen herunterreguliert sind, stellte sich die Frage, ob alternative Bindungspartner außerhalb der Gruppe der cdk in Kardiomyocyten detektierbar sind. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems kann in dieser Arbeit erstmals mit RACK1 ein neuer Interaktionspartner von p27^{KIP1} in Herzmuskelzellen präsentiert werden.

RACK1 ist bekannt als Anker-und Shuttle-Protein für PKC β 2. In den vorliegenden Versuchen mit vier Tage alten, neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde erstmals gezeigt, dass p27^{KIP1}, RACK1 und PKC β 2 *in vitro* und *in vivo* in normoxischen Kardiomyocyten in einem trimolekularen Komplex vorliegen. Dabei verhindert RACK1 durch Bindung an p27^{KIP1} dessen Degradation durch PKC β 2. Dadurch wird vermutlich zytoplasmatisches p27^{KIP1} heraufreguliert und die nucleäre Inhibition von cdk2 verhindert. An der Schwelle zur Differenzierung kann dies eine teilungsermöglichende Funktion in neonatalen Zellen von RACK1 aufzeigen. Dem entgegen steht, dass die Kinaseaktivität von PKC β 2 durch Bindung von p27^{KIP1} gehemmt wird und dadurch die Differenzierung der Kardiomyozyten ermöglicht. Eine erneute vergleichende Untersuchung in neonatalen und adulten Zellen wäre für weiterführende Aussagen notwendig. In jedem Fall ist durch Nachweis der Koordinierung von p27^{KIP1} und PKC β 2 durch RACK1 eine Verbindung zwischen der Zellzykluskontrolle und der Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen nachgewiesen.

Die hier gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass unter hypoxischen Bedingungen RACK1 zytoplasmatisches p27^{KIP1} stabilisiert, indem es die Degradation durch PKC β 2 verhindert. Somit wird der apoptoseauslösende Abfall von p27^{KIP1} verhindert. Dies könnte dazu führen, dass die Kardiomyozyten vor Zelluntergang bei einer Ischämie, ausgelöst z.Bsp. durch Infarkt, geschützt werden. Von zukünftigem Interesse ist dabei die Frage, ob und an welchem Zeitpunkt in der postischämischen Periode eine Auflösung der Komplexierung erfolgt. Vorstellbar ist, dass

PKC β 2 in der reaktiven Hypertrophie im Rahmen des Remodeling eine Rolle übernimmt. Es ist außerdem möglich, dass PKC β 2 während einer Hypoxie eine bisher unbekannte Rolle zufällt. Dafür spricht die Translokation in andere Zellkompartimente nach Aktivierung im Vergleich zu normoxischen Kardiomyozyten [90].

Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der Entdeckung der bisher unbekanntenen Interaktion von p27^{KIP1}, RACK1 und PKC β 2 in normoxischen und hypoxischen neonatalen Kardiomyozyten. Inwieweit diese Interaktion eine Rolle in der Zellzyklusregulation durch p27^{KIP1} in seiner Funktion als CKI spielt, oder eine völlig neue eigenständige Funktion von p27^{KIP1} z.Bsp. in der Apoptoseinhibition unter hypoxischen Bedingungen in Kardiomyozyten darstellt, erfordert weitere Nachforschungen.

Das Vorliegen dieses Komplexes in neonatalen Kardiomyozyten und während der Akutphase der reaktiven Prozesse nach einem Infarktgeschehen kann als Knotenpunkt verschiedenster Signalwege verstanden werden. Die Interaktion zwischen RACK1, p27^{KIP1} und PKC β 2 könnte eine Schaltstelle der Zelle abbilden, welche der Ausbalancierung der Zelle zwischen Wachstum und Hypertrophie auf der einen und dem Zelltod auf der anderen Seite dienen.

Durch medikamentöse Stabilisierung dieses Komplexes könnte eine Eindämmung der Apoptose und eine positive Beeinflussung der Inotropie am Herzen nach Infarkt erreicht werden. Dazu bedarf es jedoch sicher noch weiterführender Untersuchungen.

