

Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Matthias Grimmler

München, 2. Oktober 2002

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01.07.1998 bis zum 02.10.2002 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ durchgeführt.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Max-Planck-Gesellschaft, der Regierung von Oberbayern und der Firma Roche finanziert.

Referent: Prof. Dr. Walter Schartau

Koreferent: Prof. Dr. Hugo Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 2003

Meinen Eltern

Man ging ferner davon aus,
daß die Naturgesetze,
erst einmal entdeckt,
auch begreifbar sein würden.
Dieser Optimismus der
Griechen ist der Menschheit
auch später nie ganz
abhanden gekommen.

Isaak Asimov

*Die exakten Geheimnisse
unserer Welt*

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	12
2	EINLEITUNG.....	14
2.1	Prinzipien des eukaryontischen Zellzyklus	14
2.2	Cyclin-abhängige Kinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation.....	16
2.3	Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt durch verschiedene Mechanismen....	18
2.3.1	Die Regulation der Cyclinuntereinheit der CDKs	19
2.3.2	Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen.....	20
2.3.3	Die Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen.....	22
2.3.3.1	Die INK4-Familie.....	22
2.3.3.2	Die Cip/Kip-Familie.....	23
2.4	Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors p21 ^{Cip1}	25
2.5	Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors p27 ^{Kip1}	27
2.6	Aufgabenstellung	30
3	MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1	Material	31
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	31
3.1.1.1	Radiochemikalien	31
3.1.1.2	Materialien zur Filtration und Dialyse.....	31
3.1.1.3	Chromatographische Matrices und fertig gepackte Chromatographiesäulen	32
3.1.1.4	Molekulargewichts- und Längenstandards	32
3.1.1.5	Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)... ..	32
3.1.1.6	Verbrauchsmaterial	33
3.1.2	Puffer und Lösungen	34
3.1.3	Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur	36
3.1.3.1	Medienbestandteile und Medienzusätze	36
3.1.3.2	Medienzusammensetzung	37
3.1.4	Medien für die Bakterienkultur.....	37
3.1.5	Antikörper.....	38
3.1.6	Enzyme	40

3.1.7	DNA-Oligonukleotide	40
3.1.8	Plasmide.....	42
3.1.9	Bakterienstämme	42
3.1.10	Eukaryontische Zelllinien	42
3.2	Molekularbiologische Methoden	43
3.2.1	Nukleinsäure-Fällung	43
3.2.2	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	43
3.2.3	Präparation von Plasmid-DNA	43
3.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
3.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) .	44
3.2.6	Glätten überhängender DNA-Enden.....	45
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
3.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	45
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	46
3.2.10	Gerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese.....	46
3.2.11	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	47
3.2.12	Transformation kompetenter Bakterien.....	47
3.2.13	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	47
3.3	Zellbiologische Methoden.....	48
3.3.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	48
3.3.2	Kultivierung von Insektenzellen	48
3.3.3	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen	49
3.3.4	Synchronisation von Gewebekulturzellen	50
3.3.5	Durchflußzytofluorimetrie (FACS-Analyse)	50
3.3.6	Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen.....	51
3.3.7	Echtzeit-Mikroskopie und Mikroinjektion	52
3.4	Biochemische Methoden	53
3.4.1	Grundlegende Standardmethoden.....	53
3.4.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	53
3.4.1.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
3.4.1.3	Coomassiefärbung von Proteingelen	54
3.4.1.4	Silberfärbung von Proteingelen	54
3.4.1.5	Autoradiographie von Elektrophoresegelen	54

3.4.2	Immunologische und immunobiochemische Methoden	55
3.4.2.1	Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern	55
3.4.2.2	Immunopräzipitation von Proteinen	56
3.4.2.3	Immunozytologie.....	56
3.4.2.4	Herstellung von Antisera und Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	57
3.4.3	2-Dimensionale Gelelektrophorese.....	57
3.4.4	Präparation von Gesamt-Zellysaten.....	58
3.4.5	Metabolische Markierung von Gewebekulturzellen mit [³² P]- <i>ortho</i> -Phosphat und dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phosphoaminosäuren	59
3.4.6	Gekoppelte <i>in-vitro</i> -Transkription und -Translation von Proteinen.....	60
3.4.7	Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins durch metabolische Markierung mit [³⁵ S]-Methionin und [³⁵ S]-Cystein (Pulse-Chase)	61
3.4.8	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	62
3.4.9	Native und denaturierende Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen, Renaturierung von Proteinen	62
3.4.10	Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration	65
3.4.11	Reinigung der Cip/Kip-Proteine durch Kochen und Stabilisierung von Proteinen	66
3.4.12	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Insektenzellen	67
3.4.13	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von Proteinen	67
3.4.14	<i>In vitro</i> -Protein-Protein-Bindungsstudien	69
3.4.15	Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF.....	69

4 ERGEBNISSE 70

4.1	Erzeugung und Charakterisierung einer CDK- und Cyclin-bindungsdefizienten Mutante von p27	70
4.2	Identifikation neuer Bindungspartner von p27.....	71
4.2.1	Die Interaktion von p27 mit Hitzeschockproteinen	73
4.2.2	Die Interaktion von p27 mit FBX3 und p19 ^{SKP1}	75
4.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen Grb2 und p27.....	80
4.3.1	p27 bindet spezifisch Grb2	80
4.3.2	Charakterisierung der SH3-Bindedomäne in p27	81
4.3.3	p27 interagiert mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2	83
4.3.4	Die Interaktion zwischen Grb2 und p27 hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Kinaseinhibitors p27	84
4.3.5	Die Interaktion zwischen Grb2 und p27 <i>in vivo</i>	86

4.4	Biochemische Analyse der Bindung verschiedener isolierter SH3-Domänen mit p27.....	89
4.4.1	Die Interaktion von p27 mit der Tyrosinkinase Lyn.....	89
4.5	Die Tyrosinphosphorylierung von p27	92
4.5.1	p27 und p21 werden <i>in vivo</i> an Tyrosin phosphoryliert	92
4.5.2	Spezifität der Tyrosinphosphorylierung	99
4.5.3	Identifikation der phosphorylierbaren Tyrosine in p27 und p21	102
4.5.4	Charakterisierung der Bindung von tyrosinphosphoryliertem p27 an den CDK2/Cyclin A-Komplex	104
4.5.5	Änderung der inhibitorischen Aktivität von an Tyrosin phosphoryliertem p27	106
4.5.6	Tyrosinphosphoryliertes p27 wird verstärkt an Threonin 187 phosphoryliert	108
4.5.7	p27 wird nicht an Tyrosinresten phosphoryliert, wenn es an den CDK2/Cyclin A-Komplex gebunden vorliegt.....	110
4.5.8	Mechanismus der Bindung und Phosphorylierung von p27 durch die Tyrosinkinase Lyn.....	111
4.5.9	Die Modifikation von p27 an Tyrosin 88 oder 89 inaktiviert und destabilisiert p27 <i>in vivo</i>	113
4.5.10	Charakterisierung von verschiedenen mutierten Formen von p27	116
5	DISKUSSION	119
5.1	Identifikation neuer Interaktionspartner von p27.....	119
5.1.1	Die Wechselwirkung von p27 mit Hitzeschockproteinen (Chaperonen)	121
5.1.2	FBX3 - eine neue, für p27 spezifische E3-Ligase?.....	122
5.1.3	Eine Verbindung zwischen Zellzyklus und Signaltransduktion	124
5.1.3.1	Die Interaktion zwischen p27 und Grb2.....	124
5.1.3.2	Die Interaktion von p27 mit Grf40 und Lyn	127
5.2	Die Tyrosinphosphorylierung von p27	132
6	LITERATUR	145

Abkürzungen

A	Ampere
A	Adenin, im Zusammenhang mit DNA
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	„copy“-DNA
CIAP	engl.: calf intestinal alkaline phosphatase
Ci	Curie
cpm	Zählereignisse pro Minute
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethan
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
ddH ₂ O	hochreines Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	engl.: Dulbecco' s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	Escherichia
ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	engl.: expressed sequence tag
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FPLC	engl.: fast protein liquid chromatography
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	engl.: high pressure liquid chromatography
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid
IRES	interne Ribosomenbindestelle
k-	Kilo-
KAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m-	Milli-
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

n-	Nano-
N-Terminus	Aminoterminus
NaAc	Natriumacetat
NP-40	Nonidet P-40, nichtionisches Detergens
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p-	Piko-
³² P	radioaktives Phosphorisotop der Massenzahl 32
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches (engl.: inorganic) Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	Reaktionspuffer
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop der Massenzahl 35
S.	Saccharomyces
SB	Superbroth-Bakterienmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
v/v	engl.: volume per volume
w/v	engl.: weight per volume
U	Uracil
5'UTR	5'-untranslatierte Region
3'UTR	3'-untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Abkürzungen der Gene und ihrer Produkte

Abl	engl.: v-abl Abelson murine leukemia viral oncogen homolog 1
c-	zelluläre Form
CAK	CDK-aktivierende Kinase
Cdc	engl.: cell division cycle
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Cip1	engl.: CDK-interacting protein 1
CKI	CDK-Inhibitor
myc	engl.: v- <i>myc</i> avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
GFP	engl.: green fluorescent protein
Grb2	engl.: growth factor receptor-bound protein 2
Grf40	engl.: Grb2 family member of 40 kDa
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
INK	engl.: inhibitor of CDK4
Kip1	engl.: kinase-inhibitory protein 1
Kip2	engl.: kinase-inhibitory protein 2
Lyn	Protein Tyrosinkinase Lyn
PCNA	engl.: proliferating cell nuclear antigen
PDGF	engl.: platelet-derived growth factor
pRB	Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein
PSTAIR	Primärstrukturmotiv Cyclin-abhängiger Kinasen
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SKP1(2)	engl.: S-phase kinase associated protein 1(2)
Src	engl.: v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogen homolog (avian)
TGF- β	engl.: transforming growth factor β
v-	virale Form
Waf1	engl.: wildtype p53-activated fragment 1
WEE1	Tyrosinkinase, homolog zur wee1-Kinase von <i>S. pombe</i>

1 Zusammenfassung

Der eukaryontische Zellzyklus wird durch die Aktivität verschiedener Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) reguliert. Die zelluläre Menge des CDK-Inhibitorproteins p27^{Kip1} spielt eine entscheidende Rolle beim Übergang der Zelle von der G₁- zur S-Phase. Die Menge von p27^{Kip1} steigt während der G₀- oder der G₁-Phase an und nimmt zu Beginn der S-Phase rasch wieder ab. Die Bindung von p27^{Kip1} an die CDK-Komplexe der G₁-Phase inaktiviert diese und verhindert dadurch die Initiation der S-Phase. Eine verminderte Menge von p27^{Kip1} am G₁/S-Phaseübergang findet man dagegen häufig in verschiedenen Tumorgeweben. Die geringere zelluläre Menge des Inhibitors ist dabei mit einer hohen Patientensterblichkeit und einem aggressiven Verlauf der Erkrankung verbunden.

Die zelluläre Aktivität und Menge von p27^{Kip1} wird entscheidend durch Proteine reguliert, die mit p27^{Kip1} interagieren. In dieser Arbeit wurden deshalb mit Hilfe von rekombinantem p27^{Kip1} Interaktionspartner des Inhibitors in HeLa-Zellextrakt identifiziert.

Es konnte gezeigt werden, daß p27^{Kip1} an die CDK-Proteine und an Grb2 bindet. Grb2 ist ein Adapterprotein der Signaltransduktion. Die Interaktion zwischen p27^{Kip1} und Grb2 könnte damit, nach Stimulation der Zelle durch verschiedene Mitogene, die Signalweitergabe mit der Zellzyklusmaschinerie verbinden. Die zu dieser Interaktion notwendige Domäne in p27^{Kip1} konnte in weiteren Analysen auf eine acht Aminosäuren lange Prolin-reiche Region eingegrenzt werden. Auf der anderen Seite interagiert Grb2 vornehmlich über seine C-terminale SH3-Domäne mit p27^{Kip1}. Die beiden mit p27^{Kip1} nah verwandten Inhibitorproteine p21^{Cip1} und p57^{Kip2} interagieren dagegen nicht mit Grb2.

In einer erweiterten Analyse wurden 41 verschiedene rekombinante SH3-Domänen auf eine Interaktion mit p27^{Kip1} hin getestet. Es konnte gezeigt werden, daß p27^{Kip1} nur mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grf40/Mona und der SH3-Domäne der Tyrosinkinase Lyn wechselwirkt. Die Interaktion der Tyrosinkinase Lyn *in vivo* führte zur Hypothese, daß p27^{Kip1} durch Lyn phosphoryliert werden könnte. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb die Tyrosinphosphorylierung von p27^{Kip1} untersucht.

In Phosphoaminosäureanalysen mit metabolisch markierten Zellen konnte gezeigt werden, daß p27^{Kip1} *in vivo* an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Diese

Phosphorylierung konnte durch rekombinant hergestellte Tyrosinkinase und verschiedene Tyrosin/Phenylalanin-Austausche in p27^{Kip1} auf Tyrosin 88 und 89 eingegrenzt werden. Nach Kristallstrukturdaten des trimeren Komplexes aus p27^{Kip1}, CDK2 und Cyclin A kommt der Tyrosinrest 88 von p27^{Kip1} in der ATP-Bindetasche der Kinase zu liegen und blockiert diese. Es wurde deshalb untersucht, inwieweit eine Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Tyrosin 88 oder 89 Einfluß auf die Aktivität des Inhibitors hat. Die Tyrosinphosphorylierung von p27^{Kip1} verhindert nicht die Bindung an den CDK-Komplex. Allerdings konnte mit *in vitro*-phosphoryliertem p27^{Kip1} gezeigt werden, daß eine Tyrosinphosphorylierung zu einer etwa 40%-igen Reduktion der Aktivität des Inhibitors führt. Dieses Ergebnis konnte *in vivo* bestätigt werden. Interessanterweise verstärkt die Tyrosinphosphorylierung des Inhibitors die Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Threonin 187 durch den gebundenen CDK-Komplex. Die Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Threonin 187 ist in der Zelle ein initiales Signal zum Abbau von p27^{Kip1} durch das 26S-Proteasom. Das so markierte p27^{Kip1} wird von einem E3-Ligase-Komplex erkannt und ubiquitiniert. Es wurde deshalb untersucht, welchen Einfluß die Tyrosinphosphorylierung auf den Abbau von p27^{Kip1} besitzt. In Halbwertszeitbestimmungen mit einer SH3-bindedefizienten Form von p27^{Kip1} und einer Tyrosin/Phenylalanin-Austauschform von p27^{Kip1} konnte gezeigt werden, daß beide Formen, im Vergleich zu unverändertem p27^{Kip1}, eine höhere Stabilität aufweisen.

Die Interaktion von p27^{Kip1} mit der Tyrosinkinase Lyn und die Inaktivierung des Inhibitors durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten zeigt eine Möglichkeit auf wie p27^{Kip1}, in Abhängigkeit von mitogenen Stimuli, reguliert werden kann. Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion von Grb2, Grf40 und Lyn mit p27^{Kip1} verbindet damit die Signaltransduktion mit der Zellzykluskontrolle.

2 Einleitung

2.1 Prinzipien des eukaryontischen Zellzyklus

Die Vermehrung einer Zelle setzt die Verdoppelung wichtiger Zellkomponenten und deren gleichmäßige und vollständige Weitergabe an die Tochterzellen voraus. Dieser Vorgang erfolgt in einem streng kontrollierten Prozeß, der als Zellzyklus bezeichnet wird. Die Verdoppelung der genetischen Information und deren anschließende Aufteilung auf zwei Tochterzellen können als die zentralen Vorgänge des Zellzyklus angesehen werden. Beide Vorgänge sind bei höheren eukaryontischen Zellen zeitlich voneinander getrennt (Howard und Pelc, 1951). Die Verdoppelung des Chromosomensatzes erfolgt in der Synthese- oder S-Phase, die Trennung und Verteilung der beiden Schwesterchromatiden auf zwei Tochterkerne erfolgt in der Mitose. Beide Phasen, die Mitose und die Synthesephase, werden durch zwei sogenannte „Gap“-Phasen voneinander getrennt: Die vor der Synthesephase gelegene Phase wird als G₁-Phase, die vor der Mitose gelegene Phase als G₂-Phase bezeichnet. Die Mitose ist normalerweise mit der Teilung der Zelle (Zytokinese) verknüpft und wird dann als M-Phase bezeichnet.

Die Replikation des Genoms und die Mitose sind in den meisten eukaryontischen Zellen alternierende und voneinander abhängige Vorgänge, die einer strengen Regulation und Kontrolle unterliegen. So gewährleisten Kontrollpunkte, sogenannte „Checkpoints“, die zeitlich korrekte und irreversible Abfolge eines Zyklus. Beispielsweise stellt der „DNA replication checkpoint“ sicher, daß die Mitose erst erfolgen kann, wenn die Replikation der DNA abgeschlossen ist. Der Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Mitose steht unter der Kontrolle eines weiteren Checkpoints, des Spindelcheckpoints. Dieser erlaubt die Trennung der Schwesterchromatiden erst, wenn alle Chromosomen mit beiden Polen der mitotischen Spindel verbunden sind. Die Initiation der Replikation wie auch der Beginn der Mitose hängen von der Integrität der DNA ab. Die Signalprozesse, die diese Abhängigkeit sicherstellen, werden als „DNA damage checkpoints“ bezeichnet. Diese speziellen Kontrollpunkte reagieren auf DNA-Schäden mit dem Anhalten des Zellzyklus in der G₁- oder G₂-Phase oder einer Verlangsamung der S-Phase. Sie ermöglichen damit die Beseitigung von Schäden bevor diese bei der Replikation zu Mutationen führen können oder an die Tochterzellen weitergegeben

werden. Die Checkpoints tragen damit entscheidend zur Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms bei (Weinert, 1997; Puri *et al.*, 1999).

Neben den endogenen Regulationssignalen greifen aber auch exogene Signale in den Ablauf des Zellzyklus ein (Denhardt, 1999). Bei einzelligen eukaryontischen Organismen sind dies in erster Linie Umweltfaktoren wie das Nahrungsangebot. Bei mehrzelligen Organismen sind die Anforderungen an die Proliferationskontrolle komplexer. Hier sind die Zellen Teil eines Gewebes und dürfen sich nur dann teilen, wenn dies zur Bildung des Gewebes während der Embryogenese oder später zu seiner Regeneration angebracht ist. Manche Gewebe, wie Haut- oder Blutzellen, erneuern sich fortwährend. Dabei teilen sich Vorläuferzellen mit kontrollierter Geschwindigkeit. Andere Zellen teilen sich nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder zur Wundheilung. Diese Zellen können den Zellzyklus verlassen und später, wenn dies erforderlich ist, wieder in den Zellzyklus eintreten. Eine Deregulation der sorgsam aufeinander abgestimmten Maschinerie der Zellteilung führt zu einer unkontrollierten Teilung der Zelle. Ein solches uneingeschränktes Zellwachstum ist ein prinzipielles Charakteristikum hyperproliferativer Erkrankungen, wie es beispielsweise in allen Tumorgeweben vorliegt.

Die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt, ist je nach Zelltyp oder Zelllinie von der Präsenz mitogener und antimitogener Faktoren abhängig (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Zelladhäsion, Zell-Zell-Kontakt). Empfänglich für diese Faktoren sind die Zellen jedoch nur, solange sie sich vor dem sogenannten Restriktionspunkt (R) in der späten G₁-Phase befinden (Pardee, 1974; Pardee, 1989). So veranlaßt z.B. der Entzug von Wachstumsfaktoren Zellen dazu, den Zyklus zu verlassen und in einen Ruhezustand, die G₀-Phase oder Quieszenz, überzugehen. Bei Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren können diese G₀-Zellen wieder in die G₁-Phase zurückkehren und erneut proliferieren. Nach dem Überschreiten des Restriktionspunktes reagieren die Zellen dagegen nicht mehr auf die genannten Faktoren und durchlaufen den begonnenen Zellzyklus bis zur nächsten G₁-Phase. Schließlich gibt es in vielzelligen Organismen quieszente Zellen, die ihr proliferatives Potential eingebüßt haben. Es sind hochspezialisierte, terminal differenzierte Zellen wie z.B. Neurone, oder Skelettmuskelzellen. Diese haben den Zellzyklus während der Entwicklung des Organismus irreversibel verlassen und reagieren nicht mehr auf mitogene Signale.

2.2 Cyclin-abhängige Kinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation

Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent Kinases, CDKs) sind die zentralen Elemente der Zellzykluskontrolle. Die Menge und Aktivität dieser Kinasen stellt den geordneten und störungsfreien Ablauf des Zellzyklus sicher (Ekholm and Reed, 2000; Morgan, 1997; Pines and Rieder, 2001; Planas-Silva and Weinberg, 1997; Sherr, 1996). Diese Kinasen werden im Verlauf des Zellzyklus phasenspezifisch aktiviert und inaktiviert. Die oszillierende Aktivität der Kinasen ist die Voraussetzung für das Durchlaufen des Zellzyklus. Endogene Checkpointssignale und auch exogene proliferative und antiproliferative Signale wirken regulierend auf die CDK-Aktivität ein und werden so in die Kontrolle des Zellzyklus integriert.

CDKs sind *per se* katalytisch inaktiv und müssen mit einer regulatorischen Untereinheit aus der Proteinfamilie der Cycline assoziieren um aktiviert zu werden. Die intrazellulären Konzentrationen vieler Cycline unterliegen im Verlauf des Zellzyklus dramatischen Schwankungen. Diese unterschiedliche verfügbare Menge der Cycline trägt wesentlich zur phasenspezifischen Aktivierung und Deaktivierung der CDKs bei.

Die CDKs bilden eine Familie von Proteinen ähnlicher Größe (34 bis 40 kDa) und konservierter Sequenz (> 35% Identität auf Aminosäure-Ebene). Die Prototypen dieser Familie sind Cdc2 aus der Spaltheefe (*Schizosaccharomyces pombe*) und Cdc28 aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Cdc2 und Cdc28 sind in der Lage, alle Phasenübergänge in den beiden Organismen zu ermöglichen. Eine Reihe verwandter Kinasen sind seitdem auf genetischem oder biochemischem Wege in vielen verschiedenen Organismen identifiziert worden.

Die Cycline bilden demgegenüber eine Familie von Proteinen variabler Größe (35 bis 90 kDa), deren Mitglieder auf der Ebene der Primärstruktur nur mäßig verwandt sind. Die Sequenzhomologie konzentriert sich auf einen Bereich von 100 Aminosäuren, der sogenannten Cyclin-Box, die für die Bindung und Aktivierung von CDKs notwendig ist. Durch die Bindung der Cyclin-Untereinheit erfährt die Kinase dabei eine Konformationsänderung, die für die Herstellung der katalytischen Aktivität erforderlich ist.

In Säugerzellen wurden neun Cyclin-abhängige Kinasen (CDK1 bis 9) und zehn Cyclin-Klassen (Cyclin A bis T) identifiziert. Die Kinasen assoziieren in unterschiedlichen Kombinationen mit den verschiedenen Cyclinen. Die Aktivität dieser Komplexe kennzeichnet die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Eine direkte Funktion bei der Regulation des Zellzyklus ist jedoch nur für einen Teil dieser CDKs und Cycline nachgewiesen worden. Andere CDK-Komplexe spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Transkriptionsmaschinerie.

Die D-Typ-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) sind die ersten Cycline, die nach der Stimulierung quieszenter Zellen mit Wachstumsfaktoren in Erscheinung treten. In kontinuierlich proliferierenden Zellen ist ihre Konzentration häufig nahezu konstant. Da die Synthese der D-Cycline in hohem Maße von Wachstumsfaktoren abhängig ist und die D-Cycline metabolisch instabil sind, fällt ihre Konzentration nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren rasch wieder ab (Sherr, 1993). Die Funktion der D-Cycline besteht also darin, mitogene und antimitogene Signale während der G₁- und G₀-Phase in die Kontrolle des Zellzyklus zu integrieren (Sherr and Roberts, 1999).

Cyclin E wird in proliferierenden Zellen selektiv am Übergang von der G₁- zur S-Phase exprimiert (Ekholm *et al.*, 2001). Das Protein bildet einen Komplex mit seinen katalytischen Partnern CDK2 oder CDK3, von deren Aktivierung der Eintritt in die S-Phase abhängt (Dulic *et al.*, 1992; Ohtsubo *et al.*, 1995; Resnitzky *et al.*, 1994).

Cyclin A wird in steigenden Mengen während der S- und G₂-Phase exprimiert und tritt zunächst im Komplex mit CDK2 auf, in der späten S-Phase und in der G₂-Phase auch im Komplex mit CDK1 (Draetta *et al.*, 1989; Pagano *et al.*, 1992; Pines and Hunter, 1990; Tsai *et al.*, 1991). Es ist als Partner von CDK2 für die Progression durch die S-Phase und möglicherweise für ihre Initiation erforderlich (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992; Resnitzky *et al.*, 1995). Auch für die Initiation der Mitose ist Cyclin A/CDK-Aktivität essentiell (Furuno *et al.*, 1999; Knoblich and Lehner, 1993; Pagano *et al.*, 1992).

Cyclin B akkumuliert dagegen später als Cyclin A in der Zelle (Pines and Hunter, 1990) und bildet zusammen mit CDK1 einen Komplex, der auch „M-phase Promoting Factor“ (MPF) bezeichnet wird. Die Aktivierung dieses Komplexes ist für den irreversiblen Übergang in die Mitose notwendig. Seine Inaktivierung hingegen ist essentiell für den Eintritt in die Telophase (Pines and Rieder, 2001).

Die phasenspezifische Aktivität von Cyclin/CDK-Komplexen während des Säuger-Zellzyklus ist in Abbildung 2.1 schematisch zusammengefasst.

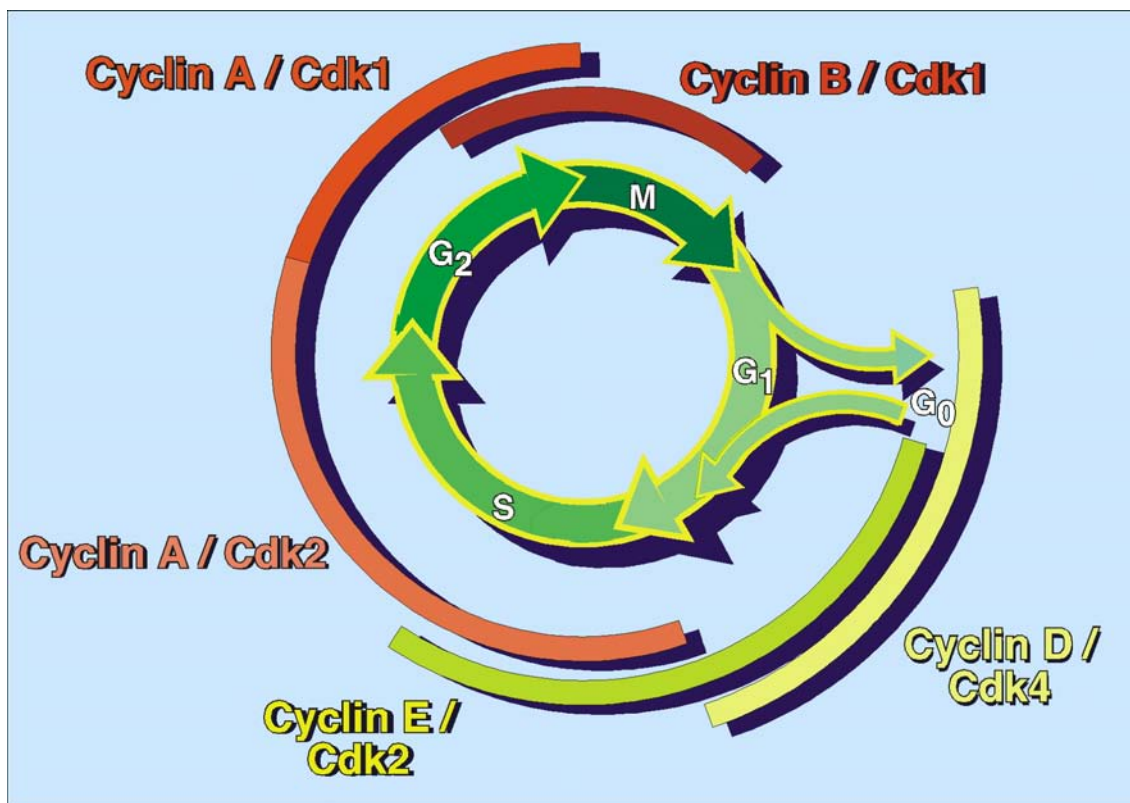


Abbildung 2.1: Modell zur Regulation des Zellzyklus durch die alternierende Aktivität unterschiedlicher CDK/Cyclin-Komplexe.

2.3 Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt durch verschiedene Mechanismen

Die zeitliche Abfolge der unterschiedlichen CDK-Komplexe ist der treibende Motor des Zellzyklus. Zur Regulation der CDK-Aktivität und Menge tragen unterschiedliche Mechanismen bei: Neben der jeweils vorhandenen Menge der Cyclin-Untereinheiten regulieren aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen der CDK-Untereinheit, sowie Änderungen in der intrazellulären Lokalisation die Aktivität der Kinasen. Eine spezielle Regulation erfährt die Aktivität der Kinasen darüberhinaus durch die Interaktion der Kinasen mit inhibitorisch wirkenden Proteinen, den sogenannten „Cyclin-dependent Kinase Inhibitors“ (CKIs).

2.3.1 Die Regulation der Cyclinuntereinheit der CDKs

Durch die kontrollierte Synthese und den kontrollierten Abbau der Cyclinuntereinheiten wird ein Zeitfenster innerhalb des Zellzyklus geschaffen, in dem ein bestimmter Cyclin/CDK-Komplex aktiv sein kann.

Die Expression der Cycline wird unter anderem durch die mRNA-Menge der verschiedenen Cycline reguliert. Die Synthese der D-Cycline ist von einer mitogenen Stimulation der Zelle abhängig. Die Gene der D-Cycline werden dabei unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren c-Myc, AP1 und NF- κ B transkriptionell aktiviert (Ekholm and Reed, 2000). Daneben wird eine translationale Induktion der D-Cycline über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg diskutiert (Muisse-Helmericks *et al.*, 1998; Sonenberg and Gingras, 1998; Takuwa *et al.*, 1999).

Die Cyclin-E-mRNA akkumuliert in der späten G₁-Phase (Ekholm *et al.*, 2001; Reed, 1997). Das Cyclin-E-Gen gehört zu einer Gruppe von Genen, deren Transkription im Verlauf des Zellzyklus durch die Familie der heterodimeren E2F/DP-Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Viele dieser Gene kodieren für Proteine, die eine direkte Rolle bei der DNA-Synthese (Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase, Polymerase α) oder bei der Regulation des Zellzyklus (Cyclin E, Cyclin A, CDK1, E2F) spielen (Denhardt, 1999).

Auf Seiten des Proteins dagegen unterliegen die D-Cycline einem raschen Umsatz. So liegt die Halbwertszeit von Cyclin D1 in proliferierenden Zellen bei nur 20 Minuten (Diehl *et al.*, 1998; Matsushime *et al.*, 1992). Der Abbau von Cyclin D1 wird durch einen mitogeninduzierten Signaltransduktionsweg reguliert. Die Inhibition dieses Signalweges führt zur Phosphorylierung von Cyclin D1 durch die Glykogensynthase-Kinase-3 β . Diese Modifikation induziert den Export des Proteins aus dem Kern und seinen beschleunigten ubiquitinabhängigen Abbau durch das Proteasom (Diehl *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 1997). Die Rolle der D-Cycline als Sensoren für Wachstumsfaktoren basiert demnach nicht nur auf ihrer mitogenabhängigen Synthese, sondern auch auf ihrer mitogenabhängigen Lokalisation und ihrem mitogenabhängigen Abbau (Sherr and Roberts, 1999).

Der Abbau von CDK2-gebundenem Cyclin E ist ebenfalls ubiquitinabhängig und wird durch die Phosphorylierung des Proteins über die assoziierte CDK2-Untereinheit induziert (Clurman *et al.*, 1996; Won and Reed, 1996). Der Cyclin E/CDK2-Komplex sorgt damit in einer negativen Rückkopplung für seine eigene Inaktivierung. Die

Autophosphorylierung von Cyclin E/CDK2-Komplexen markiert die Cyclin-Untereinheit für die Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Ligasen (E3-Enzyme) aus der Familie der SCF-Komplexe (Koepp *et al.*, 2001; Strohmaier *et al.*, 2001). Die Abkürzung SCF steht für die Grundbausteine der Komplexe: SKP1, Cullin-1 und ein F-Box-Protein. Die F-Box-Proteine dienen als Adaptoruntereinheiten, die spezifische Substrate für den SCF-Komplex rekrutieren, wobei die Interaktion zwischen F-Box-Protein und Substrat von dessen Phosphorylierungszustand abhängig ist (Patton *et al.*, 1998; Tyers and Jorgensen, 2000).

Cyclin A und Cyclin B werden dagegen durch einen großen Ubiquitin-Ligase-Komplex, den „Anaphase-Promoting Complex“ (APC) ubiquitiniert. Dessen Aktivierung beruht weitgehend auf der Assoziation des Komplexes mit zwei Hilfsfaktoren, CDC20 und CDH1 (Pines and Rieder, 2001; Tyers and Jorgensen, 2000; Zachariae and Nasmyth, 1999). APC bleibt aktiv bis CDH1 durch Phosphorylierung am Übergang von der G₁ zur S-Phase inaktiviert wird. Diese Phosphorylierung erfolgt vermutlich durch CDK2/Cyclin A und erlaubt die erneute Akkumulation von Cyclin B während der S- und G₂-Phase (Lukas *et al.*, 1999).

2.3.2 Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen

Die Assoziation mit einer Cyclin-Untereinheit reicht bei den meisten CDKs nicht aus, um sie vollständig zu aktivieren. Sie müssen darüber hinaus an einem konservierten Threoninrest phosphoryliert werden (Morgan, 1997). Die Röntgenstruktur eines Komplexes aus einer verkürzten Form von Cyclin A und CDK2 zeigt, daß die Phosphorylierung von T160 die Wechselwirkung zwischen CDK2 und Cyclin A stabilisiert und vermutlich die Substratbindung verbessert (Russo *et al.*, 1996b). Der Hauptkandidat für die CDK-aktivierende Kinase (CAK) in Vertebraten ist der trimere Komplex aus Cyclin H, CDK7 und MAT1. Die CDK7-Aktivität scheint jedoch bei Vertebraten weder limitierend noch im Zellzyklus reguliert zu sein (Kaldis, 1999; Morgan, 1997). Ihr kommt damit vermutlich keine regulatorische Funktion zu.

Im Gegensatz dazu spielen inhibitorische Phosphorylierungen im aminoterminalen Bereich der katalytischen Untereinheit eine zentrale Rolle bei der Regulation von CDKs. Diese wurden eingehend während des G₂/M-Übergangs an CDK1 untersucht (Takizawa and Morgan, 2000). Vor der Mitose werden Cyclin B/CDK1-Komplexe

durch inhibitorische Phosphorylierungen an Y15 und T14 in einem inaktiven Zustand gehalten. Die nukleäre Kinase WEE1 katalysiert die Phosphorylierung an Y15, während die membranassoziierte Kinase MYT1 CDK1 bevorzugt an T14 phosphoryliert. Die Aktivierung der Kinasen erfolgt über die Demodifikation beider Reste durch die dualspezifische Proteinphosphatase CDC25C, eine der drei Formen aus der CDC25-Familie.

CDK2 und CDK4 werden ebenfalls an Y15 bzw. Y17 phosphoryliert und die Behandlung von CDK2 mit Phosphatase führt zur Hyperaktivierung des Enzyms *in vitro* (Ekholm and Reed, 2000). Für die Dephosphorylierung dieser Kinasen wird CDC25A verantwortlich gemacht (Vigo *et al.*, 1999). Die Aktivierung von CDC25A in der späten G₁-Phase fällt zeitlich mit der Aktivierung von Cyclin E/CDK2 zusammen. Die inhibitorische Phosphorylierung von CDK2 trägt somit zum „Timing“ des G₁/S-Überganges bei.

Neben der Regulation der Aktivität der Kinasen durch Modifikation, hat auch die nukleo-zytoplasmatische Lokalisation der CDK-Komplexe Einfluß auf die geregelte Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen. Cyclin B1/CDK1 wird so beispielsweise durch die Phosphorylierung der Cyclin-Untereinheit kontrolliert. Diese Modifikation bewirkt den Import der Kinase in den Zellkern (Takizawa and Morgan, 2000). Während der G₂-Phase werden Cyclin B1/CDK1-Komplexe ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. In der späten Prophase wird ein Großteil von ihnen rasch in den Kern verlagert. Ein Vorgang, der zusammen mit der Dephosphorylierung von CDK1, als essentiell für die Einleitung der wesentlichen Abläufe der Mitose angesehen wird. Diese Verlagerung ist von der Phosphorylierung einer Region von Cyclin B1 abhängig, die als „Cytoplasmic Retention Signal“ (CRS) bezeichnet wird (Hagting *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Inzwischen wurde gezeigt, daß diese Region eine Leucinreiche, sogenannte „Nuclear-Export-Sequence“ (NES) enthält und daß Cyclin B kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma wechselt (Toyoshima *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des CRS führt zu einem beschleunigten Kernimport und einem verlangsamten Export des Proteins durch eine schwächere Bindung des Exportfaktors Crm1 an die CRS/NES-Sequenz von phosphoryliertem Cyclin B.

2.3.3 Die Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

Die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen steht unter der Kontrolle inhibitorischer Proteine, die als CDK-Inhibitoren (CKIs) bezeichnet werden. Die CKIs von Säugern werden nach ihrer Struktur, ihrem Wirkmechanismus und den CDKs, die sie inhibieren, in zwei Familien unterteilt: die Cip/Kip- und die INK4-Familie (Carnero and Hannon, 1998; Hengst and Reed, 1998).

2.3.3.1 Die INK4-Familie

Die INK4-Familie umfaßt in Säugern vier Mitglieder: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Diese binden und inhibieren spezifisch CDK4 und CDK6, indem sie an die katalytische CDK-Untereinheit binden. Die Inhibitoren bestehen aus vier (p15 und p16) oder fünf (p18 und p19) Struktureinheiten, die als „Ankyrin-Repeats“ bezeichnet werden. Die mechanistische Grundlage für die Inhibition von CDK6 durch p16 und p19 wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt (Brotherton *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998). Die „Ankyrin-Repeats“ bilden eine konkave Struktur, die an die nichtkatalytische „Rückseite“ der Kinase bindet. Dies führt zu einer Verdrehung der amino- und carboxyterminalen Domäne der Kinase gegeneinander. Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung bewirkt die Inaktivierung der Kinase.

Die zellulären Funktionen der INK4-Proteine sind komplex (Ekholm and Reed, 2000; Roussel, 1999; Sherr and Roberts, 1999). Genetische Veränderungen des p16-Genlocus (Deletionen, Translokationen) sind in vielen humanen Tumoren, insbesondere familiären und spontanen Melanomen zu finden (Chellappan *et al.*, 1998; Sherr, 1993). p16 wurde daher als Tumorsuppressor qualifiziert. Allerdings betreffen die Mutationen auch den überlappenden Genlocus von p19^{ARF}. Ein Protein, das den Abbau des Tumorsuppressors p53 inhibiert. Studien an Mäusen, bei denen *ARF* alleine bzw. *ARF* und *INK4a* deletiert wurden, lassen darauf schließen, daß die Tumorsuppressorfunktion des gemeinsamen Genlocus vor allem auf *ARF* zurückzuführen ist (Kamijo *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1996). p16 akkumuliert außerdem während der Zellalterung (Seneszenz) und ist an deren Induktion beteiligt, wobei der Beitrag, den p16 dabei leistet, offenbar von Zelltypus und Spezies abhängt (Lundberg *et al.*, 2000).

p15 wird in epithelialen Zellen unter anderem durch das Zytokin TGF- β transkriptionell induziert. Die Akkumulation des Inhibitors trägt dazu bei, daß diese Zellen in der G₁-Phase arretieren (Hannon and Beach, 1994; Seoane *et al.*, 2001). Die beiden anderen

Mitglieder der INK-Proteine, p18 und p19, werden in der Maus während der Embryogenese und auch im erwachsenen Tier gewebespezifisch exprimiert und spielen daher wahrscheinlich bei der terminalen Differenzierung mancher Zelltypen eine Rolle (Chan *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 1995). Diese Hypothese wurde durch Studien an p18- bzw. p19-negativen Mäusen bestätigt, wobei die gleichzeitige Deletion beider Gene auf eine teilweise redundante Funktion der beiden CKIs schließen ließ (Roussel, 1999).

2.3.3.2 Die Cip/Kip-Familie

Die Mitglieder der Cip/Kip-Familie, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}, binden und inhibieren ein breites Spektrum von Cyclin/CDK-Komplexen. Sie besitzen eine konservierte aminoternale Domäne, die für die Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen notwendig und ausreichend ist. Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes der Inhibitor-domäne von p27 mit CDK2 und der carboxyterminalen Hälfte von Cyclin A wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt (Russo *et al.*, 1996a) und läßt Rückschlüsse auf den Inhibitionsmechanismus zu: Der aminoternale Bereich der Inhibitor-domäne von p27 bindet die konservierte Cyclin-Box von Cyclin A ohne dessen Struktur wesentlich zu beeinträchtigen. Der carboxyterminale Bereich der Inhibitor-domäne interagiert mit der aminoternalen Domäne von CDK2 und verändert deren Konformation. Zusätzlich ragt der Inhibitor in das aktive Zentrum der Kinase hinein und blockiert dadurch deren ATP-Bindestelle.

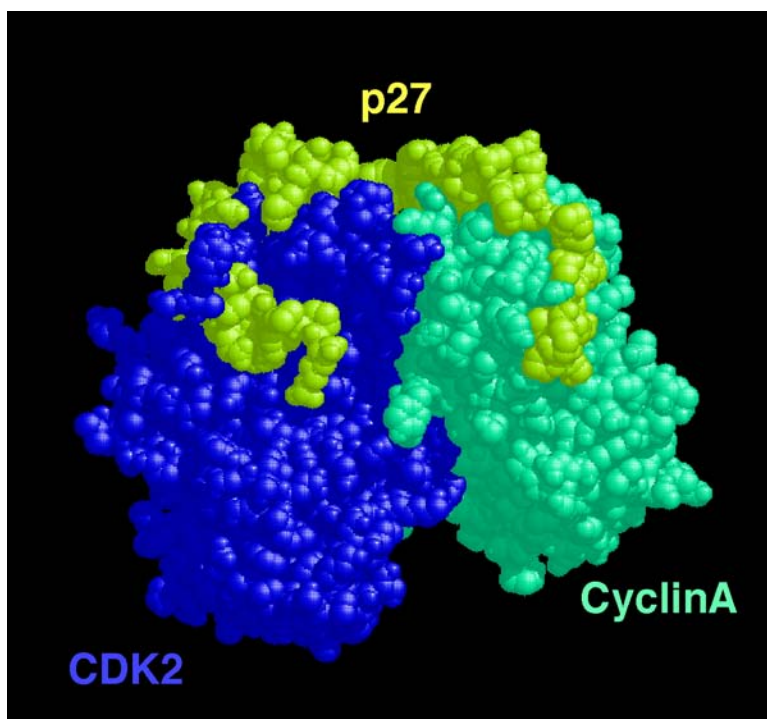


Abbildung 2.2: Struktur des Inhibitors p27 komplexiert mit CDK2/Cyclin A, nach Russo *et al.* (1996a).

Obwohl die Struktur von p21 und p57 im Komplex mit einem Cyclin/CDK-Heterodimer noch nicht bestimmt wurde, läßt die Sequenzhomologie ihrer Inhibitor-domänen einen analogen Inhibitionsmechanismus vermuten (Ekholm and Reed, 2000).

Die carboxyterminalen Domänen der Cip/Kip-Proteine sind unterschiedlich groß und weisen untereinander nur geringfügige Sequenzhomologien auf. Durch Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen dieser carboxyterminalen Domänen kann die Aktivität der Cip/Kip-Proteine spezifisch reguliert werden (Hengst and Reed, 1998).

Die Stabilität von p27 wird beispielsweise wesentlich durch eine Phosphorylierung von Threonin 187 am carboxy-terminalen Ende beeinflußt (Montagnoli *et al.*, 1999; Sheaff *et al.*, 1997). Daneben besitzt p27 in dieser Region ein „Nuclear Localization Signal“ (NLS), das für die Lokalisation des Inhibitors ausschlaggebend ist (Reynisdottir and Massague, 1997; Zeng *et al.*, 2000). Eine vergleichbare NLS ist auch in den C-terminalen Domänen von p21 und p57 für deren nukleäre Lokalisation verantwortlich.

Die physiologischen Funktionen von p21 und p27 waren und sind Gegenstand intensiver Forschung. Beide Proteine wurden als ubiquitäre negative Regulatoren der Zellproliferation charakterisiert, da sie auf eine Reihe endogener und exogener antiproliferativer Signale hin in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. p21 ist offenbar vorwiegend in Checkpointkontrollen und die Induktion von Differenzierungsvorgängen involviert, während p27 in vielen Zelltypen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Restriktionspunktes spielt.

Über die Funktion von p57 ist sehr viel weniger bekannt. Der Inhibitor wird vor allem in terminal differenzierten Zellen exprimiert (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995). p57-negative Mäuse weisen schwere Entwicklungsstörungen auf und sterben meist kurz nach der Geburt. Dies läßt auf eine essentielle Rolle des Inhibitors bei der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose während der Embryonalentwicklung schließen (Yan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Der p57-Genlocus befindet sich in einer Chromosomenregion (Matsuoka *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1996), deren Veränderung mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, einer erblichen Prädisposition für Tumoren, und dem Wilms-Tumor, einem Nierentumor, assoziiert ist. Die funktionelle Rolle von p57 bei diesen Erkrankungen ist jedoch noch nicht gesichert. Allerdings ähnelt der Phänotyp von p57-negativen Mäusen dem von Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Zhang *et al.*, 1997).

2.4 Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors p21^{Cip1}

p21^{Cip1} wurde nahezu gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen im Rahmen sehr unterschiedlicher wissenschaftlicher Fragestellungen entdeckt und ist der am längsten bekannte CDK-Inhibitor der Cip/Kip-Familie. Das Protein wurde als Inhibitor der Zellproliferation in seneszenten und p53-induzierten Zellen sowie als CDK2-bindendes Protein identifiziert (el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Noda *et al.*, 1994). Daneben wurde p21 aus Cyclin/CDK2-Immunkomplexen isoliert und anschließend als CDK-Inhibitor charakterisiert (Gu *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993).

p21 wird transkriptionell durch die Bindung des p53-Proteins an den Promotor von p21 reguliert. Dadurch ist p21 an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt. So arretieren p53-positive Zellen nach DNA-Schäden in der G₁- und der G₂-Phase und weisen in G₁ einen erhöhten Gehalt an p21 auf. Beides gilt nicht für p53-negative Zellen (Dulic *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1993). Untersuchungen an p21- bzw. p53-negativen Mäusen gaben Aufschluß über die Rolle von p21 am p53-vermittelten G₁-Arrest. Während Fibroblasten aus p53-negativen Mausembryonen nach der Induktion von DNA-Schäden nicht in der G₁-Phase arretieren, kommt es bei Fibroblasten aus p21-negativen Mausembryonen in eingeschränktem Umfang zum Zellzyklusarrest (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995). Dagegen fehlt ein anderer, p53-abhängiger Checkpoint in p21-negativen Fibroblasten vollständig. Diese Zellen sind nicht in der Lage, auf Störungen des intrazellulären Nukleotidpools mit einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase zu reagieren (Deng *et al.*, 1995). p21 ist also offenbar ein wichtiger, aber nicht der alleinige Vermittler p53-abhängiger Checkpointkontrolle in der G₁-Phase. In Übereinstimmung damit werden Mutationen des p21-Locus nur selten in humanen Tumoren detektiert (Hirama and Koeffler, 1995), wohingegen das p53-Gen eines der am häufigsten mutierten Gene in humanen Tumoren ist (Levine, 1997). p21-negative Mäuse entwickeln sich zunächst normal, später tritt jedoch eine erhöhte Rate spontaner Tumoren auf, so daß man von einer signifikanten Rolle von p21 bei der Tumorsuppression ausgehen kann (Martin-Caballero *et al.*, 2001).

p21 kann mit einem Bereich seiner carboxyterminalen Domäne an PCNA, den Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ , binden und dadurch die Aktivität des Enzyms *in vitro* inhibieren. Dies könnte, neben der Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen, ein zusätzlicher Mechanismus sein, durch den p21 als Antwort auf DNA-

Schäden die Replikation verlangsamt und der Zelle Gelegenheit zur DNA-Reparatur gibt (Hengst and Reed, 1998; Vidal and Koff, 2000).