8 Akürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol
AD	Aktivierungsdomäne
ANF	Atrium natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumperoxodiulfat
Aqua dest	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BD	Bindungsdomäne
BLAST	engl.: Basic Local Alignment Search Tool, Software-Sammlung
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	Zyclin (engl.: cyclin) aktivierende Kinase
CDK	Zyclin abhängige (engl.: dependent) Kinase
CKI	Zyclin- Kinase- Inhibitor
Cyh	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DFX	Desferrioxamin
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorfröhrchen
FKS	Fetales Kälberserum
GST	Glutathion S-Transferase
HA	Haemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxieinduzierte Faktoren
His	Histidin
HRP	Meerrettich (engl.: Horse Radish) Peroxidase
IGF	engl.: insulin-like growth factor, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	engl.: lysogeny broth
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumazetat
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
MONICA	engl.: monitoring cardiovascular disease
NES	Nucleäre Exportsequenz
NLS	Nucleäre Lokalisationssequenz
NTP	Nukleosidtriphosphat

ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	(engl.: phosphate buffered saline) Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDGF	engl.: platelet derived growth factor, von Blutplättchen freigesetzter Wachstumsfaktor
PIP	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Miristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastoma Protein
PS	Phosphatidylserin
RACK	Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	Skp1/Cul1/F-Box-Protein
SD	Synthetisches Auswahlmedium (engl.: synthetic dropout)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SERCA	Sarcoplasmische-Endoplasmische-Retikulum-Calcium-ATPase
TBE	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor

tPA	Gewebespezifischer (engl.: tissue-type) Plasminogenaktivator
TPA	Tetradecanol-Phenylazetat
TRIS	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRP	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
TUNEL	engl.: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WB	Westernblot
z.Bsp.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Destatis, *Todesursachenstatistik 2007*. Pressemitteilung Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2008.
2. Chambless, L., U. Keil, A. Dobson et al., *Population versus clinical view of case fatality from acute coronary heart disease: results from the WHO MONICA Project 1985-1990. Multinational MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*. Circulation, 1997. **96**(11): p. 3849-59.
3. Thefeld, W., *Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypcholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung* Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2000. **43**: p. 415-423.
4. Wiesner, G., J. Grimm und E. Bittner, *Vorausberechnungen des Herzinfarktgeschehens in Deutschland. Zur Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz bis zum Jahre 2050*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2002. **45**: p. 438-445.
5. Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
6. Anversa, P. und J. Kajstura, *Myocyte cell death in the diseased heart*, in *Circ Res*. 1998. p. 1231-3.
7. Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq et al., *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage*, in *Oncogene*. 1999. p. 7719-30.
8. Nadal-Ginard, B., J. Kajstura, A. Leri et al., *Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure*, in *Circ Res*. 2003. p. 139-50.
9. Hiranandani, N., T. Bupha-Intr und P.M. Janssen, *SERCA overexpression reduces hydroxyl radical injury in murine myocardium*, in *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006. p. H3130-5.
10. Li, F., X. Wang, J.M. Capasso et al., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*, in *J Mol Cell Cardiol*. 1996. p. 1737-46.
11. Poolman, R.A., R. Gilchrist und G. Brooks, *Cell cycle profiles and expressions of p21CIP1 AND P27KIP1 during myocyte development*, in *Int J Cardiol*. 1998. p. 133-42.
12. Kang, M.J. und G.Y. Koh, *Differential and dramatic changes of cyclin-dependent kinase activities in cardiomyocytes during the neonatal period*, in *J Mol Cell Cardiol*. 1997. p. 1767-77.
13. Pasumarthi, K.B. und L.J. Field, *Cardiomyocyte cell cycle regulation*, in *Circ Res*. 2002. p. 1044-54.
14. Anversa, P., T. Palackal, E.H. Sonnenblick et al., *Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart*, in *J Clin Invest*. 1990. p. 994-7.
15. Olivetti, G., R. Ricci und P. Anversa, *Hyperplasia of myocyte nuclei in long-term cardiac hypertrophy in rats*, in *J Clin Invest*. 1987. p. 1818-21.
16. Lewin, B., ed. *Genes VI* 1997, Oxford University Press. 1280.