Neben seiner Funktion als Effektor der p53-vermittelten Antwort auf genotoxischen Stress spielt p21 eine Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen. So wird während der Embryonalentwicklung eine gewebespezifische Expression von p21 beobachtet, die unabhängig von p53 ist und offenbar erfolgt, wenn die Zellen vor ihrer Differenzierung den Zellzyklus verlassen (Macleod *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1995). Anhand eines Zellkulturmodells für die Entwicklung der Skelettmuskulatur wurde gezeigt, daß p21 induziert wird, wenn Myozyten aufhören zu proliferieren und zu Myotuben fusionieren (Guo *et al.*, 1995; Halevy *et al.*, 1995). Die transkriptionelle Induktion von p21 wird dabei über den differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD gesteuert. Die daraus resultierende Inaktivierung von CDKs spricht für eine funktionelle Rolle von p21 bei diesem Prozeß der Zelldifferenzierung. Überraschenderweise wurden bei p21-negativen Mäusen keine offenkundigen Entwicklungs- oder Gewebedefekte beobachtet (Deng *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, daß die Rolle von p21 während der Individualentwicklung redundant besetzt ist, d.h. daß andere Proteine eine überlappende Funktion ausüben können. Übereinstimmend mit dieser Hypothese können Mausdoppelmutanten, die weder p21 noch p57 exprimieren, keine Myotuben bilden (Zhang *et al.*, 1999).

p21 akkumuliert außerdem in Zelllinien, die sich der Seneszenz nähern (Noda *et al.*, 1994). Die funktionelle Bedeutung dieser Akkumulation ist jedoch unklar. Die Deletion des p21-Gens verhindert die Seneszenz humaner Fibroblasten, nicht jedoch die Seneszenz von Mausfibroblasten (Brown *et al.*, 1997; Pantoja and Serrano, 1999).

Die Expression von p21 wird in den meisten Szenarien vornehmlich transkriptionell reguliert (Gartel and Tyner, 1999). Der p21-Genpromotor wurde intensiv charakterisiert und enthält z.B. Elemente, die durch p53, den Vitamin-D3-Rezeptor IRF-1 oder den myogenen Transkriptionsfaktor MyoD aktiviert werden.

Demgegenüber wird die Expression von p21 in einigen Zellkultursystemen auch induziert, wenn ruhende Zellen zur Proliferation stimuliert werden und in den Zellzyklus zurückkehren (Li *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde berichtet, daß in proliferierenden humanen Fibroblasten die Mehrheit der CDK4- und CDK2-Komplexe mit p21 assoziiert ist (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997; Zhang

et al., 1993). Auf der anderen Seite ist p21 ein Protein, das die Progression von Zellen im Zellzyklus inhibieren kann. Um dieses Paradoxon zu erklären, wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem Cyclin/CDK-Komplexe, die nur mit einem p21-Molekül assoziiert sind, aktiv bleiben und erst durch die Bindung von mehr als einem p21-Molekül inhibiert werden (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Die dreidimensionale Struktur eines Komplexes aus Cyclin A, CDK2 und der Inhibitor-domäne des verwandten CKIs p27 zeigte jedoch, daß ein Molekül dieses Inhibitors ausreichen sollte, diese Kinase zu inhibieren. Der scheinbare mechanistische Unterschied der CDK-Inhibition p21 und p27 konnte geklärt werden indem mit biochemischen und biophysikalischen Methoden gezeigt wurde, daß der Komplex aus Cyclin A, CDK2 und p21 in einer Stöchiometrie von 1:1:1 vorliegt und katalytisch inaktiv ist (Hengst *et al.*, 1998).

2.5 Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}

p27^{Kip1} wurde nahezu zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen als CDK-inhibierende Aktivität in G₁-arretierten Zellkulturen entdeckt (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994b; Slingerland *et al.*, 1994). Daneben wurde p27 auf genetischem Weg als Protein identifiziert, das an Cyclin D1 bindet (Toyoshima and Hunter, 1994).

p27 wird in proliferierenden Zellen periodisch exprimiert. Die p27-Konzentration ist maximal während der G₁-Phase, fällt stark ab, sobald die Zellen in die S-Phase eintreten und bleibt niedrig bis die Zellen die nächste G₁-Phase erreichen (Hengst *et al.*, 1994; Hengst and Reed, 1996; Millard *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird p27 durch eine breite Palette antiproliferativer Signale in vielen verschiedenen Zelltypen induziert (Hengst and Reed, 1998). So akkumuliert p27 z.B. in Zellen, die nach Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Kontaktinhibition oder nach Entzug der Substratverankerung den Zellzyklus verlassen und quieszent werden.

Eine Fülle experimenteller Daten weist darauf hin, daß die intrazelluläre p27-Menge eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Restriktionspunktes spielt. So ist der Großteil der Cyclin E/CDK2- und der Cyclin A/CDK2-Komplexe in quieszenten Mausfibroblasten mit p27 assoziiert. Die Inhibition dieser Komplexe ist damit auf p27 zurückzuführen (Coats *et al.*, 1996). Zum anderen hat die Überexpression von p27 in Zellen einen Arrest in der G₁-Phase zur Folge (Polyak *et al.*, 1994a; Toyoshima and Hunter, 1994). Zudem verhindert die Reduktion der intrazellulären p27-Menge mit

Hilfe der Antisense-RNA-Technik, daß Fibroblasten von Nagern nach dem Entzug von Serum quieszent werden. Diese Fibroblasten zeigen außerdem eine verkürzte G₁-Phase (Coats *et al.*, 1996; Rivard *et al.*, 1996). Dieser Phänotyp wird ansonsten bei Überexpression von G₁-Cyclinen beobachtet und ist daher konsistent mit der CDK-Inhibitorfunktion von p27 (Ohtsubo *et al.*, 1995; Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994; Resnitzky *et al.*, 1995; Resnitzky and Reed, 1995).

Die Rolle von p27 bei der Zellzykluskontrolle wurde durch die Analyse von p27-negativen Mäusen bestätigt. In zwei Studien wurde das p27-Gen vollständig deletiert und in einer weiteren durch eine verkürzte p27-Mutante ohne CDK-Inhibitor-domäne ersetzt (Fero *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Alle drei Mausstämme zeigen den gleichen Phänotyp. Er ist vor allem gekennzeichnet durch eine Gendosis-abhängige Zunahme der Körpergröße, die generelle Unfruchtbarkeit der weiblichen Mäuse und Taubheit. Letzteres wird durch die fortgesetzte Proliferation der Haarzellen des Corti-Organs in adulten Mäusen verursacht (Chen and Segil, 1999; Lowenheim *et al.*, 1999). Offenbar ist bei einer Reihe von Zelltypen durch das Fehlen von p27 die Fähigkeit beeinträchtigt, während der Individualentwicklung aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase überzutreten (Vidal and Koff, 2000).

Es liegt nahe anzunehmen, daß p27 als negativer Regulator der CDK-Aktivität während der G₁-Phase eine Rolle als Tumorsuppressor spielt. Demgegenüber werden homozygote inaktivierende Mutationen des p27-Gens selten in humanen Tumoren gefunden (Kawamata *et al.*, 1995; Morosetti *et al.*, 1995; Pietenpol *et al.*, 1995; Spirin *et al.*, 1996). p27 ist daher kein Tumorsuppressor im klassischen Sinn (Knudson, 1971). In humanen Tumoren werden jedoch häufig auffallend niedrige Mengen an p27 detektiert, und diese niedrigen Mengen an p27 korrelieren mit hoher Tumor-Aggressivität und hoher Patientensterblichkeit (Slingerland and Pagano, 2000). Bei p27-negativen Mäusen wird keine generelle Häufung von Tumoren beobachtet, die Tiere leiden jedoch an einer Veränderung der Hypophyse, die als benignes Adenom klassifiziert wurde (Nakayama *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigen sowohl p27-negative als auch p27-heterozygote Mäuse bei γ -Bestrahlung oder bei Behandlung mit chemischen Karzinogenen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine erhöhte Rate an Tumoren. Dies weist auf eine zentrale Bedeutung der p27-Menge bei der Verhinderung von Tumoren hin. p27 wurde daher als „haplo-insufficient tumorsuppressor“ bezeichnet (Fero *et al.*, 1998).

Für die Funktion von p27 ist die Aktivität und Menge des Inhibitors von entscheidender Bedeutung. Die intrazelluläre Menge an p27 kann dabei auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Dies spiegelt die Fähigkeit des Inhibitors wieder, diverse mitogene und antiproliferative Signale in die Zellzykluskontrolle zu integrieren. Eine transkriptionelle Induktion von p27 wurde z.B. beobachtet, wenn U937-Zellen infolge der Behandlung mit Vitamin D3 zu Monozyten/Makrophagen differenzieren (Inoue *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1996), oder in Fibroblasten, die als Antwort auf einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) in der G₁-Phase arretieren (Gardner *et al.*, 2001). In der Mehrzahl der untersuchten Szenarien gehen Veränderungen der p27-Proteinmenge jedoch nicht mit einer Veränderung der p27-mRNA-Menge einher (Hengst and Reed, 1998). Die regulierte Translation der p27-mRNA und der regulierte Abbau des p27-Proteins wurden als Mechanismen identifiziert, die der Oszillation von p27 während des Zellzyklus und seiner Akkumulation in quieszenten Fibroblasten und zu Monozyten differenzierenden HL60-Zellen zugrunde liegen (Agrawal *et al.*, 1996; Hengst and Reed, 1996; Millard *et al.*, 1997; Pagano *et al.*, 1995).

Über die translationale Regulation von p27 ist wenig bekannt. Es wurde beobachtet daß sich die Effizienz, mit der die p27-mRNA translatiert wird, verändert, wenn Zellen aus dem proliferativen Zustand in die Quieszenz übergehen oder umgekehrt aus der Quieszenz wieder in den Zellzyklus zurückkehren. So wird die Translation von p27 in ruhenden BALB/c-3T3-Fibroblasten nach einer Stimulierung mit PDGF beim Eintritt in den Zellzyklus reprimiert (Agrawal *et al.*, 1996). Umgekehrt steigt die Effizienz der Translation der p27-mRNA, wenn normale diploide Fibroblasten (HS68) durch Kontaktinhibition den Zellzyklus verlassen. Demgegenüber unterliegt die Translation der p27-mRNA im Verlauf des Zellzyklus einer periodischen Schwankung. Sie ist in, mit Lovastatin in der G₁-Phase arretierten HeLa-Zellen, im Vergleich zu Zellen der S-Phase um ein Mehrfaches erhöht (Hengst and Reed, 1996).

Die zweite Möglichkeit, die zelluläre Menge eines Proteins zu beeinflussen, ist die Regulation des Proteinabbaus. p27 wird *in vivo* und in Zellextrakten ubiquitinabhängig durch das 26S-Proteasom abgebaut (Pagano *et al.*, 1995). Eine Reihe experimenteller Daten weist darauf hin, daß die Ubiquitinierung von p27 am G₁/S-Phasenübergang durch einen SCF-Ubiquitin-Ligasekomplex mit dem F-Box-Protein p45^{SKP2} als Adapterprotein erfolgt (Carrano *et al.*, 1999; Morimoto *et al.*, 2000; O'Hagan *et al.*,

2000; Spruck *et al.*, 2001; Sutterluty *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999). p27 wird in Extrakten aus proliferierenden Zellen und Zellen der S-Phase rascher ubiquitiniert und abgebaut als in Extrakten aus quieszenten Zellen und Zellen der G₁-Phase (Brandeis and Hunt, 1996; Montagnoli *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995). Während der späten G₁- der S- und der G₂-Phase muß p27 durch CDK2 am Threoninrest 187 phosphoryliert werden, um effizient abgebaut zu werden (Malek *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999; Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). Während der G₁-Phase wird p27 durch einen zweiten, ebenfalls p45^{SKP2}-abhängigen Abbauweg degradiert, der von der Phosphorylierung an Threonin 187 unabhängig ist (Malek *et al.*, 2001). In einer unlängst erschienenen Veröffentlichung wurde ein p45^{SKP2}-unabhängiger proteasomaler Abbauweg für p27 am G₀/G₁-Übergang von Lymphozyten beschrieben, der jedoch ebenfalls ubiquitinabhängig ist (Hara *et al.*, 2001). Dabei scheint die, durch spezifische E3-Ligasen vermittelte Ubiquitinierung von p27 im Zytoplasma stattzufinden.

2.6 Aufgabenstellung

Die Aktivität und Menge von p27 in der Zelle wird entscheidend durch die Assoziation von Proteinen reguliert, die mit p27 wechselwirken. So beeinflusst die Interaktion von p27 mit CDK2/Cyclin E die Stabilität des Inhibitors durch Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 (Malek *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999; Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). Zum Anderen verändert die Assoziation von p27 mit dem 12s- und 13s-Protein des Adenovirus E1A die inhibitorische Aktivität von p27 (Alevizopoulos *et al.*, 1998; Mal *et al.*, 1996). E1A-12s und -13s führen *in vivo* zu einer Deaktivierung des Inhibitors durch die Wechselwirkung des viralen Proteins mit der inhibitorisch wirksamen N-terminalen Domäne von p27.

Vor Beginn dieser Arbeit waren neben den verschiedenen CDK-Komplexen und dem E1A-Protein keine weiteren Interaktionspartner von p27 bekannt. Ziel dieser Arbeit sollte es deshalb sein, mit Hilfe eines biochemischen Identifikationsverfahrens neue Interaktionspartner von p27 zu ermitteln. Durch die Charakterisierung dieser identifizierten Faktoren sollte es ermöglicht werden, die Regulation von p27 besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, aus Sambrook *et al.* (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Protein Science* und *Current Protocols in Cell Biologie* abgeleitet.

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), SERVA (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde über eine „Purelab Plus UV/UF“-Filteranlage der Firma USF (Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Es wird im folgenden als ddH₂O bezeichnet.

3.1.1.1 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen:

Adenosine 5'-[γ -³²P]triphosphat, Triethylammoniumsalz, 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

L-[³⁵S]Methionine, >1000 Ci/mmol, 15 mCi/ml

Phosphorus-32, Orthophosphat verdünnt in HCl, 10mCi/ml

Pro-mix L-[³⁵S] *in vitro* cell labelling mix, >1000 Ci/mmol, 14,3 mCi/ml

3.1.1.2 Materialien zur Filtration und Dialyse

Centricon 5, 10 und 30	Amicon, Witten
Diaflo Ultrafiltrationsmembranen	Amicon, Witten
MF-Millipore Membranfilter	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spectra-Por, Dialyseschläuche	The Spectrum Companies, Gardena, USA
UH 100/10 und 30 Ultrahülsen	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman 3 MM, Filterpapier	Maidstone, UK
Whatman GF/C, Glasfaserfilter	Maidstone, UK
Zentrifugen Filtereinheiten 5K, 10K und 30K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.1.3 Chromatographische Matrices und fertig gepackte Chromatographiesäulen

Affi-Gel10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CNBr-Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DC-Platten 20 X 20 cm, Cellulose	Merck, Darmstadt
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HighTrap Q 1 ml und 5ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HighTrap SP 1 ml und 5ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MonoQ HR 5/5	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ProBond Nickel-Chelating Resin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Protein A Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G Sepharose 4 „fast flow“	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sepharose-SP „fast flow“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sepharose-Q „fast flow“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sephasil C4 μ m ST 4.6/250 Protein C4	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 pg HiLoad 16/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 200 pg HiLoad 26/60	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.1.4 Molekulargewichts- und Längenstandards

BenchMark Protein Ladder, Protein-Größenstandard	Life Technologies, Karlsruhe
GeneRuler 100bp Ladder Plus, DNA-Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1kb Ladder Plus, DNA-Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
IEF Markers 3-10, SERVA flüssig-Mix	Invitrogen, Groningen, Niederlande
MW-GF-200, Gelfiltrations Marker 12-200kDa	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.1.5 Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)

Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor-Mischung	Roche, Mannheim
Desoxynukleotid-Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Effectene, Transfektions Reagenz	QIAGEN, Hilden
Freund's Adjuvant, incomplete	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glow, mounting medium	Energene, Regensburg
IPG-Puffer, pH 3-10 und pH 6-11	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
pGEM-T Easy Vector System I und II	Promega, Mannheim
QIAGEN Plasmid Kit (Mini, Midi)	QIAGEN, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, USA
TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TiterMax Gold, Adjuvant	CytRx Corporation, Norcross, USA
TNT-SP6/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

3.1.1.6 Verbrauchsmaterial

Kunststoffware:

Einmalkunststoffwaren wurden von den Firmen B. Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht), und Zinsser Analytic (Frankfurt) bezogen.

Lieferanten für Gewebekulturgefäße waren die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden).

Einmalkanülen wurden von der Firma Terumo (Frankfurt), Einmalhandschuhe von der Firma Semperit (Wien) geliefert.

Sterilfilter stammten von den Firmen Millipore (Eschborn), Pall (Dreieich) und Renner (Dannstadt).

Transfermembran:

Hybond-P, PVDF-Membran Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Röntgenfilme:

Es wurden verschiedene Röntgenfilmtypen der Firma Kodak (Stuttgart) eingesetzt: BioMax MS, BioMax MR, X-Omat AR und X-Omat LS.

3.1.2 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% (w/v) Amidoschwarz 10B, 10% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Blocklösung	2% (w/v) BSA in PBS
complete ohne EDTA, 50 x	1 Tablette „complete without EDTA“-Proteaseinhibitor-Mischung (Roche) in 1 ml ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)
DC-Puffer I	50 ml (88%) Ameisensäure, 156 ml Eisessig ad 2000 ml ddH ₂ O, pH-Wert nicht einstellen, sollte etwa bei 1,8-1,9 liegen
DC-Puffer II	100 ml Eisessig, 10 ml Pyridin, 0,5 mM EDTA ad 2000 ml ddH ₂ O, mit Pyridin auf pH 3,5 einstellen
DNA-Auftragspuffer, 6 x	10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
IP-Puffer	200 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5, 0,25% (w/v) NP-40, 5 mM EDTA und 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A
Kinasierungspuffer I, 10 x	200 mM Tris/HCl, 75 mM MgCl ₂ , pH 7,2
Kinasierungspuffer II	20 mM HEPES pH 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 0,05% (w/v) NP-40, 7,15 mM β-Mercaptoethanol, 125 µM Na- <i>ortho</i> -Vanadat, 10 µM PMSF, 0,1 µg/ml A, P, LP
NET-Gelatine Blockpuffer, 10 x	1,5 M NaCl, 0,05 M EDTA, 0,5 M Tris pH 7,5, 0,5% (w/v) Triton-X-100, 25 g/l Gelatine, auf pH 7,5 einstellen
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	3 M K-Azetat, pH 5,5

Paraformaldehyd-Lösung	6% (w/v) Paraformaldehyd mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt; dunkel bei 4°C gelagert; Arbeitslösung 3% Paraformaldehydlösung in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5 eingestellt mit NaOH
PBS-T	0,05% (w/v) Tween-20 in PBS
PI-Färbelösung	1 µg/ml Popidiumiodid, 0,1% (v/v) Triton-X-100, 0,2 mg/ml RNase A in PBS
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, pH 7,5
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10 x	209 mM Tris/HCl, 41% (w/v) Glycerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 17 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 2 x	125 mM Tris/HCl, 17 % (w/v) Glycerin, 4,1% (w/v) SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Sammelgelpuffer, 4 x	0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer, 4 x	1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TBS	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Triton-X-100-Lösung	0,2% (w/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium

3.1.3 Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur

3.1.3.1 Medienbestandteile und Medienzusätze

5-Brom-2'-desoxyuridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung 1% (w/v) in PBS	
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung 25 mg/ml in PBS	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4500 mg/l Glucose, ohne Natrium-Pyruvat	LifeTechnologies, Karlsruhe
DMEM mit 4500 mg/ml Glucose, ohne L-Glutamin, Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin	LifeTechnologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS) und Neugeborenen Kälberserum (NCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (100 x)	LifeTechnologies, Karlsruhe
Joklik's Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Lovastatin	Merck, Darmstadt
Stammlösung 40 mM in Ethanol, aktiviert	
MEM-Minimum Essential Medium	Life Technologies, Karlsruhe
MEM-Nichtessentielle Aminosäuren-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Minimum Essential Medium Eagle, ohne Na-Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung 25 mg/ml in PBS	
Natriumpyruvat (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung 5 mg/ml in DMSO	
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Sf-900 II SFM Basal Powdered Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Sf-900 II Supplement	Life Technologies, Karlsruhe
Thymidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung 200 mM in PBS	
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.3.2 Medienzusammensetzung

Standardmedium

für adhärenzte HeLa, 293T und MCF7	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
für HS68	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat
HeLa-Suspensionszellen	Joklik's-Medium, 5% (v/v) NCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Chase-Medium	Standardmedium mit 0,1 mg/ml L-Methionin, 0,12 mg/ml L-Cystein, 25 mM HEPES/KOH, pH 7,4
Hungermedium	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 mM HEPES/KOH, pH 7,4, ohne Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin
Phospholabel-Medium	Minimum Essential Medium Eagle mit Earls` Salzen, L-Glutamin, NaHCO ₃ und mit 4,5 g/l Glucose, 2% (v/v) FCS, ohne Natriumphosphat
Puls-Medium	Hungermedium mit 0,05 mCi „Pro-mix“/ml
SF-900 II-Medium	„Sf-900 II SFM Basal Powdered Medium“ mit „Sf-900 II Supplement“, 0,35 g Na(CO ₃) ₂ und 10% (v/v) FCS, pH 6,2
Timelab-Medium	MEM-Minimum Essential Medium, mit Hanks` Salzen, L-Glutamin, 25 mM HEPES, 0,35 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose und MEM Nicht- essentielle Aminosäuren-Lösung, 10% (v/v) FCS

3.1.4 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl
Superbroth-Medium	3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl

SOC-Medium 2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

3.1.5 Antikörper

primäre Antikörper:

anti-Abl 1 (Klon 24-11)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-BrdU (Klon B44), gekoppelt an FITC	Becton Dickinson, Hamburg
anti-Cullin 1 (Hs), Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes Cullin1	Labor Willi Krek, Basel
anti-Cyclin A (T310), Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes Cyclin	Hengst <i>et al.</i> , 1994
anti-Cyclin B1 (Klon GNS1)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Cyclin D1 (Klon DCS-6)	Labor Jiri Bartek, Kopenhagen
anti-Cyclin E1 (Klon HE12)	Labor Ed Harlow, Harvard, USA
anti-Grb2 , Ziegenantiserum gerichtet gegen die AS 195-217 von humanem Grb2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Grb2 (Klon 3F2)	Upstate Biotechnology, Eching
anti-GST , Kaninchenantiserum gerichtet gegen GST	Labor Ludger Hengst
anti-HA.11 (Klon 16B12)	BAbCo, Richmond, USA
anti-Hsp70/Hsc70 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen Hsp70/Hsc70	Labor Jörg Höhfeld, Bonn
anti-Lyn (Klon 42)	Becton Dickinson, Hamburg
anti-p19^{SKP1} , Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes p19 ^{SKP1}	Labor Willi Krek, Basel

anti-p21 (Klone CP36 und CP 74, gemischt)	Upstate Biotechnology, Eching
anti-p21 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 19 C-terminalen AS von humanem p21	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p21 , Ziegenantiserum gerichtet gegen p21	diese Arbeit
anti-p27/Kip1 (Klon 57)	Becton Dickinson, Hamburg
anti-p27 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 19 C-terminalen AS von humanem p27	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p27 (G96), Ziegenantiserum gerichtet gegen p27	diese Arbeit
anti-p45^{SKP2} , Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes p45 ^{SKP2}	Labor Willi Krek, Basel
anti-p57 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 20 C-terminalen AS von humanem p57	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PSTAIRES , monoklonaler Antikörper gerichtet gegen die PSTAIRES-Region Cyclin-abhängiger Kinasen	Dulic <i>et al.</i> , 1992
anti-Phospho-p27 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes, an T187 phosphoryliertes p27	Upstate Biotechnology, Eching
anti-Phospho-p27 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes, an T187 phosphoryliertes p27	Zymed Laboratories, South San Francisco, USA
anti-Phospho-Tyrosin (Klon 4G10)	Upstate Biotechnologies, Eching
anti-Phospho-Tyrosin (Klon P-Tyr-100)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
anti-Rb , Ziegenantiserum gerichtet gegen die letzten 15 C-terminalen AS von humanem pRb	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Src , Kaninchenantiserum gerichtet gegen humanes Src	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-α-Tubulin (Klon DM 1A)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sekundäre Antikörper:	
Goat anti-Mouse IgG, (H+L) , Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
Goat anti-Rabbit IgG, (H+L) , Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA

anti-Goat IgG , Peroxidase-gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat anti-Mouse IgG , (H+L), FITC-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Goat anti-Rabbit IgG , (H+L), FITC-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Goat anti-Mouse IgG , (H+L), Rodamin-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Goat anti-Rabbit IgG , (H+L), Rodamin-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

3.1.6 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt.

3.1.7 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) bezogen.

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von p27 und p27-Fragmenten:

Primer	DNA-Sequenz
LHSD37	5'-GGATCCGGGAGACATATGTCAAACGTGCG-3'
LHSD40	5'-GGAGTCTTCTGCAGTTTGCATTACTATCCCTAGG-3'
Mg1-p27LF/AA	5'-GCCTGCAGGAACGCCCGCCG-3'
Mg2-p27FY/AA	5'-CCGCGGGGGTCTGTAGGCGGCCTCG-3'
Mg6-p27-Nt	5'-CACCTTGAATTCTCATTTGGGGGGCC-3'
Mg7-p27-Ct	5'-CGCGGCCCCATATGGGTGCCTGCAAG-3'
p27dSH3	5'-CCCGCGGGGCGGCGCAGGTGCCTGCAAGGTG-3'
p27-F/Y2, Re-FD	5'-GCTTGCCCGAGTTCTATTTTCAGACCCCCGCGG-3'

p27-F/Y2, Re-Rev	5'-CCGCGGGGGTCTGAAATAGAACTCGGGCAAGC -3'
p27-F/Y3, Re-FD	5'-GCTTGCCCGAGTTCTTCTACAGACCCCGCGGCC -3'
p27-F/Y3, Re-Rev	5'-GGCCGCGGGGGTCTGTAGAAGAACTCGGGCAAGC -3'
p27-N SH3-TGA	5'-GGGTCAGTAGTAGAACTCG -3'
p27-Y1 FD	5'-CCCCTAGAGGGCAAGTTCGAGTGGCAAGAG -3'
p27-Y1 Rev	5'-CTCTTGCCACTCGAACTTGCCCTCTAGGGG-3'
p27-Y2Y3B	5'-GCCGCGGGGGTCTGAAGAAGAACTCGG -3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von p21 und p21-Fragmenten:

Primer	DNA-Sequenz
p21-Ct-ATG-NdeI	5'-CTACCTTCATATGGGGCCC -3'
p21 Stop-Rev	5'-GGCGGATTAGGGCTTCCTC -3'
p21Y1/F-FD	5'-GCCTGCCCAAGCTTTCCTTCCCACGGGGCC -3'
p21Y1/F-Rev	5'-GGCCCCGTGGGAAGGAAGAGCTTGGGCAGGC -3'
p21Y2/F-FD	5'-GCATGACAGATTTCTTCCACTCAAACGCCG -3'
p21Y2/F-Rev	5'-CGGCGTTTGGAGTGGAAGAAATCTGTCATGC -3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation von Grb2:

Primer	DNA-Sequenz
GRB2-ATG	5'-CTCACCATGGAAGCCATC -3'
GRB2-TAA	5'-CTTGACTCTTAGACG -3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation von FBX3:

Primer	DNA-Sequenz
FBX3, 2	5'-CCAATCATCAGCCCAGGTCG -3'
FBX3-ATG, 1	5'-CCATGGCGGGCGATGGAGACCGAGACGGCGCCGCTG -3'
FBX3-CT-His	5'-CGGATCCTTACTTACCAATCGGGCTATAG-3'
FBX3-DBox-ATG	5'-GCCATGGGCAAAAAATACTGGCTG -3'
FBX3-Stop-BamHI	5'-GGATCCTTAACTTACCAATCGGGCTATAG -3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation von c-Abl und von c-Abl Fragmenten:

Primer	DNA-Sequenz
Abl-inc SH3	5'-CATATGCCCAACCTTTTTGTGGCA -3'
Abl Kin.Dom.- ATG	5'-CATATGGTCAACAGCCTGGAGAAAC -3'
Abl Kin.Dom.- TGA	5'-CTTCAGCAGGTTCTGGTCTTGGTG-3'
Abl-NdeI-Exon IB	5'-GCATATGGGGCAGCAGCCTGG -3'
Abl-TAG	5'-GCAGGCGGATCCGACGGGCC -3'

3.1.8 Plasmide

pApuro	Labor Markus Warmuth, Hämatologikum der GSF, Großhadern
pBluescript SK (-)	Stratagene, Heidelberg
pCMXpl2	Labor Roland Schüle, Freiburg
pCR2.1	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCruz-HA	Santa Cruz, Heidelberg
pEGFP-C2	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pET-3a,-11a, -24d, -28a	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
pEYFP-C1	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pGEM-T, -T Easy	Promega, Mannheim
pGEX-2T, -2TK, -5X1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
prk5	Labor Axel Ullrich, MPI für Biochemie, Martinsried

3.1.9 Bakterienstämme

BL21(DE3)	Stamm E. coli B; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>

3.1.10 Eukaryontische Zelllinien

HeLa, Suspensionzellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HeLa, adhärenente Zellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HS68	menschliche diploide Fibroblasten aus Neugeborenen-Vorhaut, ATCC-Nummer CRL-1635
293T	humane embryonale Nierenzellen 293 (ATTC-Nummer CRL-1573) zusätzlich mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert
MCF7	adhärenente menschliche Brustdrüsen-Epithelialzellen, adenovirustransformiert, (ATTC-Nummer HTB-22)
Sf9	Ovar-Zelllinie aus der Puppe von <i>Spodoptera frugiperda</i> , Stamm IPLB-Sf21 AE

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Nukleinsäure-Fällung

Eine wäßrige DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) auf eine Endmolarität von 0,3 M eingestellt und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C . Das Präzipitat wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 13000 g pelletiert und mitausgefallenes Salz wurde durch Behandlung mit 70% Ethanol aus dem DNA-Präzipitat entfernt. Die durch erneute Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wurde an der Luft oder unter Vakuum (Membran Vakuumpumpe MD8C, Vakuubrand, Wertheim) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Puffer aufgenommen.

3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer wäßrigen Lösung wurde spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer (Spectrophotometer DU 640, Beckman, München) gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/µl für doppelsträngige DNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0).

3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 4 ml Superbroth-Medium in einem 15 ml Falcon-Gefäß mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung P2 wurde durch 4-6maliges Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine und die Bakteriendebris wurden abzentrifugiert (10 min, 13000 g, 4°C) und die Plasmid-DNA

mit 500 µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 13000 g und RT sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder unter Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH₂O gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde der „Midi-Plasmid Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Diese DNA wurde zur Transfektion von Gewebekulturzellen und zur *in vitro*-Translation eingesetzt.

3.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionspaltungen von DNA erfolgten unter der vom Hersteller, für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentration. Pro 1 µg DNA wurden 2 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10fache der in Glyzerin gelösten Enzyme betrug. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug, bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur, mindestens 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet.

DNA-Doppelspaltungen erfolgten nach den Angaben des Herstellers oder wurden, falls dies nicht möglich war, seriell durchgeführt.

3.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz zunächst 1:1 mit ddH₂O verdünnt und mit 1/9 Volumen 10 x CIAP-Puffer (Roche) und 3 U CIAP pro µg eingesetztem Plasmid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Dephosphorylierungsreaktion wurde anschließend durch 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer beendet.

3.2.6 Glätten überhängender DNA-Enden

Um überhängende 5'- oder 3'-DNA-Enden, einer vorangegangenen Restriktionsendonukleasen-Spaltung zu glätten, wurde eine DNA-Polymerase I-Behandlung (Klenow-Fragment) der linearisierten DNA durchgeführt. Da das Klenow-Fragment unter den Bedingungen der Restriktionsspaltung aktiv ist, wurde auf das Umpuffern der DNA verzichtet.

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und auf eine Endkonzentration von 25 μM dNTP's eingestellt. Nach Zugabe von 1 U Klenow-Fragment pro μg eingesetzter DNA wurde der Ansatz 30 min bei 14°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des Klenow-Fragments 10 min bei 75°C erwärmt. Die DNA wurde nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt oder, sofern dies erforderlich war, mit einer zweiten Restriktionsendonuklease behandelt.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die flüssige Agarose wurde in eine Gießkammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE überschichtet. Die mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 5 V/cm aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die aus der Gelelektrophorese resultierenden DNA-Banden wurden mit einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid in TBE) für 15 min inkubiert und das Agarosegel anschließend 10 min in ddH₂O entfärbt. Die DNA wurden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarose-Gel erfolgte abgewandelt nach Tautz und Renz (1983). Die DNA-Bande wurde im UV-Durchlicht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein zur Hälfte mit silanisierter Glaswolle befülltes, am Boden durchbohrtes 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und die DNA-haltige Flüssigkeit durch Zentrifugation (13000 g, 5 min) aus dem Gel in das 1,5 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die Agarose wurde dabei durch die Glaswolle im oberen Gefäß zurückgehalten. Die gesammelte DNA-TBE-Lösung wurde entweder direkt weiterverwendet (z.B. Ligation), oder einer anschließenden Isopropanolpräzipitation unterzogen.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher molarer Überschuss des DNA-Fragments mit 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei RT eine Stunde inkubiert. 5 µl der Ligationsreaktion wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten über stumpfe DNA-Enden wurde die DNA-Menge um das vierfache erhöht und die eingesetzte Ligaseaktivität verdoppelt.

3.2.10 Gerichtete *in vitro*-Mutagenese

Die gerichtete *in vitro*-Mutagenese von Plasmiden wurde in abgewandelter Form nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ der Firma Stratagene über PCR durchgeführt. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden sollte, diente dabei als Matrize für die Synthese des zu mutagenisierenden Plasmids. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide waren zueinander komplementär und enthielten die gewünschten Sequenzänderungen. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl wurden 25 ng Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 5 nmol der vier dNTPs, 2,5 µl 10 x Pfu-Polymerasepuffer, 1,5 U Pfu-DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz 12 bis 16 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 55°C und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt, mit 10 U DpnI versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die

methylierte DNA des Stammplasmids selektiv abgebaut. 5 µl dieses Reaktionsansatzes wurden direkt in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.11 Herstellung kompetenter *E. coli*

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 µl einer stationären Kultur von *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl 87% (w/v) Glycerin vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.12 Transformation kompetenter Bakterien

200 µl gefrorene kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 5 µl einer Ligationsreaktion oder einer Mutagenesereaktion zu den Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde für 90 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und für 30 bis 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde kurz abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm) und das Bakterienpellet auf vorgetrockneten Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37°C bis zum Erscheinen von Bakterienkolonien.

3.2.13 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 4 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Mix und das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 96°C, durchlief der Reaktionsansatz 40 Zyklen,

jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 96°C, einer Hybridisierungsphase von 15 s bei 50°C und einer Synthesephase von 4 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Adhärente Zelllinien (HeLa, 293T, HS68 und MCF7) wurden in Standardmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit (Hera cell, Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Zellkulturschalen variabler Größe kultiviert. Das Medium für HS68-Zellen wurde zusätzlich mit 1 mM Natriumpyruvat versetzt. HeLa-, MCF7 und 293T-Zellen wurden alle drei Tage, vor Erreichen der Konfluenz, passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit 10 x Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 auf neuen Kulturschalen ausgesät. Zellzahlen wurden im allgemeinen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. HS68-Zellen wurden mehrere Tage bis mehrere Wochen unter Kontaktinhibition kultiviert, wobei das Medium alle drei Tage erneuert wurde. Bei Bedarf wurden die Zellen wie beschrieben mit Trypsin behandelt und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:8 in neue Kulturschalen ausgebracht.

HeLa-Suspensionszellen wurden in Joklik's-Medium bei 37°C in Spinner-Flaschen unter konstantem Rühren kultiviert. Die Zelldichte der Kulturen wurde durch tägliches Verdünnen mit frischem Medium zwischen $2,5 \times 10^5$ und 10^6 Zellen pro ml gehalten.

3.3.2 Kultivierung von Insektenzellen

Zur Baculovirus-vermittelten Überexpression rekombinanter Säugerproteine wurden Sf9-Insektenzellen verwendet. Diese wurden in Suspensionskultur in Sf-900 II SFM-Medium bei einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro ml in einem Schüttelinkubator (innOva4230, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) bei 80-90 rpm und 27°C kultiviert. Bei einer Zelldichte von mehr als 2×10^6 Zellen pro ml wurden die Zellen mit frischem Medium verdünnt. Zur Amplifikation des Baculovirus wurden Insektenzellen mit niedriger Infektionsrate pro Zelle (<1) infiziert und der Überstand der lysierten Zellen nach 4-5 Tagen geerntet und abzentrifugiert (10000 g, 5 min).

Um eine Suspension mit hohem Virustiter zu erhalten wurde der Überstand erneut auf Insektenzellen gegeben und bis zur Lyse der Zellen kultiviert. Diese Prozedur wurde zwei bis dreimal wiederholt. Der klare, abzentrifugierte Überstand mit hohem Virustiter wurde direkt zur Proteinexpression eingesetzt oder bei 4°C bis zu 6 Monaten aufbewahrt. Zur Proteinexpression wurden 2×10^6 Suspensionszellen pro ml ausgesät und mit dem Überstand der lysierten Sf9-Zellen mit hohem Titer inokuliert, so daß etwa drei bis zehn Virusinfektionen auf eine Zelle erreicht wurden. Die infizierten Insektenzellen wurden drei bis vier Tage bei 27°C weiterkultiviert, zur Ernte abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min), mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters einer Lösung wurde ein „Plaque-Assay“ durchgeführt. Dazu wurden Sf9-Insektenzellen adhärent auf Gewebekulturschalen kultiviert und mit verschiedenen Verdünnungen (10^{-3} - 10^{-5}) der Virus-Lösung für 1 h bei 27°C inkubiert. Die Sf9-Zellen wurden anschließend mit 1% niedrigschmelzendem Agar (Agarplaque-Plus Agarose) in Sf-900 II SFM -Medium überschichtet um eine Diffusion des Virus bei der Zellyse zu vermeiden. Nach 6-10 Tagen Inkubation bei 27°C erfolgte, abhängig vom Virustiter, die Lyse der infizierten Zellen, so daß über die Anzahl der im Sf9-Zellrasen entstandenen „Löcher“ auf die Konzentration der Viruspartikel in einer Lösung geschlossen werden konnte.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarhythmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden entweder Suspensionszellen abgenommen oder adhärente Zellen mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (90% FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in ein Einfrierröhrchen abgefüllt, langsam auf -80°C (möglichst 1°C/min) abgekühlt und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Sf9-Insektenzellen wurden in Medium abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min), in 90% Medium, 10% DMSO aufgenommen und analog den Säugerzellen eingefroren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad (27°C für Sf9-Insektenzellen). 1 ml aufgetaute Zellsuspension wurde mit 50 ml Standardmedium (SF-900II-Medium für Sf9-Insektenzellen) verdünnt, in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt und weiterkultiviert.

3.3.4 Synchronisation von Gewebekulturzellen

Zur Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklus wurden Zellen 24 h mit Lovastatin, einem Inhibitor der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase, behandelt (Keyomarsi *et al.*, 1991). Hierzu wurde die Substanz dem Kulturmedium in einer Endkonzentration von 66 µM (für HeLa-Zellen) zugesetzt. Die Arretierung von Zellen in der S-Phase erfolgte durch 24stündige Behandlung mit Thymidin, das in einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt wurde.

Zur reversiblen Arretierung adhärenter Zellen in der Mitose (Zieve *et al.*, 1980) wurden diese zunächst 16 h lang in Gegenwart von 2 mM Thymidin kultiviert und damit in der S-Phase vorsynchronisiert. Dann wurden die Zellen einmal mit thymidinfreiem Medium gewaschen und darin für 7 h weiterkultiviert. Anschließend wurde dem Medium Nocodazol in einer Endkonzentration von 0,04 µg/ml zugesetzt. Nach 5 h wurden die mitotischen Zellen durch Pipettieren von der Zellkulturschale abgespült, einmal in Medium ohne Nocodazol gewaschen und anschließend neu ausgesät.

3.3.5 Durchflußzytofluorimetrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußzytofluorimetrie wurde eingesetzt um die Verteilung von Gewebekulturzellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu analysieren. Alternativ wurden zwei Methoden angewandt: a) die einfache Färbung mit Propidiumiodid, bei der die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes fluoreszenzmarkiert werden, und b) die Doppelfärbung mit Propidiumiodid und anti-BrdU-FITC-Antikörperkonjugaten, bei der DNA-synthetisierende Zellen zusätzlich mit einem zweiten Fluoreszenzmarker versehen werden.

a) Zur Färbung mit Propidiumiodid wurden HeLa Suspensionszellen oder trypsinbehandelte adhärenente Zellen (jeweils $0,5 \times 10^6$ bis 10^6 Zellen) in 2 ml Standardmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl eiskaltem PBS resuspendiert und unter kontinuierlichem Mischen („vortexen“) zu 3 ml vorgekühltem (-20°C) 70%igem Ethanol getropft. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 3 ml PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 1 ml PI-Färbelösung aufgenommen.

Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit Hilfe eines Durchflußzytofluorimeters (FacsCalibur, Becton Dickinson) analysiert. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm.

- b) Zur Doppelfärbung mit Propidiumiodid und anti-BrdU-FITC-Antikörperkonjugaten wurden die Zellen zunächst mit Bromdesoxyuridin (BrdU) markiert. Hierzu wurde BrdU in einer Endkonzentration von 30 µg/ml zum Kulturmedium gegeben. Nach 30minütiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen abgenommen oder trypsiniert und in 2 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g abzentrifugiert und zweimal mit PBS, 1% (w/v) BSA gewaschen. Sodann wurden sie in 200 µl eiskaltem PBS resuspendiert und unter kontinuierlichem Mischen („vortexen“) zu 3 ml vorgekühltem (-20°C) 70%igen Ethanol getropft. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1 ml 2 M HCl, 0,5% (v/v) Triton-X-100 unter kontinuierlichem Mischen tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag in 1 ml 0,1 M Na₂B₄O₇, pH 8,0 resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 500 g abzentrifugiert und in PBS, 0,5% (v/v) Tween 20 aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl anti-BrdU-FITC-Antikörperkonjugat wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend einmal mit PBS, 0,5% (v/v) Tween 20 gewaschen und in 1 ml PBS, 0,5 µg/ml Propidiumiodid aufgenommen. Die Zellen wurden wie unter a) durchflußzytofluorimetrisch analysiert.

3.3.6 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit dem „Effectene Transfection Reagent“-Kit der Firma Qiagen transfiziert.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 40% ausgesät. Die Mengen von zur Transfektion eingesetzter DNA, EC-Verdünnungspuffer, Verstärkerreagenz, Effectene und die Medienmengen richtete sich dabei nach der jeweiligen Zellkulturgefäßgröße:

Platten- größe Ø	DNA- Menge	EC- Puffer	Verstärker	Effectene	DMEM-Menge zum Mix	DMEM-Menge auf der Platte
3,5 cm	0,4 µg	100 µl	3,2 µl	2,0 µl	600 µl	1,6 ml
6 cm	1,0 µg	150 µl	8,0 µl	5,0 µl	1,0 ml	4,0 ml
10 cm	2,0 µg	300 µl	16 µl	10 µl	3,0 ml	7,0 ml
15 cm	5,6 µg	840 µl	44,8 µl	28 µl	8,5 ml	15 ml

Die zu transfizierende DNA wurde in einer geeigneten Menge des EC-Verdünnungspuffers aufgenommen und mit Verstärker-Reagenz versetzt. Diese Reaktion wurde durch „vortexen“ gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Effectene-Reagenz wurde erneut 15 min inkubiert, die jeweilige Menge DMEM-Standardmedium zum Mix pipettiert und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde sofort auf die vorbereitete Platte mit einer geeigneten Menge DMEM-Standardmedium überführt und für 3 bis 6 h auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 12 h- 48 h in Standardmedium kultiviert.

3.3.7 Echtzeit-Mikroskopie und Mikroinjektion

Adhärenente HeLa-Gewebekulturzellen wurden direkt oder nach transienter Transfektion über einige Stunden bis mehrere Tage mit einem Olympus IX70 (Olympus, Hamburg) Umkehrmikroskop mit einem ST-133 Controller (Roper Scientific, USA) und einem Polychrom IV Filter (Photonics, Martinsried), umbaut mit einer 37°C Wärmekammer (Solent Scientific Limited, Portsmouth, England), mikroskopiert. Dazu wurden die Zellen 24 h vor der Mikroskopie in ein spezielles „Timelab“-Medium überführt. Dieses Medium ermöglicht eine vom CO₂-Zellinkubator unabhängige Kultur der Gewebekulturzellen.

Zur Untersuchung der Lokalisation eines Proteins sowie zur Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und damit möglicherweise verbundenen Lokalisationsänderungen eines Proteins, wurden Zellen mit einem GFP- oder YFP-Fusionskonstrukt des jeweils untersuchten Proteins transfiziert. Entweder wurden die Zellen bereits vor der Echtzeit-Mikroskopie mit der entsprechenden DNA transfiziert, bzw. mit der DNA des Interaktionspartners kotransfiziert, oder DNA (50 µg/µl) bzw. Protein (1-5 mg/ml) wurde gezielt durch Mikroinjektion (FemtoJet und InjectMan, Eppendorf, Hamburg) in die Zellen gebracht. Die Zellen wurden in 1 min bis 1 h Abständen im Phasenkontrastkanal und identisch im Fluoreszenzkanal mit der Mikroskopier- und Auswertungssoftware IP-Lab Version 3.5.4 für Macintosh (Visitron

Systems, Puchheim) aufgenommen. Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzeinzelaufnahmen wurden mit diesem Programm übereinandergelegt und die einzelnen Bilder zu einem zusammenhängenden Film zusammengestellt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Grundlegende Standardmethoden

3.4.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach drei alternativen Methoden. Die Proteinkonzentration von Gesamt-Zellysaten wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt (1 OD₂₈₀ entspricht dabei 1 mg/ml). Die Konzentration von gereinigten, rekombinanten Proteinen wurde auch mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung des Gels abgeschätzt. Als Standard diente BSA, das in definierten Mengen auf das Gel aufgetragen worden war. In allen übrigen Fällen wurden Proteinkonzentrationen mit Hilfe des „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

3.4.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurden homogene Trenngele (8%, 10%, 12% und 15 %). Das Trenngel war jeweils mit einem 1 cm hohen 4%igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 2 x SDS-Probenpuffer oder 10 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

3.4.1.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Das Gel wurde zum Färben der aufgetrennten Proteine 15 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in (25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt und digital dokumentiert.

3.4.1.4 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine mindestens 3 h in 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0,0185% (w/v) Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 20 min mit 50% Ethanol gewaschen. Es folgte eine einminütige Inkubation in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat. Das Gel wurde mit ddH₂O gewaschen (dreimal jeweils 20 s), anschließend 20 min in 0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,028% (w/v) Formaldehyd inkubiert und nach erneutem Waschen mit ddH₂O (zweimal jeweils 20 s) zum Auslösen der Silberabscheidung mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0,0185% (w/v) Formaldehyd versetzt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Reaktion mit 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure abgestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure überführt und dokumentiert.

3.4.1.5 Autoradiographie von Elektrophoresegelen

Zur Sichtbarmachung radioaktiv ($[^{35}\text{S}]$ oder $[^{32}\text{P}]$) markierter Proteine wurden die Gele zur Verminderung des radioaktiven Hintergrundes zweimal für 30 min in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure gewaschen, auf eine Lage Filterpapier überführt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Verstärkung der radioaktiven Signale in „Transcreen HE-“ (für $[^{32}\text{P}]$) oder „Transcreen LE-“ (für $[^{35}\text{S}]$), (Amersham Pharmacia Biotech) Verstärkerfolie eingeschlagen und bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.4.2 Immunologische und immunobiochemische Methoden

3.4.2.1 Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Elektrotransfer („Semi-dry“) auf eine PVDF-Membran transferiert.

Zum Benetzen wurde die PVDF-Membran einige Sekunden in Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Lagen mit Transferpuffer gesättigtes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, drei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier und die Kathode geschichtet. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 1,5 mA pro cm² Trenngelfläche. Zur Sichtbarmachung der transferierten Proteine wurde die Membran einige Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und anschließend in 90% Methanol (v/v), 2% (v/v) Essigsäure entfärbt. Zur anschließenden spezifischen Proteindetektion wurde die Membran in PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Der Filter wurde dreimal für je 10 min in PBS-T gewaschen und mit einem, gegen den ersten Antikörper gerichteten, an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000 in PBS-T, 5 % (w/v) Magermilchpulver) für 30 min inkubiert und anschließend zweimal 30 min in PBS-T gewaschen.

Sofern mit phospho-spezifischen primären Antikörpern detektiert wurde, wurde, statt mit herkömmlicher Blocklösung, NET-Gelatine-Blocklösung mit 150 µM Na-*ortho*-Vanadat und 100 mM KF zum Blocken der Membran und zur Verdünnung der Antikörper benutzt. Die Sichtbarmachung der spezifischen Proteine erfolgte in beiden Fällen über Chemolumineszenz durch Inkubation der Blotmembran mit ECL-Lösung (5 µl, 6,8 mM *p*-Kumarinsäure in DMSO, mit 5 ml, 1,25 mM Luminol sowie 1,5 µl 30% H₂O₂) und anschließender Exposition gegen einen Röntgenfilm. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „Supersignal West Femto“-System wiederholt.

3.4.2.2 Immunopräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt um ein bestimmtes Protein aus Gesamtzellextrakten (Pulse-Chase-Markierung, *in vitro*-Translationsansätze oder Interaktions-Untersuchungen) aufzureinigen oder um in Koimmunopräzipitationen die *in vivo* an das präzipitierte Protein assoziierten Proteine zu identifizieren. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt.

Der spezifische Antikörper (1-3 µg) wurde an 20 µl 50% (v/v) Protein-A-Sepharose oder 20 µl 50% (v/v) Protein-G-Sepharose gebunden (1 h auf einem Überkoprotator). Nach zweimaligem Waschen in IP-Puffer wurde die Suspension zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe 1-3 h mit dem Proteinextrakt inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die Sepharosebeads in 25 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach 5minütigem Kochen mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

3.4.2.3 Immunozytologie

Adhärenente Säugerzellen oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24 h nach der Transfektion) wurden auf sterile Deckgläschen in „6-Loch“-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40% kultiviert. Die Zellen wurden direkt nach Absaugen des Standardmediums bei RT mit je 4 ml Paraformaldehydlösung pro Loch für 7 min auf den Deckgläsern fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 4 ml einer Triton-X-100-Lösung pro Loch für 5 min auf Eis permeabilisiert und anschließend zweimal mit Blocklösung gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50 – 1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, verdünnt in Blocklösung) erfolgte für 1 h bei RT. Die Zellen wurden zweimal mit Blocklösung gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper (FITC- oder Rodamin-konjugierte Antikörper, 1:100 in Blocklösung) bei RT im Dunklen inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mit 10 µl „Glow-mounting medium“ überschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

3.4.2.4 Herstellung von Antiseren und Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine als GST- oder His-Fusion rekombinant in *E. coli* exprimiert und über diverse Methoden bis zur höchstmöglichen Homogenität gereinigt. Das gereinigte Protein (1 mg/ml) wurde für die erste Injektion im Verhältnis 1:1 mit TiterMax Gold über eine Doppelkanüle intensiv emulgiert. Zur Immunisierung von Kaninchen wurde 250 µg, für Ziegen 500 µg Protein subkutan injiziert. Nach 6 Wochen wurden jeweils, im Abstand von 14 Tagen, weitere Injektionen vorgenommen. TiterMax Gold wurde dabei durch Freund's Adjuvant ersetzt. Das abgenommene Blut wurde zur Gerinnung 2 h bei RT belassen und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur Gewinnung des Serums wurde für 15 min bei 5500 rpm abzentrifugiert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert oder direkt zur Affinitätsreinigung von Antikörpern verwendet. Zur Affinitätsreinigung des spezifischen Antikörpers wurden 2-4 mg des Antigens kovalent an zyanbromid-aktivierte Sepharose 4B, nach den Angaben des Herstellers, gekoppelt und gewaschen. Das Serum wurde 1:1 mit PBS verdünnt und über Nacht mit dem immobilisierten Antigen auf einem Überkoprotator bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde fünfmal mit 0,5 M NaCl in PBS gewaschen und in eine Säule überführt. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 0,2 M Essigsäure, 0,5 M NaCl. Der Säulendurchfluß wurde zu je 0,5 ml Fraktionen aufgefangen und sofort mit 100 µl 1 M Tris, pH 9,0 pro Fraktion neutralisiert. Die einzelnen Fraktionen wurden spektralphotometrisch auf ihren Antikörpergehalt hin getestet. Die antikörperhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und eingeeengt (UH 100/1 Ultrahülsenapparatur, Schleicher & Schüll, Dassel). Die Antikörperlösung wurde zu einer Endkonzentration von 0,2% (w/v) und 0,1% (w/v) mit Gelatine und Natriumazid versetzt. Die Qualität der gereinigten Antikörper wurde mit einer Konzentrationstitration des Antikörpers gegen das spezifische Antigen und Totalzellextrakt von HeLa-Zellen im Immunoblot getestet.

3.4.3 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Alle Materialien zur isoelektrischen Fokussierung wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Fokussierung wurde in einer gekühlten (20°C) Multiphor II nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Fokussierung wurden isoelektrische Fokussierungsstreifen (Immobiline DryStrip NL 3-10 oder pH 6-11) mit 0,1 mg- 2 mg Protein in 300 µl Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG-Puffer (pH 3-10 oder pH 6-11), 18,5 mM DTT) über Nacht in einer ölüberschichteten Rehydratisierungskassette inkubiert. Die Streifen wurden anschließend in der Multiphor II mit einem steigenden Spannungsgradienten fokussiert.

Gradient:	1.Phase 300 V, 30 min	6.Phase 2200 V, 30 min
	2.Phase 600 V, 30 min	7.Phase 2700 V, 30 min
	3.Phase 900 V, 30 min	8.Phase 3200 V, 30 min
	4.Phase 1200 V, 30 min	9.Phase 3500 V für 18,5 bis 27 h
	5.Phase 1700 V, 30 min	

Insgesamt wurde, abhängig von der Proteinmenge, für 70000-100000 V/h fokussiert. Die Streifen wurden kurz mit ddH₂O gespült, bei -80°C eingefroren oder direkt für die Auftrennung in der zweiten Dimension eingesetzt. Dazu wurden die Streifen dreimal 5 min in Äquilibriumspuffer I (6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 mg/ml DTT) inkubiert, erneut kurz mit ddH₂O gespült und dreimal 5 min in Äquilibriumspuffer II (identisch Äquilibriumspuffer I, statt DTT 25 mg/ml Iodacetamid) inkubiert. Die so behandelten Streifen wurden kurz mit ddH₂O gespült, abgetropft und über ein SDS-PAGE Trenngel (12%, 20 x 20 cm) mit heißer 0,5% (w/v) Agarose, gelöst in SDS-Elektrophoresepuffer mit Spuren von Bromphenolblau, eingegossen. Die Elektrophorese der zweiten Dimension fand, wie unter Punkt 3.4.1.2 beschrieben, statt. Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte über eine Coomassie- oder Silberfärbung bzw. über spezifische Antikörper nach SDS-PAGE und Immunoblot.

3.4.4 Präparation von Gesamt-Zellysaten

Zur Präparation von Gesamt-Zellysaten aus Gewebekulturzellen wurden Suspensions-HeLa-Zellen benutzt oder adhärenente Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin von der Unterlage gelöst, 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpelett wurde in IP- oder RIPA-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen) auf Eis aufgeschlossen. Alternativ wurden Gewebekulturzellen direkt, nach zweimaligem

Waschen mit PBS, mit IP- oder RIPA-Puffer versetzt und durch Abschaben mit einem Zellschaber in den Puffer überführt. Auch hierbei wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde anschließend für 15 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert.

3.4.5 Metabolische Markierung von Gewebekulturzellen mit [³²P]-ortho-Phosphat und dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phosphoaminosäuren

Für die metabolische Markierung wurde jeweils eine 250 ml Flasche adhärenter HeLa- oder MCF7-Gewebekulturzellen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Diese wurden zweimal mit warmem TBS und einmal mit Phospholabel-Medium gewaschen und anschließend mit 0,5 mCi [³²P]-ortho-Phosphat pro ml Phospholabel-Medium für 4 h weiterkultiviert. Die Gewebekulturzellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml IP-Puffer (mit 150 µM Na-ortho-Vanadat und 100 µM KF Phosphataseinhibitoren) versetzt und mit einem Zellschaber von der Kulturunterlage gelöst. Die Zellsuspension wurde auf Eis mit einer G23 Kanüle homogenisiert, 10 min bei 100°C gekocht, 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 µl Protein A-Sepharose (50%, v/v) zur Bindung unspezifischer Proteine 1 h auf einem Überkoprotator bei 4°C inkubiert. Die Bindung an den vorgekoppelten Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei 4°C. Die Sepharosebeads wurden viermal mit IP-Puffer mit Phosphataseinhibitoren gewaschen und in 25 µl 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Nach Amidoschwarzfärbung wurde die PVDF-Membran ein bis zwei Tage mit einem Verstärkerschirm gegen einen sensitiven Film (MS) exponiert. Die resultierenden Radioaktivsignale wurden mit der Amidoschwarz gefärbten Membran zur Deckung gebracht und die radioaktiv markierten Proteine aus der PVDF-Membran ausgeschnitten. Dabei wurde jeweils nur zwei Drittel einer Bande ausgeschnitten, um nach erneuter Exposition der Membran zu überprüfen, ob das ausgeschnittene Membranstück mit dem radioaktiven Signal übereinstimmte. Zudem wurde mit der verbliebenen Membran eine Antikörper-Detektion durchgeführt um die ausgeschnittene Bande dem gewünschten spezifischen Protein zuzuordnen.

Das ausgeschnittene Membranstück wurde kurz in Methanol rehydriert, zweimal in ddH₂O gewaschen und mit 25 µl 6N HCl versetzt. Die Hydrolyse des Proteins erfolgte

für 50 min bei 110°C im Wärmeschrank. Die Reaktion wurde mit 25 µl ddH₂O abgestoppt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Membran Vakuumpumpe MD8C (Vakuubrand, Wertheim) getrocknet. Das getrocknete Hydrolysat wurde in 3,5 µl DC-Puffer I resuspendiert, mit 1 µl Phosphoaminosäurestandard (Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin, jeweils 0,3 µg/ml, Sigma) versetzt und in 0,25 µl Fraktionen auf eine Dünnschichtchromatographie-Celluloseplatte in einem Punkt aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoaminosäuren erfolgte elektrophoretisch in zwei Dimensionen mit einer HTLE-7000 Apparatur (CBS Scientific, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die erste Dimension wurde bei pH 1,9 in DC-Puffer I bei 1,5 kV, für 35 min durchgeführt. Die Platte wurde anschließend mit einem Fön 20 min lang getrocknet und eine zweite Elektrophorese, um 90° gedreht, mit DC-Puffer II bei pH 3,5 für 30 min und 1,3 kV durchgeführt. Die Platte wurde bei 60°C getrocknet und der Phosphoaminosäurestandard mit 0,5% Ninhydrin-Lösung in Aceton bei 80°C visualisiert. Der Nachweis der radioaktiven Phosphoaminosäuren erfolgte durch ein- bis dreiwöchige Exposition der DC-Platte mit einem Verstärkerschirm gegen einen sensitiven MS-Röntgenfilm.

3.4.6 Gekoppelte in-vitro-Transkription und -Translation von Proteinen

Zur gekoppelten *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das „TNT-Sp6/T7 coupled Transcription/Translation Assay“ der Firma Promega nach deren Angaben verwendet. Die zur Translation verwendeten Konstrukte enthielten einen T7 oder Sp6 Promoter und leiteten sich von pET11a, pET28a oder pBluescript SK(-) ab. Zur radioaktiven Markierung wurde [³⁵S]-Methionin verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 µCi/µl), 1 µl Aminosäuremischung ohne Methionin, 1 µl RNasin, 25 µl „TNT-T7 Quick Reticulocyte Lysate“, 1 µl TNT-Reaktionspuffer und 1µl TNT-RNA Polymerase (T7 oder Sp6). Die Reaktion wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt, für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren. Ein Aliquot der Reaktion wurde durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

3.4.7 Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins durch metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein (Pulse-Chase)

Zur Analyse der Halbwertszeit von p27 und abgeleiteten Mutanten wurde je eine 15 cm Zellkulturschale HeLa-Gewebekulturzellen (80% konfluent) mit HA-Fusionskonstrukten von p27 transfiziert, 5 h nach der Transfektion mit Trypsin von der Kulturschale gelöst und zu gleichen Teilen pro Konstrukt auf je vier frische Zellkulturflaschen (entsprechend der Anzahl der geplanten Zeitpunkte für die Halbwertszeitbestimmung des Proteins) aufgeteilt und über Nacht weiterkultiviert.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 5 ml Hungermedium pro Flasche, zur Reduktion des endogenen Methionin und Cystein, für 60 min kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit „Pro-mix L-[³⁵S] *in vitro* cell labelling mix“ (Amersham) zu einer Endaktivität von 0,05 mCi /ml [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein versetzt und 1 h metabolisch markiert. Das radioaktive Medium wurde jeweils durch 25 ml Chase-Medium ersetzt, das Medium im Fall des 0 h-Wertes umgehend wieder entfernt und die Zellen geerntet. Für die übrigen Zeitpunkte wurden die markierten Zellen insgesamt je 2 h, 4 h und 6 h weiterkultiviert und anschließend geerntet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 ml 10 x Trypsin versetzt und 2 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Chase-Medium versetzt, in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt, 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert, in 1,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 1500 rpm) wurde das Zellpelett in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Lyse der Zellen erfolgte in je 750 µl IP-Puffer durch Homogenisieren mit einer G23 Kanüle auf Eis. Die Proben wurden 5 min bei 13000 g abzentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes wurde mit dem „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ bestimmt. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei 100°C gekocht, 10 min auf Eis abgekühlt und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (10 min, 13000 g) pelettiert. Jeweils genau gleiche Proteinmengen wurden mit identischen Mengen an Protein G-Sepharose gebundenen HA-Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert, dreimal mit Lysispuffer gewaschen, abzentrifugiert und in 25 µl 2 x -SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben und Aliquote der Überstände wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Coomassiefärbung und

Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der [³⁵S]-Totalinkorporation sowie der Halbwertszeit von p27 wurde mit einem Fujifilm BAS-2500 Phosphoimager (Fujifilm, Düsseldorf) durchgeführt.

3.4.8 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und eine Einzelkolonie auf 200 ml bis 10 l Superbroth-Medium überimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 4 bis 5 h bei 20°C (z.B. die Kinasen Abl^{KD}, Abl^{KD+SH3}), 30°C (die isolierten SH3-Domänen und CAKp1-GST) oder 37°C (alle restlichen in dieser Arbeit exprimierten Proteine) wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, direkt weiter aufgearbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.4.9 Native und denaturierende Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen, Renaturierung von Proteinen

Proteine wurden in dieser Arbeit rekombinant als GST- oder His-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt und daraus gereinigt. Zur Aufreinigung von Proteinen wurden zwei grundlegende Methoden angewandt. Lag das Protein in einer löslichen Form in *E. coli* vor, wurde eine native Affinitätsreinigung des Proteins über eine Nickel-Chelat- oder Glutathionsepharosematrix durchgeführt. Lag das rekombinante Protein in unlöslicher Form in Bakterien vor („inclusion-bodies“), wurde eine denaturierende Reinigung mit anschließender Renaturierung des Proteins durchgeführt.

Aufschluß der Zellen:

Das Bakterienpellet wurde in Resuspensionspuffer (200 mM NaCl, 25 mM Naphosphat pH 8,0, 2,5 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin) aufgenommen und auf Eis mittels Ultraschall (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen) aufgebrochen. Alternativ zur Ultraschallbehandlung wurde bei besonders empfindlichen Proteinen (z.B. die Kinasen Abl^{KD}, Abl^{KD+SH3}) das Bakterien-Pellet mit 3,5 mg/ml Lysozym für 30 min bei RT in 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0 aufgeschlossen.

Native Reinigung von Proteinen über Nickel-Chelat- oder Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie:

Eine native Anreicherung über Nickel-Chelat-Chromatographie wurde für Abl^{KD}, Abl^{KD+SH3}, p27 sowie für verkürzte Formen von p27 und Aminosäureaustausche von p27, für p57 und für Grb2-His angewandt. Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der bakteriellen Zelltrümmer 35 min bei 45000 rpm zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde mit ca. 1 mg „ProBond Nickel-Chelating Resin“ pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und 1 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Das immobilisierte Protein wurde dreimal mit Resuspensionspuffer gewaschen (mit zusätzlich 10 mM Imidazol) und mit 300 mM Imidazol eluiert.

Das Eluat wurde dialysiert, gegebenenfalls eingeeengt (Centricon, Zentrifugenfiltereinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle) oder, falls eine höhere Reinheit der Proteine erforderlich war, weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde analog über eine Glutathionsepharosematrix durchgeführt. Die Elution des immobilisierten Proteins erfolgte hierbei mit 20 mM Glutathion bei pH 8,0. Eine Glutathionaufreinigung kam für die isolierten SH3-Domänen der 41 Signaltransduktionsproteine, sowie für die isolierten Domänen von Grb2, für p27-GST, Grb2-GST, für CAKp1-GST und für GST selbst zum Einsatz.

Denaturierende Reinigung von Proteinen über Nickel-Chelat- oder Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie:

Zur Aufreinigung von „inclusion-bodies“ (z.B. p21 und Aminosäureaustausche von p21, FBX3) wurde das Pellet in 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA und 0,5% (w/v) Triton-X-100-Lösung zur Solubilisierung der bakteriellen Membranen mittels Ultraschall resuspendiert, 15 min bei RT auf einem Überkoprotator inkubiert und 15 min bei 10000 rpm und RT abzentrifugiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, abschließend wurde das Pellet in Resuspensionspuffer mit Ultraschall homogenisiert, gewaschen und 15 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Zur Denaturierung des Proteins wurde das „inclusion-body“-Pellet in Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M Na-Phosphat, pH 8,0) über Nacht bei RT gelöst. Bei sehr schwer löslichen Proteinen (Src^{rec}) wurde das Pellet mit 12 M Harnstoff bei 50°C für 4 h gelöst. Die denaturierte Proteinlösung wurde bei 10000 rpm 15 min, RT abzentrifugiert.

Der Überstand wurde auf eine mit Denaturierungspuffer voräquilierte Nickel-Chelat-Matrix gegeben und 1-2 h auf einem Überkoprotator inkubiert. Die immobilisierten Proteine wurden dreimal mit Denaturierungspuffer gewaschen und mit 300 mM Imidazol in Denaturierungspuffer eluiert.

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen (cdc14 aktiv und cdc14 inaktiv) über eine Glutathionsepharosematrix wurde analog durchgeführt. Die Konzentration der Harnstofflösung wurde nach dem Lösen der Proteine auf 4 M eingestellt. Die Elution des Fusionsproteins von der Glutathionsepharosematrix erfolgte mit 20 mM Glutathion bei pH 8,0.

Renaturierung affinitätsgereinigter, denaturierter Proteine:

Zur Renaturierung der denaturierend affinitätsgereinigten Proteine kamen, abhängig vom jeweiligen Protein, vier verschiedene Renaturierungsstrategien zum Einsatz.

Im einfachsten Fall ließ sich das eluierte Protein mit einer Stufendialyse zurückfallen (p57 aus „inclusion-bodies“). Dazu wurde das Eluat in einem Dialyseschlauch jeweils 2 h mit einer, pro Schritt um 2 M sinkenden Harnstoff-Konzentration dialysiert. Der letzte Dialyseschritt erfolgte gegen IP-Puffer. Alternativ wurde das Protein an der Chelat- oder Glutathion-Matrix immobilisiert belassen, dort mit den analog sinkenden Harnstofflösungen renaturiert und anschließend mit Imidazol (300 mM, pH 8,0) oder Glutathion (20 mM, pH 8,0) von der Matrix eluiert (cdc14). In einer weiteren Renaturierungsstrategie wurde das denaturierte Proteineluat durch tropfenweises Versetzen mit IP-Puffer (mit einer Membranpumpe über 24 h) unter ständigem Rühren auf das 15fache seines ursprünglichen Volumens verdünnt. Ausgefällene Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand erneut über Nacht gegen IP-Puffer dialysiert, um den restlichen Harnstoff zu entfernen (Src^{rec}). Bei sehr schwer zu renaturierenden Proteinen (p21 und Aminosäureaustasche von p21) kam eine Ionenaustauscherchromatographie mit immobilisierter Renaturierung und anschließender Elution des renaturierten Proteins über einen Salzgradienten zur Anwendung (siehe Punkt 3.4.10). Die renaturierten Proteine wurden, falls nötig, eingeeengt (Centricon, Zentrifugenfiltereinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle) oder, falls eine höhere Reinheit der Proteine erforderlich war, weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

3.4.10 Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration

Ionenaustauscherchromatographie:

Eine Chromatographie über Anionen- oder Kationenaustauscher wurde zur Aufreinigung oder Anreicherung von Proteinen durchgeführt (p27 und abgeleitete Formen, p57). Dazu wurden Proteinlösungen aus vorangegangenen nativen oder denaturierten Affinitätsreinigungen (p57 aus „inclusion-bodies“), (siehe 3.4.9) eingesetzt. Ionenaustauscherchromatographien wurden auch zur Renaturierung von Proteinen benutzt (p21 und abgeleitete Formen). Die Chromatographien wurden mit Anionen- und Kationenaustauschersäulen der Firma Amersham durchgeführt.

Die Chromatographie erfolgte mit einem Äktapurifier FPLC/HPLC-System unter Benutzung der vom Hersteller (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für die jeweilige Säule angegebenen Säulenlaufparametern (Programm UNICORN 3.00).

Zur Aufreinigung von nativen Proteinen wurde die Proteinlösung 24 h gegen einen Puffer mit niedrigem Salzgehalt (25 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8,0, 1 mM PMSF, 1 mM DTT; Puffer A) dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A voräquilibrierte, Ionenaustauschersäule geladen und nichtgebundene Proteine wurden mit 10 Säulenvolumina Puffer A ausgewaschen. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgte mit einem Gradienten von Puffer A nach Puffer B (0,5 M –1 M NaCl (abhängig vom Protein), 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM PMSF, 1 mM DTT) mit einer Flußrate von 1 ml/min. Das Eluat wurde zu 0,25 ml Fraktionen aufgefangen und nach SDS-PAGE durch Coomassiefärbung oder im Immunoblot analysiert.

Zur Renaturierung von Proteinen wurde das denaturierte Protein 24 h gegen Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 25 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8,0) dialysiert und auf eine mit Denaturierungspuffer voräquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Volumina Denaturierungspuffer zum Entfernen von ungebundenem Protein gewaschen. Die Renaturierung des an die Säulenmatrix gebundenen Proteins erfolgte mit einem sehr langsamen Gradienten (0,1 ml/min Flußrate) von Denaturierungspuffer zu Puffer A über 24 h. Die Elution des Proteins erfolgte mit einem zweiten Gradienten von Puffer A nach Puffer B. Die Fraktionen des gewünschten Proteins wurden vereinigt, eingengt und eingefroren oder gegebenenfalls weiter aufgereinigt.

Gelfiltration:

Weitere Aufreinigungen von Proteinen nach einer Affinitäts- und Ionenaustauscherchromatographie erfolgten über eine Gelfiltration der Proteinprobe (p27 und abgeleitete Formen, p21 und p57). Daneben wurden analytische Gelfiltrationen zur Analyse der Zusammensetzung eines Proteinkomplexes und zur Abschätzung der Größe von Proteinen in Lösung herangezogen (CDK2/Cyclin A; CDK2/Cyclin A/p27; p27-Grb2). Gelfiltrationen wurden mit vorgepackten Gelfiltrationssäulen (Amersham) unter Verwendung des FPLC/HPLC-Äktapurifizier-Systems durchgeführt. Eine Proteinlösung wurde auf eine, mit Laufpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) voräquilibrierte Säule aufgetragen und in einer isokratischen Elution über 1,5 Säulenvolumina größenfraktioniert.

Der Säulendurchlauf wurde zu 0,25 ml - 5 ml Fraktionen aufgefangen und nach SDS-PAGE durch Coomassiefärbung oder im Immunoblot analysiert.

3.4.11 Reinigung der Cip/Kip-Proteine durch Kochen und Stabilisierung von Proteinen

Eine für die Cip/Kip-Proteine spezifische Reinigungsstrategie basiert auf der Hitzestabilität der Inhibitorproteine. Säugerzellextrakt oder Proteinextrakte aus bakteriellen Expressionen der rekombinanten Inhibitoren wurden 10 min bei 100°C gekocht, 10 min auf Eis abgekühlt und für 35 min bei 45000 rpm von den ausgefallenen Proteinverunreinigungen abgetrennt. Die erhaltene Proteinlösung wurde direkt für Untersuchungen eingesetzt oder das gewünschte Protein wurde weiter angereichert.

Die mit den beschriebenen Methoden (3.4.8-3.4.11) aufgereinigten Proteine wurden meist direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Bei sehr instabilen Proteinen wurden die Proteine mit stabilisierenden Reagenzien (1-10% (w/v) Glycerin (Abl^{KD}, Abl^{KD+SH3}, CDK2/Cyclin A), mit 1 mg/ml BSA (cdc14, Src^{rec}), oder mit 100 mM Arginin für p21 und abgeleitete Formen) stabilisiert. Daneben wurden Proteine durch Variation der Salzkonzentrationen oder der pH-Werte des Lagerungspuffers stabilisiert.

3.4.12 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Insektenzellen

Die Reinigung von aktivem Cyclin A-CDK2 aus überexprimierenden Insektenzellen erfolgte über eine Nickel-Chelat-Affinitätsreinigung und eine anschließende Gelfiltration. Alle Reinigungsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4°C bzw. auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Humanes Cyclin A und ein aminoterminales Hexahistidin-fusionsprotein von humanem CDK2 wurden mit Hilfe rekombinanter Baculoviren in SF9 exprimiert. Die Baculoviruskonstrukte stammten aus dem Labor von Dr. D. Morgan (University of California, San Francisco, USA).

Die beiden Insektenzellpellets wurden im gleichen Volumen Baculovirus-Lysispuffer (40 mM Na-Phosphat, 600 mM NaCl, 20% (w/v) Glycerin, pH 8,0, 0,1 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 x complete ohne EDTA (Roche), 20 mM MgCl₂, 8 mM ATP) resuspendiert und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators (Braun, Typ L) aufgebrochen. Das Homogenisat für CDK2 wurde mit rekombinantem CAK1p-Protein (10 µg, einer Kinase aktivierenden Kinase aus Hefe, die CDK2 phosphorylieren kann) versetzt und 45 min bei 30°C zur Phosphorylierung und Aktivierung durch die endogenen Kinasen der Insektenzellen sowie der rekombinanten CAK1p inkubiert (Kaldis, 1999). Die beiden Homogenisate wurden vereinigt und 1 h zur Bildung des CDK2/Cyclin A-Komplexes inkubiert. Das Homogenisat wurde 35 min bei 35000 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit „ProBond Nickel-Chelating Resin“ versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Überkopffrotator zur Immobilisierung des Cyclin A-CDK2 Komplexes inkubiert. Der Komplex wurde viermal in IP-Puffer mit 10 mM Imidazol gewaschen und mit 300 mM Imidazol in IP-Puffer von der Chelat-Matrix eluiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Eluat über eine Superdex 200 pg HiLoad 26/60-Gelfiltrationssäule weiter angereichert (Laufpuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF). Nach Analyse der Gelfiltrations-Fractionen mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurden die, den Cyclin A-CDK2 Komplex enthaltenden Fractionen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.13 In vitro-Phosphorylierung von Proteinen

In vitro-Phosphorylierungsexperimente wurden benutzt um Substrate für Kinasen zu identifizieren, um phosphorylierbare Aminosäurereste in Proteinen zu lokalisieren und um die Aktivität von, die Kinasen inhibierenden Proteinen, in einem gekoppelten

Kinasierungs-Inhibitions-Experiment zu testen. Bei der Phosphorylierung von Substratproteinen wurde sowohl die Phosphorylierung an Serin- /Threoninresten wie auch die Phosphorylierung von Tyrosinresten untersucht.

Serin/Threonin-Phosphorylierungen wurden in Kinasierungspuffer I durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz je zwei Mischungen hergestellt, die zur Kinasierung vereinigt wurden:

MixA: 1 μ l Substratprotein (1-2 μ g/ μ l)	MixB: 1 μ l Kinase (verschiedene
1 μ l ATP (25 μ M Endkonzentration)	Konzentrationen)
add 10 μ l ddH ₂ O	1 μ l Kinasierungspuffer I (10x)
	0,5-1 μ l [γ - ³² P] ATP (10 μ Ci/ μ l)
	add 10 μ l ddH ₂ O

Als Substratproteine wurden dabei p21, p27 und davon abgeleitete Formen sowie Histon H1 und pRb eingesetzt. Als Kinase diente CDK2/Cyclin A.

Die Kinasereaktion wurde 30 min bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von 20 μ l 2 x-SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die phosphorylierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Autoradiographie analysiert. Die Aktivität von Kinase-Inhibitoren (p21, p27, p57 und davon abgeleitete Formen) wurde in analoger Weise getestet. Dem MixA wurden dabei noch das Inhibitor-Protein (1 μ l) zugefügt. Um die Km des Inhibitors zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen (0,1 ng - 1 μ g) des Inhibitor-Proteins gegen eine konstante Menge einer Kinase titriert.

Tyrosin-Phosphorylierungen wurden in 20 μ l Kinasierungspuffer II durchgeführt. 0,5-2,5 μ l Kinase (Abl, Abl^{KD}, Abl^{KD+SH3}, Src^{Sf9}, Src^{rec.} und Lyn; verschiedene Konzentrationen), 1 μ l Substratprotein (0,5-1 μ g/ μ l, p21, p27, p57 und davon abgeleitete Formen, sowie Sam68, RanGAP1 und BSA), ATP (50 μ M Endkonzentration) und 0,5-1 μ l [γ -³²P] ATP (10 μ Ci/ μ l) sowie 1 μ l BSA (2 μ g/ μ l) wurden bei 30°C für 2 h inkubiert. Die Kinasierung wurde mit 20 μ l 2 x-SDS-Probenpuffer abgestoppt und die phosphorylierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasierungen wurden auch immobilisiert durchgeführt. Dazu wurde entweder die Kinase oder das Substrat an Glutathion- oder Nickel-Chelat-Sepharose gebunden, oder eine der beiden Komponenten (Substrat oder Kinase) wurde mittels spezifischem Antikörper an Protein A-Sepharose aus Zellextrakt immunopräzipitiert. Die Reaktion selbst wurde unter den für die jeweilige

Phosphorylierung nötigen (siehe oben) Bedingungen durchgeführt. Die an der Sepharosematrix immobilisierte Komponente wurde dazu mit 25 µl des erforderlichen Kinasepuffers versetzt. Zur besseren Durchmischung der immobilisierten Kinasierungsreaktionen wurde die Probe alle 5 min gemischt.

Zur Quantifizierung der in ein Protein inkorporierten Radioaktivität wurde das Gel nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung getrocknet und die Cherenkov-Strahlung der ausgeschnittenen Protein-Bande gemessen. Alternativ wurde die Aktivität über ein Phosphoimagersystem (Fujifilm BAS-2500 Phosphoimager, Fujifilm, Düsseldorf) ermittelt.

3.4.14 In vitro-Protein-Protein-Bindungsstudien

Für Bindungsstudien wurden jeweils eine Proteinkomponente rekombinant als GST- oder His-Fusion vorgelegt, während die anderen Komponenten in Form von *in vitro*-translatierten Proteinen oder rekombinantem Protein ohne Fusions-„tag“ zugegeben wurden. Beide Komponenten wurden in IP-Puffer 1-3 h auf einem Überkoprotator bei 4°C inkubiert, anschließend mit Glutathionsepharose oder „ProBond Nickel-Chelating Resin“ versetzt und erneut 30 min bis 1 h inkubiert. Der immobilisierte Komplex wurde dreimal mit IP-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in 25 µl 2 x-SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse einer Protein-Protein Interaktion erfolgte über SDS-PAGE und Coomassiefärbung, Immunoblot-Analyse oder Autoradiographie.

3.4.15 Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF

Zur Identifikation von Proteinen wurden die entsprechenden Banden aus Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gelen ausgeschnitten und direkt im Gel mit Trypsin oder LysC nach Eckerskorn und Lottspeich (1990) verdaut. Die massenspektroskopische Analyse der Peptidfragmente erfolgte mittels eines „Bruker Reflex III MALDI – time of flight“ Massen-Spektrometers (Bruker-Franzen, Bremen) und wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Friedrich Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Die ermittelten Peptidmassen wurden durch Datenbankanalysen mit dem Programm MSFIT (<http://prospector.ucsf.edu>) ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Erzeugung und Charakterisierung einer CDK- und Cyclin-bindungsdefizienten Mutante von p27

p27^{Kip1} bindet eine Vielzahl von verschiedenen CDK-Komplexen. Um Bindungspartner von p27^{Kip1} zu identifizieren, die unabhängig von CDKs und Cyclinen an p27 assoziieren, wurde ein CDK- und Cyclin-bindungsdefizientes Protein (p27^{ΔCKI}) erzeugt. p27^{ΔCKI} wurde aufgrund der bekannten Röntgenstrukturdaten des Komplexes p27^{wt} - CDK2/Cyclin A (Russo *et al.* 1996a, siehe auch Abb. 2.2) konstruiert. Dazu wurden mittels PCR jeweils zwei Aminosäuren in den beiden Bindungsstellen von p27 mit der höchsten Interaktion des Inhibitors für CDK2 und für Cyclin A in p27 ausgetauscht (L32, F33, F87, Y88/ A). Beide Proteine, p27^{wt} und p27^{ΔCKI}, wurden in pET28a kloniert und als N-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die Proteine wurden über eine Nickel-Chelat-Matrix angereichert. Eine zusätzliche Aufreinigung erfolgte durch Ionenaustauscherchromatographie (HighTrapSP, p27 eluiert bei 100-150 mM NaCl). In einem abschließenden Schritt wurden die p27-haltigen Fraktionen aus der Ionenaustauscherchromatographie über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200pg HiLoad 26/60) bis zu einer Reinheit > 96% aufgereinigt. Die fehlende inhibitorische Aktivität von p27^{ΔCKI} wurde *in vitro* in einem Histon H1-Kinaseassay belegt. Zudem wurde in einer Untersuchung mittels Echtzeit-Mikroskopie gezeigt, daß eine N-terminale YFP-Fusion von p27^{ΔCKI} (pEYFP-C1), nach Transfektion in HeLa-Zellen, nicht mehr zu einem Zellzyklusarrest führt. Mit YFP-p27^{ΔCKI} transfizierte Zellen können eine komplette Zellteilung durchlaufen, während mit p27^{wt}-YFP transfizierte HeLa-Zellen arretieren. Dies belegt, daß p27^{ΔCKI} nicht mehr als Inhibitor der CDK-Komplexe fungieren kann.

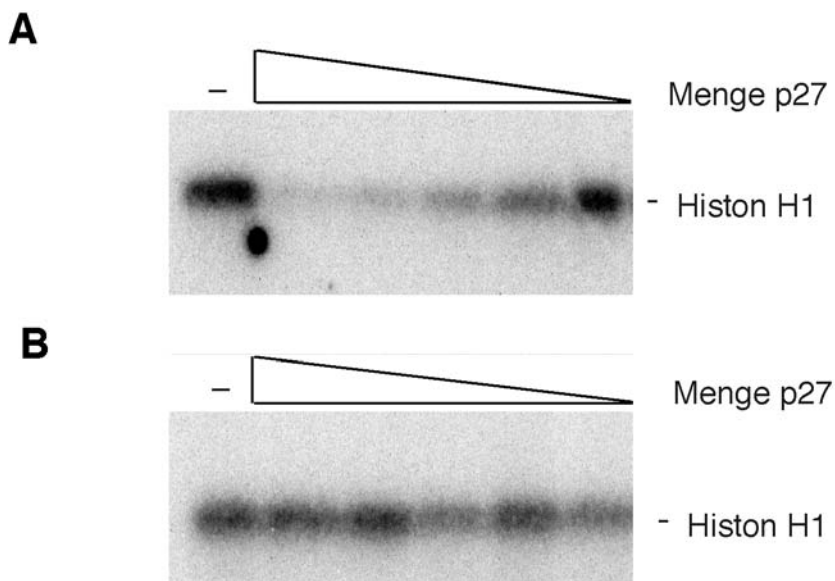


Abbildung 4.1: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von p27^{wt} und der CDK-bindungsdefizienten Mutante p27^{ΔCKI}.

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität beider Proteine wurde ein Histon H1-Kinaseassay mit aktivem, rekombinantem CDK2/Cyclin A aus Insektenzellen durchgeführt. Die beiden Inhibitorproteine p27^{wt} und p27^{ΔCKI} wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und wie unter 4.1 beschrieben gereinigt. Die Menge beider Proteine wurde über Coomassieanfärbung nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine abgeglichen. Mit jeweils gleichen Ausgangsmengen der beiden Inhibitoren wurde eine Titration durchgeführt. Die Aktivität des Inhibitors wird dabei über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das CDK2/Cyclin A-Substrat Histon H1 bestimmt. Das Inhibitorpotential von p27 ist dabei gekennzeichnet durch die Inaktivierung der CDK2/Cyclin A-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Die Titration wurde mit unterschiedlichen Mengen p27 (1 μ g, 0,5 μ g, 10 ng und 0,5 ng) bei konstanten Mengen Kinase (50 ng) und Substrat (2 μ g) durchgeführt. Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Gels der über SDS-PAGE aufgetrennten Kinasereaktionen. (A) Titration von p27^{wt}. (B) Titration der CDK-bindungsdefizienten Mutante p27^{ΔCKI}.

4.2 Identifikation neuer Bindungspartner von p27

p27^{wt}, p27^{ΔCKI}, p21 und p57 wurden in größeren Mengen (15 mg) rekombinant in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt. Die Reinigung von p27 erfolgte wie in Punkt 4.1 beschrieben. p21 wurde in einer denaturierenden Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie angereichert. Das denaturierte Protein wurde anschließend auf einer Ionenaustauschersäule (HighTrapSP) renaturiert und mit einem Salzgradienten (p21 eluiert bei 400-450 mM NaCl) von der Säule eluiert. Für p57 wurde eine Reinigungsstrategie über eine native Nickel-Affinitätschromatographie und eine zusätzliche Anreicherung über Ionenaustauscherchromatographie (HighTrap SP) bei pH 8,0 und Elution bei 160-200 mM NaCl erarbeitet. p57 wurde abschließend über eine Superdex 200pg HiLoad 26/60-Säule gelfiltriert. Das aufgereinigte p27^{wt} und p27^{ΔCKI} wurde kovalent an einer Matrix (Affi-Gel10) immobilisiert.

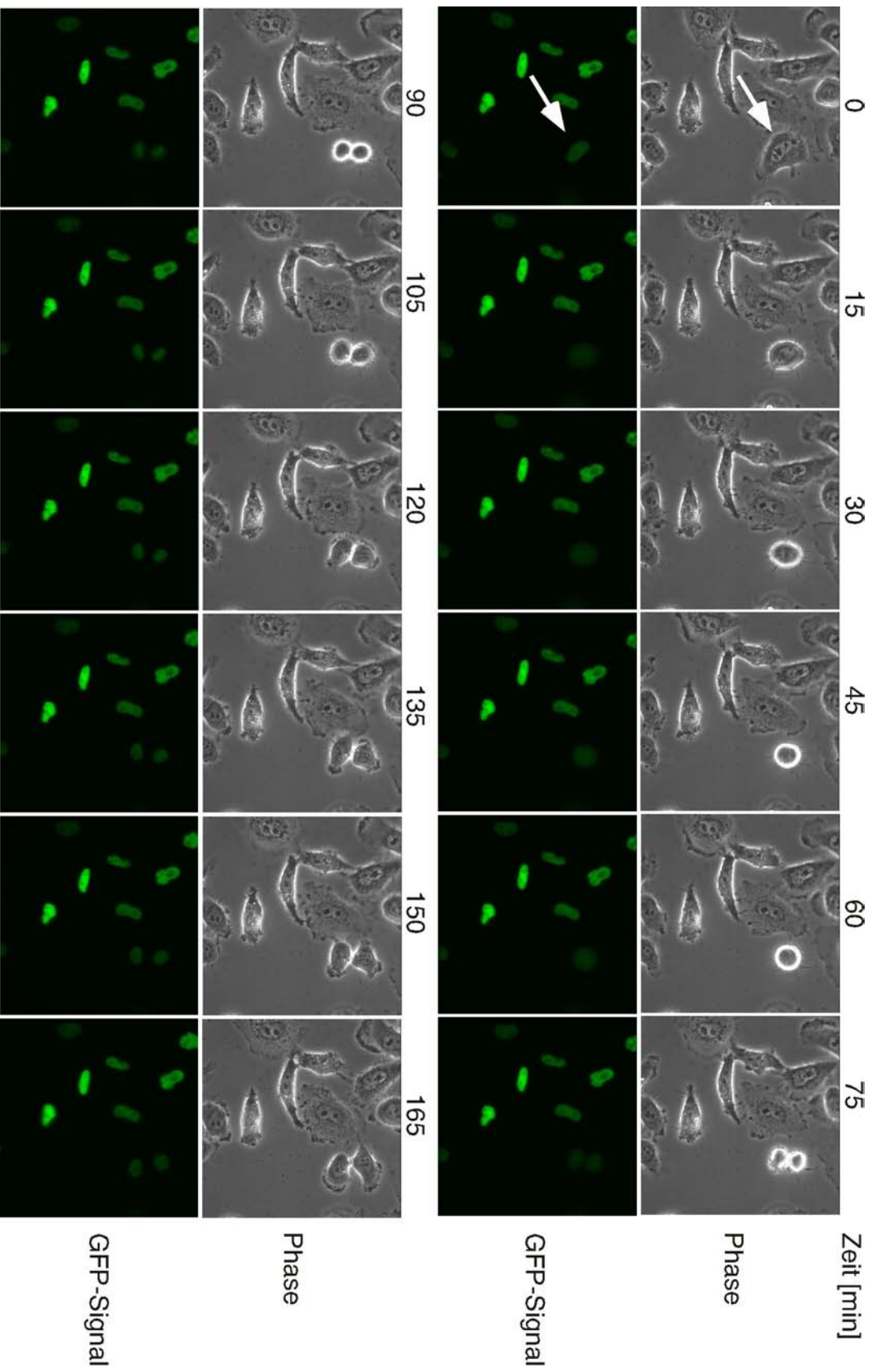


Abbildung 4.2: Echtzeitmikroskopische Aufnahme einer kompletten Zellteilung einer, mit der CDK-bindungsdefizienten Mutante p27^{CKI} transfizierten HeLa-Zelle.

HeLa-Zellen wurden mit dem YFP-Fusionskonstrukt der CDK-bindungsdefizienten Mutante von p27, p27^{CKI}, transfiziert und die Zellteilung wurde in seriellen Aufnahmen am Echtzeitmikroskop dokumentiert. Die Zellen wurden im Abstand von 15 min im Fluoreszenzkanal (Anregungswellenlänge 498 nm) und im Phasenkontrastkanal aufgenommen. Die Bilder wurden anschließend zu einer seriellen Abfolge zusammengestellt. Die CDK-bindungsdefiziente Mutante von p27 zeigt im Vergleich mit dem analogen YFP-Fusionskonstrukt von p27^{wt} (Daten nicht gezeigt) keinen Zellzyklusarrest. Die sich teilende Zelle ist mit einem Pfeil markiert.

Als Spezifitätskontrolle der Cip/Kip-Proteine wurden p21 und p57 mit der Affi-Gel10-Matrix kovalent quervernetzt. Diese gekoppelten Proteine wurden mit HeLa-Proteinextrakt in IP-Puffer (aus je 25 l HeLa-Suspensionskultur) inkubiert, um Interaktionspartner der immobilisierten Proteine zu identifizieren (Abbildung 4.3). In einem Kontrollansatz wurde ein „pull-down“ mit p27^{wt} durchgeführt. Um die erwarteten CDKs und Cycline dieses „pull-down“ zu identifizieren wurden die im Coomassiegelel sichtbaren Interaktionspartner von p27 ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zerkleinert und in 2 x SDS-Probenpuffer gekocht. Diese Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch analysiert. Die vermuteten Cycline und CDKs wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für p27^{wt} wurden eine Reihe der erwarteten Cycline und CDKs gefunden und eindeutig den jeweiligen Proteinbanden des „pull-down“ (Abbildung 4.4) ihrem Laufverhalten gemäß zugeordnet. Dagegen fehlten bei p27^{ΔCDK} erwartungsgemäß die Cyclin/CDK-Komplexe. Dies belegte die Anwendbarkeit dieses Systems zur Identifikation neuer Bindungspartner von p27. Die restlichen, unbekannt Proteine wurden durch Massenspektroskopie und Peptidsequenzierung (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Friedrich Lottspeich am MPI für Biochemie) identifiziert (Abb. 4.3).

Die gefundenen Proteine lassen sich dabei in drei Gruppen unterteilen.

4.2.1 Die Interaktion von p27 mit Hitzeschockproteinen

Die identifizierten Proteine Grp78, Hsc70, Hsp70 und Hspc017 sind Hitzeschockproteine. Diese werden in einem „pull-down“-Verfahren mit rekombinanten Proteinen erwartet. Bei einer derartigen Vorgehensweise liegt immer ein Teil der Proteine nicht oder unzureichend gefaltet vor. Die endogenen Chaperone der Säugerzelle binden an diese Proteine, um sie in ihrer Funktion als zelleigenes Reparatursystem zu stabilisieren und korrekt zu falten. Andererseits könnte den Hitzeschockproteinen auch *in vivo* eine Rolle für die Regulation von p27 zukommen. Die potentielle Assoziation von p27 mit Hitzeschockproteinen *in vivo* wurde mit p27- sowie mit Hsp70/Hsc70-spezifischen Antikörpern in Koimmunopräzipitationen aus HeLa-Proteinextrakt untersucht.

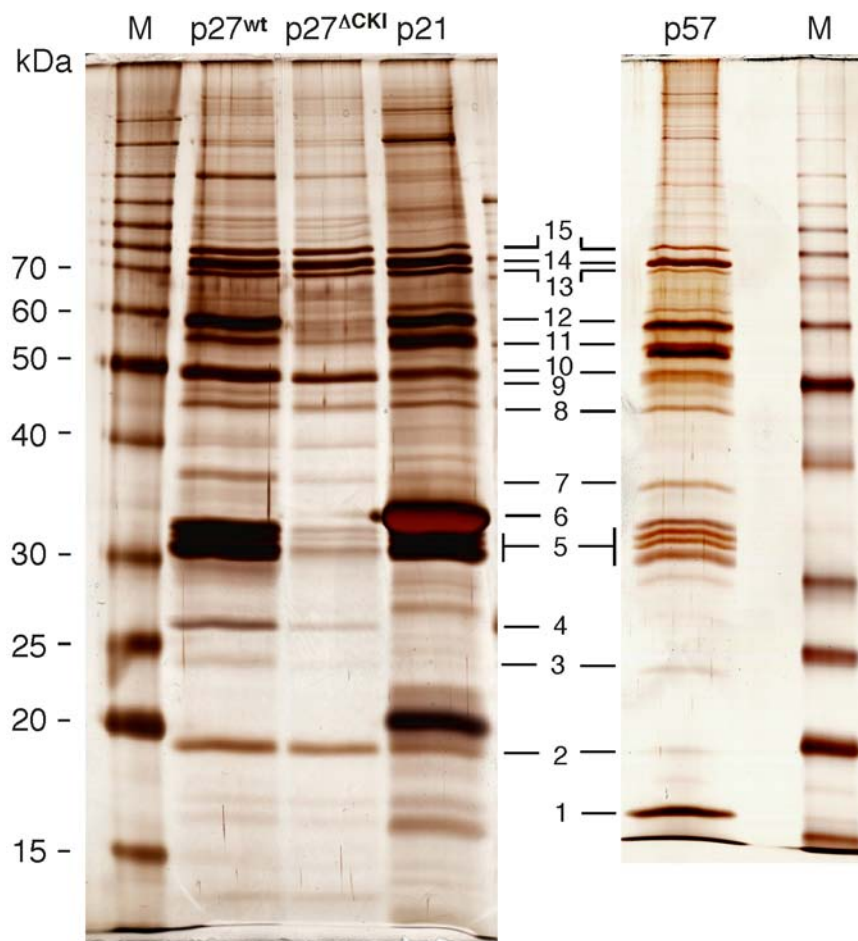


Abbildung 4.3: Identifikation neuer Bindungspartner der Cip/Kip-Inhibitorproteine.