17. Zetterberg, A., O. Larsson und K.G. Wiman, *What is the restriction point?* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 835-42.
18. Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation.* Science, 1989. **246**(4930): p. 603-8.
19. Temin, H.M., *Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells.* J Cell Physiol, 1971. **78**(2): p. 161-70.
20. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.* Science, 1996. **274**(5293): p. 1664-72.
21. Brooks, G., R.A. Poolman und J.M. Li, *Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors,* in Cardiovasc Res. 1998. p. 301-11.
22. Capasso, J.M., S. Bruno, W. Cheng et al., *Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats,* in Circ Res. 1992. p. 1379-89.
23. Reiss, K., W. Cheng, A. Giordano et al., *Myocardial Infarction Is Coupled with the Activation of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Myocytes,* in Exp Cell Res. 1996. p. 44-54.
24. Reiss, K., W. Cheng, A. Giordano et al., *Myocardial Infarction Is Coupled with the Activation of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Myocytes.* Exp Cell Res, 1996. **225**(1): p. 44-54.
25. Lees, E., *Cyclin dependent kinase regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 773-80.
26. Sherr, C.J., *G1 phase progression: cycling on cue.* Cell, 1994. **79**(4): p. 551-5.
27. Sherr, C.J. und J.M. Roberts, *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.* Genes Dev, 1995. **9**(10): p. 1149-63.
28. Lammer, C., S. Wagerer, R. Saffrich et al., *The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 16)**: p. 2445-53.
29. Nevins, J.R., *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins.* Science, 1992. **258**(5081): p. 424-9.
30. Koh, K.N., M.J. Kang, A. Frith-Terhune et al., *Persistent and heterogenous expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27KIP1, in rat hearts during development,* in J Mol Cell Cardiol. 1998. p. 463-74.
31. Xiong, Y., H. Zhang und D. Beach, *D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA.* Cell, 1992. **71**(3): p. 505-14.
32. Harper, J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(4): p. 387-400.
33. Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zhang et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.* Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
34. el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
35. Dulic, V., G.H. Stein, D.F. Far et al., *Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 546-57.
36. Berndt, N., *Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number.* Front Biosci, 1999. **4**: p. D22-42.

37. Martin-Caballero, J., J.M. Flores, P. Garcia-Palencia et al., *Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6234-8.
38. Reynisdottir, I., K. Polyak, A. Iavarone et al., *Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta*. *Genes Dev*, 1995. **9**(15): p. 1831-45.
39. Slingerland, J.M., L. Hengst, C.H. Pan et al., *A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(6): p. 3683-94.
40. Kato, J.Y., M. Matsuoka, K. Polyak et al., *Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation*. *Cell*, 1994. **79**(3): p. 487-96.
41. Pagano, M., S.W. Tam, A.M. Theodoras et al., *Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. *Science*, 1995. **269**(5224): p. 682-5.
42. Jin, J. und J.W. Harper, *RING finger specificity in SCF-driven protein destruction*. *Dev Cell*, 2002. **2**(6): p. 685-7.
43. Tsvetkov, L.M., K.H. Yeh, S.J. Lee et al., *p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27*. *Curr Biol*, 1999. **9**(12): p. 661-4.
44. Amati, B. und J. Vlach, *Kip1 meets SKP2: new links in cell-cycle control*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(4): p. E91-3.
45. Boehm, M., T. Yoshimoto, M.F. Crook et al., *A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression*. *Embo J*, 2002. **21**(13): p. 3390-401.
46. Tomoda, K., Y. Kubota und J. Kato, *Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1*. *Nature*, 1999. **398**(6723): p. 160-5.
47. Carrano, A.C., E. Eytan, A. Hershko et al., *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(4): p. 193-9.
48. Sutterluty, H., E. Chatelain, A. Marti et al., *p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(4): p. 207-14.
49. Reed, S.I., *Cell cycling? Check your brakes*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(8): p. E199-201.
50. Hara, T., T. Kamura, K. Nakayama et al., *Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(52): p. 48937-43.
51. Kamura, T., T. Hara, M. Matsumoto et al., *Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(12): p. 1229-35.
52. Cheng, M., V. Sexl, C.J. Sherr et al., *Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(3): p. 1091-6.
53. Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane et al., *Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors*. *Cell*, 1996. **85**(5): p. 707-20.