Die aus *E. coli* gereinigten Inhibitorproteine p27^{wt}, p27^{ΔCKI}, p57 wurden kovalent an eine aktivierte Affi-Gel10-Matrix gekoppelt. Die immobilisierten Proteine wurden als „Köder“ für interagierende Proteine aus HeLa-Rohextrakt benutzt. Pro immobilisiertes Protein wurde Zellextrakt aus 25 l dichter HeLa-Suspensionskultur (1 x 10⁶ Zellen/ ml) eingesetzt.

Gezeigt sind die silbergefärbten Gele der über SDS-PAGE aufgetrennten Interaktionspartner von p27^{wt}, der CDK-bindungsdefizienten Mutante p27^{ΔCKI}, p21 und p57. Die vermuteten CDKs und Cycline wurden über Immunoblotanalyse identifiziert (siehe Abbildung 4.4). Die übrigen unbekannt Proteine wurden über Massenspektroskopie und Peptidsequenzierung aus der Spur p27^{wt} ermittelt.

1: potentieller Interagierer von p57, ca. 16 kDa; 2: p19^{SKP1}; 3: potentieller Interagierer; 4: Grb2; 5: CDKs (CDK1, CDK2 und CDK3); 6: PCNA, spezifischer Interagierer von p21; 7: Hspc017; 8: β-Actin; 9: FBX3; 10: Cyclin E1; 11: Cyclin A1; 12: Cyclin B1; 13: Hsp70; 14: Hsc70; 15: Grp78.

In adhärennten asynchronen HeLa-Zellen konnte jedoch keine Interaktion von p27 und Hsp70 oder Hsc70 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die im „pull-down“ erhaltenen Chaperone Hsp/Hsc70 sind daher wahrscheinlich artifizielle Bindungspartner von p27. Die weiteren im „pull-down“ identifizierten Chaperone wurden nicht untersucht, da für diese keine Antikörper verfügbar waren.

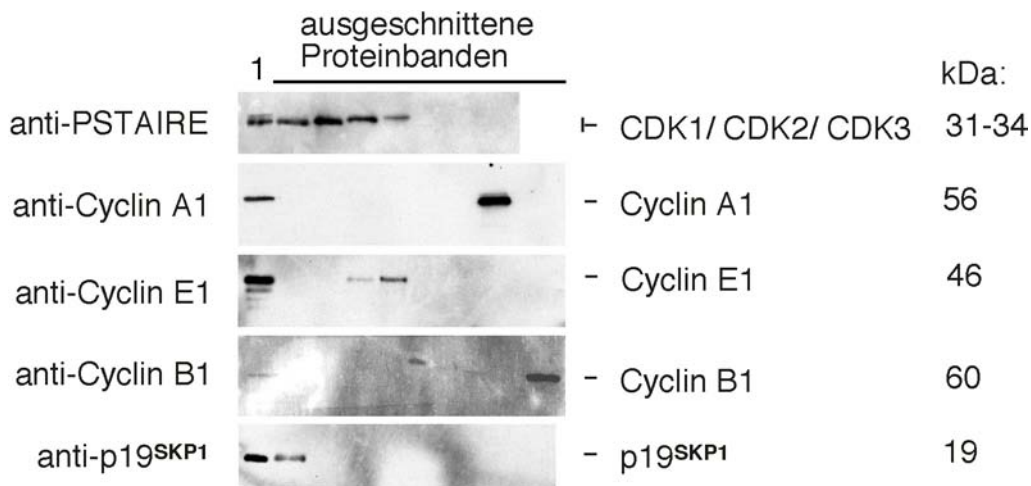


Abbildung 4.4: Identifikation der im „pull-down“ mit p27^{wt} erhaltenen CDKs und Cycline.

Die im „pull-down“ erhaltenen Coomassiegefärbten Proteinbanden (siehe auch Abbildung 4.3) wurden mit dem Polyacrylamid ausgeschnitten, in 2 x SDS-Probenpuffer aufgeköcht und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Identifizierung von Cyclinen, CDKs und p19^{SKP1} erfolgte durch Immunoblotanalyse mit spezifischen Antikörpern. Spur 1: HeLa-Proteinextrakt.

4.2.2 Die Interaktion von p27 mit FBX3 und p19^{SKP1}

Die zweite Gruppe von Proteinen, p19^{SKP1} und FBX3, sind Proteine, von denen belegt ist (p19^{SKP1}) oder bei denen vermutet wird (FBX3), daß sie Funktionen als E3-Ubiquitin-Ligase besitzen. p27 wird nach Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom abgebaut (Pagano *et al.*, 1995). In einem Abbauweg wird die Ubiquitinierung von p27 durch den Ubiquitin-Ligase-Komplex SCF^{SKP2} vermittelt. Dieser Komplex besteht unter anderem aus SKP1, Cullin1, und einem F-Box-Protein (p45^{SKP2}) und ubiquitiniert an T187 phosphoryliertes p27 (Krek, 1998; Malek *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 1999).

Im „pull-down“ wurde nur p19^{SKP1} identifiziert, die weiteren Komponenten des SCF^{SKP2}-Komplexes, p45^{SKP2} (das spezifische F-Box Protein im SCF^{SKP2}-Komplex) und Cullin1, konnten jedoch weder mit Massenspektrometrie noch mittels Westernblot nachgewiesen werden (Abbildungen 4.3 und 4.4). Dagegen konnte ein neues F-Box-Protein, FBX3, identifiziert werden. FBX3 besitzt wie aus dessen Namen (F-Box Protein 3) hervorgeht, ein, dem Cyclin F verwandtes F-Box-Motiv (siehe auch Abb. 4.5). Das Protein wurde in EST-Datenbanken bei einer Suche nach Proteinen mit einem F-Box-Motiv identifiziert und beschrieben (Ilyin *et al.*, 2000; Winston *et al.*, 1999). FBX3 ist bis jetzt noch nicht mit einer Funktion als E3-Ligase in Verbindung gebracht worden. Möglicherweise wird der Abbau von p27 über verschiedene Wege reguliert:

An Threonin 187 phosphoryliertes p27 wird über den bekannten SCF^{SKP2}-Komplex ubiquitiniert. Freies, unphosphoryliertes oder differenziell zu T187 phosphoryliertes p27 (siehe unten) könnte möglicherweise über eine neue E3-Ligase ubiquitiniert werden. Dieser Ubiquitin-Ligase-Komplex könnte die Grundbausteine p19^{SKP1} und FBX3 beinhalten. Um zu überprüfen, ob FBX3, analog zu p45^{SKP2}, an p27 binden kann, wurde eine cDNA von FBX3 kloniert. Dazu wurde die cDNA von FBX3 über PCR aus einem am 5'-Ende unvollständigen EST-„Template“ (pBluescript SK⁻, IMAGp998L191358Q2) amplifiziert und die fehlenden 13 Nukleotide am 5'-Ende mit einem Primer ergänzt. Die Primersequenzen für FBX3 wurden aus der Datenbank des sequenzierten menschlichen Genoms (National Center for Biotechnology Information, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) erhalten. Da zwei Isoformen der cDNA von FBX3 bekannt sind, wurden die Primerpaare so gewählt, daß die theoretische Proteinmasse der cDNA von FBX3 der im „pull-down“ für FBX3 (Abb. 4.3) ermittelten Masse von 49 kDa entsprach.

```

agcggggcagacctgcaccggggccaggcaagATGCGGCCATGGAGACCGAGACGGCGCCGCTGACCCTAGAGTCGC
M A A M E T E T A P L T L E S
TGCCACCGATCCCCTGCTCCTCATCTTATCCTTTTTGGACTATCGGGATCTAATCAACTGTTGTATGTCAGTCGA
L P T D P L L L I L S F L D Y R D L I N C C Y V S R
AGACTTAGCCAGCTATCAAGTCATGATCCGCTGTGGAGAAGACATTGCAAAAAATACTGGCTGATATCTGAGGAAGA
R L S Q L S S H D P L W R R H C K K Y W L I S E E E
GAAAACACAGAAGAATCAGTGTGGAAATCTCTCTTCATAGATACTTACTCTGATGTAGGAAGATAACATTGACCATT
K T Q K N Q C W K S L F I D T Y S D V G R Y I D H
ATGCTGTATTAATAAGGCTGGGATGATCTCAAGAAATATTTGGAGCCCAGGTGTCCTCGGATGGTTTTATCTCTG
Y A A I K K A W D D L K K Y L E P R C P R M V L S L
AAAGAGGGTGCTCGAGAGGAAGACCTCGATGCTGTGGAAGCGCAGATTGGCTGCAAGCTTCTGACGATTATCGATG
K E G A R E E D L D A V E A Q I G C K L P D D Y R C
TTCATACCGAATTCACAATGGACAGAAGTTAGTGGTTCCTGGGTATTTGGAAGCATGGCACTGTCTAATCACTATC
S Y R I H N G Q K L V V P G L L G S M A L S N H Y
GTTCTGAAGATTTGTTAGACGTCGATACAGCTGCCGGAGGATTCCAGCAGAGACAGGGACTGAAATACTGTCTCCCT
R S E D L L D V D T A A G G F Q Q R Q G L K Y C L P
TTAACTTTTTGCATACATACTGGTTTTGAGTCAGTACATAGCAGTGGAAAGCTGCAGAGGGCCGAAACAAAATGAAGT
L T F C I H T G L S Q Y I A V E A A E G R N K N E V
TTTCTACCAATGTCCAGACCAAATGGCTCGAAATCCAGCTGCTATTGACATGTTTATTATAGGTGCTACTTTTACTG
F Y Q C P D Q M A R N P A A I D M F I I G A T F T
ACTGGTTTACCTCTTATGTCAAAAATGTTGTATCAGGTGGCTTCCCCATCATCAGAGACCAAATTTTCAGATATGTT
D W F T S Y V K N V V S G G F P I I R D Q I F R Y V
CACGATCCAGAATGTGTAGCAACAACCTGGGGATATTACTGTGTGCTGTTCCACATCGTTTCTGCCAGAACCTTAGCTC
H D P E C V A T T G D I T V S V S T S F L P E L S S
TGTACATCCACCCACTATTTCTTCACATACCGAATCAGGATTGAAATGTCAAAGATGCACTTCTGAGAAGGCCT
V H P P H Y F F T Y R I R I E M S K D A L P E K A

```

GTCAGTTGGACAGTCGCTATTGGAGAATAACAAATGCTAAGGGTGACGTGGAAGAAGTTCAAGGACCTGGAGTAGTT
 C Q L D S R Y W R I T N A K G D V E E V Q G P G V V
 GGTGAATTTCCAATCATCAGCCCAGGTCGGGTATATGAATACACAAGCTGTACCACATTCTCTACAACATCAGGATA
 G E F P I I S P G R V Y E Y T S C T T F S T T S G Y
 CATGGAAGGATATTATACCTTCCATTTCTTTACTTTAAAGACAAGATCTTTAATGTTGCCATCCCCGATTCCATA
 M E G Y Y T F H F L Y F K D K I F N V A I P R F H
TAAgttaaattttcctctagtgtgattacatgactttg
 TGGCATGTCCAACATTCAGGGTGTCTATAGCCCGATTGGAATGGGTCTGATGAATATGAAGAGATGGAAGAAGAG
 M A C P T F R V S I A R L E M G P D E Y E E M E E E
 taggggttaactgagataagccaggcaaatagttagttataaatagtgttccagagaaccctagagattttgag
 GAGGAGGAGGAAGAGGAGGAAGACGAGGATGATGATTCAGCAGATATGGATGAATCAGATGAAGATGATGAAGAGGA
 E E E E E E E D E D D D S A D M D E S D E D D E E E
 aaagtatcttgggggtcatgtgaatttgttgagagaaatggacaagtaaattgggctccatagtctctaaccagagaa
 GAGACGGAGGAGAGTCTTTGATGTTCCCATTCGCAGACGCCGCTGCTCACGCCTTTTTAGcaagccttctgctgat
 R R R R V F D V P I R R R R C S R L F ·
 tttctgctgttttaagattcaacttgtttttcactgttcagtgccataatgtagattatgagaaataccacatta
 ggaagcactaggtatgattctaggctgttaaataagatttctcaataatgtaataactaaattgttctctgcatatag
 gaccagtagaatcagctttaagactgggaaaacaacttcttacagtgtttttgctcaaacttccaatttaagtcaa
 caggaaaactagcatgaaatattgtttcaggccctgggttctatgtgacactacattaggaattggattggttgggt
 ataaacaaatattccataaagatcattataaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 ttgctttgtgtttttgaggtagaggaagaaatgggaatctttttttctcttccaggagtcagtggaagaatagttct
 cttagtaaggaacggacatacctttgttttaaaatattttataacttacaaaaatctagaaatggagagggaaactgttt
 tgaataaggatttaaaatacctgcacaaggatagagagaaactatgtgactcattctgtgaaaagacttcttgcagtt
 gtgagttatttagaaatgatcaaaatttgaattaggtcaatccatttagtgattcctaataattttgtactcacagag
 aactaattgactaacaacttgaacgctagtggtttgtccttagacaatctgtccttgaatttaagctttatcgct
 aag accttgactt taaattttc atcactacaaccttgaattt aatttcaggt cttcaacatg atgaccttg
 gatttaatttaagcttcaacactatgctgtttatcatattttcacagatgcatttttgaaatgtagtatgtaaaa
 gtatgtaacgtgctgtttattaacaaaagattgttcacaacatctcatgtagtttaaaatttgtaaaactgcttctgt
 tttgtttctcctttatacacttgactgtcctttgtgataagtgacatgaattttatgttaggattaagtatgttttct
 gaaacttgattttttttgtaattataaattgagagttagaatgaaatccttcaagtgttaaaaactcacatttta
 aaagcaaattttggttcc

Abbildung 4.5: mRNAs und abgeleitete Proteinsequenzen der beiden Isoformen von FBX3.

Isoform 2 besitzt im Unterschied zu Isoform 1 einen um 58 Aminosäuren verlängerten C-Terminus. Auffällig in dieser zusätzlichen Sequenz ist eine stark negativ geladene Asparagin- und Glutaminsäure-reiche Domäne (blau hervorgehoben) und im direkten Anschluß, eine stark positiv geladene Arginin-reiche Domäne (grün hervorgehoben). Beide Isoformen besitzen das F-Box-Motiv (rot hervorgehoben). Die mittels Primer am 5'-Ende verlängerte Sequenz ist unterstrichen.

Die cDNA von FBX3 wurde in einen bakteriellen Expressionsvektor (pET28a) kloniert und FBX3 rekombinant hergestellt. FBX3 liegt in *E. coli* jedoch in unlöslicher Form („inclusion-bodies“) vor und konnte deshalb nicht zu Interaktionsstudien mit p27 herangezogen werden.

Zur Untersuchung einer Assoziation von p27 und FBX3 wurde FBX3 deshalb mittels gekoppelter *in vitro*-Transkription/Translation hergestellt und mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Das *in vitro*-translatierte FBX3 wurde mit rekombinanten His-Fusionsproteinen von p27^{wt} inkubiert und in einem Interaktionsexperiment auf seine Fähigkeit hin untersucht, p27 zu binden (Abb. 4.6 A). Zur Eingrenzung der Bindungsstelle von FBX3 in p27 wurden verschiedene, verkürzte Formen von p27 (nähere Beschreibung siehe 4.3.2), p27^{N-t}, p27^{C-t} herangezogen (Abb. 4.6 B, Spuren 5 und 6). Zudem wurde rekombinantes p19^{SKP1} mit dem *in vitro*-translatierten FBX3 vorinkubiert, um durch eine Assoziation von p19^{SKP1} mit FBX3 eventuell eine bessere Bindung an p27 zu ermöglichen (Abb. 4.6 B, Spur 4). Für viele Interaktionen von Substraten mit E3-Ligasen wird die spezifische Substraterkennung durch eine Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren vermittelt. In einem weiteren Ansatz wurde p27 deshalb mit ATP in HeLa-Totalextrakt vorphosphoryliert (Abb. 4.6 B, Spur 7). FBX3 bindet nach diesen Daten unabhängig vom Phosphorylierungszustand an p27. Zudem kann FBX3 sowohl mit dem N- wie auch mit dem C-terminalen Proteinteil von p27 interagieren. Um zu klären, ob FBX3 ausschließlich an p27 oder auch an die restlichen Mitglieder der Cip/Kip-Familie binden kann, wurde ein Interaktionsexperiment mit p21 und p57 (Abb. 4.6 C, Spuren 4 und 5) und verschiedenen Aminosäure-Austauschformen von p27 (Abb. 4.6 C Spur, 2 und 3) durchgeführt. Da alle eingesetzten Proteine von FBX3 gebunden wurden, wurden in einer zusätzlichen Kontrolle eine Hexahistidinfusion einer verkürzten Form der Tyrosinkinase Abl (Abl^{KD+SH3}, genaue Beschreibung siehe 4.5.2) und von SMN-rp (rekombinantes spleißosomales Protein, Hexahistidinfusion, Arbeitsgruppe Utz Fischer, MPI für Biochemie, Martinsried) getestet (Abb. 4.6 D, Spuren 1 und 2). FBX3 bindet in diesen Experimenten alle rekombinant hergestellten Proteine. Möglicherweise ist FBX3 ein Bestandteil einer E3-Ligase, die alle unstrukturierten Proteine *in vivo* erkennt und dem Abbau zuführt. Wahrscheinlicher ist, daß FBX3 mit der stark geladenen Histidin-Domäne der Fusionsproteine interagiert. Darauf deutet auch die fehlende Interaktion eines *in vitro*-translatierten p27 (ohne Hexahistidinfusion) mit dem ebenfalls *in vitro*-translatierten FBX3 hin (Abb. 4.6 B, Spur 3). Die Interaktion von p27 mit FBX3 in „pull-down“ (Abb. 4.3) und in allen weiteren Interaktionsexperimenten ist demzufolge wahrscheinlich eine artifizielle Interaktion der Histidinfusion von p27 mit FBX3.

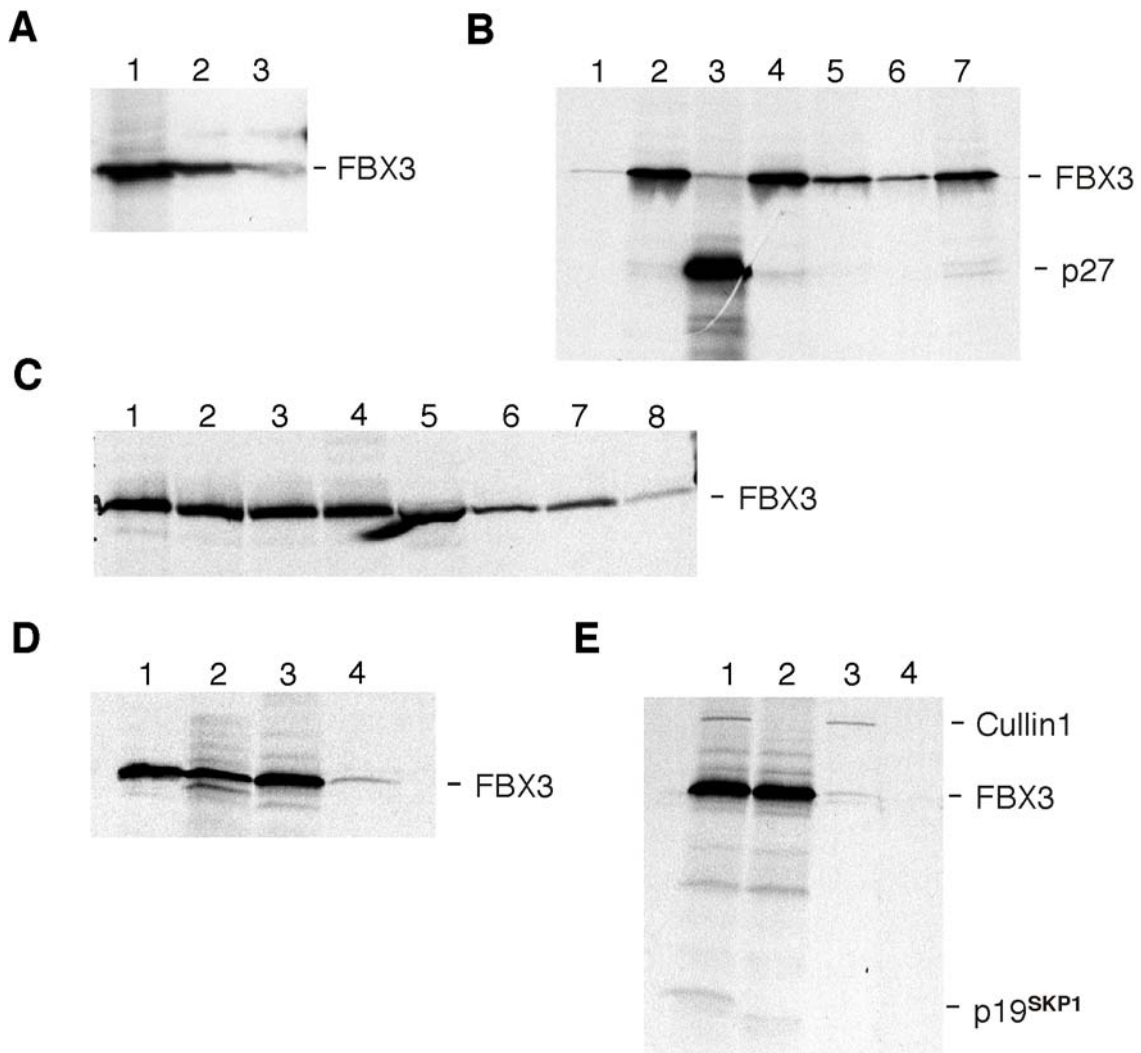


Abbildung 4.6: Analyse der Interaktion von p27 mit FBX3.

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung von FBX3 mit p27 wurde die kurze Isoform von FBX3 mit [³⁵S]-Methionin *in vitro*-translatiert und radioaktiv markiert. Das *in vitro*-Translationsprodukt wurde mit bakteriellem Totalextrakt von p27 und anderen rekombinant hergestellten Proteinen inkubiert und die Hexahistidinfusion dieser Proteine wurde zur Präzipitation über Nickel-Chelat-Sepharose genutzt. Gezeigt sind die Radiogramme der über SDS-PAGE aufgetrennten Interaktionsexperimente.

(A) Spur 1: eingesetzte Menge FBX3, Spur 2: Interaktionsexperiment mit p27^{wt}, Spur 3: Kontrollansatz, Nickel-Chelat-Matrix mit *in vitro*-translatiertem FBX3 ohne rekombinantes Protein.

(B) Spur 1: Kontrollansatz, Spur 2: rekombinantes p27^{wt}, Spur 3: *in vitro*-translatiertes unfusioniertes p27^{wt} wurde mit ebenfalls *in vitro*-translatiertem FBX3 inkubiert und über einen p27-spezifischen Antikörper präzipitiert, Spur 4: rekombinantes p27^{wt} wurde mit rekombinantem p19^{SKP1} vorinkubiert, Spur 5: rekombinantes p27^{N-t}, Spur 6: rekombinantes p27^{C-t}, Spur 7: p27^{wt} wurde 30 min bei 30°C mit HeLa-Rohextrakt und ATP vorinkubiert.

(C) Spur 1: p27^{wt}, Spur 2: p27^{ACK1}, Spur 3: p27^{ASH3}, Spur 4: p21, Spur 5: p57, Spur 6: ternärer Komplex p27/CDK2/Cyclin A in einer Stöchiometrie von 1:1:1 zur Ermittlung eines eventuellen Einflusses der CDKs auf eine Interaktion von p27 mit FBX3, Spur 7: freies p27 in einer, mit Spur 7 vergleichbaren Menge von p27, Spur 8: Kontrollansatz ohne Fremdprotein.

(D) Spur 1: Abl^{KD+SH3}, Spur 2: SMN-rp, Spur 3: p27^{wt}, Spur 4: Kontrollansatz.

(E) Spur 1: *in vitro*-translatiertes FBX3 (C-terminale Histidinfusion), Cullin1 und p19^{SKP1} wurden 1 h inkubiert und über Nickel-Sepharose präzipitiert, Spur 2: eingesetzte Menge *in vitro*-translatiertes FBX3, Spur 3: Matrixkontrolle mit Cullin1 ohne FBX3, Spur 4: Kontrollansatz mit p19^{SKP1} ohne FBX3.

Für alle rekombinanten Proteine wurden jeweils 2 µg Protein eingesetzt, die Menge von *in vitro*-translatiertem FBX3 entsprach der in Abb. 4.6 A, Spur 1.

Da FBX3 ein F-Box-Motiv besitzt und zudem im „pull-down“-Experiment auch p19^{SKP1} identifiziert wurde (siehe Abb. 4.3), wurde vermutet, daß FBX3 und p19^{SKP1} Bestandteile einer E3-Ligase darstellen. Es wurde deshalb getestet, ob FBX3 mit p19^{SKP1} und Cullin1 einen Komplex bilden kann. Dazu wurden Interaktionsexperimente mit einer *in vitro*-translatierten Hexahistidinfusion von FBX3 und *in vitro*-translatiertem p19^{SKP1} und Cullin1 (pET-abgeleitete Plasmide, Willi Krek, Basel) durchgeführt (Abb. 4.6 E).

Analog zu den im „pull-down“ gefundenen Daten konnte auch hier keine Assoziation mit Cullin1 gezeigt werden. Dagegen konnte eine Interaktion von FBX3 mit p19^{SKP1} detektiert werden (Abb. 4.6 E, Spur 1). FBX3 bildet mit p19^{SKP1} und möglicherweise, statt mit Cullin1, mit einem weiteren Cullin (zum Beispiel Cullin2 oder 3; Du *et al.*, 1998; Kipreos *et al.*, 1996) und weiteren Bestandteilen des SCF-Komplexes (Rbx/Roc1; Zheng *et al.*, 2002) einen Komplex. Alternativ könnte die Bindung p19^{SKP1} und FBX3 stabiler sein als die Wechselwirkung dieser beiden Proteine mit dem Cullin. Möglicherweise erklärt dies das Fehlen eines Cullin im „pull-down“ (Abb. 4.3) oder in der *in vitro*-Translation (Abb. 4.6 E).

4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen Grb2 und p27

Als ein weiteres, mit p27 interagierendes Protein wurde Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) identifiziert. Grb2 ist ein Adapterprotein, dem Funktionen in verschiedenen Signaltransduktionswegen zugeschrieben werden. Es fungiert dabei ausschließlich als Binfaktor zwischen Proteinen. Grb2 bindet dabei über seine zentrale SH2-Domäne an Phosphotyrosinreste. Die SH3-Domänen des Proteins binden dagegen an Prolin-reiche Aminosäuresequenzen seines Interaktionspartners (Abbildung 5.1). Von besonderem Interesse ist die Interaktion Grb2-p27 deshalb, weil damit eine erste direkte Verbindung zwischen der Signaltransduktion und dem Zellzyklus nachgewiesen werden könnte.

4.3.1 p27 bindet spezifisch Grb2

Die Bindung von p27 und GRB2 sollte *in vitro* reproduziert werden. Daneben sollte getestet werden, ob p21 oder p57 an Grb2 binden können. Dazu wurde ein Interaktionsexperiment mit allen drei Cip/Kip-Proteinen und Grb2 durchgeführt.

Grb2 wurde mittels PCR (Mutterplasmid pRK5-Grb2, Axel Ullrich, MPI für Biochemie) in pET3d umklontiert und rekombinant hergestellt. Die bakteriellen Rohextrakte von Grb2 und die Histidininfusionen der Cip/Kip-Proteine wurden im Verhältnis 1:1 der untersuchten Proteine miteinander inkubiert. Die Cip/Kip-Proteine und das potentiell damit interagierende Grb2 wurden mittels Nickel-Chelat-Matrix präzipitiert, gewaschen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Analog zum biochemischen „pull-down“ (siehe auch Abb. 4.3) wurde diesmal unter ausschließlich rekombinanten Bedingungen gezeigt, daß nur p27 an Grb2 binden kann (Abb. 4.7). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß die Interaktion zwischen p27 und Grb2 über ein drittes, die Interaktion vermittelndes, humanes Protein stattfindet.

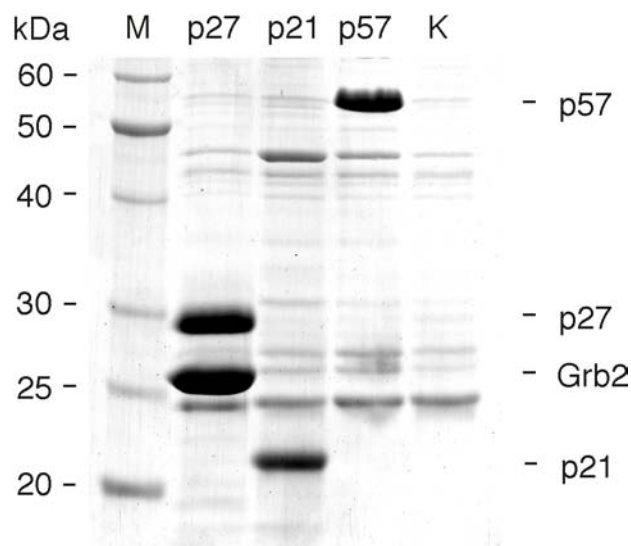


Abbildung 4.7: Untersuchung zur Interaktion von Grb2 mit der Cip/Kip-Inhibitorfamilie.

p27, p21 und p57 wurden als Hexahistidininfusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Grb2 wurde rekombinant ohne Fusions„tag“ in *E. coli* hergestellt. Gleiche Mengen der bakteriellen Rohextrakte des jeweiligen Inhibitorproteins und von Grb2 wurden miteinander inkubiert. Die Histidininfusionen der Inhibitoren wurden über Nickel-Chelat-Sepharose präzipitiert. Das an die Inhibitoren assoziierte Grb2 wurde nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung nachgewiesen. Als Kontrolle diente freie Nickel-Chelat-Sepharose, die mit einer vergleichbaren Menge an Grb2-Rohextrakt inkubiert wurde (K).

4.3.2 Charakterisierung der SH3-Bindedomäne in p27

Zur Charakterisierung der Bindung von Grb2 an p27 wurden über PCR vier verkürzte Versionen von p27^{wt} (Spur 1), p27^{wt-C-t} (AS 97-198, Spur 5), p27^{wt-N-t} (AS 1-96, Spur 3), sowie die analog verkürzte Form von p27^{ΔCKI} (Spur 2), p27^{ΔCKI N-t} (Spur 4), alle in pET28a hergestellt.

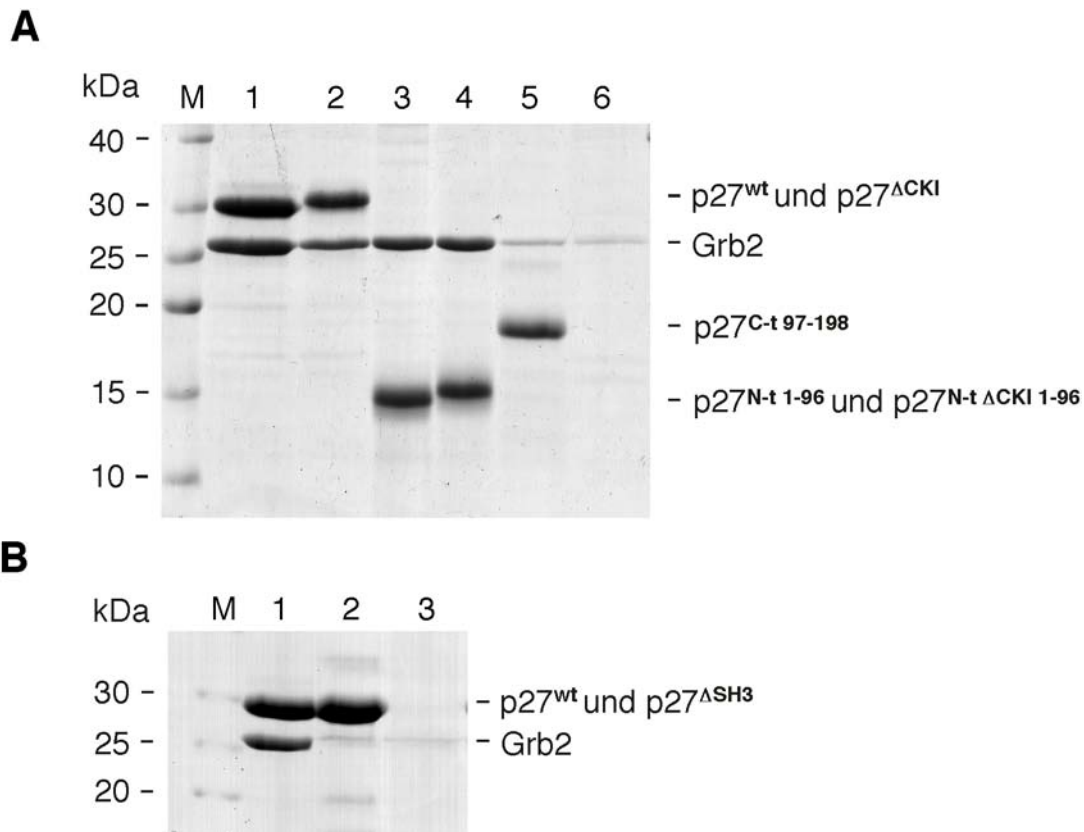


Abbildung 4.8: Analyse der Bindungsstelle von Grb2 in p27.

(A) p27^{wt} (Spur 1) und zwei verkürzte Formen von p27, die N-terminale Hälfte von p27, p27^{N-t} (As 1-96), sowie die C-terminale Hälfte von p27, p27^{C-t} (As 97-198, Spuren 3 und 5), und die analoge Verkürzung der CDK-bindungsdefizienten Form von p27^{ΔCK1} (Spur 2), p27^{ΔCK1 N-t} (Spur 4) wurden als Hexahistidinfusionen in *E. coli* exprimiert. Grb2 wurde rekombinant, ohne Fusions-,tag“ in *E. coli* hergestellt. Gleiche Mengen der bakteriellen Rohextrakte des jeweiligen Inhibitorproteins und von Grb2 wurden miteinander inkubiert. Die Histidinfusionen der Inhibitoren wurden über Nickel-Chelat-Sepharose präzipitiert. Das an die Inhibitoren gebundene Grb2 wurde nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung nachgewiesen. Als Kontrolle diente freie Nickel-Chelat-Sepharose, die mit einer vergleichbaren Menge an Grb2-Rohextrakt inkubiert wurde (Spur 6).

(B) p27^{wt} (Spur 1) und eine Form von p27, in der die zur Interaktion mit Grb2 nötigen Aminosäuren P94P95K96 zu G94G95A96 umgewandelt wurden (p27^{ΔSH3}, Spur 2), wurden in *E. coli* als Hexahistidinfusionen hergestellt. Das Interaktionsexperiment mit Grb2-Rohextrakt erfolgte wie unter (A) beschrieben. Auch hier diente freie Nickel-Chelat-Sepharose als Kontrolle (Spur 3).

Mit Hilfe dieser rekombinanten Proteine-Fragmente konnte in Interaktionsexperimenten die Bindungsstelle von Grb2 in p27 auf den N-terminalen Proteinteil (der auch die CDK- und Cyclin-Bindestellen enthält) eingengt werden. Zudem konnte bestätigt werden, daß die Interaktion zwischen Grb2 und p27 unabhängig von den intakten Bindungsstellen für CDKs und Cycline stattfindet (Abb. 4.8 A).

Computergestützte Vergleiche verschiedener SH3-Domänen-Liganden mit p27 ergaben eine Prolin-reiche Aminosäuresequenz im direkten Anschluß an die CDK-Bindedomäne von p27.

Dieses YYRPPRPPKGA-Motiv in p27 entspricht dabei der XPPXPPX-Konsensussequenz (X= geladene AS, Sparks *et al.*, 1996), die zur Bindung an SH3-Domänen notwendig ist. Mittels Quick-Exchange-PCR wurden deshalb zwei essentielle Proline und ein Lysin in dieser Domäne zu Glycin und Alanin umgewandelt (P94G, P95G, K96A). Diese p27-Variante (p27^{ΔSH3} in pET28a) wurde rekombinant exprimiert und mit Grb2 auf eine Interaktion hin getestet. Grb2 kann p27^{ΔSH3} (Abb. 4.8 B, Spur 2) nicht mehr binden. Somit wurde die Bindungsstelle für SH3-Domänenproteine in p27 *in vitro* identifiziert (Abb. 4.8 B).

4.3.3 p27 interagiert mit der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2

p27 bindet Grb2 über eine Prolin-reiche Sequenz. Es konnte daher angenommen werden, daß die Interaktion zwischen Grb2 und p27 entweder über die N- oder C-terminale SH3-Domäne von Grb2 stattfindet. Um die Bindung von p27 in Grb2 näher zu charakterisieren, wurden GST-Fusionen der C- und N-terminalen SH3-Domäne sowie eine GST-Fusion der zentralen SH2-Domäne von Grb2 (in pGEX-2T, in Kooperation mit Ottmar Jansen, Kiel) in *E. coli* exprimiert. Die Bindung dieser Domänen an p27 wurde in Interaktionsexperimenten untersucht. Die an Glutathionsepharose immobilisierten GST-Fusionen der isolierten Grb2-Domänen wurden mit rekombinantem p27 inkubiert (Verhältnis der Proteine zueinander 1:1) und gewaschen. Die interagierenden Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Eine Bindung von p27 an die einzelnen Grb2-Domänen wurde mit einem spezifischem Antikörper gegen p27 detektiert.

Mit diesem experimentellem Ansatz konnte gezeigt werden, daß p27 vornehmlich an die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 bindet. (Abb. 4.9) Allerdings weist die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 ebenfalls eine Interaktion (6-7fach schwächer) mit p27 auf. Die zentrale SH2-Domäne von Grb2 interagiert dagegen nicht mit p27.

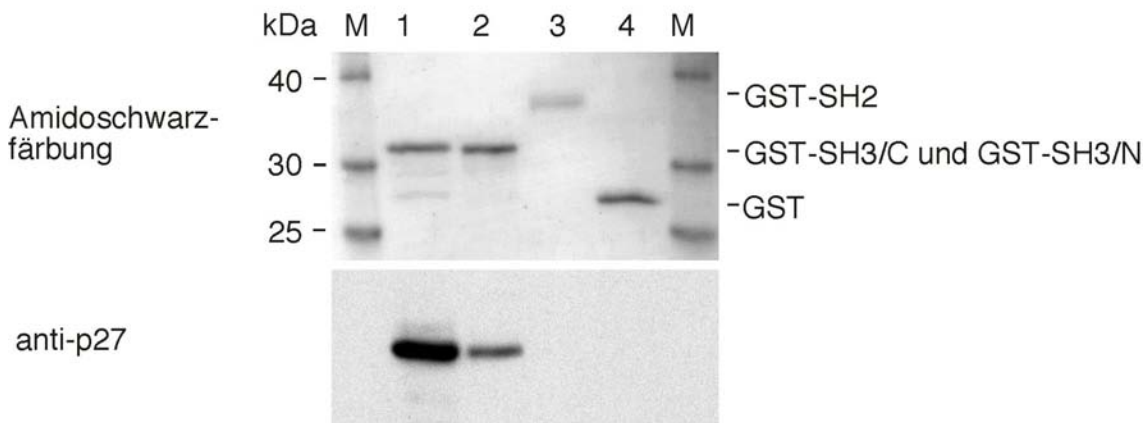


Abbildung 4.9: Charakterisierung der Bindung der C- und N-terminalen SH3-Domänen und der zentralen SH2-Domäne von Grb2 an p27.

Die isolierte C- und N-terminale SH3-Domäne (Spur 1 und 2), sowie die isolierte zentrale SH2-Domäne (Spur 3) von Grb2 wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Glutathionsepharose spezifisch angereichert. Diese an Glutathionsepharose immobilisierten Domänen wurden mit rekombinanten, gereinigtem p27 in einem gleichen Mengenverhältnis inkubiert. Die immobilisierten Domänen wurden gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (oben, Amidoschwarzfärbung). Die Analyse der Interaktion erfolgte immunologisch unter Verwendung eines gegen p27 gerichteten Antikörpers (unten). Als Kontrolle diente, an Glutathionsepharose immobilisiertes GST, das mit einer vergleichbaren Menge an p27 inkubiert wurde (Spur 4).

4.3.4 Die Interaktion zwischen Grb2 und p27 hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Kinaseinhibitors p27

Die Interaktion zwischen p27 und Grb2 findet über ein Prolin-reiches Motiv in p27 statt (Abb. 4.8). Diese Region liegt in direkter Nachbarschaft zur Hauptinteraktionsstelle von p27 mit der ATP-Bindetasche der Kinase-Untereinheit der CDKs (Abb. 5.3). Diese räumliche Nähe der beiden Bindungsstellen ließ vermuten, daß die Bindung zwischen p27 und Grb2 einen Einfluß auf die Interaktion von p27 mit dem CDK/Cyclin-Komplex haben könnte. Um diese Frage abzuklären wurde eine analytische Gelfiltration mit einem gereinigten CDK2/Cyclin A-Komplex aus Insektenzellen und einem rekombinanten p27-Grb2-Komplex aus Bakterien durchgeführt. Die beiden gereinigten Komplexe wurden vereinigt und inkubiert, anschließend erfolgte eine Auftrennung der Proteinkomplexe nach ihrem Stoke'schen Radius über eine Superdex 200 HR 10/30-Gelfiltrationssäule. Aufgrund der Verteilung der Proteine in den Fraktionen der Gelfiltration wird ersichtlich, daß der CDK2/Cyclin A-Komplex p27 bindet. Grb2 wird dadurch aus seiner Bindung mit p27 verdrängt (Abb. 4.10).

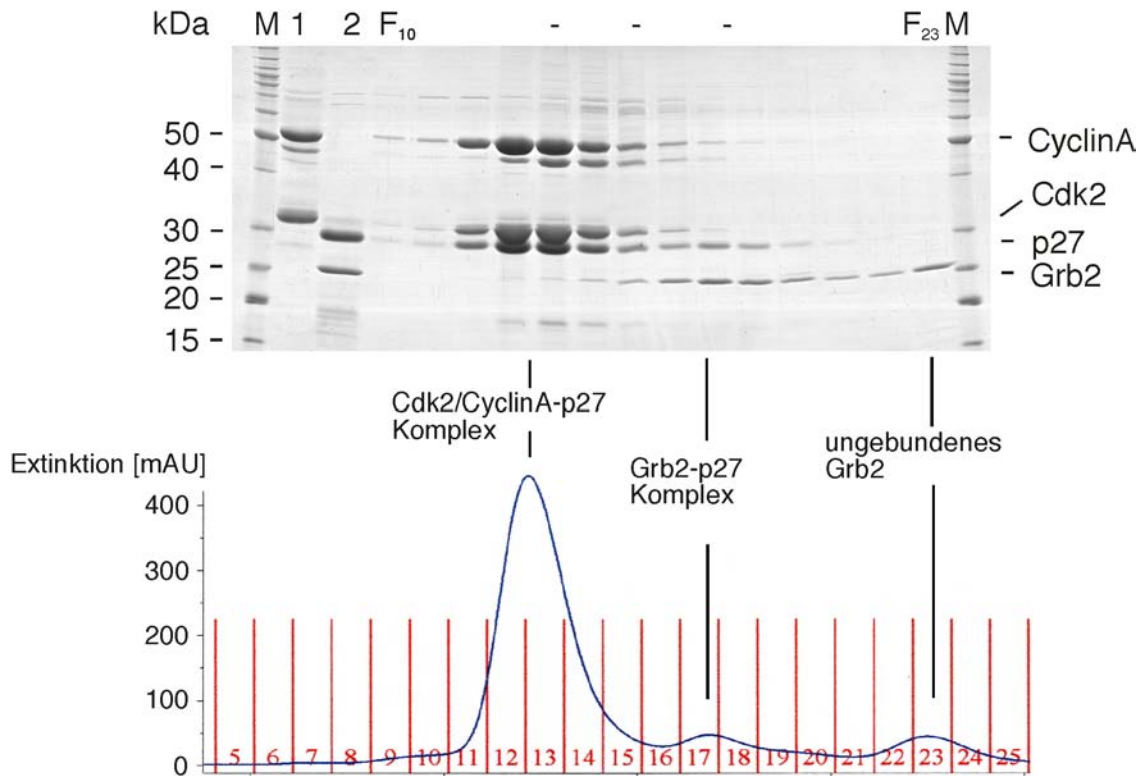


Abbildung 4.10: Grb2 wird durch CDK2/Cyclin A aus seiner Bindung mit p27 verdrängt.

Der CDK2/Cyclin A-Komplex (Spur 1) wurde durch Überexpression der einzelnen Proteine mit rekombinanten Baculoviren in Sf9-Insektenzellen hergestellt und gereinigt. Der Grb2-p27-Komplex (Spur 2) wurde in Bakterien exprimiert und daraus gereinigt. Beide Komplexe wurden miteinander inkubiert. Die daraus erhaltenen Komplexe wurden über eine Gelfiltration mit einer Superdex 200pg 26/60 Säule nach ihrem Stoke'schen Radius aufgetrennt. Das Säulenelutionsprofil des isokratischen Laufes (unten) zeigt drei Maxima in der Proteinmenge bei einer Messung bei 280 nm. Die Fraktionen (rot) des Säulenlaufes wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (oben).

Dieses Ergebnis legt nahe, daß Grb2 schwächer an p27 bindet als der CDK2/Cyclin A-Komplex. Daher hatte die Interaktion p27-Grb2 keinen signifikanten Einfluß auf die inhibitorische Aktivität von p27. Dies wurde in einem Histon H1-Kinaseassay mit CDK2/Cyclin A getestet. Dazu wurden gleiche Mengen freies- und Grb2-gebundenes p27 als Inhibitorproteine eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Assoziation von p27 mit Grb2 *in vitro* keine Auswirkung auf die Aktivität von p27 hat (Abb. 4.11).

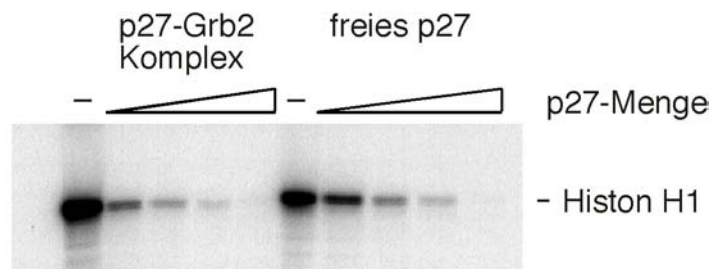


Abbildung 4.11: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von Grb2-gebundenem und freiem p27.

Gereinigtes, freies p27 und der gereinigte Komplex p27-Grb2 (in einer Stöchiometrie von 1:1) wurden nach SDS-PAGE-Auftrennung und Coomassieanfärbung in ihren Mengen aufeinander abgeglichen. Jeweils gleiche Mengen freies und komplexgebundenes p27 wurden zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität in einem Kinaseassay mit CDK2/Cyclin A verglichen. Die Aktivität des Inhibitors wird dabei über die der Inkorporation von $[\gamma\text{-}^{32}\text{ATP}]$ in das CDK2/Cyclin A-Substrat Histon H1 ermittelt. Die inhibitorische Aktivität von p27 ist gekennzeichnet durch die Inaktivierung der CDK2/Cyclin A-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Die Titration wurde mit verschiedenen Mengen des Inhibitors (500 ng, 100 ng, 25 ng, 1 ng) bei konstanten Mengen Kinase (50 ng) und Substrat (2 μg) durchgeführt. Als Aktivitätsvergleich diente eine Probe ohne Inhibitor bzw. ohne den komplexierten Inhibitor (-). Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Gels der über SDS-PAGE aufgetrennten Kinasereaktionen.

4.3.5 Die Interaktion zwischen Grb2 und p27 *in vivo*

Die Interaktion zwischen p27 und Grb2 sollte *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurde Immunopräzipitationen mit verschiedenen polyklonalen p27- und Grb2-Antikörpern durchgeführt. Neben unterschiedlichen Zelltypen (HeLa, MCF7, HS68) wurden auch unterschiedliche Zellzyklusstadien analysiert. HeLa-Zellen wurden dazu mit Thymidin (2 mM, 24 h) in früher S-Phase, mit Nocodazole (120 ng/ml, 12 h) in der M-Phase und durch Lovastatin (66 μM , 48 h) in der späten G₁-Phase arretiert. Der jeweilige Zellzyklusarrest wurde durch FACS-Analysen bestätigt. Bei keiner der durchgeführten Immunopräzipitationen konnte eine Kopräzipitation von p27 oder Grb2 *in vivo* nachgewiesen werden. Durch Überexpression von Grb2 und p27 in adhärenenten HeLa-Zellen konnte ebenfalls keine Interaktion in Koimmunopräzipitationen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da Grb2 ein Adapterprotein der Signaltransduktion ist, wurde versucht, in MCF7-Zellen nach Hungern (0,5% FCS, 12 h) und anschließender Serumgabe (20% FCS, 6 h), verschiedene serumabhängige Signaltransduktionswege zu stimulieren. Eine Immunopräzipitation mit p27- und Grb2-Antikörper ergab keine Interaktion von p27 mit Grb2. Allerdings zeigte sich in weiterführenden Untersuchungen, daß sich die für dieses Experiment eingesetzten MCF7-Zellen durch Serumentzug und anschließende Serumgabe nicht mehr stimulieren ließen (keine Hochregulation von EGF- oder PDGF-

Rezeptor oder der nachgeschalteten Tyrosinkinasen Abl und Src). Damit ist zumindest keine eindeutige Aussage über eine stimulationsabhängige Assoziation von Grb2 und p27 möglich.

Aufgrund der in der Gelfiltrationsanalyse gefundenen schwachen Interaktion zwischen Grb2 und p27 (Abb. 4.10) lag es nahe anzunehmen, daß diese Interaktion *in vivo* nur transient vorliegt. Es wurde deshalb in immunozytologischen Untersuchungen versucht, eine Kolokalisation von p27 und Grb2 zu zeigen. Außerdem wurde versucht, durch Kotransfektion von adhärenenten HeLa-Zellen mit p27 und Grb2 eine vom jeweiligen Bindungspartner abhängige Lokalisationsänderung zu erhalten. Dazu wurde ein N-terminales GFP-Fusionsprotein von Grb2 (in pEGFP-C2) und N-terminale HA-Fusionen von p21, p27^{wt} und p27^{ASH3} (in pCruz-HA) kloniert. Die Lokalisation der Proteine wurde nach Transfektion der Konstrukte in HeLa-Zellen immunozytologisch analysiert. Für GFP-Grb2 ist dabei neben einer zytoplasmatischen eine deutliche nukleäre Lokalisation zu beobachten (Abb 4.12 oben). Diese wurde durch immunozytologische Analysen mit endogenem Grb2 bestätigt. Eine nukleäre Lokalisation von Grb2 war für ein Protein der Signaltransduktion, das als Adapterprotein meist mit Kinasen der Zytoplasmamembran assoziiert vorliegt, unerwartet. Allerdings belegen Publikationen, daß z.B. in neoplastischem Gewebe (Verbeek *et al.*, 1997) eine dramatische Anreicherung von Grb2 im Kern vorliegen kann. Die gefundene nukleäre Lokalisation von Grb2 ermöglicht eine Interaktion von Grb2 mit p27 im Kern. Bedingt durch die Kotransfektion von p27 mit GFP-Grb2 kommt es zu einer zusätzlichen Anreicherung von GFP-Grb2 im Zellkern (Abb. 4.12, oben). Da aber das Kontrollprotein p27^{ASH3} und auch p21 eine vergleichbare Lokalisationsänderung hervorrufen, kann diese Änderung nicht auf einer direkten Interaktion von p27 mit Grb2 beruhen. Die Lokalisationsänderung von Grb2 ist sehr wahrscheinlich auf sekundäre Effekte zurückzuführen (Abb. 4.12, unten).

Demgegenüber belegen in Zusammenarbeit mit Sonja Weiß und Helene Hudry durchgeführte „Two-Hybrid“-Analysen mit p27 und Grb2 und von *in vitro*-translatiertem p27 und Grb2 eine Assoziation dieser Proteine unter *in vivo*-angenäherten Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

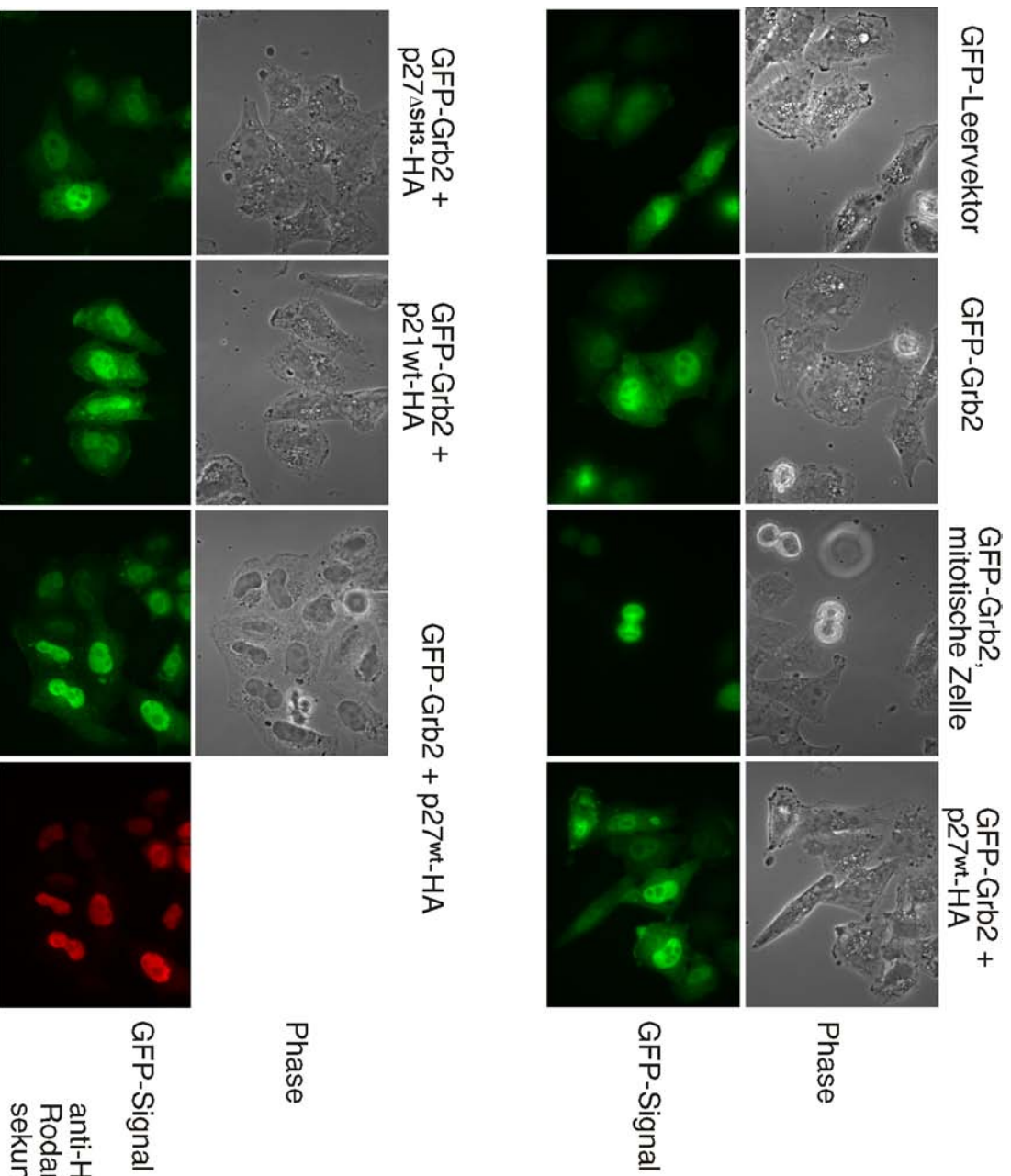


Abbildung 4.12: Untersuchung zur Lokalisation von Grb2 in HeLa-Zellen und Lokalisation von, mit p27 und Grb2 kotransfizierten HeLa-Zellen.

Zur Untersuchung der Lokalisation von Grb2 wurde Grb2 als N-terminale Fusion mit GFP kloniert. 24 h nach der Transfektion von adhärennten HeLa-Zellen wurde die Lokalisation von Grb2 im Fluoreszenzlicht und Phasenkontrast mikroskopisch analysiert. Als Kontrolle diente der GFP-Leervektor. Um zu untersuchen, ob p27 eine Lokalisationsänderung von Grb2 verursachen kann, wurden GFP-Grb2 und p27-HA kotransfiziert und ebenfalls 24 h nach der Transfektion mikroskopisch untersucht. Als Kontrollen dienten dabei ein HA-Fusionskonstrukt von p21 und das HA-Fusionskonstrukt der SH3-domänenbindungsdefizienten Mutante p27^{ΔSH3}. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde p27-HA mittels spezifischen HA-Antikörper im Rodamin-Fluoreszenzkanal detektiert.

4.4 Biochemische Analyse der Bindung verschiedener isolierter SH3-Domänen mit p27

Grb2 bindet in den durchgeführten Untersuchungen *in vivo* nicht an p27. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, daß p27 *in vivo* von anderen SH3-Domänenproteinen gebunden wird. Diese Proteine könnten gewebsspezifisch exprimiert werden, oder sie liegen in der Zelle in zu geringen Konzentrationen vor, um im „pull-down“-Experiment (siehe 4.3) identifiziert zu werden.

Um das zu klären, wurden 41 isolierte SH3-Domänen verschiedener Signaltransduktionsproteine als GST-Fusionen (pGEX-2T, in Kooperation mit Ottmar Jansen, Kiel) in *E. coli* exprimiert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. Die Fähigkeit dieser GST-SH3-Fusionsproteine p27 zu binden, wurde in einem Interaktionsversuch mit gereinigtem, rekombinantem p27 getestet. (Abb. 4.13). Neben der bekannten Interaktion der C-terminalen SH3-Domäne von Grb2, zeigen nur zwei weitere Proteine, die isolierte C-terminale SH3-Domäne des Adapterproteins Grf40/Gads/Mona (Abb. 4.13 B, Spur 16) und die isolierte SH3-Domäne der Tyrosinkinase Lyn (Abb. 4.13 A, Spur 5), eine mit Grb2 vergleichbare oder bessere Interaktion mit p27. Zudem konnte durch diese relativ umfassende Studie verschiedener isolierter SH3-Domänen gezeigt werden, daß nur die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 effizient an p27 binden kann (Abb. 4.13, Spur 22 A und 18 B). Die N-terminale SH3-Domäne (Abb. 4.13, Spur 21 A und Spur 19 B) besitzt keine stärkere Affinität zu p27 als die meisten anderen untersuchten SH3-Domänen.

4.4.1 Die Interaktion von p27 mit der Tyrosinkinase Lyn

Die isolierte SH3-Domäne der Tyrosinkinase Lyn (p56) interagiert mit p27 *in vitro* (Abb. 4.13). Diese Interaktion sollte durch Immunopräzipitationen *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurden je eine 10 cm Schale mit adhärenen HeLa-Zellen mit p27^{wt}, p27^{ΔSH3} und p27^{Y123/F} (Y74, Y88 und Y89 /F, alle Konstrukte als HA-Fusionsproteine in pCruz-HA), transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und mit einem p27-spezifischen Antikörper präzipitiert. Nach SDS-PAGE/ Immunoblot erfolgte die Detektion von kopräzipitiertem Lyn über einen spezifischen Antikörper gegen Lyn.

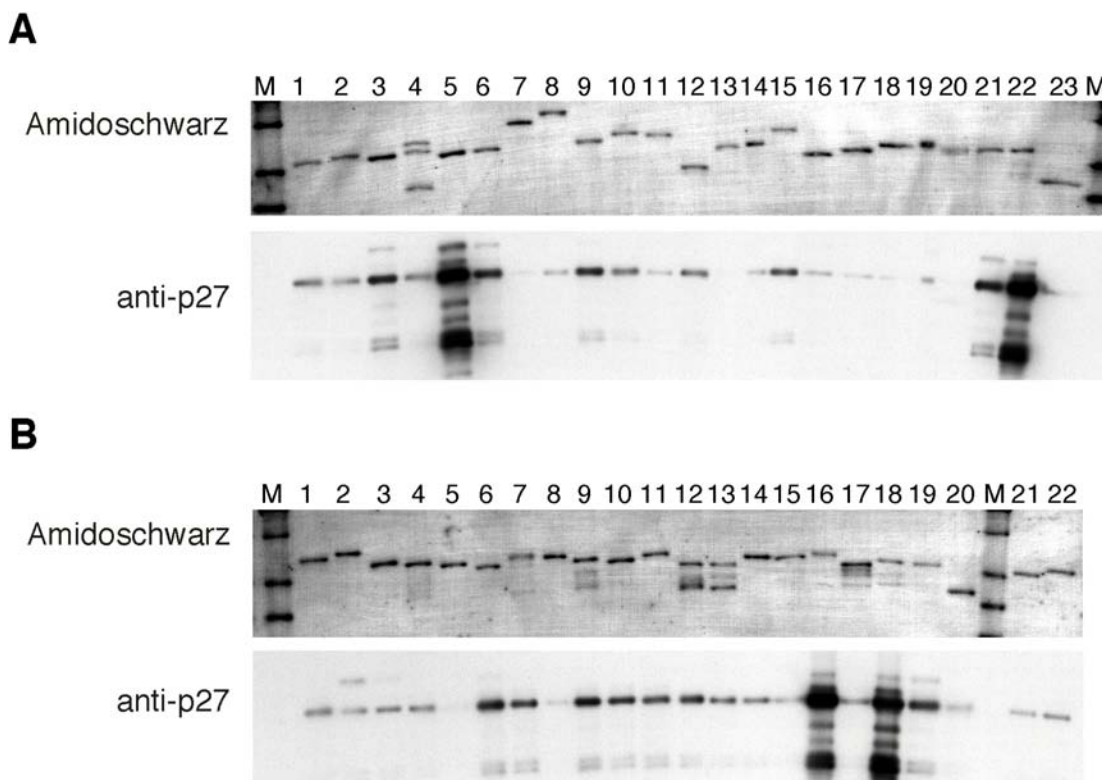


Abbildung 4.13: Systematische Interaktionsanalyse von isolierten SH3-Domänen verschiedener Proteine mit p27.

Die isolierten SH3-Domänen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Glutathionsepharose angereichert. Die Proteinmengen der isolierten Domänen wurden nach SDS-PAGE-Auftrennung über Coomassiefärbung gegeneinander abgeglichen. Jeweils identische Mengen von, an Glutathionsepharose immobilisierten SH3-Domänen und rekombinatem, gereinigtem p27 wurden miteinander inkubiert. Die Analyse einer Interaktion erfolgte durch Auftrennung der Reaktionsansätze über SDS-PAGE und Nachweis mit einem, gegen p27 gerichteten Antikörper im Immunoblot. Als Kontrolle für die Spezifität der Interaktionen diente die isolierte C- und N-terminale SH3-Domäne von Grb2 (Spuren 21 und 22 (A) sowie 18 und 19 (B)) und das an Glutathionsepharose immobilisierte freie GST (Spuren 23 (A), 20 (B)).

(A) Analyse der isolierten SH3-Domänen verschiedener Kinasen der Signaltransduktion:

1: Abl; 2: Src; 3: Yes; 4: Fyn; 5: Lyn; 6: Hck; 7: Lck; 8: Csk; 9: Itk; 10: p85; 11: CIP4; 12: MAGUK2; 13: CD2BP1; 14: GapC1; 15: FBP17; 16: Fe65WW; 17: Flaf1WW; 18: Flaf2-1; 19: Flaf2-3; 20: Flaf3; 21: Grb2 (N-t SH3); 22: Grb2(C-t SH3); 23: GST-Kontrolle.

(B) Analyse der isolierten SH3-Domänen von Adapterproteinen der Signaltransduktion:

1: Pacsin1; 2: Pacsin2; 3: Pacsin3; 4: FYB/Slap-130; 5: Nck (SH3-1); 6: Nck (SH3-2); 7: Nck (SH3-3); 8: Vav (N-t SH3); 9: Vav (C-t SH3); 10: Phox47 (C-t SH3); 11: Phox47 (N-t SH3); 12: Phox40; 13: SKAP55; 14: Grap2 (N-t SH3); 15: Grap2 (C-t SH3); 16: Grf40 (C-t SH3); 17: Grf40 (N-t SH3); 18: Grb2 (N-t SH3); 19: Grb2 (N-t SH3); 20: GST-Kontrolle; 21: FLJ; 22: KIAA.

Neben der Detektion von endogenem Lyn wurden die gleichen p27-Konstrukte mit Lyn-pApuro (Isoform p56 von Lyn, erhalten von Markus Warmuth, Hämatologikum der GSF, Großhadern) kotransfiziert und auf eine Interaktion von überexprimiertem Lyn mit p27 hin untersucht. In beiden Fällen ließ sich eine deutlich verstärkte Bindung von Lyn an die Tyrosin-Deletionsmutante von p27 (p27^{Y123/F}) feststellen (Abb. 4.14, Spuren 2 und 7).

Für endogenes oder überexprimiertes Lyn war dagegen nur eine sehr schwache Assoziation mit p27^{wt} (Abb. 4.14, Spuren 1 und 6) zu beobachten. Zusätzlich wurden die nach Ultraschallaufschluß und Zentrifugation erhaltenen Zellmembranen der Kotransfektion von p27^{Y123/F} und Lyn isoliert und in RIPA-Puffer gelöst. Eine Immunopräzipitation mit anti-p27 Antikörper im zehnfach verdünnten RIPA-Lysat zeigte eine signifikante Menge membrangebundenes p27 (Abb. 4.14, Spur 8). Dieses p27 interagiert ebenfalls mit Lyn (Abb. 4.14, Spur 8).

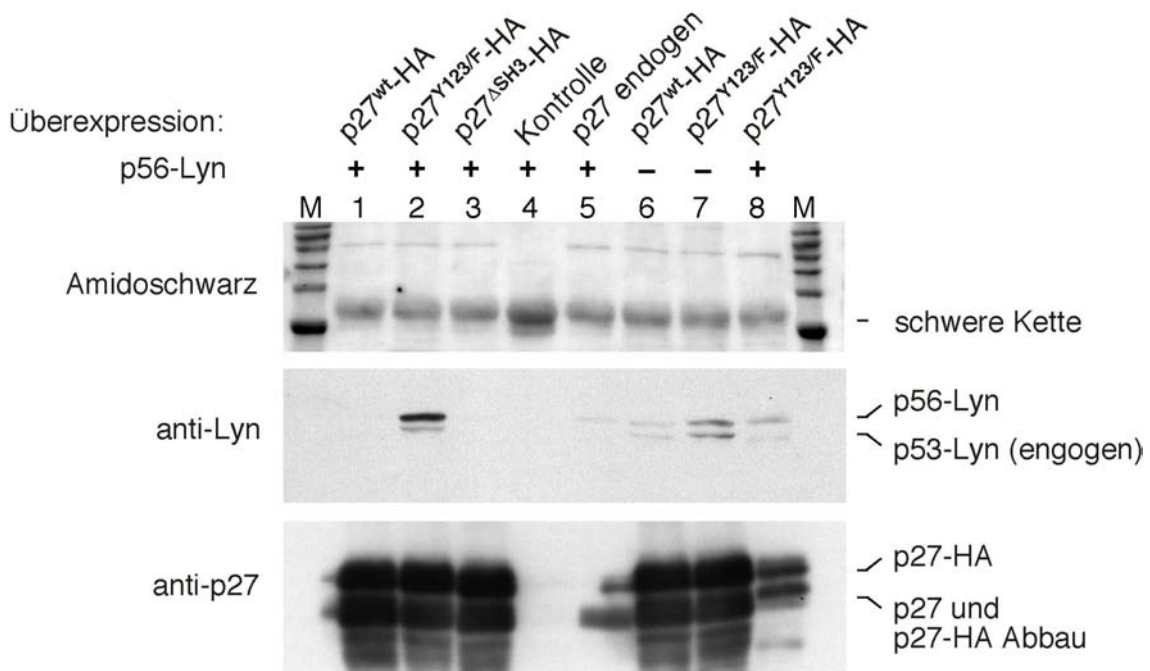


Abbildung 4.14: Charakterisierung der Interaktion zwischen p27 und Lyn *in vivo*.

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen HA-Fusionskonstrukten von p27, p27^{wt}-HA (Spur 1, 4 und 6), p27^{Y1Y2Y3/F}-HA (Spur 2, 7 und 8) sowie p27^{ΔSH3}-HA (Spur 3) transfiziert. In den Spuren 1, 2, 3, 4, 5 und 8 wurde zudem mit der längeren Isoform (p56) der Tyrosinkinase Lyn kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in IP-Puffer aufgeschlossen und die Proteinmenge der Extrakte wurde aufeinander abgeglichen. p27 wurde über einen spezifischen Antikörper (Sc C-19) präzipitiert. Die Analyse einer Interaktion mit Lyn erfolgte durch einen, gegen Lyn gerichteten Antikörper im Immunoblot. Als Kontrolle für die Spezifität der Interaktion diente die Transfektion mit einer SH3-Domänenbindungsdefizienten Mutante von p27, p27^{ΔSH3} (Abb. 4.14, Spur 3), und eine Immunopräzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen aus normalem Kaninchenserum (Abb. 4.14, Spur 4). Auch diese Immunopräzipitation wurden mit p27^{wt}-HA und Lyn kotransfizierten HeLa-Zell-extrakt durchgeführt. Zusätzliche Immunopräzipitationen erfolgten mit endogenem p27 und überexprimiertem Lyn (Abb. 4.14, Spur 5) sowie den gereinigten Plasmamembranen einer Transfektion mit p27^{Y1Y2Y3/F}-HA und Lyn (Abb. 4.14, Spur 8). Die Plasmamembranen wurden in RIPA-Puffer solubilisiert und nach zehnfacher Verdünnung mit IP-Puffer mit einem p27-spezifischem Antikörper präzipitiert.

4.5 Die Tyrosinphosphorylierung von p27

Die Bindung einer Tyrosinkinase an p27 *in vivo* machte es wahrscheinlich, daß p27 auch ein direktes Substrat für eine Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen sein könnte. Die Phosphorylierung der drei ausschließlich im inhibitorischen, N-terminalen Teil von p27 (Abb. 5.2) gelegenen Tyrosine könnten einen Mechanismus zur Regulierung der inhibitorischen Aktivität von p27 darstellen. Alle drei Proteine der Cip/Kip-Familie besitzen in ihrem hochkonservierten inhibitorisch aktiven Teil ein konserviertes Tyrosin (Y88 in p27). Nach der Kristallstruktur von p27 mit dem CDK2/Cyclin A-Komplex ist Tyrosin 88 von p27 die Aminosäure, die die ATP-Bindetasche der Kinaseuntereinheit des CDK-Komplexes blockiert (Russo *et al.*, 1996a). Da gezeigt wurde, daß p27 mit ATP um diese Bindungsstelle kompetitiert (Sheaff *et al.*, 1997), könnte die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes die Inhibitoreigenschaften von p27 verändern.

4.5.1 p27 und p21 werden *in vivo* an Tyrosin phosphoryliert

p27^{wt} bindet *in vivo* an Lyn (siehe 4.4.1). Die Bindung einer Tyrosinkinase an p27 ließ vermuten, daß p27 *in vivo* an Tyrosin phosphoryliert sein könnte. Zum Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* wurde p27 mit einem spezifischen Antikörper aus HeLa-Totalextrakt immunopräzipitiert. Nach anschließendem Immunoblot wurde versucht, mit einem phosphotyrosinspezifischen Antikörper eine Tyrosinphosphorylierung von p27 zu detektieren. Mit dieser Strategie ließ sich jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielen. p27 komigriert im SDS-Gel mit der leichten Kette des präzipitierenden Antikörpers. Beide Ketten von Immunglobulinen sind stark durch Tyrosinphosphorylierungen modifiziert, so daß mit einem global gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörper ein unspezifisches Signal detektiert wird. Eine kovalente Kopplung des präzipitierenden Antikörpers an die Protein A-Matrix reichte nicht aus, um den, durch den p27-präzipitierenden Antikörper verursachten Signalthintergrund zu reduzieren. Um eine Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* nachweisen zu können, wurde deshalb eine antikörperunabhängige Strategie zur Anreicherung von p27 aus adhärennten MCF7-Zellen erarbeitet. p27 wurde durch Kochen des Rohextraktes und eine anschließende Gelfiltration angereichert.

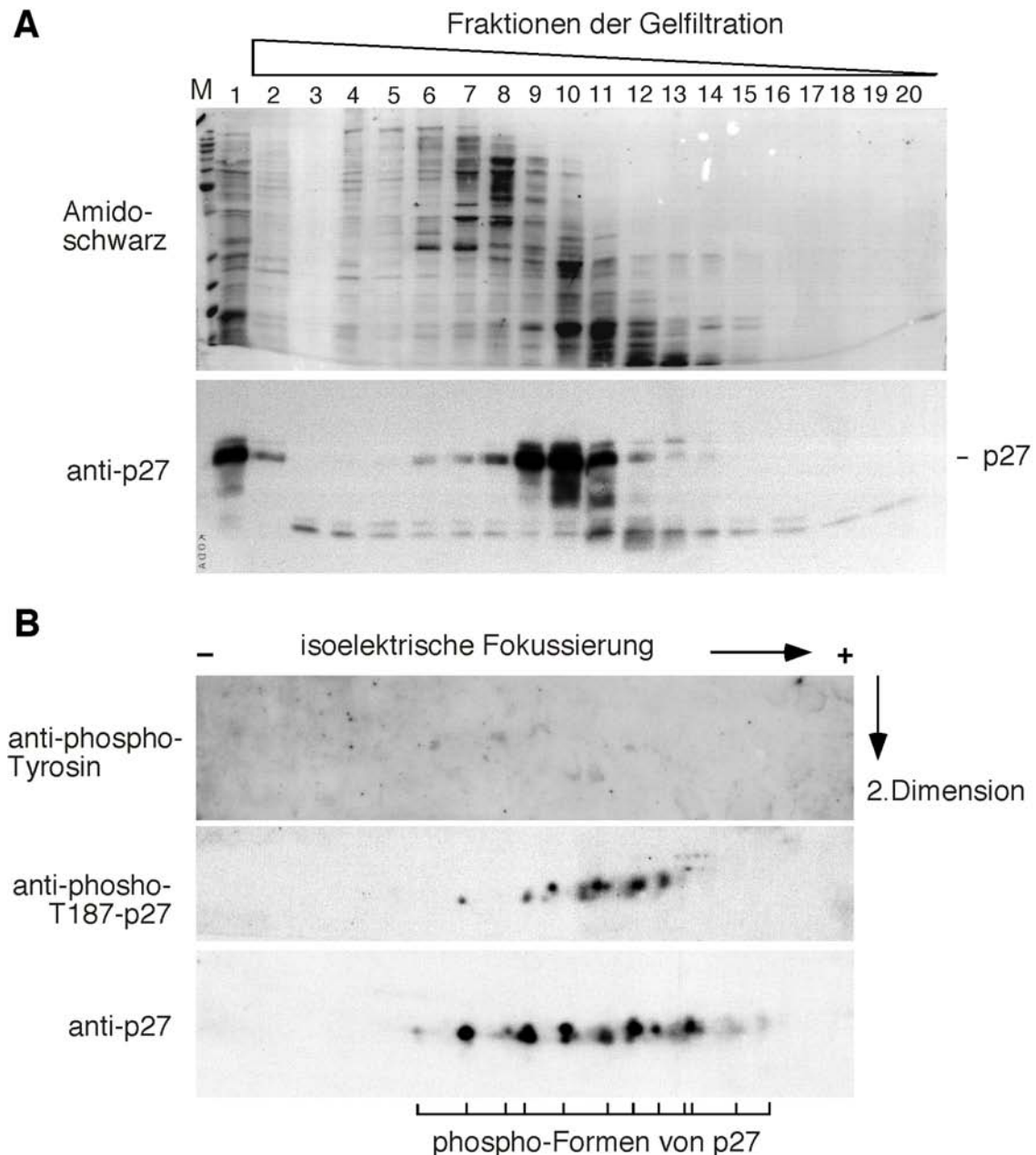


Abbildung 4.15: Ermittlung des *in vivo*-Phosphorylierungszustandes von p27 durch 2-D-Gelelektrophorese.

(A) Anreicherung von endogenem p27 aus MCF7-Zellen: MCF7-Zellen von zehn konfluenten 15 cm Platten wurden in IP-Puffer aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde 10 min bei 98 °C gekocht, 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Die verbliebenen hitzestabilen Proteine wurden aus dem Überstand mit Aceton präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde in PBS gelöst und die Proteine über eine Gelfiltration nach ihrem Stoke'schen Radius aufgetrennt. Die p27-haltigen Fraktionen wurden immunologisch ermittelt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt (Fraktionen 9-11). Gezeigt sind die einzelnen Fraktionen der Proteinfractionierung (oben) und die spezifische Antikörperdetektion (unten), Spur 1: eingesetzter gekochter Rohextrakt.

(B) Auftrennung von p27 im 2-D-Gel: Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden erneut mit Aceton präzipitiert und im Puffer der isoelektrischen Fokussierung aufgenommen. Die Fokussierung erfolgte mit einem nicht-linearen, immobilisierten Gelstreifen (pH 3-10) über 100000 V/h. Die fokussierten Proteine wurden anschließend in der zweiten Dimension über SDS-PAGE aufgetrennt, der Phosphorylierungszustand von p27 wurde mit p27- und phospho-spezifischen Antikörpern im Immunoblot analysiert.

Die Auftrennung der Phosphoformen von p27 erfolgte in einer 2-D-Gelelektrophorese. Tyrosinphosphoryliertes p27 wurde anschließend mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 4.15). An Threonin 187-phosphoryliertes p27 wurde mit einem, gegen diese Modifikation von p27 gerichteten Antikörper (Abb. 4.15 mitte) nachgewiesen. Alle modifizierten Formen von p27 wurden schließlich mit einem, gegen p27 gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.15 unten). Für p27 ließ sich keine Tyrosinphosphorylierung nachweisen. Analog durchgeführte Versuche mit adhärenen HeLa-Zellen brachte keine Tyrosinphosphorylierung von p27. Auch durch die Verwendung von weiteren Phosphotyrosin-Antikörpern konnte keine Tyrosinphosphorylierung von p27 nachgewiesen werden. Möglicherweise ist eine Tyrosinphosphorylierung von p27 sehr labil und geht durch die beschriebene aufwendige und langwierige Anreicherungsstrategie verloren.

Eine weitere Nachweismöglichkeit der Phosphorylierung von Proteinen ist die metabolische Markierung von Zellen mit [^{32}P]-*ortho*-Phosphat *in vivo*. Der Nachweis der phosphorylierten Aminosäuren erfolgt dabei über eine zweidimensionale, dünnschichtchromatographische Auftrennung (DC) der hydrolysierten Aminosäuren. Im Gegensatz zur Threonin- oder Serinphosphorylierung ist die Phosphorylierung an Tyrosinen mit etwa 1% der Gesamtphosphorylierung die seltenste Modifikation von Proteinen. Die Phosphomonoesterbindung bei phosphorylierten Tyrosinresten besitzt zudem eine instabilere Phosphatgruppe, speziell bei der sauren Hydrolyse der Proteine. Phosphotyrosin weist dabei, im Vergleich zu Phosphothreonin (Stabilität größer 25 h) und Phosphoserin (8 h), bei 110°C und 6 N HCl die kürzeste Lebensdauer auf (1-2 h), (Duclos *et al.*, 1991). Zur Etablierung dieser Technik auf die spezielle Tyrosinphosphorylierung von p27 wurde in einem Experiment p27 mit [γ - ^{32}P]ATP und Abl^{SH3+KD} (zu diesem Konstrukt siehe 4.5.2) *in vitro*-phosphoryliert. Um gleiche Bedingungen zur geplanten Präzipitation von endogenem p27 zu schaffen, wurde das radioaktiv phosphorylierte p27 in MCF7-Rohextrakt inkubiert, gekocht und anschließend über einen spezifischen p27-Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das radioaktive p27 wurde aus der Membran ausgeschnitten, hydrolysiert und die Phosphoaminosäuren über zweidimensionale DC aufgetrennt (Abb. 4.16). Für das *in vitro*-phosphorylierte p27 wurde dabei eine ausschließliche Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen.

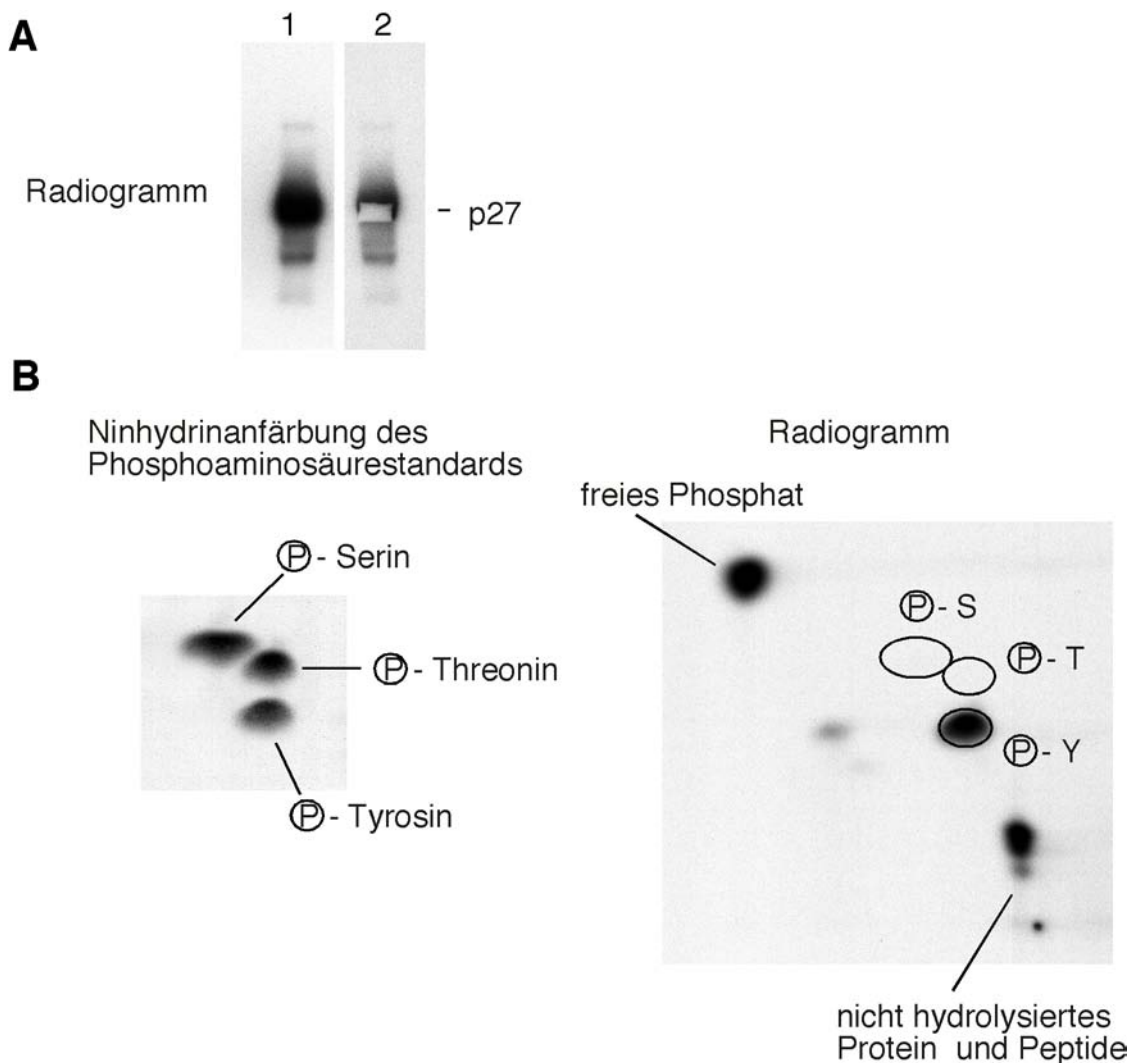


Abbildung 4.16: Analyse von *in vitro* an Tyrosin phosphoryliertem p27 über dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Phosphoaminosäuren des hydrolysierten p27.

(A) Rekombinantes p27 wurde *in vitro* mit dem rekombinant hergestellten Abl-Tyrosinkinasefragment Abl^{KD+SH3} mit [γ -³²P]ATP phosphoryliert. Das radioaktiv markierte p27 wurde in MCF7-Rohextrakt in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit einem spezifischen p27-Antikörper präzipitiert. Die Probe wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und gegen einen Röntgenfilm exponiert (Spur 1). Die Membran wurde mit dem Röntgenfilm zur Deckung gebracht und das phosphorylierte p27 aus der Membran ausgeschnitten. Zur Überprüfung der richtigen Lage des ausgeschnittenen p27 wurde die restliche Membran erneut exponiert (Spur 2).

(B) Zweidimensionale Auftrennung der Phosphoaminosäuren von p27: Das Membranfragment wurde in Methanol rehydriert, gewaschen und für 1 h mit 6 N HCl bei 110°C behandelt. Das erhaltene Proteinhydrolysat wurde abgenommen und unter Vakuum getrocknet, im Laufpuffer der ersten Dimension gelöst und zusammen mit einem Phosphoaminosäurestandard auf eine Cellulosedünnenschichtplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoaminosäuren erfolgte elektrophoretisch in zwei Dimensionen. Die erste Dimension wurde bei pH 1,9 und 1,5 kV für 35 min ausgeführt. Die Platte wurde getrocknet und die Aminosäuren wurden in der zweiten Dimension bei pH 3,5 und 1,3 kV für 30 min aufgetrennt. Der Phosphoaminosäurestandard wurde anschließend durch eine Ninhydrinanfärbung sichtbar gemacht. Die phosphorylierten Aminosäuren wurden durch Exponieren der Celluloseplatte gegen einen Röntgenfilm nachgewiesen.

Zur Analyse des Phosphorylierungszustandes von endogenem p27 wurde eine 250 ml Zellkulturflasche mit adhärenen MCF7-Zellen mit 5 mCi (0,5 mCi/ml) [³²P]-*ortho*-Phosphat für 4 h markiert. Der Phosphorylierungsstatus von endogenem p27 wurde mit derselben Methode wie für *in vitro*-phosphoryliertes p27 ermittelt. Endogenes p27 zeigt dabei hauptsächlich eine Phosphorylierung an Serin, während Threonin nur zu einem Prozent der Gesamtphosphorylierung beiträgt (Abb. 4.17 B, unten). Ein identisches Ergebnis wurde mit p27 aus adhärenen HeLa-Zellen erzielt. Das endogene p21 wurde aus dem bereits für p27 depletierten, metabolisch markierten Gesamtextrakt präzipitiert. Endogenes p21 zeigt dabei eine ausschließliche Phospho-Modifikation an Serin (Abb. 4.17 B, oben). In der Phosphoaminosäureanalyse mit endogenem p27 und p21 konnte keine Tyrosinphosphorylierung detektiert werden. Möglicherweise kann nur ungebundenes p27 *in vivo* an Tyrosinen modifiziert werden, oder Lyn muß zur Phosphorylierung von p27 aktiviert werden. Vorstellbar ist auch eine veränderte Stabilität von an Tyrosin phosphoryliertem p27. Dieses könnte z.B. verstärkt abgebaut werden. Adhärenente HeLa-Zellen wurden deshalb mit p27 (in pCMX.p12, Originalquelle des parentalen Plasmids Roland Schüle, Freiburg) und einer konstitutiv aktiven Form von Lyn (pApuro-Lyn, Y508F, erhalten von Markus Warmuth, Hämatologikum der GSF, Großhadern) kotransfiziert und 24 h nach der Transfektion mit [³²P]-*ortho*-Phosphat markiert. Zudem wurden die Zellen während der Markierung mit MG132 (100 µM) und LLnL (20 µM) zur Inhibition des Proteasoms inkubiert. Eventuelle *in vivo* aktive Phosphatasen wurden durch Zugabe von 100 µM Na-*ortho*-Vanadat, Okadeinsäure (40 µM) zum Medium sowie durch eine Na-*metha*-Vanadat Behandlung (durch Kochen bei pH 10 aktiviertes Na-*ortho*-Vanadat) der Zellen in den letzten 30 min der *in vivo*-Markierung inaktiviert. Im Vergleich zum Phosphorylierungszustand von endogenem p27 (siehe Abb. 4.17 B, unten) zeigt hier überexprimiertes und stabilisiertes p27 eine deutliche Tyrosinphosphorylierung. Serin stellt mit 72% dabei weiterhin die am häufigsten modifizierte Aminosäure dar, gefolgt von Tyrosin (16%) und Threonin (12%). Bei der Überexpression (ebenfalls in pCMX.p12, Roland Schüle, Freiburg) und Stabilisierung von p21 in adhärenen HeLa-Zellen konnte ebenfalls eine Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Die mit p21 transfizierten Zellen wurden zusammen mit den p27 transfizierten Zellen markiert und stabilisiert.

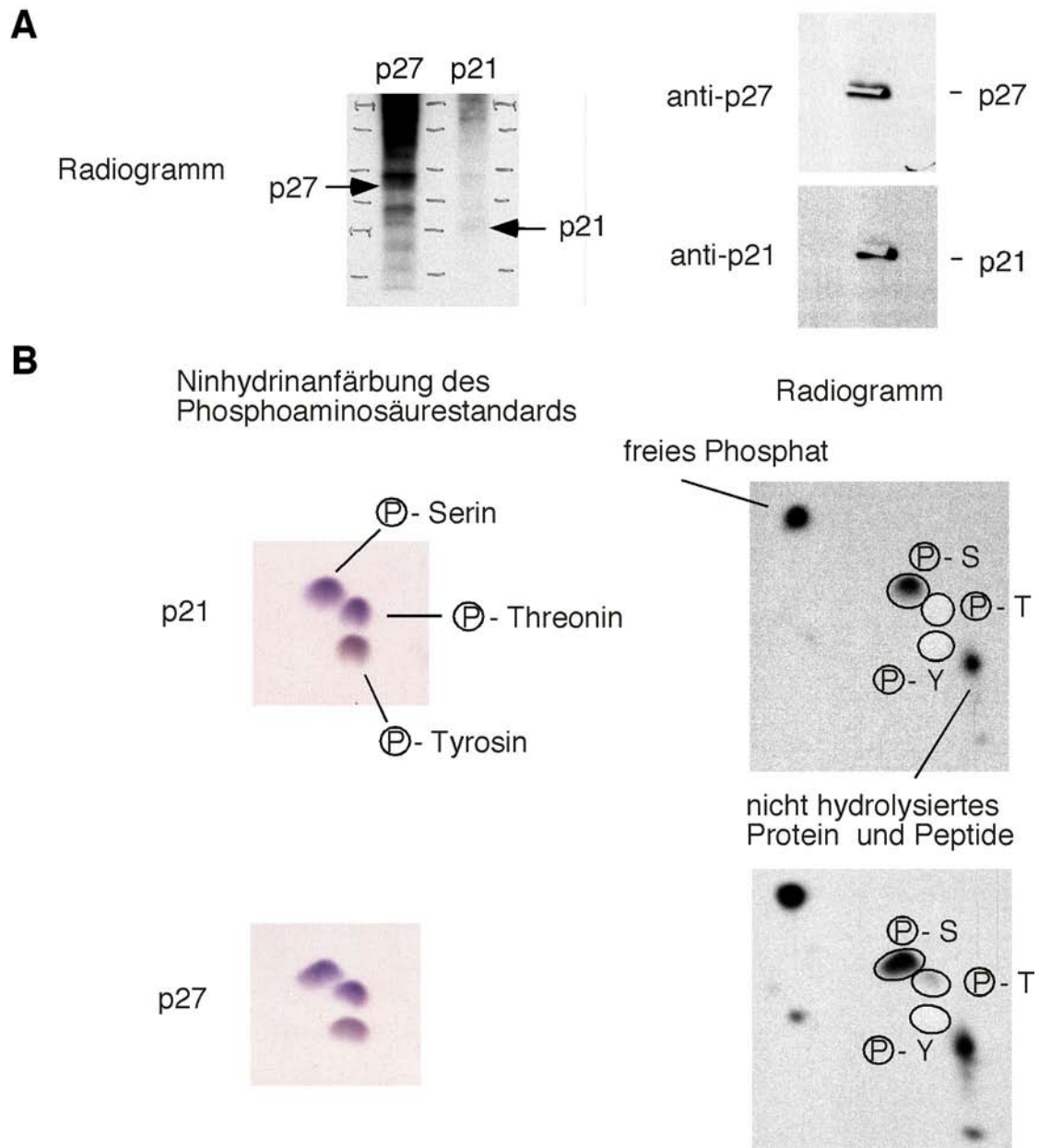


Abbildung 4.17: Metabolische Markierung von adhärenenten HeLa-Zellen mit [^{32}P]-ortho-Phosphat und dünnenschichtchromatographische Analyse der Phosphoaminosäuren von endogenem p21 und p27.

(A) Eine 250 ml Flasche adhärenenten HeLa-Zellen wurde mit 5 mCi (0,5 mCi/ml) [^{32}P]-ortho-Phosphat für 4 h metabolisch markiert. Das endogene p21 und p27 wurde über spezifische Antikörper immunopräzipitiert, gewaschen und nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine auf PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde gegen einen Röntgenfilm exponiert (links) und die radioaktiven Signale der Membran mit dem Film zur Deckung gebracht. p21 und p27 wurden aus der Membran ausgeschnitten. Mit der restlichen Membran wurde, zur erneuten Verifizierung der ausgeschnittenen Proteine, eine Immunoblotanalyse mit spezifischen Antikörpern durchgeführt (rechts).

(B) Zweidimensionale Auftrennung der Phosphoaminosäuren von endogenem p21 und p27: Die Membranfragmente wurden in Methanol rehydriert, gewaschen und für 1 h in 6 N HCl bei 110°C behandelt. Das erhaltene Proteinhydrolysat wurde abgenommen und unter Vakuum getrocknet, im Laufpuffer der ersten Dimension gelöst und zusammen mit einem Phosphoaminosäurestandard auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoaminosäuren erfolgte elektrophoretisch in zwei Dimensionen. Die erste Dimension wurde bei pH 1,9 und 1,5 kV für 35 min ausgeführt. Die Platte wurde getrocknet, und die Aminosäuren wurden in der zweiten Dimension bei pH 3,5 und 1,3 kV für 30 min aufgetrennt. Der Phosphoaminosäurestandard wurde anschließend durch eine Ninhydrinanfärbung sichtbar gemacht. Die phosphorylierten Aminosäuren wurden durch Exponieren der Celluloseplatte gegen einen Röntgenfilm detektiert.