54. Poolman, R.A., J.M. Li, B. Durand et al., *Altered expression of cell cycle proteins and prolonged duration of cardiac myocyte hyperplasia in p27KIP1 knockout mice*. *Circ Res*, 1999. **85**(2): p. 117-27.
55. Shin, I., F.M. Yakes, F. Rojo et al., *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. *Nat Med*, 2002. **8**(10): p. 1145-52.
56. Zhang, Q., L. Tian, A. Mansouri et al., *Inducible expression of a degradation-resistant form of p27Kip1 causes growth arrest and apoptosis in breast cancer cells*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(18): p. 3932-40.
57. Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli et al., *PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest*. *Nat Med*, 2002. **8**(10): p. 1153-60.
58. Viglietto, G., M.L. Motti, P. Bruni et al., *Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*. *Nat Med*, 2002. **8**(10): p. 1136-44.
59. Katayose, Y., M. Kim, A.N. Rakkar et al., *Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. *Cancer Res*, 1997. **57**(24): p. 5441-5.
60. Eymin, B., M. Haugg, N. Droin et al., *p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(7): p. 1411-8.
61. Kiyokawa, H., R.D. Kineman, K.O. Manova-Todorova et al., *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)*. *Cell*, 1996. **85**(5): p. 721-32.
62. Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz et al., *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(21): p. 9578-82.
63. Fields, S. und O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. *Nature*, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
64. Fields, S. und R. Sternglanz, *The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions*. *Trends Genet*, 1994. **10**(8): p. 286-92.
65. Wilson, T.E., K.A. Padgett, M. Johnston et al., *A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 9186-90.
66. Iwabuchi, K., B. Li, P. Bartel et al., *Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization*. *Oncogene*, 1993. **8**(6): p. 1693-6.
67. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
68. Ron, D., Z. Jiang, L. Yao et al., *Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 27039-46.
69. Mackay, K. und D. Mochly-Rosen, *Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(7): p. 1301-7.
70. Ron, D. und D. Mochly-Rosen, *An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(2): p. 492-6.

71. Steinberg, S.F., M. Goldberg und V.O. Rybin, *Protein kinase C isoform diversity in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 141-53.
72. Ivan, M., K. Kondo, H. Yang et al., *HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
73. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
74. Ron, D., C.H. Chen, J. Caldwell et al., *Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 839-43.
75. Schechtman, D. und D. Mochly-Rosen, *Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6339-47.
76. Takagaki, Y. und J.L. Manley, *A human polyadenylation factor is a G protein beta-subunit homologue*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 23471-4.
77. Stebbins, E.G. und D. Mochly-Rosen, *Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 29644-50.
78. Yarwood, S.J., M.R. Steele, G. Scotland et al., *The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14909-17.
79. Hermanto, U., C.S. Zong, W. Li et al., *RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(7): p. 2345-65.
80. Mamidipudi, V., J. Zhang, K.C. Lee et al., *RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(15): p. 6788-98.
81. Kanashiro, C.A. und R.A. Khalil, *Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1998. **25**(12): p. 974-85.
82. Mellor, H. und P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332** (Pt 2): p. 281-92.
83. Ron, D., J. Luo und D. Mochly-Rosen, *C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24180-7.
84. Buchner, K., *The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signaling to the cell nucleus*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(1): p. 1-11.
85. Kaibuchi, K., Y. Takai, M. Sawamura et al., *Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation*. J Biol Chem, 1983. **258**(11): p. 6701-4.
86. Gowdy, P.M., H.J. Anderson und M. Roberge, *Entry into mitosis without Cdc2 kinase activation*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 22): p. 3401-10.
87. Bowling, N., R.A. Walsh, G. Song et al., *Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 384-91.
88. Simpson, P.C., *Beta-protein kinase C and hypertrophic signaling in human heart failure*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 334-7.