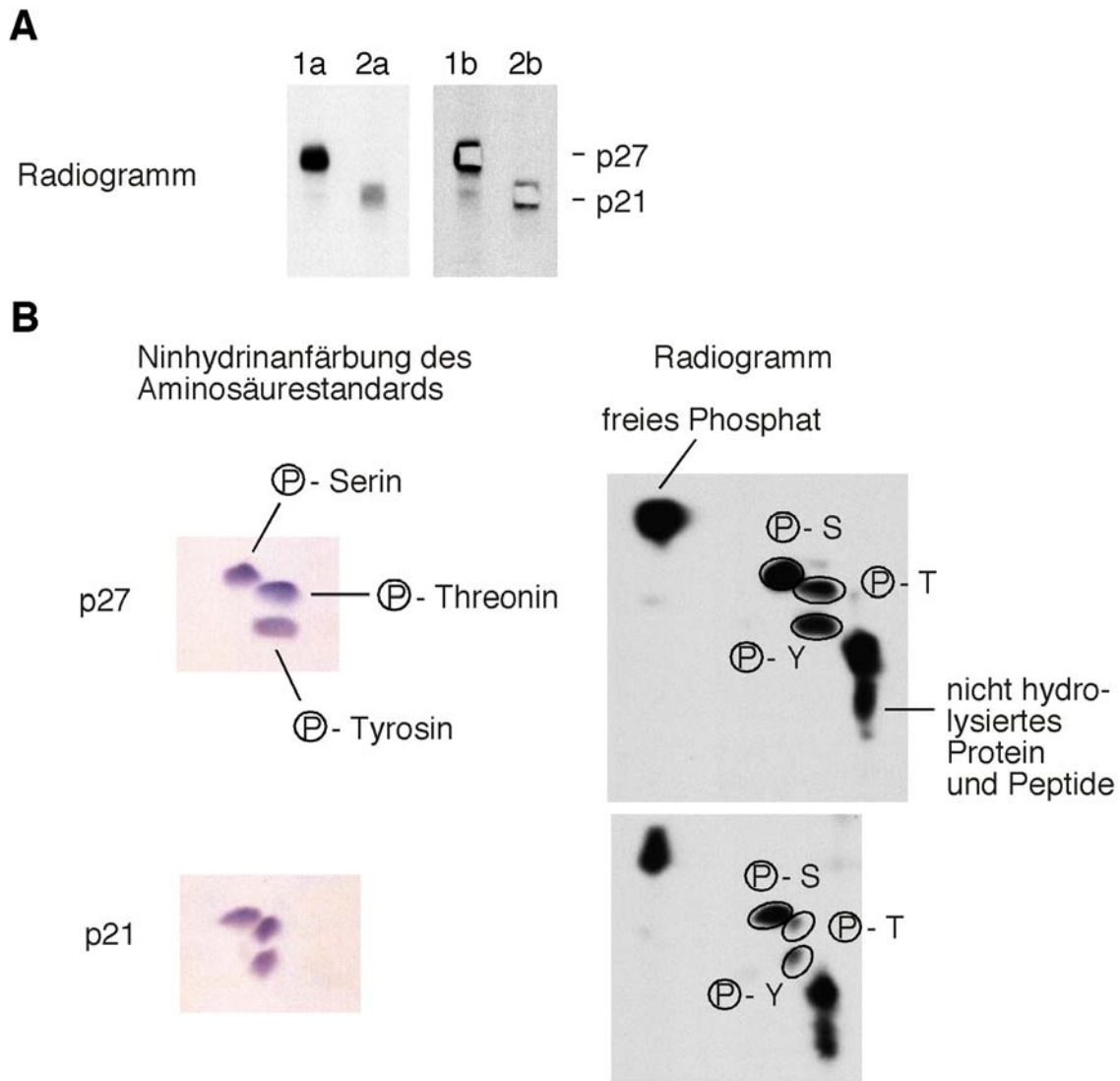


Abbildung 4.18: Metabolische Markierung von adhärenenten HeLa-Zellen mit [32 P]-*ortho*-Phosphat und dünnschichtchromatographische Analyse der Phosphoaminosäuren von überexprimiertem und stabilisiertem p21 und p27.

(A) Eine 250 ml Flasche adhärenenten HeLa-Zellen wurde mit p21 und p27 transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit 5 mCi (0,5 mCi/ml) [32 P]-*ortho*-Phosphat für 4 h metabolisch markiert. Zusätzlich wurden die Zellen zur Inhibition des Proteasoms und von zelleigenen Phosphatasen in Gegenwart von MG132, LLnL, Okadeinsäure und Na-*ortho*-Vanadat kultiviert. In den letzten 30 min der metabolischen Markierung wurden die Zellen zudem mit Na-*meta*-Vanadat kultiviert. p21 und p27 wurden über spezifische Antikörper immunopräzipitiert. Die Ansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde gegen einen Röntgenfilm exponiert (Spur 1a und 2a) und die Membran mit dem radioaktiven Signale des Film zur Deckung gebracht. p21 und p27 wurden aus der Membran ausgeschnitten. Die restliche Membran wurde zur Verifizierung der ausgeschnittenen Proteine erneut exponiert (Spur 1b und 2b).

(B) Zweidimensionale Auftrennung der Phosphoaminosäuren von überexprimiertem p21 und p27: Die Membranfragmente wurden in Methanol rehydriert, gewaschen und für 1 h in 6 N HCl bei 110°C behandelt. Das erhaltene Proteinhydrolysat wurde abgenommen und unter Vakuum getrocknet, im Laufpuffer der ersten Dimension gelöst und zusammen mit einem Phosphoaminosäurenstandard auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoaminosäuren erfolgte elektrophoretisch in zwei Dimensionen. Die erste Dimension wurde bei pH 1,9 und 1,5 kV für 35 min ausgeführt. Die Platte wurde getrocknet und die Aminosäuren wurden in der zweiten Dimension bei pH 3,5 und 1,3 kV für 30 min aufgetrennt. Der Phosphoaminosäurestandard wurde anschließend durch eine Ninhydrinanfärbung sichtbar gemacht. Die phosphorylierten Aminosäuren wurden durch Exponieren der Celluloseplatte gegen einen Röntgenfilm detektiert.

Bei p21 macht die Modifikation von Serin mit 74% den Hauptanteil der Gesamtphosphorylierung aus, gefolgt von 19% Phosphotyrosin und 7% Phosphothreonin. Inwieweit die Tyrosinphosphorylierung von p27 in diesem Ansatz auf die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von Lyn oder auf die Stabilisierung von p27 durch proteasomale Inhibitoren bzw. der Inaktivierung zelleigener Phosphatasen zurückzuführen ist, muß in weiterführenden Experimenten abgeklärt werden.

4.5.2 Spezifität der Tyrosinphosphorylierung

Parallel zu der Detektion der *in vivo*-Tyrosinphosphorylierung von p27 wurde p27 *in vitro* an Tyrosinen phosphoryliert. Mit an Tyrosin phosphoryliertem p27 sollte *in vitro* untersucht werden, ob sich die inhibitorischen Eigenschaften von p27 oder dessen Bindung an den CDK/Cyclin-Komplex verändern. p27 wurde dazu mit den rekombinant hergestellten Tyrosinkinase Abl und Src *in vitro* an Tyrosinen phosphoryliert. Da c-Abl zu groß ist, um es bakteriell exprimiert und aktiv gefaltet zu erhalten, wurde c-Abl aus Maus (Abl in pRK5, Labor Axel Ullrich, MPI für Biochemie, Martinsried) mit PCR so verkürzt, daß das erhaltene Konstrukt der viralen Form, dem Protoonkogen v-Abl (Abl^{KD}, AS 119 bis 535), entsprach. Zusätzlich wurde eine zweite Form von Abl hergestellt, die neben der SH2- und der Kinase-Domäne von v-Abl noch die SH3-Domäne beinhaltet (Abl^{KD+SH3}, AS 63-535). Beide Formen, Abl^{KD} und Abl^{KD+SH3}, wurden in pET28a als Hexahistidininfusion kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die löslichen Fraktionen von Abl^{KD} und Abl^{KD+SH3} wurden über eine native Nickel-Chelat-Matrix (Abl ist zu 1-2 % löslich) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Eine konstitutiv aktive Form von Src (aus Huhn, ebenfalls in pRK5, Labor Axel Ullrich) wurde komplett in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Das Protein Src liegt in Bakterien als unlösliches „inclusion-body“-Pellet vor. Dieses wurde durch eine „inclusion-body“-Reinigungsprozedur und mehrmaliges Waschen und Resuspendieren in 8 M Harnstoff bis zu 80% Reinheit angereichert. Die anschließende Denaturierung der Src-Kinase erfolgte in 12 M Harnstoff bei 50°C. Die Renaturierung von Src wurde durch Verdünnen nach der Tröpfchenmethode durchgeführt.

Mit diesen drei rekombinanten Kinasen sowie mit einem kommerziell erhältlichen Src aus Sf9-Zellen (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) wurde die Tyrosinphosphorylierbarkeit von p27 im Vergleich zu Sam68 (Santa Cruz Biotechnology), einem etablierten Substrat für Abl und Src (Plattner *et al.*, 1999), getestet (Abb 4.19).

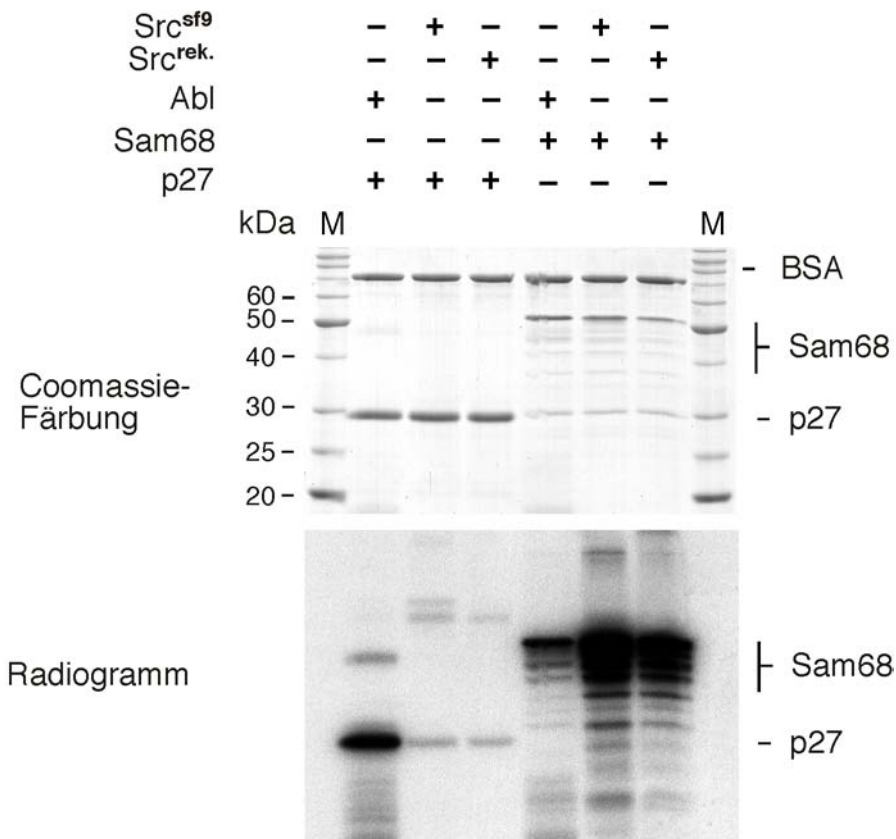


Abbildung 4.19: Vergleich der Phosphorylierungseffizienz der Tyrosinkinase Abl und Src für die Substrate p27 und Sam68.

In *E. coli* hergestelltes und gereinigtes p27 und das käufliche Tyrosinkinasesubstrat Sam68 wurden in einem Tyrosinkinaseassay als Substrate eingesetzt. In dem Versuch wurde die in Bakterien hergestellte verkürzte Tyrosinkinase Abl^{KD+SH3} mit der kompletten, ebenfalls in Bakterien hergestellten und gereinigten Tyrosinkinase Src (Src^{rek.}) bezüglich ihrer Fähigkeit, p27 zu phosphorylieren, verglichen. Zum Vergleich der Aktivität der Tyrosinkinase Src^{rek.} wurde rekombinant in Sf9-Zellen hergestelltes Src (Src^{sf9}) zur Phosphorylierung der Substrate p27 und Sam68 verwendet. Die Kinasierungen erfolgten für 2 h bei 30°C in Kinasierungspuffer II. Gezeigt ist das Coomassiegefärbte, über SDS-PAGE aufgetrennte Gel der Kinasereaktionen (oben) und das Radiogramm des getrockneten Gels (unten).

Abl zeigt im Vergleich zu den beiden Src-Varianten eine weitaus höhere Phosphorylierungseffizienz für p27. Auch das Verhältnis von Autophosphorylierung der Kinasen zur Phosphorylierung der einzelnen Substratproteine zeigt, daß p27 effizienter von Abl modifiziert werden kann. Zwischen den beiden Formen der Tyrosinkinase Abl, Abl^{KD} und Abl^{KD+SH3} bestand kein Unterschied in der Phosphorylierungseffizienz von p27 (Abb. 4.19).

Deshalb wurde für alle weiteren, *in vitro* durchgeführten Tyrosinphosphorylierungen $\text{Abl}^{\text{KD}+\text{SH3}}$ benutzt. Um die Spezifität der Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen, wurden die drei Inhibitoren Cip/Kip-Familie, p21 (zwei Tyrosine im gesamten Protein), p27 (drei Tyrosine) und p57 (zwei Tyrosine) mit $\text{Abl}^{\text{KD}+\text{SH3}}$ *in vitro* phosphoryliert. Als Kontrollen dienten dabei der GTP-Austauschfaktor für Ran, RanGAP-1 (drei Tyrosine, Arbeitsgruppe Frauke Melchior, MPI für Biochemie, Martinsried), sowie das der Kinasierungsreaktion zur Stabilisierung beigefügte BSA (21 Tyrosine), (Abb. 4.20). Alle drei Inhibitorproteine, nicht aber die Kontrollproteine, wurden an Tyrosin phosphoryliert. Analoge Ergebnisse wurden bei einer Kinasierung von p27 mit Src^{rec} erhalten.

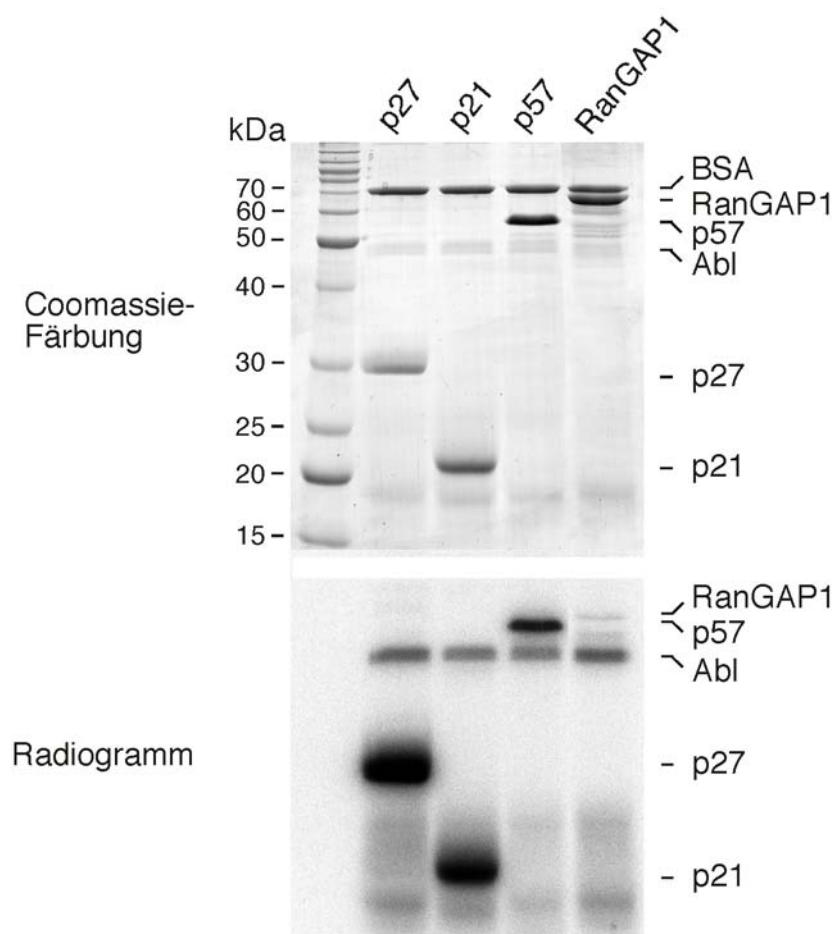


Abbildung 4.20: Vergleich der Tyrosinphosphorylierbarkeit der Cip/Kip-Inhibitorproteine *in vitro*.

In *E. coli* hergestelltes und gereinigtes p21, p27 und p57 wurde mit der rekombinanten, verkürzten Tyrosinkinase $\text{Abl}^{\text{KD}+\text{SH3}}$ phosphoryliert. Die Kinasereaktion erfolgte für 2 h bei 30°C. Die Effektivität der Phosphorylierung der verschiedenen Inhibitorproteine wurde durch die Inkorporation von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in das jeweilige Protein abgeschätzt. Als Kontrolle der spezifischen Phosphorylierung diente der Nukleotidaustauschfaktor RanGAP1 und das, den Kinasereaktionen zur Stabilisierung zugefügte, BSA. Gezeigt ist das coomassiefärbte Gel der Kinasereaktionen (oben) und das Radiogramm des getrockneten Gels (unten).

4.5.3 Identifikation der phosphorylierbaren Tyrosine in p27 und p21

p27 besitzt insgesamt drei Tyrosine. Diese liegen alle im N-terminalen, inhibitorisch wirksamen Proteinteil. Um zu untersuchen, welcher dieser drei Reste *in vitro* von Abl^{KD+SH3}, Src und Lyn phosphoryliert werden kann, wurden die Tyrosine in p27 gegen das strukturähnliche Phenylalanin ausgetauscht. Es wurden dazu die Mutanten p27^{Y1/F} (Y74 zu F), p27^{Y2Y3/F} (Y88 und 89 zu F), p27^{Y123/F} (Y74, Y88 und Y89 zu F), p27^{Y2/F} (Y88 zu F) und p27^{Y3/F} (Y89 zu F) mittels „Quick Exchange“-PCR hergestellt und in pET28a kloniert. Alle p27-Varianten wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach exaktem Mengenabgleich der p27-Varianten und p27^{wt} über SDS-PAGE und Coomassieanfärbung wurde eine Tyrosinphosphorylierung der verschiedenen p27-Substrate mit Abl^{KD+SH3} durchgeführt (Abb. 4.21).

Tyrosin 74 wird *in vitro* nicht als Substrat erkannt, wohl aber Tyrosin 88 oder 89. Wobei für Tyrosin 89 im Vergleich zu Tyrosin 88 und der unveränderten Form von p27 eine etwas höhere (1,3fach) Phosphorylierungseffizienz zu erkennen ist. Aus der gemessenen Inkorporation von [γ -³²P]ATP ergibt sich, daß pro Molekül p27 nur jeweils eines der beiden Tyrosine phosphoryliert wird. Eine initiale Phosphorylierung eines der beiden Tyrosinreste führt wahrscheinlich zur sterischen Blockierung der Phosphorylierung des zweiten Tyrosins (Abb. 4.21). Zum gleichen Ergebnis kommt man durch Einsatz von Src anstelle von Abl^{KD+SH3}. Eine Phosphorylierung der p27-Aminosäureaustauschformen wurden mit der käuflichen (Upstate biotechnology) Tyrosinkinase Lyn durchgeführt. Dies führte jedoch zu keinem auswertbaren Ergebnis, da die käufliche Kinase Lyn eine starke Serin /Threonin –Kinaseaktivität besaß. Diese, die Tyrosinkinaseaktivität überlagernde Kontamination, ließ keine Rückschlüsse auf eine eventuelle Präferenz von Lyn für die drei Tyrosine in p27 zu (Daten nicht gezeigt).

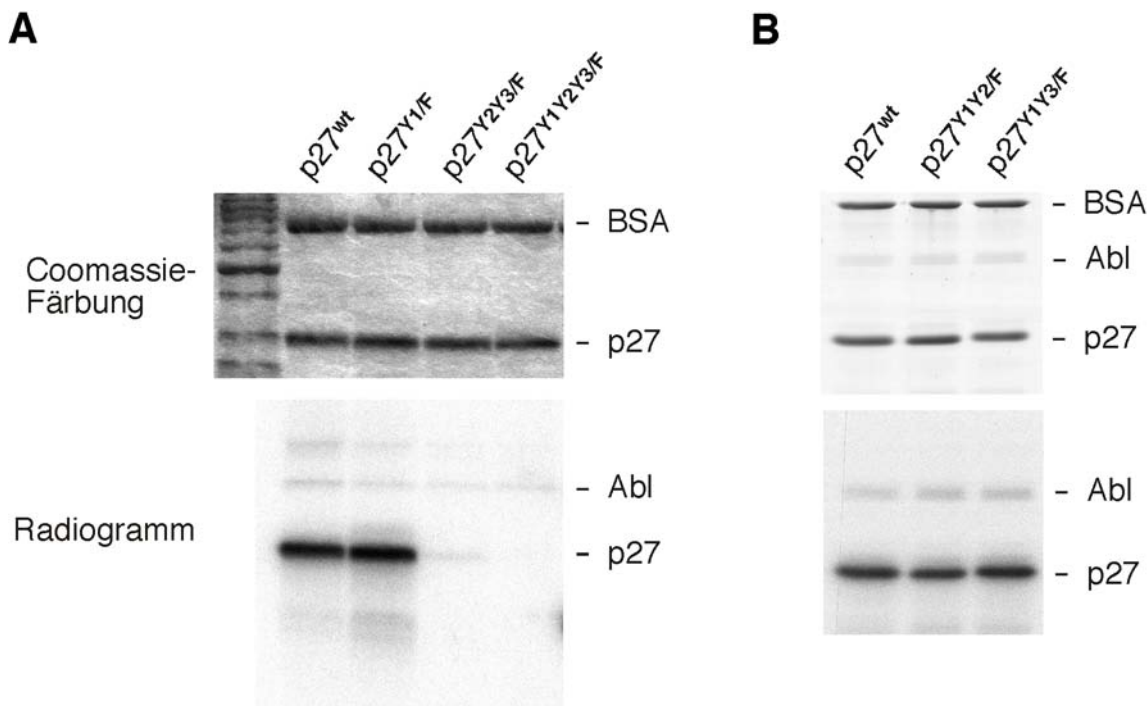


Abbildung 4.21: Ermittlung der *in vitro* durch Abl^{KD+SH3} phosphorylierbaren Tyrosine von p27.

Zur Charakterisierung der phosphorylierbaren Tyrosine in p27 wurden die drei Tyrosine von p27 in verschiedenen Kombinationen konstitutiv durch Phenylalanin ersetzt. Die verschiedenen Austauschmutanten von p27 und p27^{wt} wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt. Die Kinasierung gleicher Mengen dieser Proteine erfolgte mit der rekombinanten, verkürzten Tyrosinkinase Abl^{KD+SH3} für 2 h bei 30°C. Die Effektivität der Phosphorylierung der verschiedenen Substratproteine wurde durch die Messung der Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das jeweilige Protein ermittelt. Als Kontrolle für das Fehlen einer Serin/Threonin-Kinaseaktivität der Substrate und der Tyrosinkinase wurde eine Form von p27 eingesetzt, bei der alle Tyrosine zu Phenylalanin umgewandelt wurden (p27^{Y1Y2Y3/F}). Gezeigt ist das Coomassiegefärbte Gel der Kinasereaktionen (oben) und das Radiogramm des getrockneten Gels (unten).

(A) Ermittlung der Phosphorylierbarkeit des Tyrosins in Position 74 und der beiden benachbarten Tyrosinen in Position 88 und 89. p27^{wt} wurde dabei mit den Austauschmutanten p27^{Y1/F} und p27^{Y2Y3/F} verglichen.

(B) Ermittlung der gleichzeitigen Phosphorylierbarkeit von Tyrosin 88 und 89. p27^{wt} wurde dabei mit den Austauschmutanten p27^{Y1Y2/F} und p27^{Y1Y3/F} verglichen.

Um zu testen, welche Tyrosinreste in p21 *in vitro* phosphorylierbar sind, wurden p21^{wt} sowie p21^{Y1/F} (Y77 zu F) und p21^{Y2/F} (Y151 zu F) als C-terminale Hexahistidinfusion in pET24d kloniert. Alle drei Proteine wurden rekombinant hergestellt, über eine denaturierende Nickel-Affinitäts-Matrix angereichert und über eine Ionenaustauscher-Chromatographie renaturiert und ankonzentriert. Die Kinasierung von p21 erfolgte auch hier mit Abl^{KD+SH3}. p21 wird dabei an seinen beiden Tyrosinresten mit vergleichbarer Effizienz modifiziert (Daten nicht gezeigt).

4.5.4 Charakterisierung der Bindung von tyrosinphosphoryliertem p27 an den CDK2/Cyclin A-Komplex

p27 wird *in vitro* nur an Y88 oder an Y89 phosphoryliert. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren findet in einem Bereich von p27 statt, der mit dem Kinaseanteil der CDK assoziiert ist. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Tyrosinphosphorylierung von p27 nur die Bindung an die Kinaseuntereinheit der CKIs beeinflusst, oder ob die Modifikation von p27 an Tyrosinresten auch die Assoziation mit der Cyclin-Untereinheit der Kinase verhindert.

Diese Frage wurde mit einer analytischen Gelfiltration des ternären Komplexes aus tyrosinphosphoryliertem p27 und CDK2/Cyclin A abgeklärt. Dazu wurde der aus Insektenzellen aufgereinigte rekombinante CDK2/Cyclin A-Komplex mit einem Überschuss an freiem p27 versetzt. p27 bestand dabei aus einem 1:1-Gemisch aus unphosphoryliertem und aus *in vitro* an Tyrosin phosphoryliertem Protein. CDK2/Cyclin A und p27 wurden inkubiert und anschließend über eine Superdex 200 HR 10/30-Gelfiltrationssäule nach dem jeweiligen Stoke'schen Radius aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden nach SDS-PAGE über Coomassieanfärbung und über Immunoblot-Analyse ausgewertet. Zur Detektion von tyrosinphosphoryliertem p27 wurde ein phosphotyrosinspezifischer Antikörper eingesetzt (4G10), (Abb. 4.22 A). Die Spezifität des Antikörpers wurde in einem Immunoblot mit unphosphoryliertem und mit *in vitro* an Tyrosin phosphoryliertem p27 überprüft. (Abb. 4.22 B). Tyrosinphosphoryliertes p27 befindet sich in den Fraktionen der Gelfiltration, die ausschließlich mit CDK2/Cyclin A assoziiert vorliegen. Demzufolge bindet tyrosinphosphoryliertes p27 den CDK-Komplex. Diese Bindung findet möglicherweise über eine Wechselwirkung mit dem Cyclinanteil der CDKs statt. Modifiziertes p27 könnte aber auch ein verändertes Bindungsverhalten zu der Kinaseuntereinheit aufweisen, das für eine Bindung, aber nicht mehr für eine vollständige Inhibition der Kinase ausreicht.

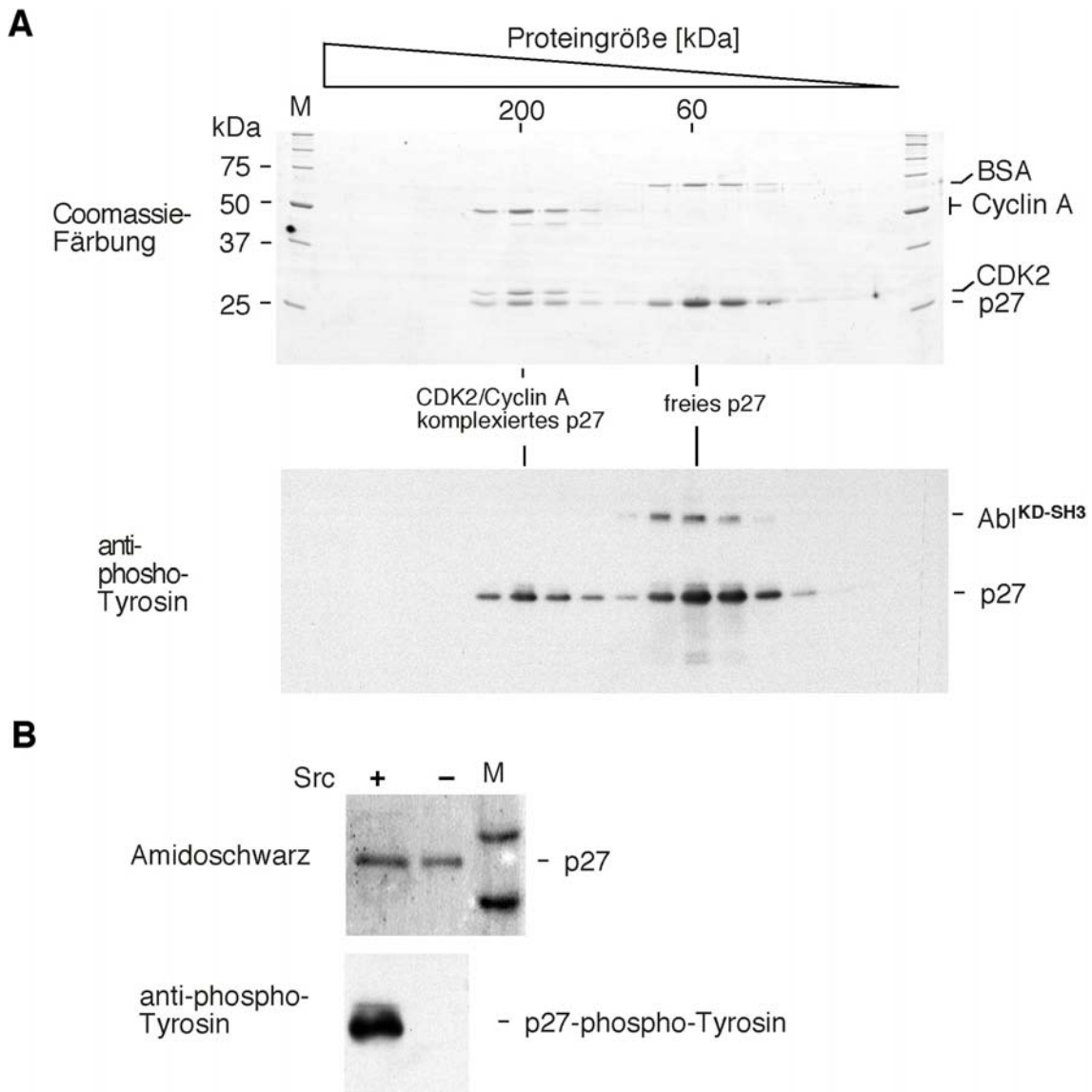


Abbildung 4.22: Charakterisierung der Bindung von tyrosinphosphoryliertem p27 an den CDK2/Cyclin A-Komplex.

(A) Der durch Überexpression der einzelnen Proteine durch rekombinante Baculoviren in Sf9-Insektenzellen hergestellte und gereinigte CDK2/Cyclin A-Komplex wurde mit einem Überschuss von tyrosinphosphorylierten und unphosphorylierten p27 (in einer Stöchiometrie von 1:1 für beide Inhibitoren) versetzt und inkubiert. p27^{wt} wurde dazu *in vitro* mit der verkürzten, rekombinanten Tyrosinkinase Abl^{KD+SH3} phosphoryliert. Das tyrosinphosphorylierte p27 wurde zur Abtrennung der Kinase gekocht und abzentrifugiert. Um das überschüssige ATP abzutrennen, wurde die Probe anschließend diafiltriert. Der trimere Komplex CDK2/Cyclin A-p27 wurde über eine Gelfiltration mit einer Superdex 200pg 26/60 Säule nach dem Stoke'schen Radius aufgetrennt, um zu ermitteln, ob tyrosinphosphoryliertes p27 an CDK2/Cyclin A binden kann. Die Fraktionen des Säulenlaufes wurden zur Analyse der Komplexzusammensetzung über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (oben). Zur Ermittlung des Phosphozustandes von komplexiertem und freiem p27 wurden die Fraktionen aus der Gelfiltration durch Immunoblotanalyse mit einem spezifischen, gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörper analysiert (unten).

(B) Die Spezifität des eingesetzten Phosphoantikörpers wurde mit einem *in vitro* durch Src (rekombinant aus Bakterien) phosphoryliertem p27 und einem kontroll-behandelten p27 getestet.

4.5.5 Änderung der inhibitorischen Aktivität von an Tyrosin phosphoryliertem p27

p27 wird *in vitro* an Y88 und Y89 phosphoryliert. Diese Aminosäuren stellen nach Röntgenstrukturdaten (Russo *et al.*, 1996a) die Hauptinteraktionsstellen des Inhibitors mit der Kinaseuntereinheit der CKIs dar. Es wurde deshalb untersucht, ob eine derartige Modifikation an Tyrosin 88 oder 89 eine Änderung in der inhibitorischen Aktivität von p27 nach sich zieht. Dazu wurde rekombinantes p27^{wt} und p27^{Y123/F} mit Abl^{KD+SH3} in größerer Menge (50 µg) *in vitro* an den Tyrosinen phosphoryliert. Zusätzlich wurde p27^{wt} analog behandelt, jedoch ohne Tyrosinkinase (Mock-Kontrolle). Alle drei Ansätze wurden zur Inaktivierung der Kinase 10 min bei 100°C gekocht, 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Zur Abtrennung von unverbrauchtem ATP wurde, in einem 2,5 ml Zentricon 10, viermal gegen 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT diafiltriert und eingeeengt. Durch SDS-PAGE und Coomassieanfärbung der behandelten Proteine wurde die Proteinmenge von p27^{wt}, p27^{Y123/F} und der MOCK-Kontrolle aufeinander abgeglichen. Zudem ließ sich im Vergleich zu p27^{wt} bei tyrosinphosphoryliertem p27 eine leichte Änderung des Laufverhaltens im SDS-Gel erkennen (dazu siehe auch Abb. 4.26 B). Durch die Änderung im Laufverhalten von p27 ließ sich belegen, daß p27 komplett phosphoryliert wurde.

Um Rückschlüsse auf das Inhibitorpotential von phosphoryliertem im Vergleich zu unphosphoryliertem p27 ziehen zu können, wurde ein Histon H1-Kinaseassay durchgeführt. Dazu wurden identische Ausgangsmengen des jeweiligen Inhibitors in einer Titrationreihe eingesetzt (Abb. 4.23). Tyrosinphosphoryliertes p27 weist dabei, im Vergleich zu Mock-behandeltem p27 und zu p27^{Y123/F}, eine deutliche Verschiebung in der Inhibitionskinetik auf (Abb. 4.23 C). Dieses Experiment zeigt, daß tyrosinphosphoryliertes p27 *in vitro* eine um ca. 40% reduzierte Inhibitorwirkung auf den CDK2/Cyclin A-Komplex besitzt. Neben Histon H1 als Substrat der CDKs wurde das Retinoblastomprotein (p110^{Rb}), das hauptsächliche Zielsubstrat der Zellzykluskinasen *in vivo*, getestet. Kommerziell erhältliches pRb (QED Bioscience Inc., San Diego, Kalifornien) wurde dazu in einem Kinaseassay als Substrat von CDK2/Cyclin A benutzt, um die Inhibitoraktivität von tyrosinphosphoryliertem p27, von p27^{wt} und von p27^{Y123/F} durch Titration zu bestimmen (Abb. 4.23 D). Auch hier läßt sich eine etwa 40%-ige Abschwächung der inhibitorischen Aktivität von an Tyrosin phosphoryliertem p27 feststellen.

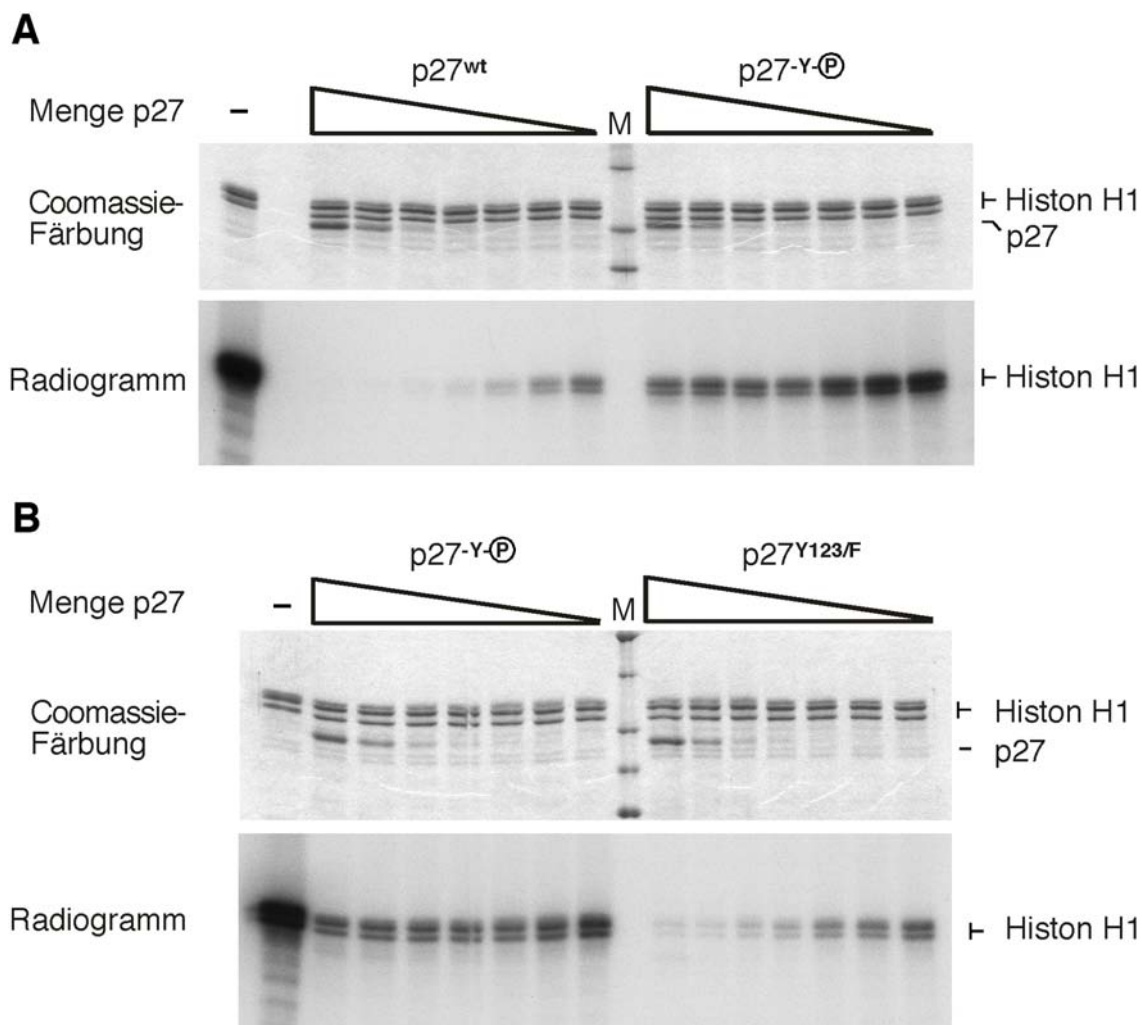


Abbildung 4.23: Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von *in vitro* an Tyrosin phosphoryliertem p27 im Vergleich zu unphosphoryliertem p27 und zu p27^{Y123/F}.

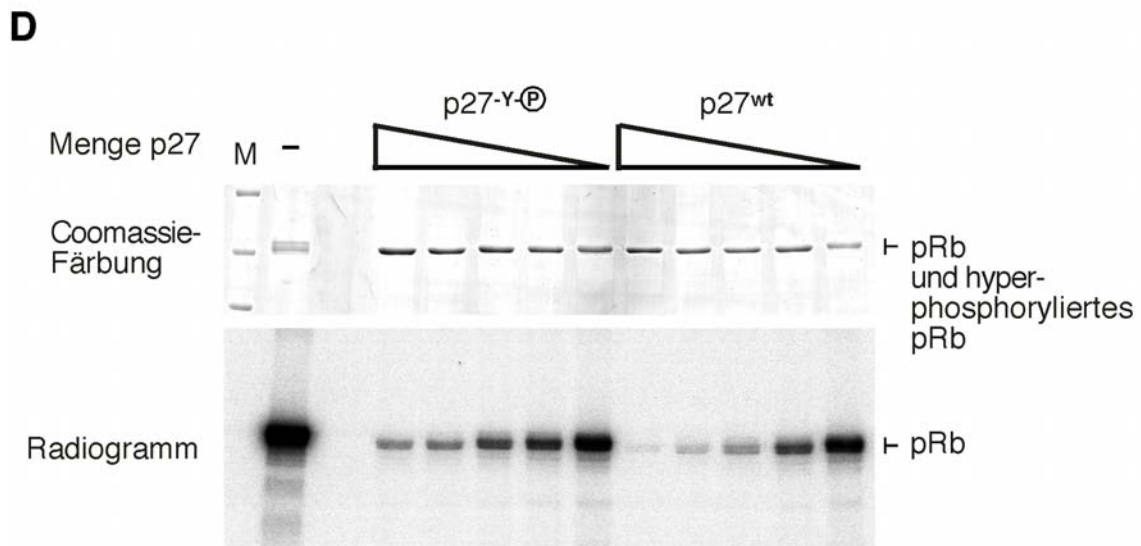
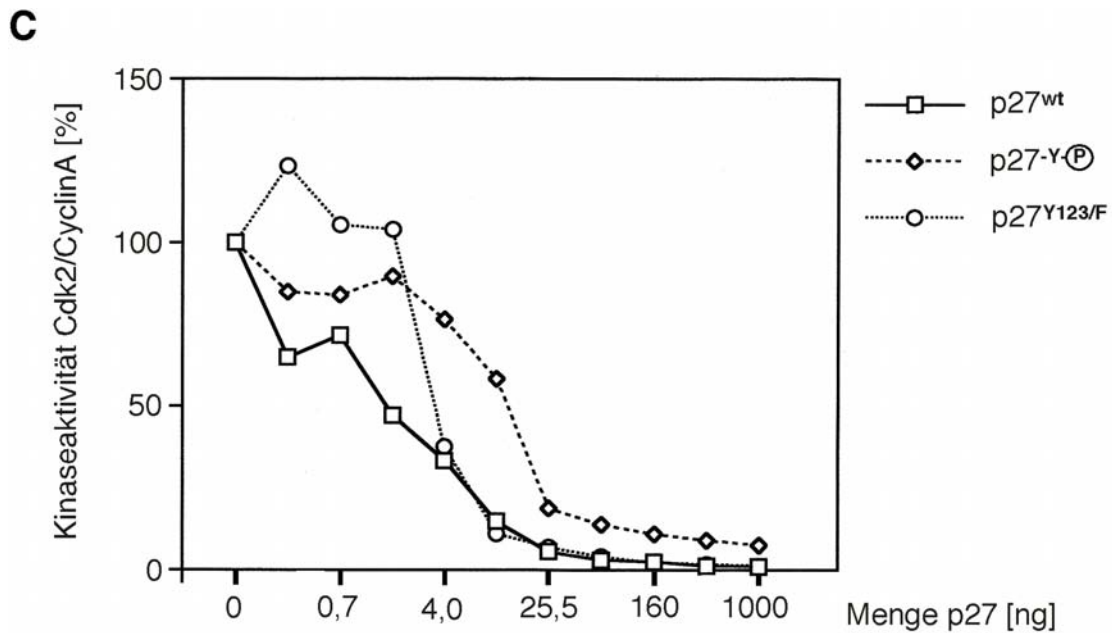
p27^{wt} und p27^{Y123/F} wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Ein Teil des gereinigten p27^{wt} wurde *in vitro* mit der verkürzten, rekombinanten Tyrosinkinase Abl^{KD+SH3} phosphoryliert. Das tyrosinphosphorylierte p27 wurde zur Abtrennung der Kinase gekocht und abzentrifugiert. Um das überschüssige ATP der Kinasierungsreaktion abzutrennen, wurde die Probe anschließend dialtriert. Alle drei Proteine wurden nach SDS-PAGE über Coomassieanfärbung in der Proteinmenge aufeinander abgeglichen. Zur Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der Proteine wurde ein Histon H1-Kinaseassay mit aktivem, humanem CDK2/Cyclin A, isoliert aus Insektenzellen, durchgeführt. Zur Ermittlung der Inhibitorikinetik wurde eine Titration mit jeweils gleichen Ausgangsmengen der Inhibitoren durchgeführt. Die Aktivität des Inhibitors wird dabei über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das Cdk2/Cyclin A-Substrat Histon H1 gemessen. Die inhibitorische Aktivität von p27 ist gekennzeichnet durch die Inaktivierung der CDK2/Cyclin A-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Die Titration wurde mit je sieben Punkten einer fallenden Mengen des jeweiligen Inhibitors bei konstanten Mengen Kinase (50 ng) und Substrat (2 μ g) durchgeführt. Als Kontrolle der Aktivität diente eine Kinasereaktion ohne Inhibitor (-). Gezeigt sind die coomassiegefärbten Gele der Kinasereaktionen (oben) und die Radiogramme der getrockneten Gele (unten).

(A) Titrationskinetik für p27^{wt} und tyrosinphosphoryliertes p27.

(B) Titrationskinetik für p27^{Y123/F} und tyrosinphosphoryliertes p27.

Die ermittelten Kinetiken der jeweiligen Inhibitoren sind in (C) graphisch zusammengefaßt.

Um die erhaltene Kinetik für an tyrosinphosphoryliertes p27 für ein weiteres Substrat von CDK2/Cyclin A zu bestätigen, wurde ein Kinaseassay mit pRb als Substrat durchgeführt. Das Inhibitorpotential von p27^{wt} und von *in vitro* an Tyrosin phosphoryliertem p27 in einer Kinasereaktion mit aktivem CDK2/Cyclin A und pRb wurde unter, zu (A) und (B) identischen Bedingungen, ermittelt (D).



4.5.6 Tyrosinphosphoryliertes p27 wird verstärkt an Threonin 187 phosphoryliert

Tyrosinphosphoryliertes p27 bindet *in vitro* an den CDK2/Cyclin A-Komplex (siehe 4.5.4), inhibiert den CDK-Komplex aber weniger effizient. Aus der Literatur ist bekannt, daß p27 seinerseits ein Substrat von CDK2/Cyclin E und möglicherweise auch von CDK2/Cyclin A ist. Die von diesen Kinasen vermittelte Phosphorylierung an Threonin 187 ist dabei das initiale Signal für die Bindung von p27 an den SCF^{SKP2}-Komplex, einer E3-Ligase der Ubiquitinierungsmaschinerie (Montagnoli *et al.*, 1999). Ubiquitiniertes p27 wird anschließend proteasomal abgebaut (Pagano *et al.*, 1995).

Um zu untersuchen, ob ein inhibitorisch inaktives, tyrosinphosphoryliertes p27 ein besseres Substrat der Zellzykluskinasen darstellt als unphosphoryliertes, wurde ein CDK2/Cyclin A-Kinaseassay mit tyrosinphosphoryliertem p27 durchgeführt. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen identisch ohne Tyrosinkinase behandeltes p27^{wt}, tyrosinphosphoryliertes p27 und p27^{Y123/F}, mit einem Überschuß an aktivem CDK2/Cyclin A-Komplex phosphoryliert.

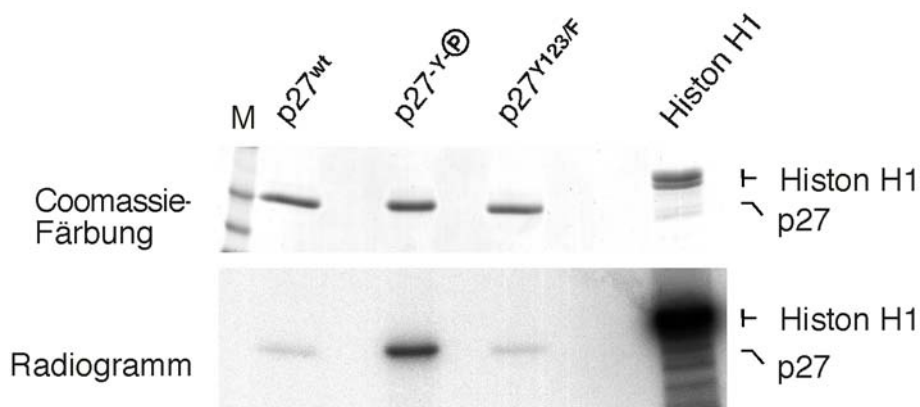


Abbildung 4.24: Charakterisierung der verstärkten Serin/Threonin-Phosphorylierung von tyrosinphosphoryliertem p27 durch CDK2/Cyclin A.

p27^{wt} wurde *in vitro* mit Abl^{KD+SH3} phosphoryliert. Das tyrosinphosphorylierte p27 wurde zur Abtrennung der Kinase gekocht und abzentrifugiert. Um das überschüssige ATP abzutrennen, wurde die Probe anschließend diafiltriert. Gleiche Mengen von tyrosinphosphoryliertem p27, von p27^{wt} und von p27^{Y123/F} (oben) wurden mit aktivem CDK2/Cyclin A 30 min bei 30°C inkubiert. Die Phosphorylierbarkeit des Inhibitors p27 durch den CDK2/Cyclin A-Komplex wurde über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in p27 ermittelt. Als Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion diente die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das CDK2/Cyclin A-Substrat Histon H1 (unten).

Tyrosinphosphoryliertes p27 wird *in vitro* deutlich besser von CDK2/Cyclin A an Threonin 187 phosphoryliert als p27^{wt} und p27^{Y123/F} (Abb. 4.24). Diese 17,5fach verstärkte Threonin 187-Phosphorylierung von modifiziertem p27 zeigt erneut das unter 4.5.5 beschriebene, von unphosphoryliertem p27 abweichende, Inhibitionsverhalten. Möglicherweise bewirkt die Inaktivierung von p27 durch eine Phosphorylierung an Tyrosinresten die Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 durch die gebundene, aber aktive Kinase (siehe 4.5.4). Eine Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 durch CDK2/Cyclin A könnte allerdings auch transient durch eine weitere, ungebundene Kinase erfolgen.

4.5.7 p27 wird nicht an Tyrosinresten phosphoryliert, wenn es an den CDK2/Cyclin A-Komplex gebunden vorliegt

Der Mechanismus der Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vitro* belegt eine Inaktivierung des Inhibitors (Abb. 4.23). Ein Großteil von p27 liegt in vielen Zellen nahezu ausschließlich gebunden an CDKs vor (Hengst *et al.*, 1994; Steiner *et al.*, 1995). Es wurde daher untersucht, ob ein an CDK/Cyclin-gebundenes p27 ebenfalls an Tyrosin phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung würde zu einer Inaktivierung von komplexgebundenem p27 führen. Um die Phosphorylierung von komplexgebundenem p27 zu untersuchen, wurde der ternäre Komplex aus rekombinantem p27 und CDK2/Cyclin A aus Insektenzellen in einer Stöchiometrie von 1:1:1 über Gelfiltration aufgereinigt. Ein Teil des so gereinigten Komplexes wurde 10 min gekocht und abzentrifugiert um p27 wieder freizusetzen. Diese beiden Proben, das CDK2/Cyclin A-komplexierte p27 (Abb 4.25, Spur 1 und 2) und das freie p27 (Abb 4.25, Spur 3), wurden in der Menge aufeinander abgeglichen und mit Abl^{KD+SH3} phosphoryliert. Als Kontrolle wurde komplexgebundenes p27 phosphoryliert, um die durch CDK2/Cyclin A vermittelte Phosphorylierung von p27 zu ermitteln (Abb. 4.25, Spur 2). Die durch CDK2/Cyclin A vermittelte Phosphorylierung von p27 wurde von der Gesamtyrosinphosphorylierung subtrahiert. Der freie Inhibitor wird *in vitro* sehr viel besser (6,5fach) durch Abl^{KD+SH3} phosphoryliert als der komplexierte. Möglicherweise ist ein an CDK2/Cyclin A gebundenes p27 für die Tyrosinkinase nicht zugänglich. Allerdings wurde auch für komplexgebundenes p27 eine Verstärkung der Phosphorylierung durch Abl nachgewiesen (Abb. 4.25, Spur 1). Ob diese Phosphorylierung aufgrund einer zeitweisen Dissoziation von p27 vom CDK-Komplex zustande kommt, oder ob p27 im Komplex in einem reduzierten Maß phosphoryliert werden kann, bleibt nachzuweisen. Die schwächere Phosphorylierung von komplexiertem p27 bestätigen demgegenüber die Daten aus Punkt 4.3.4. Diese belegen, daß Grb2 nicht in der Lage ist, an einen Komplex aus p27 und CDK2/Cyclin A zu binden. Ob eine Bindung und Phosphorylierung von CDK-gebundenem p27 durch die Tyrosinkinase Lyn möglich ist, muß noch untersucht werden.

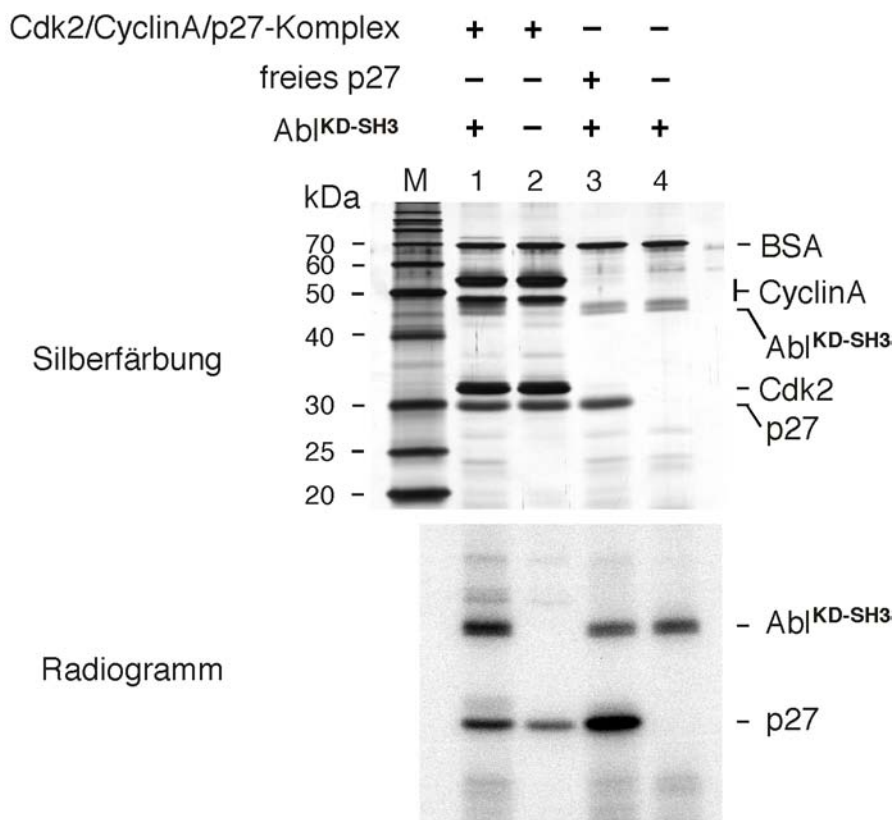


Abbildung 4.25: Untersuchung zur Tyrosinphosphorylierbarkeit von an CDK2/Cyclin A gebundenem p27.

Der rekombinante, gereinigte CDK2/Cyclin A-Komplex aus Insektenzellen und gereinigtes p27 aus Bakterien wurden miteinander inkubiert und der trimere Komplex (in einer Stöchiometrie von 1:1:1) durch Gelfiltration von ungebundenen Proteinen abgetrennt. Ein Teil des gereinigten trimeren Komplexes wurde zur Abtrennung von CDK2/Cyclin A 10 min gekocht und abzentrifugiert. Freies p27 und die identische Menge CDK2/Cyclin A-gebundenes p27 wurden *in vitro* mit Abl^{KD-SH3} phosphoryliert, um die Zugänglichkeit von gebundenem p27 für die Tyrosinkinase zu ermitteln. Die durch den CDK2/Cyclin A-Komplex vermittelte Serin/Threonin-Phosphorylierung von p27 selbst wurde in einer Kinasierungsreaktion ohne Tyrosinkinase analysiert (Spur 2). Diese Aktivität wurde von der gemessenen Gesamtaktivität subtrahiert. Die Phosphorylierbarkeit des Inhibitors p27 durch die Tyrosinkinase wurde über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in p27 charakterisiert. Gezeigt ist das coomassiegefärbte Gel der Kinasereaktion (oben) und das Radiogramm des getrockneten Gels (unten).

4.5.8 Mechanismus der Bindung und Phosphorylierung von p27 durch die Tyrosinkinase Lyn

Die Assoziation von Lyn an p27 *in vivo* konnte verstärkt an einer Mutante von p27 gezeigt werden, bei der alle drei phosphorylierbaren Tyrosinreste durch Phenylalanin ersetzt wurden (p27^{Y123/F}, siehe 4.4.1). p27^{wt} interagiert dagegen nicht oder nur schwach mit Lyn. p27^{wt} kann *in vivo*, im Gegensatz zu p27^{Y123/F}, an Tyrosin phosphoryliert werden. Diese Modifikation von p27 könnte *in vivo* bewirken, daß tyrosinphosphoryliertes p27 nicht mehr von der SH3-Domäne der Tyrosinkinase gebunden werden kann.

Um zu untersuchen, ob eine Tyrosinphosphorylierung des Inhibitors zu einer Dissoziation der Kinase von p27 führt, wurde ein Interaktionsassay mit dem GST-Fusionsprotein der isolierten SH3-Domäne von Lyn und einem an Tyrosin phosphorylierten p27 durchgeführt. Die aufgereinigten, rekombinanten Formen von p27 ($p27^{Y123/F}$, $p27^{\Delta SH3}$, $p27^{wt}$) sowie *in vitro*-tyrosinphosphoryliertes p27 wurde mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung in der Menge abgeglichen (Abb. 4.26 B). Gleiche Mengen der Inhibitoren wurde mit der gleichen Menge der an Glutathionsepharose-Matrix immobilisierten SH3-Domäne von Lyn inkubiert. Eine Interaktion von p27 mit Lyn-SH3 wurde nach SDS-PAGE immunologisch mittels eines spezifischen p27-Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.26 A).

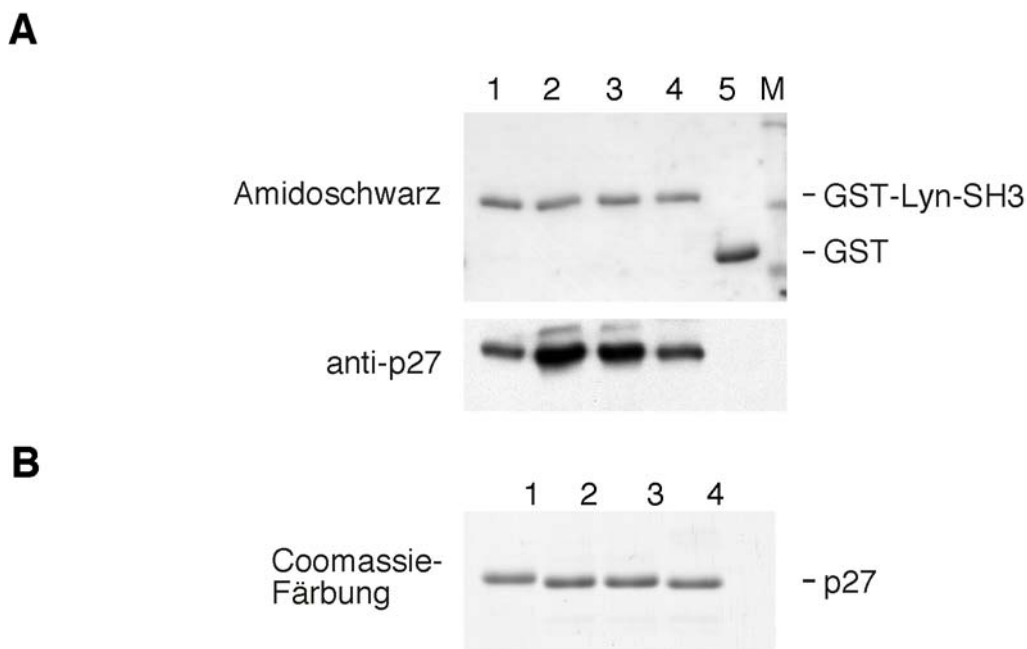


Abbildung 4.26: Untersuchung zum Mechanismus der Dissoziation der Tyrosinkinase Lyn von deren Substrat p27 *in vitro*.

(A) Die isolierte SH3-Domäne der Tyrosinkinase Lyn wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und über Glutathionsepharose angereichert. Die an Glutathionsepharose immobilisierte Domäne wurde mit rekombinanten, gereinigtem $p27^{wt}$ (Spur 2), $p27^{Y123/F}$ (Spur 3), $p27^{\Delta SH3}$ (Spur 4) und mit einem an Tyrosin phosphorylierten p27 (Spur 1) inkubiert. Dieses p27 (Spur 1) wurde *in vitro* mit der verkürzten, rekombinanten Tyrosinkinase Abl^{KD+SH3} kinasiert und zur Abtrennung der Kinase gekocht und abzentrifugiert. Um das überschüssige ATP abzutrennen, wurde die Probe anschließend diafiltriert. Das Interaktionsexperiment wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (oben). Die Analyse der Interaktion erfolgte immunologisch mit einem spezifischen, gegen p27 gerichteten Antikörper (unten). Als Kontrolle diente an Glutathionsepharose immobilisiertes GST, das mit einer vergleichbaren Menge an tyrosinphosphoryliertem p27 inkubiert wurde (Spur 5).

(B) Die Proteinmenge der verschiedenen, rekombinant hergestellten Formen von p27 und von tyrosinphosphoryliertem p27 wurde über eine Coomassiefärbung der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine abgeglichen. Die Effizienz der Tyrosinphosphorylierung von p27 ließ sich durch eine leichte Größenzunahme von Phospho-p27 im Vergleich zu unphosphoryliertem p27 ermitteln. Spur 1: Tyrosinphosphoryliertes p27, Spur 2: $p27^{wt}$, Spur 3: $p27^{Y123/F}$, Spur 4: $p27^{\Delta SH3}$.

An Tyrosin phosphoryliertes p27 bindet etwa zehnfach schwächer an die SH3-Domäne von Lyn als p27^{wt} oder p27^{Y123/F}. Interessanterweise bindet p27^{ΔSH3} schwächer an die SH3-Domäne von Lyn, eine komplett fehlende Interaktion wie in der GST-Kontrolle dieses Experiments, oder im Fall der Interaktion von p27 und Grb2 (siehe Abb. 4.9) ist hier allerdings nicht zu erkennen. Die Phosphorylierung der Tyrosine 88 oder 89, in direkter Nachbarschaft zur SH3-Bindedomäne in p27, führt damit *in vitro* zu einer verstärkten Dissoziation der Kinase Lyn vom Substrat p27.

4.5.9 Die Modifikation von p27 an Tyrosin 88 oder 89 inaktiviert und destabilisiert p27 in vivo

Die Tyrosinphosphorylierung von p27 schwächt *in vitro* die Aktivität des Inhibitors ab (siehe 4.5.5). Zudem erleichtert eine initiale Modifikation von p27 an Tyrosin eine nachgeschaltete Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 (Punkt 4.5.6). Diese Phosphorylierung stellt das spezifische Signal zur Erkennung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ligasekomplex und den damit verbundenen Abbau des Moleküls *in vivo* dar (Krek, 1998; Montagnoli *et al.*, 1999).

Um zu untersuchen, ob die Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* zu einer Inaktivierung und Destabilisierung des Inhibitors führt, wurde ein *in vivo*-Kinaseassay und eine Halbwertszeitbestimmung (Pulse Chase-Markierung) von p27 durchgeführt. Für den *in vivo*-Kinaseassay wurde je eine 10 cm Schale adhärenter HeLa-Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form von Lyn (pApuro-Lyn, erhalten von Markus Warmuth, Hämatologikum der GSF, Großhadern) und mit HA-p27^{wt} und HA-p27^{Y123} (beide in pCruz-HA) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschlossen, und aus identischen Mengen Totalprotein wurden mittels anti-Cyclin A-Antikörper die Cyclin A/CDK-Komplexe immunopräzipitiert. Mit der präzipitierten Kinase und den damit kopräzipitierten überexprimierten Inhibitoren wurde ein immobilisierter Histon H1-Kinaseassay durchgeführt. Nach Auswertung der radioaktiven Signale mittels Phosphoimager (Fujifilm BAS-2500 Phosphoimager, Fujifilm), wurden die Mengen an präzipitierter CDK2 und p27 über spezifische Antikörper analysiert und die erhaltenen Signale der Antikörperdetektion densitometrisch (Programm ImageMaster 1D Elite, Amersham) bestimmt.

Aus der Quantifizierung der Kinaseaktivität und nach Berücksichtigung der Quantifizierung der erhaltenen Signale der Antikörperdetektion von CDK2 und p27 zeigt p27^{wt} *in vivo* im Vergleich zu p27^{Y123/F} eine rund 50-prozentige Reduktion seiner inhibitorischen Aktivität. Diese Aktivitätsänderung stimmt mit der *in vitro* bestimmten Aktivitätsänderung von tyrosinphosphoryliertem p27 überein (siehe 4.5.5). Dies legt nahe, daß p27 auch *in vivo* durch eine Tyrosinphosphorylierung inaktiviert werden kann. Allerdings wurde in der Präzipitation der Inhibitoren (Abb. 4.27 anti-HA, Spuren 1 und 2) nur eine geringe Menge an CDK2 detektiert. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß p27 in der anschließend durchgeführten Kinasereaktion im Überschuß zur Kinase vorlag. Eine längere Exposition der Kinasereaktion zeigte allerdings auch hier eine verstärkte Inhibition bei der Tyrosinaustauschmutante von p27.

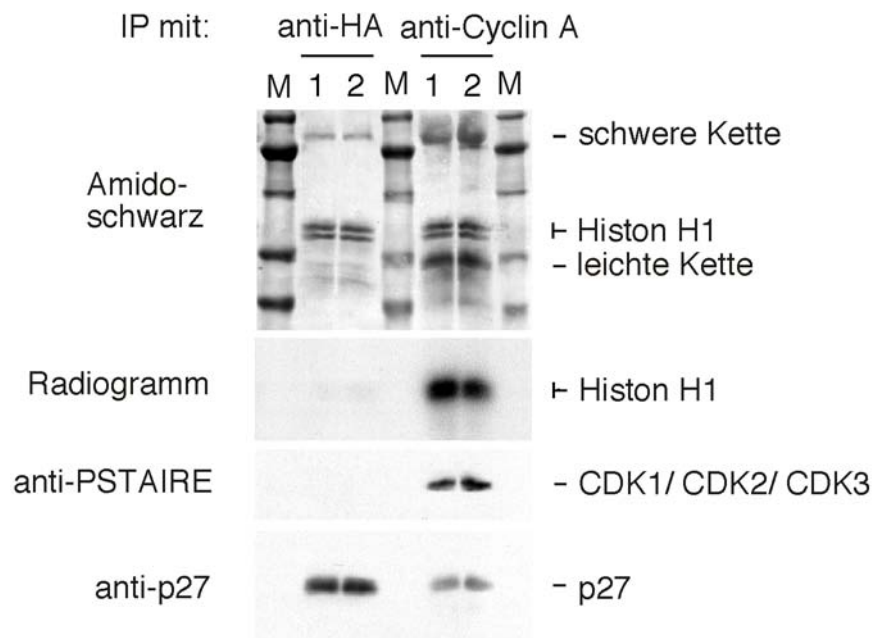


Abbildung 4.27: Untersuchung zur Inaktivierung von p27 durch Tyrosinphosphorylierung des Inhibitors *in vivo*.

Eine 10 cm Schale adhärenter HeLa-Zellen wurden je mit HA-Fusionskonstrukten von p27^{wt}-HA (Spur 1) und p27^{Y1Y2Y3/F}-HA (Spur 2) und zudem mit der längeren Isoform (p56) einer konstitutiv aktiven Form der Tyrosinkinase Lyn kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in IP-Puffer aufgeschlossen und in der Proteinmenge gegeneinander abgeglichen. Aus den Extrakten wurde p27-HA mit einem spezifischen HA-Antikörper und aus parallelen Ansätzen Cyclin A spezifisch immunpräzipitiert. Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der beiden transfizierten Inhibitoren p27^{wt} und p27^{Y1Y2Y3/F} wurde ein immobilisierter Histon H1-Kinaseassay mit der immunpräzipitierten Kinase durchgeführt. Die Aktivität des an Antikörper und Protein-A-Sepharose immobilisierten Inhibitors wird dabei über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das CDK2/Cyclin A-Substrat Histon H1 ermittelt. Die inhibitorische Aktivität von p27 ist gekennzeichnet durch die Inaktivierung der CDK2/Cyclin A-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Gezeigt ist das Radiogramm der PVDF-Membran der über SDS-PAGE aufgetrennten Kinasereaktionen. Die Ermittlung der im Kinaseassay eingesetzten Mengen von endogenen CDKs und überexprimierten Inhibitoren erfolgte mit spezifischen Antikörpern in der Immunoblotanalyse der PVDF-Membran der Kinasereaktionen.

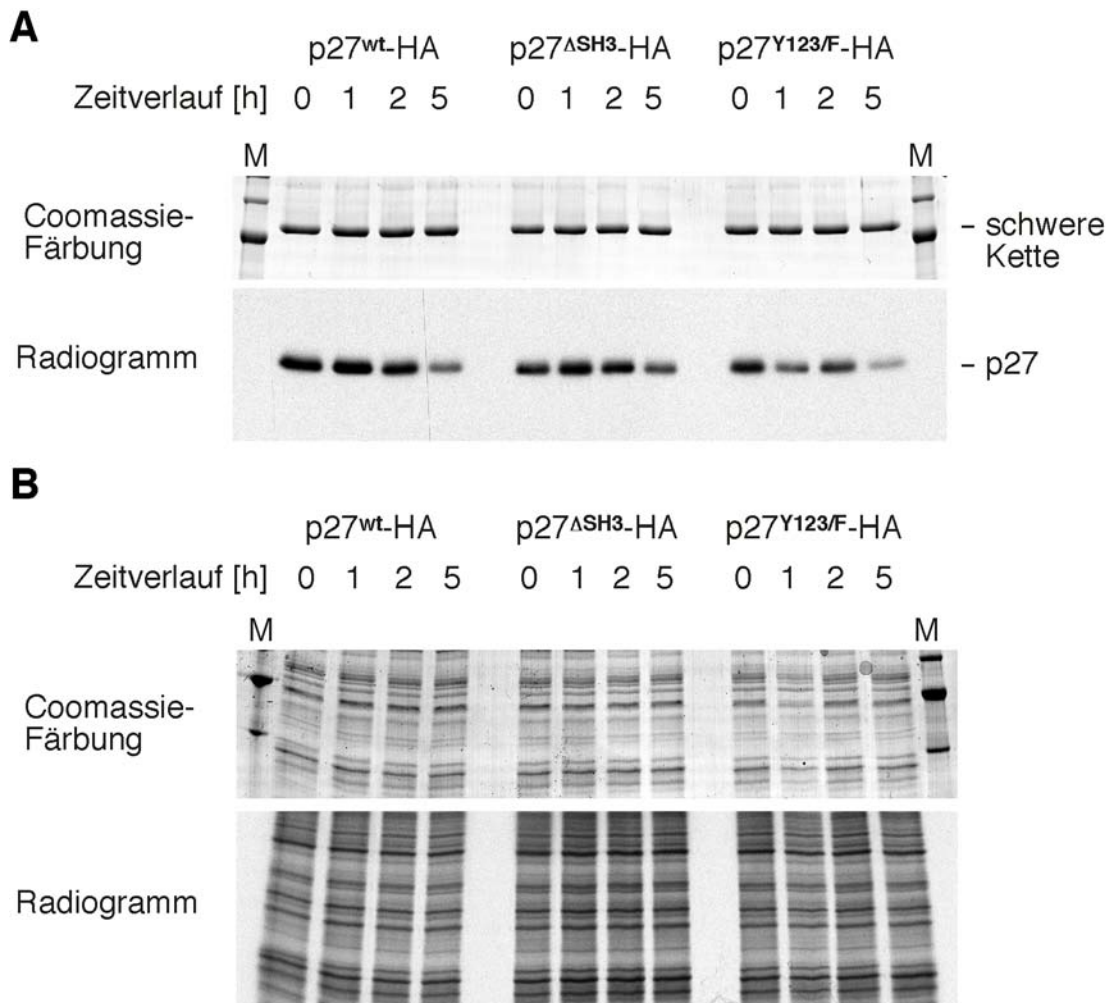


Abbildung 4.28: Bestimmung der Halbwertszeit von p27^{Y123/F} und p27^{ΔSH3} im Vergleich zu p27^{wt}.

(A) Je eine 15 cm Schale adhärenter HeLa-Zellen wurde mit p27^{wt}, p27^{ΔSH3} und p27^{Y123/F} transfiziert und jede der transfizierten Schalen wurde 5 h nach der Transfektion zu gleichen Teilen auf vier Zellkulturflaschen aufgeteilt. 16 h nach dem Aufteilen der Zellen wurden die Zellen für 1 h mit 0,05 mCi/ml [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein metabolisch markiert. Die Zellen wurden für 0, 1, 2 und 5 h in Medium mit nichtradioaktivem Methionin und Cystein weiterkultiviert und geerntet.

Die Zellen wurden lysiert und die Proteinmenge der Lysate wurde gegeneinander abgeglichen. Der Rohextrakt wurde 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Die radioaktiv markierten p27-HA-Fusionen wurden über einen gegen HA gerichteten Antikörper immunopräzipitiert. Gezeigt ist die Coomassiefärbung der aufgetrennten Präzipitate (oben) und das Radiogramm des getrockneten Gels (unten).

(B) Zur Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen und der Inkorporationseffizienz von [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein in die Proteine der Zelle wurde der gekochte Rohextrakt aus der Depletion mit HA-spezifischem Antikörper über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (oben). Die Abschätzung der Inkorporation erfolgte durch Exposition des getrockneten Gels gegen einen Röntgenfilm (unten).

Inwieweit die verstärkte Kinaseaktivität in der Präzipitation mit Antikörpern gegen Cyclin A auf eine freie Kinase zurückzuführen ist, bleibt noch zu klären. Um auf der anderen Seite zu überprüfen, ob eine initiale Tyrosinphosphorylierung von p27 zu einer Destabilisierung des Inhibitors *in vivo* beiträgt, wurde eine metabolische Markierung von p27 mit [³⁵S]-Methionin und -Cystein (Pulse Chase) zur Halbwertszeitbestimmung durchgeführt. Die nach 0, 1, 2 und 5 h erhaltenen Aktivitäten für die verschiedenen Formen von p27 wurden über einen Phosphoimager quantifiziert und mit der eingesetzten Proteinmenge und dem Totaleinbau an [³⁵S] abgeglichen.

Für p27^{ΔSH3} zeigte sich eine deutliche Stabilitätszunahme (4 h) im Vergleich zu p27^{wt} (2,5 h). Auch p27^{Y123/F} zeigte eine etwas verlängerte Halbwertszeit von 3,5 h. Dieses Ergebnis legt einen Einfluß sowohl der SH3-Domänen-bindenden Region in p27, wie auch der Phosphorylierung der Tyrosine für die Stabilität von p27 *in vivo* nahe. Dies spricht dafür, daß eine Tyrosinkinase *in vivo* wahrscheinlich über die Prolin-reiche Region von p27 mit dem Inhibitor interagiert. Anschließend wird p27 an Tyrosin phosphoryliert und inaktiviert. An Tyrosin modifiziertes p27 wird wiederum verstärkt abgebaut.

4.5.10 Charakterisierung von verschiedenen mutierten

Formen von p27

In dieser Arbeit wurden verschiedene mutierte Formen von p27 zu Untersuchungen herangezogen (p27^{Y1/F}, p27^{Y23/F}, p27^{Y123/F} sowie p27^{ΔSH3}). Um zu gewährleisten, daß diese Formen in ihrer Funktion der Aktivität von p27^{wt} vergleichbar sind, wurde ein Inhibitor-Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat der Zellzykluskinasen durchgeführt (Abb. 4.29). Die untersuchten Formen von p27 besitzen dabei eine mit p27^{wt} vergleichbare inhibitorische Aktivität. Die verstärkte Inhibition von p27^{ΔSH3} ist auf eine etwas höhere eingesetzte Menge des Inhibitors zurückzuführen.

Neben der Aktivität der mutierten Kinaseinhibitoren wurde auch die Lokalisation von p27^{Y123/F} und p27^{ΔSH3} in Bezug auf die ausschließlich nukleäre Lokalisation von p27^{wt} überprüft.

Dazu wurden die HA-Fusionskonstrukte (in pCruz-HA) von p27^{Y123/F}, p27^{ΔSH3} und von p27^{wt} in adhärenente HeLa-Zellen transfiziert und 24 h nach der Transfektion immunocytochemisch untersucht. Auch hier weisen die mutierten Formen von p27 die gleiche, ausschließlich nukleäre Lokalisation auf wie die unmutierte Form von p27.

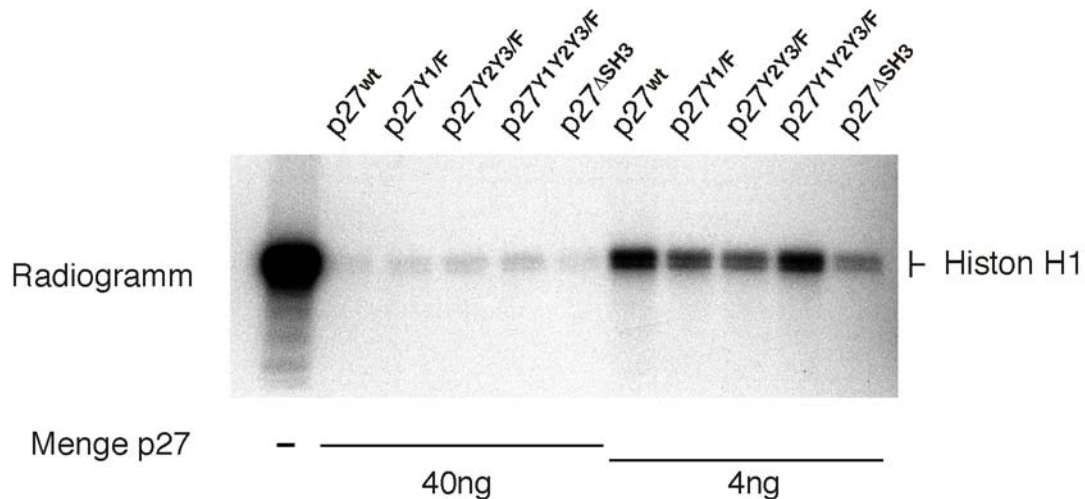


Abbildung 4.29: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von p27^{wt}, p27^{ΔSH3} und verschiedenen Tyrosinaustauschmutanten von p27.

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der Proteine wurde ein Histon H1-Kinaseassay mit aktivem, rekombinanten CDK2/Cyclin A aus Insektenzellen durchgeführt. Die Inhibitorproteine p27^{wt}, p27^{ΔSH3}, p27^{Y1/F}, p27^{Y2Y3/F} und p27^{Y1Y2Y3/F} wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die Menge der Proteine wurde über Coomassieanfärbung nach SDS-PAGE-Auftrennung abgeglichen. Mit jeweils gleichen Ausgangsmengen wurde eine Titration durchgeführt. Die Aktivität der getesteten Inhibitoren wird dabei über die Inkorporation von [γ -³²P]ATP in das CDK2/Cyclin A-Substrat Histon H1 ermittelt. Die inhibitorische Aktivität von p27 ist gekennzeichnet durch die Inaktivierung der CDK2/Cyclin A-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Die Titration wurde mit je zwei verschiedenen Mengen des jeweiligen Inhibitors (40 ng und 4 ng), bei konstanten Mengen Kinase und Substrat durchgeführt. Als Kontrolle der Aktivität der Kinase diente eine Reaktion ohne Inhibitor (-). Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Gels der über SDS-PAGE aufgetrennten Kinasereaktionen.

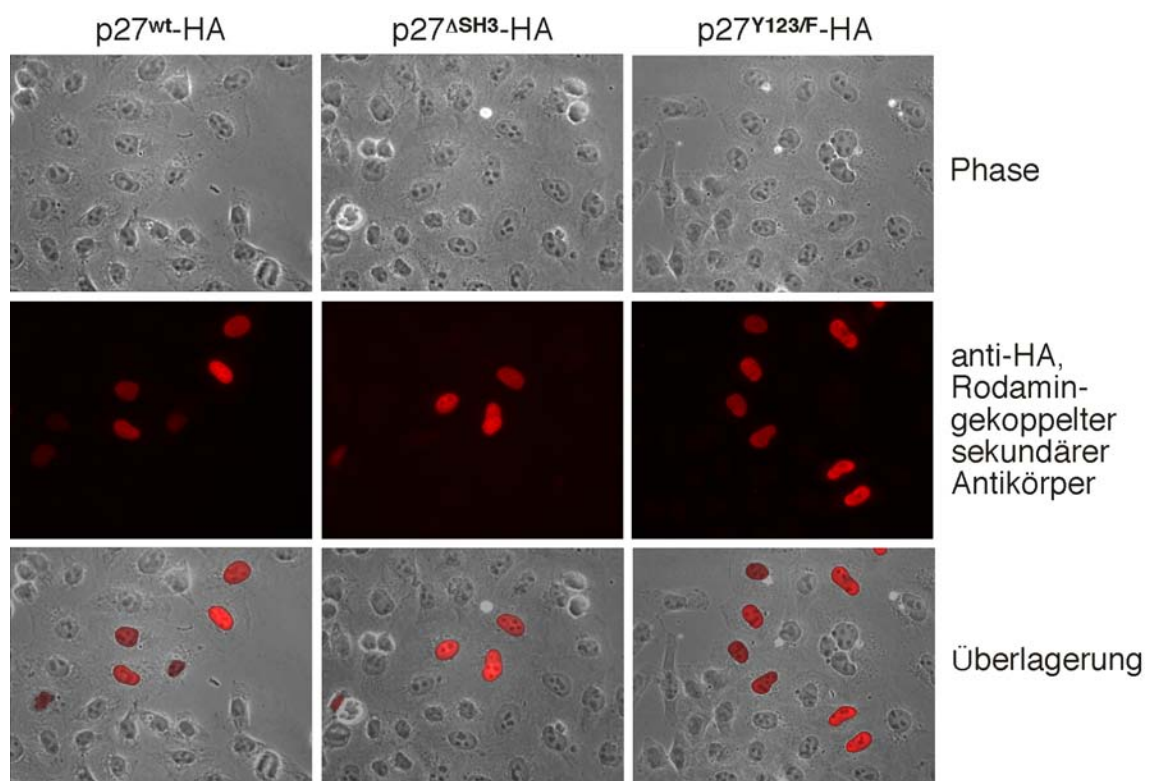


Abbildung 4.30: Untersuchung zur zellulären Lokalisation von p27^{wt}, p27^{ΔSH3} und p27^{Y123/F}.

HA-Fusionskonstrukte von p27^{ΔSH3}, p27^{Y123/F} und p27^{wt} wurden in adhärenente HeLa-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen immunozytologisch mit einem HA-spezifischen Antikörper angefärbt und die Lokalisation von überexprimiertem p27 im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Gezeigt ist die Phasenkontrastaufnahme (oben), der Fluoreszenzkanal (mitte) und die Überlagerung dieser beiden Kanäle für den jeweiligen Inhibitor (unten).

5 Diskussion

5.1 Identifikation neuer Interaktionspartner von p27

Die zelluläre Menge des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} spielt eine entscheidende Rolle für den Übergang der Zelle von der G₁- zur S-Phase. Faktoren, die die Menge oder Aktivität des Inhibitors p27 regulieren, sind damit von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Zellzykluskontrolle.

In dieser Arbeit wurde eine biochemische Methode zur systematischen Identifikation von mit p27 wechselwirkenden Proteinen erarbeitet. Es sollten damit insbesondere Interaktionspartner von p27 identifiziert werden, die unabhängig von den bekannten CDKs und Cyclinen an p27 binden können. Mit rekombinantem p27^{wt} und einer Cyclin- und CDK-bindungsdefizienten Form von p27 (p27^{ΔCKI}) wurde in einem biochemischen Interaktionsexperiment („pull-down“) versucht, Interaktionspartner dieser beiden Proteine aus HeLa-Zellextrakt zu isolieren. Durch die hohe Menge des als „Köder“ eingesetzten rekombinanten p27 sollten möglichst viele spezifisch mit p27 assoziierten Faktoren identifiziert werden. Ähnliche Versuche, p27-Bindepartner systematisch zu identifizieren wurden, parallel zu dieser Arbeit, auch in anderen Arbeitsgruppen unternommen. Dabei wurde das Hefe „Two-Hybrid“ zur Identifikation neuer Bindungspartner von p27 eingesetzt (Muller *et al.*, 2000; Sugiyama *et al.*, 2001; Tomoda *et al.*, 1999). In diesen Arbeiten wurden meist verkürzte Formen von p27 zur Identifikation neuer Bindungspartner eingesetzt (Sugiyama *et al.*, 2001; Tomoda *et al.*, 1999). Das Nachweisverfahren mit rekombinanten Proteinen bietet den Vorteil, Interaktionen zwischen Proteinen rasch und direkt zu testen. Ein Nachteil des Systems liegt demgegenüber in der zur Identifikation benötigten Menge eines interagierenden Proteins. Zur Identifikation eines Proteins über Massenspektrometrie oder Peptidsequenzierung werden Mengen benötigt, die im Bereich von 50 bis 200 ng Protein liegen. Sehr seltene Faktoren, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, können mit diesem System nicht, oder nur durch Einsatz sehr großer Mengen Zellextrakt identifiziert werden. Auch transient mit p27 interagierende Proteine lassen sich mit dieser Methode nur schwer feststellen. Ein Beispiel hierfür wären Kinasen, wie die Kinase hKIS, die p27 an Serin 10 phosphoryliert (Boehm *et al.*, 2002). Interaktionspartner, die eine initiale Modifikation von p27 zur Interaktion mit dem Inhibitor voraussetzen, könnten durch das gewählte biochemische System ebenfalls

nicht erreicht werden, es seien, die zur Interaktion benötigten Modifikationen finden auch im Zellextrakt statt. Ein Beispiel für phosphorylierungsabhängig an p27 bindende Proteine wäre der SCF^{SKP2}-Komplex, eine E3-Ligase der Ubiquitinierungsmaschinerie die p27 in Abhängigkeit einer Phosphorylierung an Threonin 187 zu binden vermag (Krek, 1998; Montagnoli *et al.*, 1999).

Mit dem in dieser Arbeit eingesetzten biochemischen „pull-down“-Verfahren ließen sich für p27^{wt} die erwarteten Cycline und CDKs identifizieren. Insbesondere im Vergleich mit der CDK-bindungsdefizienten Mutante p27^{ΔCKI} konnten daneben eine Reihe neuer Interaktionspartner von p27 identifiziert werden, die unabhängig von den CDK/Cyclin-Bindestellen an p27 binden können. Die identifizierten Proteine umfaßten dabei eine Gruppe von vier Hitze-Schockproteinen (Grp78, Hsc70/Hsp70 und Hspc017), die beiden potentiellen E3-Ubiquitinligase-Komponenten p19^{SKP1} und FBX3 und ein Adapterprotein der Signaltransduktion (Grb2). Die vor Beginn dieser Arbeit bekannten Interaktionspartner von p27, das 12s- und 13s-Protein des Adenovirus E1A (Alevizopoulos *et al.*, 1998; Mal *et al.*, 1996) konnten nicht erhalten werden, da in dem eingesetzten Identifikationsverfahren HeLa-Zellen als Ausgangsmaterial eingesetzt wurden. Diese sind nicht mit Adenoviren transfiziert und enthalten dementsprechend nicht das E1A-12s und -13s-Protein. Beide Proteine führen *in vivo* zu einer Deaktivierung des Inhibitors durch die Wechselwirkung des viralen Proteins mit der inhibitorisch wirksamen, N-terminalen Domäne von p27. Auch das, im Verlauf dieser Arbeit von Tomoda *et al.* (1999) als Interaktionspartner von p27 identifizierte Jab1 konnte mit der angewandten Methode nicht detektiert werden. Allerdings konnten Tomoda *et al.* (1999) nur mit einer verkürzten Form von p27 (AS 1-186) eine Interaktion mit Jab1 nachweisen. Jab1 wurde ursprünglich als Koaktivator des Transkriptionsfaktors c-jun (Claret *et al.*, 1996) und darüberhinaus auch als Bestandteil des COP9-Signalsomplexes (Chamovitz and Segal, 2001; Wei *et al.*, 1998) identifiziert. Die Bindung von transient überexprimiertem Jab1 an p27 verursacht eine Translokation von p27 vom Nukleus ins Zytoplasma. Dies führt zu einer Verstärkung des Abbaus von p27 in Säugerzellen (Tomoda *et al.*, 2002). Als Koaktivator und Transkriptionsfaktor könnte Jab1 in HeLa-Zellen möglicherweise in zu geringen Mengen vorliegen, um über ein biochemisches Nachweisverfahren ermittelt zu werden. In dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Charakterisierung der im biochemischen „pull-down“ als Interaktionspartner von p27 identifizierten Proteine gelegt.

5.1.1 Die Wechselwirkung von p27 mit Hitzeschockproteinen (Chaperonen)

Von den mit p27 interagierenden Hitzeschockproteinen Grp78, Hsc70/Hsp70 und Hsc70/Hsp70 wurde nur Hsc70/Hsp70 näher untersucht. Für die beiden anderen Chaperone (Grp78 und Hsc70/Hsp70) lagen im Zeitraum dieser Arbeit keine Antikörper vor. Immunopräzipitationsuntersuchungen mit Hsc70/Hsp70 ergaben für diese Proteine keine direkte Bindung an p27 *in vivo*. Zumindest konnte keine Assoziation von Hsc70/Hsp70 an p27 in asynchronen HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise assoziieren Chaperone nur an p27, wenn dieses ungebunden vorliegt. Dies trifft jedoch nur auf einige spezielle Zelllinien (Polyak *et al.*, 1994a; Slingerland *et al.*, 1994) oder auf die engen Zeitfenster der *de novo* Proteinsynthese und den Abbau von p27 zu. p27 liegt demgegenüber zu allen anderen Zeitpunkten ausschließlich in CDK-gebundener Form vor (Hengst *et al.*, 1994; Steiner *et al.*, 1995). Da p27 in ungebundenem Zustand wahrscheinlich ähnlich wie p21 (Kriwacki *et al.*, 1996; Kriwacki *et al.*, 1997) ohne definierte Struktur vorliegt, könnten Chaperone das frisch synthetisierte p27 binden und es dadurch bis zu einer möglichen Übergabe an die Zellzykluskinasen vor dessen Abbau schützen. Sie würden damit für p27 ihre klassische Funktion als Chaperone wahrnehmen (Hartl, 1996). Neben dieser Funktion als Chaperon, wurde für verschiedene Hitzeschockproteine für *in vivo* ungefaltete vorliegende Proteine ein eigener Abbauweg vorgeschlagen. Chaperone oder Kofaktoren der Chaperone wie Bag1 oder die Chaperon-assoziierte Ubiquitin-Ligase CHIP sollen dabei die unstrukturierten Proteine erkennen und diese durch Ubiquitinierung für deren Abbau markieren (Hohfeld *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001). Die im biochemischen Ansatz gefundenen Interaktionen dürften allerdings auf die klassische Chaperon-Funktion der Hitzeschockproteine zurückzuführen sein: Ungefaltetes, rekombinant in *E. coli* exprimiertes p27 wird möglicherweise von diversen Hitzeschockproteinen als Zielprotein erkannt. Die Chaperone versuchen, das immobilisierte „Köder“-Protein zu falten oder zu stabilisieren. *In vivo* käme ihnen jedoch in diesem Fall keine Rolle für die Regulation von p27 zu.

Demgegenüber konnte in Hefe wie auch in Säugerzellen für eine Reihe von Schlüsselproteinen der Zellzyklusregulation (CDK4, Wee-1, p53, pRb) eine Assoziation mit Chaperonen der Hsp70- und Hsp90-Familie gezeigt werden (zusammengefaßt in Helmbrecht *et al.*, 2000). Auch für p27 wird eine Wechselwirkung mit 73hsc (heat

shock cognate protein), einem Mitglied der Hsp70 Familie, diskutiert (Nakamura *et al.*, 1999). p27 interagiert während des G₁/S-Phasenübertritts spezifisch mit 73hsc. Inwieweit dieser Interaktion eine Funktion bei der Stabilisierung von p27 oder bei der Modulation der in der Zelle vorhandenen Gesamtmenge und Aktivität von p27 zukommt ist bisher nicht untersucht. Im hier durchgeführten Identifikationsverfahren konnte in HeLa-Zellen keine Assoziation von p27 mit 73hsc gezeigt werden. Möglicherweise beschränkt sich eine derartige Interaktion auf die von Nakamura *et al.* (2000) benutzten, wachstumsstimulierten FRTL-5 Ratten-Schilddrüsen-Zellen oder ist in anderen Zelllinien sehr instabil.

5.1.2 FBX3 - eine neue, für p27 spezifische E3-Ligase?

Mit p19^{SKP1} und dem neu charakterisierten F-Box-Protein FBX3 wurden zwei Proteine identifiziert, die in den Ubiquitin-abhängigen Abbau von p27 involviert sein könnten. p19^{SKP1} bildet mit Cullin1 und p45^{SKP2} den Kernkomplex einer E3-Ligase. Dieser sogenannte SCF^{SKP2}-Komplex markiert p27 durch Ubiquitinierung für dessen Abbau durch das 26S Proteasom (Krek, 1998; Montagnoli *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995). Mit p19^{SKP1} wurde ein essentieller Bestandteil des klassischen SCF^{SKP2}-Komplexes im biochemischen Analyseverfahren für p27 identifiziert. Weitere Komplexbestandteile, insbesondere das spezifisch in Abhängigkeit einer Phosphorylierung an Threonin 187 an p27 bindende Cullin1 oder p45^{SKP2} konnten weder mittels Massenspektrometrie noch mit Hilfe von Westernblot-Analysen identifiziert werden. Dagegen konnte eine Interaktion von p27 mit FBX3, einem neuen F-Box-Protein, gezeigt werden. Es wäre möglich, daß das, im SCF^{SKP2}-Komplex für die spezifische Erkennung von p27 zuständige F-Boxprotein p45^{SKP2}, durch FBX3 ersetzt wird.

Für p27 ist dessen Abbau in der späten G₁, der S-Phase und der G₂-Phase über die Threonin 187- vermittelte Phosphorylierung beschrieben (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1997; Montagnoli *et al.*, 1999). Für die frühe G₁-Phase wird auch eine, von einer vorgeschalteten Phosphorylierung an Threonin 187 unabhängige, aber ebenfalls SCF^{SKP2}-abhängige Ubiquitinierung diskutiert (Malek *et al.*, 2001). Auch ein SCF^{SKP2}-unabhängiger proteasomaler Abbauweg am G₀/G₁-Phasenübergang in Lymphozyten wurde für p27 beschrieben (Hara *et al.*, 2001). Nach neueren Ergebnissen handelt es sich bei p27 um ein durch diverse Phosphorylierungen stark modifiziertes und reguliertes Protein. So wurde zum Beispiel eine Phosphorylierung von p27 an Serin 10 durch hKIS beschrieben. Diese Modifikation von p27 reguliert die zytoplasmatische

Lokalisation von p27 (Boehm *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Serin 10 führt zu einer Stabilisierung von p27 (Ishida *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2001). Auch die in der vorliegenden Arbeit gefundene Phosphorylierung von p27 an Tyrosin nimmt Einfluß auf die Stabilität von p27 (diese Arbeit, 4.5.9). p27 liegt in wenigen Zelltypen als prädominant ungebundener Inhibitor vor (Polyak *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994). Die zelluläre Menge dieser verschiedenen Formen von p27 könnte durch spezifische E3-Ligase-Komplexe reguliert werden. Es wäre denkbar, daß p27 phasen- oder modifikationsabhängig durch jeweils unterschiedliche E3-Ligasen abgebaut wird. Diese Ligasen könnten aus gemeinsamen Grundbausteinen wie p19^{SKP1} oder einem Cullin (Cullin1-3) aufgebaut sein. Die spezifische Substraterkennung würde durch jeweils unterschiedliche F-Box- und Adapterproteine vermittelt werden. Ein SCF^{FBX3}-Ligasekomplex wäre somit ein idealer Kandidat für den Abbau von freiem unmodifiziertem p27, wie es im biochemischen „pull-down“ eingesetzt wurde. Nähere Untersuchungen zur Funktion von FBX3 zeigten jedoch, daß FBX3 mit allen untersuchten rekombinanten Proteinen interagieren konnte. Möglicherweise interagiert FBX3 unspezifisch über ionische Wechselwirkungen mit dem stark geladenen Histidin-„tag“ des, zur Identifizierung im „pull-down“ eingesetzten, „Köder“-p27. Die nachfolgenden Untersuchungen mit sieben Histidin-fusionierten Kontrollproteinen zur Ermittlung der Spezifität der Bindung p27-FBX3 bestätigt diese Annahme. Ein Versuch mit *in-vitro*-translatiertem, „ungetagtem“ p27 erbrachte keine Interaktion mit FBX3. Dies spricht für eine unspezifische Bindung von p27 mit FBX3. Die im biochemischen Ansatz gefundene Interaktion p27-FBX3 stellt demnach sehr wahrscheinlich eine artifizielle Interaktion ohne Relevanz für den Abbau von p27 *in vivo* dar. Eine Erklärungsmöglichkeit der Interaktion aller getesteten, rekombinant hergestellten Substratproteine mit FBX3 wäre eine E3-Ligasefunktion von FBX3, die falsch gefaltete oder unstrukturierte Proteine erkennt und diese dem Abbau zuführt. Das würde auch erklären, weshalb FBX3 alle getesteten Proteine bindet, das *in vitro*-translatierte p27 aber nicht erkannt wurde. Um endgültig eine E3-Ligaseaktivität von FBX3 für p27 abzuklären, könnten transiente Überexpressionen von FBX3 und von p27 in adhärennten HeLa-Zellen durchgeführt werden. Mit den transfizierten Zellen könnte die Halbwertszeit von p27 bestimmt werden. Dies würde zeigen, ob freies p27 in Abhängigkeit von FBX3 verstärkt abgebaut würde.