89. Hartong, R., F.J. Villarreal, F. Giordano et al., *Phorbol myristate acetate-induced hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes is associated with decreased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) gene expression and calcium reuptake*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(12): p. 2467-77.
90. Wang, J., X. Liu, E. Sentex et al., *Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2277-87.
91. Kariya, K., L.R. Karns und P.C. Simpson, *Expression of a constitutively activated mutant of the beta-isozyme of protein kinase C in cardiac myocytes stimulates the promoter of the beta-myosin heavy chain isogene*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10023-6.
92. Wakasaki, H., D. Koya, F.J. Schoen et al., *Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9320-5.
93. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2007. **49**(5): p. 962-70.
94. Mochly-Rosen, D., *Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction*. Science, 1995. **268**(5208): p. 247-51.
95. Tamamori-Adachi, M., K. Hayashida, K. Nobori et al., *Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50429-36.
96. Mercier, I., S. Mader und A. Calderone, *Tamoxifen and ICI 182,780 negatively influenced cardiac cell growth via an estrogen receptor-independent mechanism*, in Cardiovasc Res. 2003. p. 883-92.
97. Schreiber, K.L., L. Paquet, B.G. Allen et al., *Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(5): p. H2062-71.
98. Zhou, X., E. Quann und G.I. Gallicano, *Differentiation of nonbeating embryonic stem cells into beating cardiomyocytes is dependent on downregulation of PKC beta and zeta in concert with upregulation of PKC epsilon*. Dev Biol, 2003. **255**(2): p. 407-22.
99. Cheng, M., P. Olivier, J.A. Diehl et al., *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts*. Embo J, 1999. **18**(6): p. 1571-83.
100. Anversa, P. und J. Kajstura, *Myocyte cell death in the diseased heart*. Circ Res, 1998. **82**(11): p. 1231-3.
101. Nadal-Ginard, B., J. Kajstura, A. Leri et al., *Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure*. Circ Res, 2003. **92**(2): p. 139-50.
102. Hauck, L., R.G. Kaba, M. Lipp et al., *Regulation of E2F1-dependent gene transcription and apoptosis by the ETS-related transcription factor GABPgamma1*, in Mol Cell Biol. 2002. p. 2147-58.
103. Agah, R., L.A. Kirshenbaum, M. Abdellatif et al., *Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo*, in J Clin Invest. 1997. p. 2722-8.

104. Mourtada-Maarabouni, M., L. Kirkham, F. Farzaneh et al., *Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 503-14.
105. Zhang, W., G.Z. Cheng, J. Gong et al., *RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16416-26.
106. Ishii, T., M. Fujishiro, M. Masuda et al., *Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 665-70.
107. Bowman, J.C., S.F. Steinberg, T. Jiang et al., *Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2189-95.

10 Lebenslauf

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

11 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr.med.von Harsdorf (Universität von Toronto, Robert McEwen Chair, Toronto General Research Institute) für die Unterstützung meiner Arbeit und die Überlassung des Dissertationshemas.

Ich danke Herrn PD Dr.med.Bergmann für die unkomplizierte Übernahme der Doktorvaterschaft und die Betreuung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ludger Hauck für die hervorragende und geduldige Anleitung und Betreuung meiner Arbeit. Er stand mit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Ich danke Frau Marlies Grieben und Herrn Felix Engel für viele praktische Tips während der Laborarbeit. In besonderer Erinnerung bleiben mir die aufbauenden und befruchtenden Gespräche, auch mit Mitarbeitern anderer Arbeitsgruppen, auf unserem Pausenflur.

Ich danke Jens Rohne für die moralische Unterstützung während meiner Laborarbeit und Sven Kretschmann für zahlreiche technische wie auch seelische Notfalleinsätze.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung meiner Arbeit und die Möglichkeit, in einer Forschungsgruppe zu arbeiten.

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift zum Thema „RACK1 – ein neuer Interaktionspartner von p27^{KIP1} in normoxischen und hypoxischen Kardiomyozyten“ selbstständig und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter angefertigt habe. Diese Arbeit stellt nicht, auch nicht in Teilen, eine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sind vollständig angegeben. Ich habe und hatte kein Promotionsverfahren an anderer Stelle beantragt.

Ninette Pustkowski

Berlin, den 10.08.09