Dagegen interagiert FBX3 eindeutig mit p19^{SKP1}. Diese Interaktion legt nahe, daß es sich bei FBX3 um eine Komponente einer neuen E3-Ligase handeln könnte. Weitere

Bestandteile dieses Komplexes zu identifizieren, sowie Funktion und Substrate dieser neuen Ligase zu untersuchen, war nicht Ziel dieser Arbeit.

5.1.3 Eine Verbindung zwischen Zellzyklus und Signaltransduktion

5.1.3.1 Die Interaktion zwischen p27 und Grb2

Ein weiteres, im biochemischen Verfahren identifiziertes Protein, war Grb2, ein Adaptermolekül der Signaltransduktion. Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ist ein 217 Aminosäuren großes Adapterprotein mit einer von zwei SH3-Domänen flankierten zentralen SH2-Domäne. Grb2 bindet als Adapterprotein zum einen über seine SH2-Domäne an tyrosinphosphorylierte Proteine, wie die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren (EGFRs und PDGFRs: Lowenstein *et al.*, 1992; van der Geer and Hunter, 1993). Zum anderen interagiert Grb2 über seine beiden SH3-Domänen mit kurzen Prolin-reichen Regionen in Protein-Liganden (Kohda *et al.*, 1994). So interagiert Grb2 mit der carboxyterminalen Region des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Sos (Son of sevenless), einem Aktivator von Ras (Li *et al.*, 1993; Rozakis-Adcock *et al.*, 1993). Grb2 verbindet damit rezeptorvermittelte Tyrosinkinaseaktivierung mit der Ras-Signaltransduktionskaskade (Baltensperger *et al.*, 1993; Gale *et al.*, 1993).

Eine Interaktion von p27 mit Grb2 wäre von besonderem Interesse, weil damit eine direkte Wechselwirkung eines in der Signalübermittlung angesiedelten Proteins mit einem Schlüsselregulator der Zellzykluskontrolle gezeigt werden könnte. Diese Interaktion könnte möglicherweise erklären, wie die Signalweitergabe nach mitogener Stimulation der Zelle direkten Einfluß auf die Zellteilung nehmen kann.

In weiterführenden Untersuchungen zur Interaktion von p27 mit Grb2 konnte gezeigt werden, daß Grb2 in einem Prolin-reichen Bereich, kurz hinter der CDK-Bindedomäne des Inhibitors, an p27 bindet. Diese Bindestelle konnte auf p27 eingeschränkt werden, p21 und p57 binden nicht an Grb2. Für die Interaktion mit Grb2 sind zwei Proline (P94, P95) und ein Lysin (K96) essentiell. Es konnte gezeigt werden, daß Grb2 über seine C-terminale SH3-Domäne an p27 bindet. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Resultaten von Sugiyama *et al.* (2001), die Grb2 parallel zu dieser Arbeit in einem „Two-Hybrid“-Screen als Interaktionspartner von p27 identifiziert hatten. Die Bindung von p27 an Grb2 konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Sugiyama und Mitarbeiter

konnten dagegen durch Koexpression von Jab1, einem Koaktivator von c-jun und Bestandteil des COP9-Signalosoms, eine Lokalisationsänderung von p27 und damit eine *in vivo*-Wechselwirkung mit Grb2 erreichen. Durch Transfektion einer im Zytoplasma mißlokalisierenden Variante von p27 wurde ebenfalls eine Interaktion mit Grb2 erhalten. Auch mit Grb3-3, einer alternativen Spleißform von Grb2, der Teile der zentralen SH2-Domäne fehlen, wurde von Sugiyama *et al.* (2001) bei Überexpression beider Interaktionspartner in Säugerzellen eine Interaktion nachgewiesen. Von Sugiyama *et al.* (2001) und in dieser Arbeit durchgeführte Interaktionsstudien mit endogenen Proteinmengen führte dagegen zu keinem Interaktionsnachweis. Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koimmunopräzipitationen mit in verschiedenen Zellzyklusphasen arretierten Zellen zeigten keinen Hinweis auf eine Interaktion von p27 und Grb2. Das legt nahe, daß nur überexprimiertes, zytoplasmatisches oder speziell modifiziertes p27 mit Grb2 wechselwirken kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunozytologischen Experimente zeigten sowohl für überexprimiertes, wie auch für endogenes Grb2 eine Kolokalisation von Grb2 und p27 im Kern. Zudem führte die Kotransfektion von p27 zu einer Anreicherung einer Fraktion von Grb2 im Kern. Diese Anreicherung ließ sich eindeutig auf sekundäre Effekte zurückführen: Die Transfektion einer Grb2-bindungsdefizienten Form von p27 oder p21 verursachten einen Arrest in der G₁-Phase, der ebenfalls zur Akkumulation von Grb2 im Kern führte. Eine vergleichbare Lokalisationsänderung von Grb2 wurde in einer Untersuchung zur Lokalisation von Grb2 in Brustkrebsgewebe im Vergleich zu normalem Brustgewebe beobachtet (Verbeek *et al.*, 1997). Dabei zeigt sich, daß in normalem Patientengewebe 70% der gesamten Grb2-Menge im Zytoplasma zu finden ist und nur etwa 30% im Kern. Dagegen steigt die Menge an nukleärem Grb2 in den untersuchten neoplastischen Geweben auf 58% an. Würde eine Interaktion von p27 und Grb2 ausschließlich von einer Kolokalisation beider Proteine abhängen, würde man annehmen, daß die Interaktion auch im Kern stattfinden kann.

p27 kann Grb2 nicht binden, wenn p27, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, als CDK/Cyclin-gebundenes Protein vorliegt. Der CDK/Cyclin-Komplex verdrängt auch Grb2 aus seiner Bindung mit p27. Grb2 ist demzufolge *in vitro* nicht in der Lage, die Aktivität des Inhibitors zu modulieren. Eine Wechselwirkung p27-Grb2 scheint damit nur bei freiem, ungebundenem p27 im Zytoplasma möglich zu sein. Eine Überexpression von p27 und Grb2 in Säugerzellen, bei der beide Proteine vermutlich auch im ungebundenen Zustand vorliegen, führte ebenfalls nicht zu einem

Interaktionsnachweis. Möglicherweise müssen Grb2 oder auch p27 durch eine vorangehende postranslationale Modifikation oder Demodifikation verändert werden, um miteinander wechselwirken zu können. Da p27 im „pull-down“-Experiment unmodifiziert vorlag, ist anzunehmen, daß p27 keine postranslationale Modifikation zur Interaktion mit Grb2 benötigt. Man könnte sich vorstellen, daß Grb2 durch eine Stimulation der Signaltransduktionskaskade eine spezifische Modifikation erfährt, die es in die Lage versetzt nun p27 zu binden. So wurde eine Phosphorylierung von Grb2 in seiner C-terminalen SH3-Domäne beschrieben, die die Interaktion mit den Protein-Liganden des Adapters beeinflusst. Die Phosphorylierung von Grb2 wird durch die Bindung der Tyrosinkinase Abl an die SH2-Domäne von Grb2 initiiert (Li *et al.*, 2001). Das modifizierte Grb2 könnte so anschließend an Faktoren der Membran oder des Zytoplasmas binden und dort zurückgehalten werden. Eine Wechselwirkung p27-Grb2 könnte zum Beispiel nur mit ungebundenem, zytoplasmatischem p27 nach vorangegangener, stimulationsabhängiger Aktivierung von Grb2 stattfinden.

Die Funktion einer Interaktion zwischen Grb2 und p27 im Zytoplasma könnte die Stabilität von p27 beeinflussen. So konnten Sugiyama und Mitarbeiter (2001) durch Kotransfektion mit Jab1 neben der erwähnten Lokalisationsänderung von p27 auch eine Verstärkung des Abbaus von mit Jab1 und Grb2 kotransfiziertem p27 feststellen. Im Gegensatz dazu schien allerdings die Kotransfektion von Jab1 und der Isoform von Grb2, Grb3-3, p27 zu stabilisieren (Sugiyama *et al.*, 2001). Das bestärkt die bereits diskutierte Möglichkeit, daß die zentrale, der Grb3-3-Isoform fehlende, SH2-Domäne eine wichtige Rolle bei der geregelten Bindung von Grb2 an p27 spielt. So könnten die durch eine vorangegangene Phosphorylierung modifizierten und aktivierten Domänen von Grb2 Faktoren binden, die für zytoplasmatische Lokalisation von modifiziertem Grb2 ausschlaggebend sind. Die Effizienz des Grb2- bzw. Jab1-vermittelten Abbaus von p27 hinge damit möglicherweise wiederum von der vorangegangenen Modifikation und Lokalisation des Adaptermoleküls Grb2 ab.

Neben der Beeinflussung des Inhibitors p27 durch Grb2 wäre auf der anderen Seite eine Modulation der Aktivität des Adapters Grb2 durch p27 denkbar. Grb2 bindet die meisten seiner Protein-Liganden über seine, die zentrale SH2-Domäne flankierenden, SH3-Domänen (Koda *et al.*, 1994). Die Assoziation von p27 an die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 ist somit eine Möglichkeit, die potentielle Weitergabe eines Signals der Signaltransduktionskaskade zu unterbrechen. p27 wäre damit ein

Regulationsschalter, der in einem direkten Rückkoppelungsmechanismus Einfluß auf die Signalweitergabe nehmen könnte. Diese Regulation könnte zum Beispiel durch die Blockierung der Wechselwirkung von Grb2 mit Sos verursacht werden. Grb2 bindet Sos ebenfalls über seine C-terminale SH3-Domäne. Die Konkurrenz zwischen p27 und Sos um diese SH3-Domäne von Grb2 würde die Grb2-vermittelte Assoziation von Sos und Ras verhindern. Ras könnte nicht mehr aktiviert werden und es käme somit keine Signalantwort der Ras-Kaskade zustande.

Weiterhin könnte auch der geregelte Import von p27 in den Kern von einer Bindung an Grb2 betroffen sein. So konnten Müller *et al.* (2000) zeigen, daß NPAP60, ein kernporenassoziiertes Protein an p27 bindet. Diese Interaktion beeinflusst die Lokalisation von p27. Die Bindung von NPAP60 findet im 3_{10} -Helixmotiv des Inhibitors an Arginin 90 statt. Die Bindung von Grb2 in dieser Region von p27 (Bindedomäne Aminosäuren 90-96) könnte zu einer Konkurrenz des Kernporenproteins mit dem Adaptermolekül Grb2 führen. Eine Blockade des NPAP60-vermittelten Imports von p27 durch Grb2 könnte so ebenfalls Auswirkungen auf Lokalisation und Aktivität des Inhibitors haben.

Die Region zwischen Aminosäure 90 und 151 in p27 ist, neben den bekannten Bindestellen für Cycline und CDKs, die Region mit der höchsten Dichte an mit p27 wechselwirkenden Proteinen. Dieser Bereich könnte für die Regulation des Inhibitors eine entscheidende Rolle spielen: Das kernassoziierte Protein NPAP60 interagiert über Arginin 90 mit p27 und beeinflusst dessen Import in den Nukleus. Jab1/CSN5, als Adapter zwischen p27 und den Crm1-abhängigen Export des Inhibitors aus dem Kern (Tomoda *et al.*, 2002) bindet in einer Region von Aminosäure 97 bis 151. Grb2 interagiert über seine SH3-Domäne (Aminosäuren 90-96) mit p27. Welche Auswirkungen und auch gegenseitige Wechselwirkungen dieser Protein-Protein-Interaktionen sich daraus für die Regulation von p27 ergeben, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

5.1.3.2 Die Interaktion von p27 mit Grf40 und Lyn

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Analyse der Interaktion von Grb2 und p27 *in vivo* wurde eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen, weshalb p27 *in vivo* nicht mit endogenem Grb2 assoziiert vorliegen könnte. Zum Beispiel könnte ein weiteres Protein über eine SH3-Domäne mit p27 interagieren. Grb2 ist in Säugerzellen ein sehr häufiges Protein und könnte ein selten vorkommendes Protein aus seiner Bindung mit p27

verdrängen. Daneben liegen die meisten SH3-Domänenproteine der Signaltransduktion in sehr geringen Mengen in der Zelle vor. Diese Proteine, wie z.B. Tyrosinkinase, können mit der Methode wie dem gewählten „pull-down“-Verfahren, nur mit großen Mengen Ausgangsmaterial identifiziert werden. Viele Adapter und Kinasen der Signaltransduktion liegen meist gewebsspezifisch vor oder werden nur in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung exprimiert. Das eingesetzte HeLa-Zellmaterial beinhaltet so nur ein unvollständiges Spektrum an potentiell mit p27 interagierenden SH3-Domänenproteinen. In einem weiteren, systematischen Interaktionsexperiment wurden deshalb 41 isolierte SH3-Domänen auf ihre Fähigkeit hin getestet, an p27 zu binden. Neben der, als Positivkontrolle eingesetzten C-terminalen SH3-Domäne von Grb2, bindet nur die C-terminale SH3-Domäne von Grf40 (Grb2 family member of 40 kDa) und die singuläre SH3-Domäne der Tyrosinkinase Lyn an p27.

Grf40 (Synonym Grap-2, Mona) besitzt, wie Grb2 selbst, eine zentrale SH2-Domäne und zwei SH3-Domänen (Asada *et al.*, 1999 und Abbildung 5.1). Das 322 Aminosäuren große Grf40 besitzt, im Anschluß an die SH2-Domäne eine für Grf40 spezifische Prolin-reiche Region (Bourette *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998). Grf40 fungiert, ähnlich wie Grb2, ausschließlich als Adapterprotein bei der Signalübermittlung der Signaltransduktion. Grf40 weist, insbesondere in Bezug auf seine SH2- und SH3-Domänen, eine 49%-ige Aminosäurehomologie mit Grb2 auf. Diese Übereinstimmungen zwischen Grf40 und Grb2 lassen vermuten, daß beide Moleküle eine ähnliche Funktion wahrnehmen können. Demgegenüber ist die Expression von Grf40, im Gegensatz zur ubiquitären Expression von Grb2 (Lowenstein *et al.*, 1992), auf zwei hämatopoetische Gewebe, die Milz und auf die Monozyten des Blutes, beschränkt. Die Expression von Grf40 wird rasch während der Monozyten-Differenzierung, nach Stimulation durch M-CSF (Macrophage Colony-Stimulation Factor) induziert (Bourette *et al.*, 1998). Möglicherweise erfüllt die Interaktion p27-Grb2 oder p27-Grf40 in unterschiedlichen Geweben eine ähnliche oder identische Funktion. Grb2 wird demgegenüber in allen Geweben, auch in Monozyten und der Milz, exprimiert (Lowenstein *et al.*, 1992). Dies könnte dort zu einer Konkurrenz der beiden Adapterproteine um Bindungspartner führen. Möglicherweise spielt in hämatopoetischen Geweben nur die Wechselwirkung von Grf40 mit p27 eine Rolle. Grf40 könnte dort über seine, unter SH3-Adapterproteinen einzigartige Prolin-reiche Region mit Faktoren wechselwirken, die von Grb2 nicht erreicht werden. Eine Funktion

dieser Interaktion könnte zum Beispiel in der Regulation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen liegen.

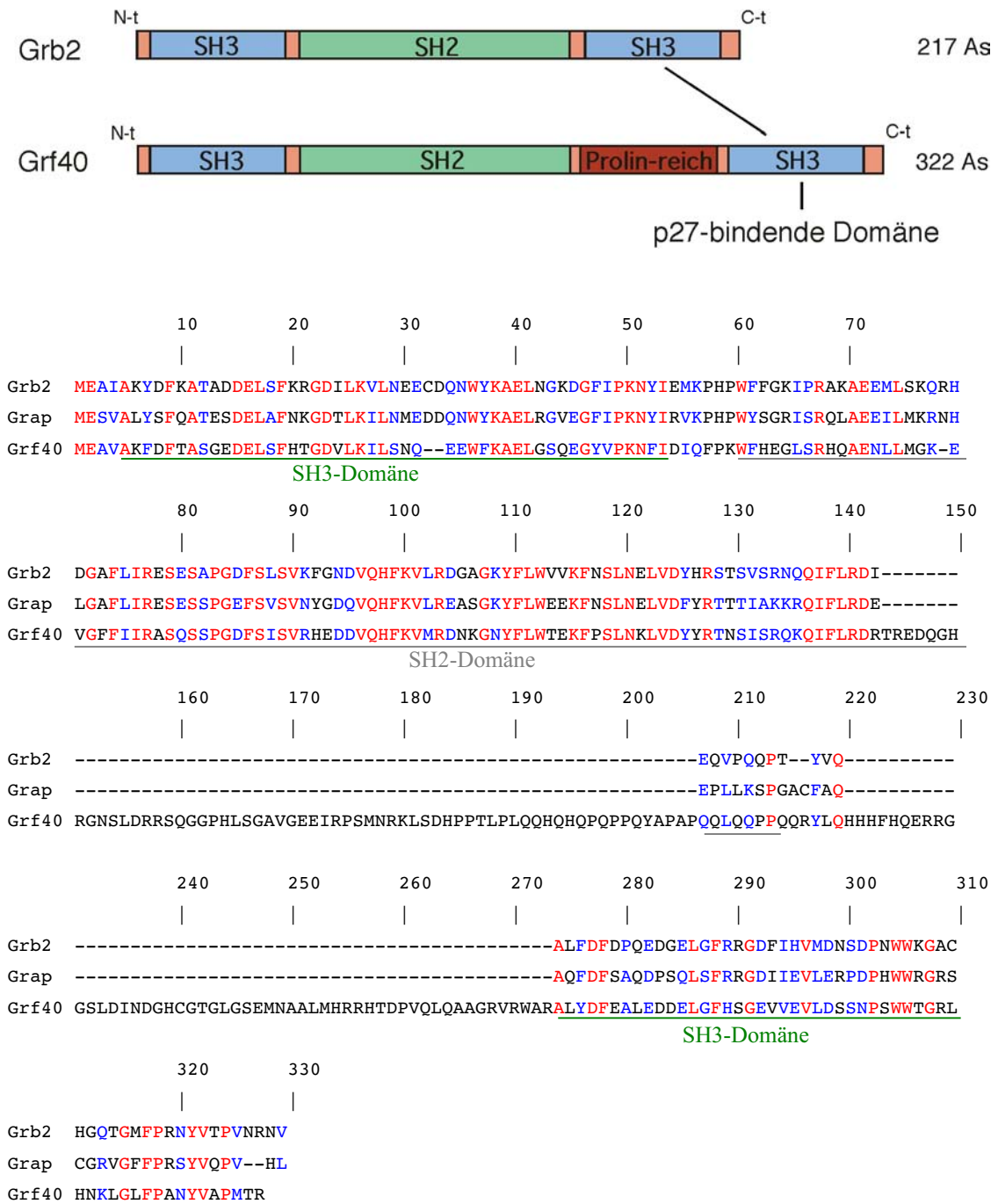


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der beiden Adapterproteine Grb2 und Grf40 und ein Sequenzvergleich der drei eng verwandten humanen Adapterproteine Grb2, Grap und Grf40. Identische Aminosäuren sind rot, konservative Aminosäureaustausche blau dargestellt. Die Domänen der Adapterproteine sind unterstrichen, grün die beiden SH3-Domänen und grau die zentrale SH2-Domäne.

In Oligodendrozyten, dem Modellsystem für den Einfluß von p27 auf die Differenzierung von Vertebratenzellen, wird eine Rolle für p27 als Taktgeber für die Differenzierung diskutiert (Durand *et al.*, 1997). Vorläuferzellen von Vertebraten teilen sich nach einem festgelegten Plan, bevor sie ihre Proliferationsphase einstellen und sich zu differenzieren beginnen. Bei der Entscheidung dieser Stammzellen, von der Teilungs- zur Differenzierungsphase überzugehen, scheint die Menge von p27 eine entscheidende Rolle zu spielen. So akkumuliert die Menge von p27 von Teilung zu Teilung und erreicht in ausdifferenzierten Oligodendrozyten das Maximum. Auch die gesteigerte Zellzahl in p27^{-/-} Mäusen pro Tier oder Organ deutet auf eine generelle Rolle des Inhibitors bei der Regulation der Entwicklung und Zelldifferenzierung hin (Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Eine ähnliche Funktion als Taktgeber für die Differenzierung könnte p27 bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Monozyten spielen. Die Interaktion Grf40-p27 könnte dabei zur Vermittlung externer Signale auf dieses System dienen. So zeigen Studien, daß Behandlung von Zellen mit Decorin, einem kleinen Proteoglykan der extrazellulären Matrix von Säugerzellen, die M-CSF (Makrophage Colony-Stimulating Factor) abhängige Proliferation der Zellen blockiert und zu einem G₁-Phasenarrest führt. Dieser Arrest wird durch die Induktion von p27 hervorgerufen (Xaus *et al.*, 2001). Die Expression von Grf40 wird durch M-CSF induziert (Bourette *et al.*, 1998). Das durch M-CSF hochregulierte Grf40 könnte als Antwort auf mitogene Stimuli p27 binden und dadurch in Monozyten die Signalweitergabe in die Zellzyklus- bzw. Differenzierungskontrolle integrieren.

Die Interaktion von p27 mit Grf40 konnte bis jetzt nur *in vitro* mit der isolierten C-terminalen SH3-Domäne von Grf40 gezeigt werden. Der nächste Schritt wäre, diese Interaktion auch *in vivo* zu bestätigen. In weiterführenden Experimenten könnte dann im hämatopoetischen Zellsystem ermittelt werden, ob der Interaktion p27-Grf40 tatsächlich eine Funktion bei der Monozytendifferenzierung zukommt.

Ein weiteres im „pull-down“ identifiziertes Protein war die Tyrosinkinase Lyn. Lyn gehört zu den „nicht-Rezeptor“-Tyrosinkinasen der Src-Familie und besitzt, wie Src selbst neben einer sogenannten C-terminalen „unique region“, eine SH3-, eine SH2- und eine Kinasedomäne. Auch Lyn wird, ähnlich wie Grf40, vor allem in hämatopoetischen Geweben exprimiert (zusammengefaßt in Hibbs and Dunn, 1997). Die Aktivierung der Kinase findet in der späten G₁-Phase statt (Mou and Linnekin, 1999). Eine deregulierte Aktivität der Tyrosinkinase stellt eine der Hauptursachen chronischer myeloischer Leukämien dar (Harder *et al.*, 2001; Roginskaya *et al.*, 1999). Mit Grf40 und Lyn

wurden zwei Proteine identifiziert, die p27 mit einer spezifischen Funktion in hämatopoetischen Zellen verbinden könnten. Inwieweit die Interaktion zwischen Lyn und p27 eine Funktion in der Differenzierung oder bei der Aktivierung von Monozyten spielt, muß noch geklärt werden.

In einem ersten Schritt wurde die Interaktion zwischen Lyn und p27 *in vivo* bestätigt. Auffällig bei der dazu durchgeführten Immunopräzipitation war die verstärkte Bindung der Kinase an eine nicht mehr phosphorylierbare Form von p27. Das deutet auf eine mögliche Phosphorylierung von p27 durch Lyn hin (dazu siehe unten). Kontrollexperimente mit dieser Form von p27, nicht aber mit p27^{wt} und einer Variante, bei der die zur Interaktion mit SH3-Domänen nötigen Aminosäuren ausgetauscht wurden, belegen die direkte Interaktion von Lyn mit p27. Die Bindung von Lyn an p27 benötigt kein zusätzliches Adapterprotein oder eine Komplexierung mit dem CDK-Komplex. Für Lyn wurde eine Interaktion mit CDK2 nach Stimulation mit 1- β -D-arabinofuranosylcytosin beschrieben (Mou and Linnekin, 1999; Yuan *et al.*, 1996). Diese Interaktion führt in U-937-Zellen zu einer Phosphorylierung von CDK2 an Tyrosin 15 und zu einer Inaktivierung der Kinase. Möglicherweise wird die Interaktion zwischen Lyn und CDK2 über den Adapter p27 vermittelt.

In den durchgeführten Immunopräzipitationsexperimenten zeigte sich eine Interaktion von p27 mit Lyn an der Plasmamembran. p27 konnte aus einer gereinigten Fraktion der Plasmamembran isoliert werden. Dieses membranassoziierte p27 interagiert mit Lyn. Das p27 trotz seiner überwiegend nukleären Lokalisation auch an der Plasmamembran zu finden ist, konnte Yaroslavskiy *et al.* (2001) zeigen. p27 lokalisiert dabei in detergensunlöslichen Mikrodomänen der Lymphozytenmembran. Denkbar wäre, daß p27 durch die Adapter Grf40 und Grb2 oder durch die Tyrosinkinase Lyn an die Plasmamembran gebracht wird. Alle drei Proteine vermögen mit den stabil in der Plasmamembran integrierten Rezeptoren der Signaltransduktion zu interagieren (Hibbs and Dunn, 1997; Lowenstein *et al.*, 1992; Skolnik *et al.*, 1993). Welche Funktion p27 an der Membran zukommt, bleibt allerdings weiterhin unklar. p27 könnte in einer Art Reservoir-Funktion an der Membran zurückgehalten werden und zu einem späteren Zeitpunkt wieder ins Zytoplasma und anschließend in den Kern transportiert werden. Möglich ist auch eine bereits diskutierte Funktion der Interaktion als Unterbrecher bei der Weitergabe eines Signals in der Signalvermittlungskaskade. Die Unterbrechung würde so an einem sehr frühen Zeitpunkt der Übergabe der Information von den Rezeptoren der Plasmamembran an den nächsten Boten stattfinden. Weiterhin könnte

p27 auch eine Rolle bei der Organisation oder Regulation des Zytoskeletts zukommen. Erste Hinweise dafür konnten Sun *et al.* (2001) erbringen, die für p27 eine Rolle bei der Migration von glatten Muskelzellen diskutieren. Eine Beeinflussung der Migration setzt wahrscheinlich eine räumliche Nähe zwischen Zytoskelett und p27 voraus. Die Tyrosinkinase Lyn oder die beiden Adapter Grb2 und Grf40 könnten die Bindung zwischen Zytoskelett und p27 vermitteln.

5.2 Die Tyrosinphosphorylierung von p27

Mit Grb2 und Grf40 und der Tyrosinkinase Lyn wurden drei Proteine der Signaltransduktionskaskade als Interaktionspartner von p27 identifiziert. Die direkte Interaktion von p27 mit einer Tyrosinkinase legt nahe, daß p27 ein Substratprotein dieser Tyrosinkinase sein könnte.

Ein externes Signal, wie zum Beispiel die Serumstimulation von Zellen führt letztendlich zu einer kontrollierten Teilung der Zelle. Über welche Wege diese externe Information über die Signaltransduktionskaskade an die entscheidenden Effektoren, die Kinasen und Inhibitoren der Zellzykluskontrolle, weitergegeben werden ist bis heute nur in Ansätzen verstanden. In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, „fehlende Bindeglieder“ zwischen der Signaltransduktion und der Zellzykluskontrolle aufzuspüren (zusammengefaßt in Denhardt, 1999). Die bisher bekannten Regulationsmechanismen beschränken sich meist auf eine transkriptionelle Aktivierung oder Deaktivierung von Zellzyklusproteinen. Häufig wird die Aktivität eines Zellzyklusproteins am Ende dieser Informationskaskade durch Phosphorylierung moduliert oder die Menge des Proteins wird phosphorylierungsabhängig über den geregelten Proteinabbau reduziert.

Eine transkriptionale Aktivierung von Cyclin A, Cyclin E oder CDC25 wird beispielsweise durch den von Src bzw. Raf1 aktivierten Transkriptionsfaktor myc erhalten. Demgegenüber wird die Expression von Cyclin D1 durch myc transkriptionell unterdrückt (Jansen-Durr *et al.*, 1993; Philipp *et al.*, 1994). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung von p53 und CDC25 durch Raf1 oder die Aktivierung von p21 und Cyclin D durch die von Src vermittelte Phosphorylierung von Raf1 an einem Tyrosin (Stokoe and McCormick, 1997). Diese Aktivierung von Raf1 wiederum führt zu einer Phosphorylierung von MEK1 und MEK2 an Threonin und Serin durch Raf1. Das aktivierte MEK1 und 2 modifiziert nun seinerseits ERK1 und 2 an Threonin und

Tyrosin, was letztendlich zu einer Aktivierung von p21 und Cyclin D führt. Auch die Menge von p27 in der Zelle wird transkriptionell durch Proteine der Signaltransduktionskaskade reguliert. So verringert die Aktivität von c-myc die Transkriptionsrate von p27 (Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001) oder die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors AFX unterdrückt die Transkription von p27. AFX ist ein Transkriptionsfaktor, der PI3K/AKT-Kinaseaktivität und die Ras-Signaltransduktion mit der transkriptionellen Regulation von p27 verbindet: Der Tumorsuppressor PTEN, eine Phosphatase, führt zur konstitutiven Aktivierung von AKT über den PI3-Kinaseweg (Cantley and Neel, 1999). AKT wiederum phosphoryliert den Transkriptionsfaktor AFX und unterdrückt durch dessen Inaktivierung die Transkription von p27 (Graff *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2001). In allen Fällen handelt es sich um eine indirekte Informationsweitergabe und nicht um Mechanismen, die schnell in der Lage sind, Zugriff auf die Zellzyklussteuerung zu nehmen. Eine möglicherweise direkte Interaktion einer Signaltransduktionskinase mit einer Kinase der Zellzykluskontrolle stellt die inaktivierende Phosphorylierung von CDK2 bzw. CDK4 an einem Tyrosin dar. Die dafür verantwortliche Kinase wurde bislang allerdings noch nicht identifiziert.

Die Tyrosinkinase Src selbst wird durch einen CDK-Komplex an Threonin 36 und an Serin 74 phosphoryliert (Kato and Maeda, 1999; Morgan *et al.*, 1989). Möglicherweise bewirkt die räumliche Nähe dieser beiden Moleküle nun die wechselseitige Phosphorylierung der CDK-Untereinheit am Tyrosin durch Src. Demgegenüber wird die Assoziation der Tyrosinkinase Lyn mit CDK2 als Kinase für die Tyrosinphosphorylierung von CDK2 diskutiert (Mou and Linnekin, 1999; Yuan *et al.*, 1996). p27 könnte in diesem Fall als Adapter zwischen der Tyrosinkinase Lyn und der Kinaseuntereinheit der CDKs fungieren. Die Aktivierung dieser, für die Zellzyklusabfolge essentiellen Kinasen erfolgt anschließend über eine Dephosphorylierung der Tyrosine durch die Phosphatase CDC25A (Saha *et al.*, 1997). Mit der Interaktion von Grb2, Grf40 und Lyn mit p27 konnte in dieser Arbeit eine direkte Bindung von Proteinen der Signaltransduktion mit einem Protein der Zellzykluskontrolle gezeigt werden.

Für das Verständnis der Funktion der Interaktion zwischen den Signaltransduktionproteinen und p27 ist die Lage von phosphorylierbaren Tyrosinen in p27 von Bedeutung (siehe Abb. 5.3). Auffällig ist die Lage der insgesamt drei Tyrosinreste im N-terminalen Teil des Inhibitors.

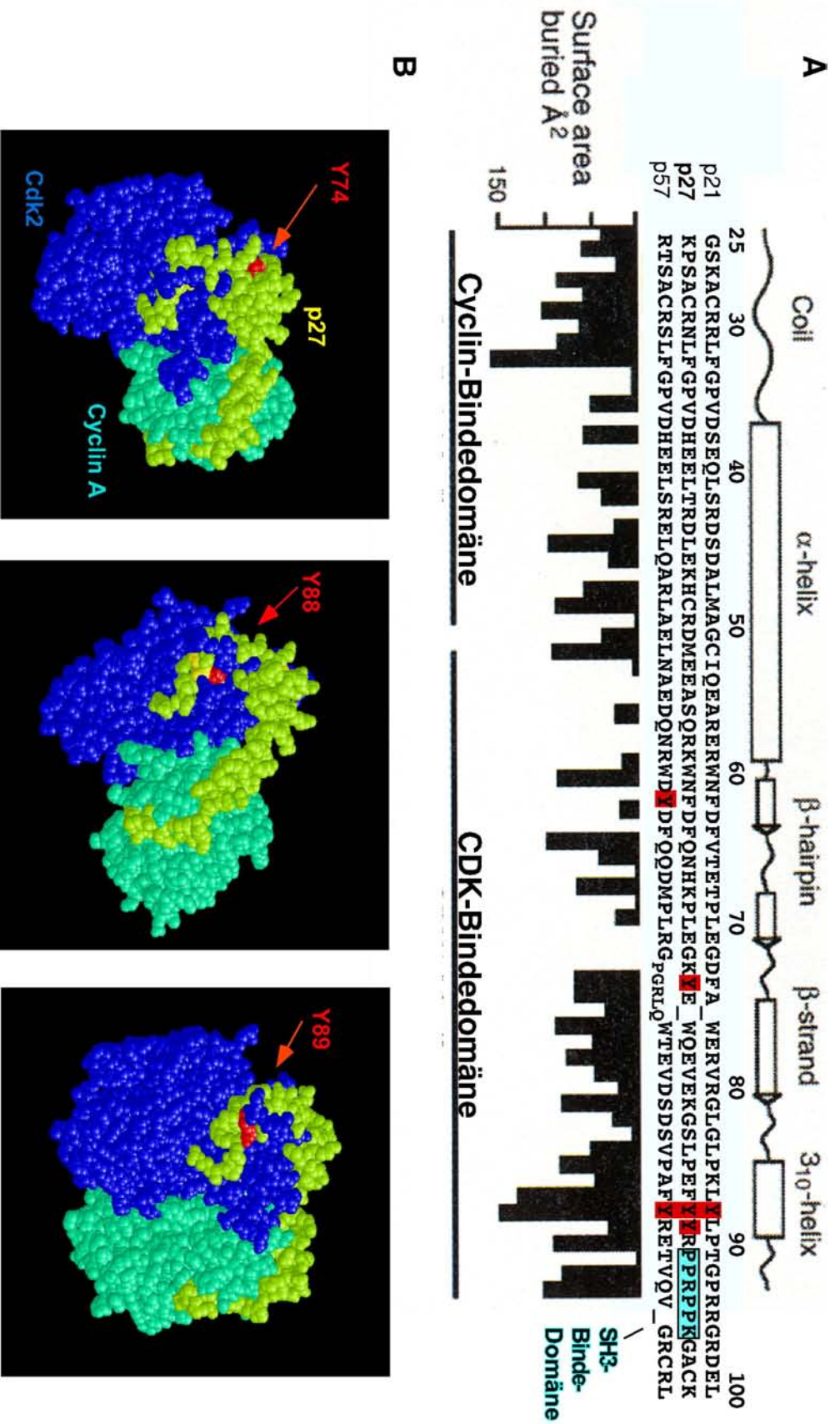


Abbildung 5.2.: Lage der Prolin-reichen Domäne in p27 (grün unterlegt). Die Tyrosin der Cip/Kip-Proteinfamilie im inhibitorisch aktiven Teil sind rot unterlegt. Über die Höhe von Balken ist die wahrscheinliche Interaktionsintensität des Inhibitors p27 mit dem CDK2/Cyclin A-Komplex dargestellt (A). Die Lage der Tyrosine in p27 (rot) ist dreidimensional in dem Komplex von p27 mit CDK2/Cyclin A (B) gezeigt, nach Russo *et al.* (1996a).

Alle drei Tyrosine befinden sich in dem die Kinaseuntereinheit der CDKs bindenden Teil von p27. Von besonderem Interesse sind dabei die beiden, direkt benachbarten Tyrosine 88 und 89. Speziell Tyrosin 88 stellt nach den Röntgenstrukturdaten des Komplexes von p27 mit CDK2/Cyclin A (Russo *et al.*, 1996a) die Aminosäure mit der wahrscheinlichsten Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und der Kinaseuntereinheit dar. Tyrosin 88 von p27 kommt dabei exakt in der ATP-Bindetasche der Kinase zu liegen und blockiert dadurch die Möglichkeit der Kinase sich mit freiem ATP zu beladen. Diese Konkurrenz von p27 mit ATP verhindert die Phosphorylierung von Substratproteinen durch die CDK (Sheaff *et al.*, 1997). Eine Modifikation von p27 an Tyrosin 88 könnte zu einer völligen Änderung der Wechselwirkung zwischen der CDK und dem Inhibitor führen. Eine Modulation in der Aktivität des Inhibitors hat möglicherweise Auswirkungen auf die Aktivität der CDKs und auf die regulierte Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde deshalb besonderes Augenmerk auf die Phosphorylierung der Tyrosine von p27 gelegt. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Tyrosinkinase und einer veränderten Aktivität oder Menge von p27 *in vivo* konnten von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden. So konnten Johnson *et al.* (1998) zeigen, daß eine reversible Transformation von Rat1-Fibroblasten mit dem Onkogen v-src zu einer Reduktion der zellulären p27-Menge führt. Jiang *et al.* (2000) konnten darüberhinaus zeigen, daß die Transformation von CD34⁺-Zellen (myeloide Leukämie) mit dem Onkogen BCR/Abl, einem konstitutiv aktiven Fusionsprotein von BCR und Abl, zu einer Erhöhung der p27-Menge im Zytoplasma führt. Zudem scheint nur wenig der vorhandenen Menge von p27 an CDK2-Komplexe binden zu können. Dies verhindert in CD34⁺-Zellen einen Arrest in der G₁-Phase.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene, direkte Assoziation einer Tyrosinkinase an die SH3-Bindedomäne von p27 ließ vermuten, daß die bei Johnson *et al.* (1998) und Jiang *et al.* (2000) beobachtete Änderung des Inhibitionsverhaltens von p27 direkt auf der Inaktivierung von p27 durch eine Tyrosinphosphorylierung beruhen könnte und nicht, wie in den beiden Publikationen diskutiert, auf indirekten, möglicherweise transkriptionellen Effekten beruht. In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, eine direkte Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* zu zeigen. Dazu wurden zwei unabhängige Methoden angewandt. Zum einen wurde endogenes p27 über 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Damit wurde versucht eine Tyrosinphosphorylierung von p27 mit einem,

gegen Phosphotyrosin gerichteten, Antikörper nachzuweisen. Zum anderen wurde eine metabolische Markierung von Säugerzellen mit [³²P]-*ortho*-Phosphat durchgeführt und die hydrolysierten Phospho-Aminosäuren von p27 wurden anschließend im Dünnschichtchromatogramm aufgetrennt.

Der Nachweis mittels 2-D-Gelelektrophorese erbrachte für unterschiedliche Zelltypen (HeLa-Zellen und MCF7-Zellen) und verschiedene Phosphotyrosin-Antikörper keine Tyrosinphosphorylierung von p27. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen einer Tyrosinphosphorylierung könnte in der komplexen Anreicherungsstrategie für p27 liegen. Dadurch könnte es zu Dephosphorylierung von p27 durch die Aktivität von Phosphatasen während der Aufreinigungsprozedur kommen. Mit der Auftrennung von p27 über 2-D-Gelelektrophorese konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich bei p27 um ein hochgradig modifiziertes Molekül handelt. So wurden sieben stärkere und drei weitere, schwächere Phosphoformen von p27 gefunden. Eine Detektion mit einem spezifischen Antikörper zeigte, daß einige der Signale einer Phosphorylierung von Threonin 187 bei p27 zuzuordnen sind. Das komplexe Phosphomuster von p27 macht es sehr wahrscheinlich, daß p27 neben der bekannten Phosphorylierung an Threonin 187 noch weitere modifizierte Aminosäuren aufweist. So konnten andere Arbeitsgruppen das 2-D-Muster für p27 bestätigen (Ciarallo *et al.*, 2002) und zudem eine Phosphorylierung von p27 an Serin 10 nachweisen. Die Serin10-Phosphorylierung von p27 beeinflusst die Stabilität des Inhibitors (Ishida *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2001). Eine Tyrosinphosphorylierung konnte jedoch keiner der im 2-D-Gel erhaltenen Phosphoformen von p27 zugeordnet werden. Möglicherweise besitzt auch keiner der eingesetzten Phosphotyrosin-Antikörper genügend Sensitivität und Spezifität für den erforderlichen Nachweis. Das mit *in vitro*-phosphoryliertem p27 und verschiedenen phosphotyrosinspezifischen Antikörpern erhaltene schwache Signal im Blot bestätigte diese Annahme. Mit einem spezifisch gegen Phosphotyrosin-p27 gerichteten Antikörper könnte dieses Problem umgangen werden. Mit einem solchen Antikörper könnte die Tyrosinphosphorylierung von p27 auch einem funktionellen Kontext zugeordnet werden. In Immunoblots könnte untersucht werden, ob eine potentielle Tyrosinphosphorylierung von p27 auf verschiedene Zelltypen, wie normale oder neoplastische Zellen, oder auf verschiedene Phasen des Zellzyklus beschränkt ist. Zudem könnte die Tyrosinphosphorylierung von p27 bei verschiedenen externen Stimuli der Zelle wie Serumentzug /-gabe oder Kontaktinhibition analysiert werden.

Der Nachweis der direkten Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* gelang mit der radioaktiven metabolischen Markierung von p27 und einer anschließender Auftrennung der Phosphoaminosäuren im Dünnschichtchromatogram. Damit konnte für adhärente HeLa-Zellen eine Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Allerdings war dazu neben der Überexpression von p27 selbst die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der Tyrosinkinase Lyn nötig. Zudem wurde der proteasomale Abbau von p27 und die zelleigenen Phosphatasen während der metabolischen Markierung durch entsprechende Inhibitoren blockiert. Diese Vorgehensweise war nötig, da mit der identischen Zelllinie ohne diese Maßnahmen (Überexpression von p27 und Lyn, Phosphatase- und Proteasominhibitoren) keine Tyrosinphosphorylierung zu detektieren war. Der Anteil der Serinphosphorylierung betrug in unbehandelten Zellen 99%, der Anteil der Threoninphosphorylierung 1% der Gesamtphosphorylierung. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten von Ishida *et al.* (2000), die gleiche Prozentzahlen für endogenes und überexprimiertes p27 ermitteln konnten. Durch die Behandlung von HeLa-Zellen mit Phosphatase- und Proteasominhibitoren und die Kotransfektion dieser Zellen mit p27 und Lyn konnte eine 16-prozentige Tyrosinphosphorylierung von p27 erhalten werden. Die Serinphosphorylierung betrug dabei 74%, die Threoninphosphorylierung 12% der Gesamtphosphorylierung. Ob die Kotransfektion oder die Stabilisierung des Inhibitors den entscheidenden Ausschlag für die Tyrosinphosphorylierung darstellt, muß in weiteren Experimenten abgeklärt werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, daß die Tyrosinphosphorylierung von p27, möglicherweise bedingt durch die Aktivität zelleigener Phosphatasen, sehr instabil ist. Auf der anderen Seite könnte die Modifikation von p27 an Tyrosin auch nur in einem sehr schmalen zeitlichen Fenster des Zellzyklus zum Tragen kommen. Das könnte zum Beispiel in der späten G₁-Phase, am Übertritt der Zelle zur S-Phase, der Fall sein. Ein derartiger Phasenarrest wurde in der metabolischen Markierung zur Phosphoaminosäureanalyse durch die Transfektion von HeLa-Zellen mit p27 erzwungen. Weitere detaillierte Studien zur Tyrosinphosphorylierung in den einzelnen Phasen des Zellzyklus oder als Reaktion auf diverse externe Stimuli, wie Kontaktinhibition der Zellen oder Serumstimulation könnten Aufschluß über das tatsächliche Auftreten von tyrosinphosphoryliertem p27 während eines kompletten Zellzyklus geben.

Ausgehend von diesem Befund der Tyrosinphosphorylierung von p27 *in vivo* wurden weitere Studien durchgeführt, um zu verstehen, was eine Modifikation von p27 an Tyrosin für dessen Funktion bedeutet. So konnte gezeigt werden, daß p27 von der

rekombinanten Tyrosinkinase Src und der verkürzten Kinasedomäne der Tyrosinkinase Abl ausschließlich an Tyrosin 88 und 89 modifiziert werden kann. Dabei kann auch nur jeweils eines der beiden Tyrosinreste phosphoryliert werden. Eine initiale Modifikation von einem der beiden Reste scheint die Zugänglichkeit des jeweils zweiten Tyrosinrestes für die Kinase sterisch zu blockieren. Diese, *in vitro* durchgeführten Studien, lassen keine endgültige Aussage über die *in vivo* phosphorylierten Tyrosine zu. Die Kinasierungen wurden mit den Kinasen Abl und Src durchgeführt. *In vivo* bindet die Tyrosinkinase Lyn über einen direkten, SH3-Domänen-abhängigen Mechanismus an p27. Eine Wiederholung der Experimente mit rekombinantem Lyn wäre dementsprechend nötig, um zumindest *in vitro* einzugrenzen, ob p27 von Lyn an den gleichen Tyrosinresten phosphoryliert werden kann wie von Src oder Abl. Ideal wäre allerdings eine Identifizierung der phosphorylierbaren Stellen von p27 unter *in vivo*-Bedingungen. Dieser Nachweis könnte zum Beispiel durch Transfektion der verschiedenen Phosphomutanten von p27 mit einer anschließenden radioaktiven metabolischen Markierung und Identifikation der Phosphoaminosäuren über eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden.

Die Phosphorylierung der Aminosäuren 88 oder 89 in p27 führt *in vitro* in einem Kinaseassay mit Histon H1 oder pRb zu einer Abschwächung der inhibitorischen Aktivität von p27 um etwa 40%. Damit konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, daß ein Inhibitor der Zellzykluskinasen durch eine Modifikation einer Aminosäure in der Interaktionsdomäne des Inhibitors mit der Kinaseuntereinheit der CDKs teilweise inaktiviert wird. Eine vergleichbare Abschwächung der inhibitorischen Aktivität konnte mit transfiziertem p27^{wt} im Vergleich zu einer, nicht mehr an Tyrosin phosphorylierbaren Mutante von p27, *in vivo* gezeigt werden. Der mit p27^{wt} assoziierte, immunpräzipitierte CDK/Cyclin A-Kinasekomplex besitzt eine um etwa 40% schwächere inhibitorische Aktivität im Vergleich zu einem Kinasekomplex der mit einem p27 assoziiert vorliegt, daß nicht mehr an Tyrosinen phosphorylierbar ist. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß p27 auch *in vivo* durch eine Modifikation von Tyrosin inaktiviert werden kann. Allerdings könnte die Transfektion mit p27 und dem damit einhergehenden G₁-Phasenarrest der Zellen zu einer Verfälschung der tatsächlich *in vivo* stattfindenden Ereignisse führen. Zudem müßte sichergestellt werden, daß die gemessene Aktivitätsänderung von p27 auf stöchiometrische Komplexe des Inhibitors mit der untersuchten Kinase zurückzuführen sind. Die *in vitro* durchgeführten Kinasereaktionen belegen dagegen eindeutig, daß die Änderung des

Inhibitionsverhaltens von p27 auf die Phosphorylierung der Tyrosinreste zurückzuführen ist.

Interessant wäre daher, die *in vivo* auftretende Tyrosinphosphorylierung und Inaktivierung des Inhibitors p27 auch in strukturbiologischer Hinsicht zu untersuchen. An Tyrosin phosphoryliertes, mit CDK2/Cyclin A-komplexiertes p27 könnte direkt mit der Struktur des bekannten CDK2/Cyclin A/p27-Komplexes verglichen werden (Russo *et al.*, 1996a). Ein Vergleich beider Kristallstrukturen würde interessante Einblicke in den Mechanismus der Inaktivierung des Inhibitors auf struktureller Ebene ermöglichen. Durch die Inaktivierung des Inhibitors durch Tyrosinphosphorylierung wird p27 selbst zum Substratprotein der CDKs. Da die CDKs nicht mehr durch den Inhibitor blockiert werden können, kann die aktive Kinase p27 an Threonin 187 modifizieren. An Tyrosinresten phosphoryliertes p27 bindet noch an den CDK-Komplex, wird aber nur teilweise vom Inhibitor inaktiviert. Möglicherweise schwächt die Phosphorylierung des modifizierten Inhibitors die Bindung mit dem CDK-Komplex ab und erleichtert dadurch sterisch die Phosphorylierung des gebundenen Inhibitors an Threonin 187. Vorstellbar wäre auch ein Modell bei dem eine weitere, transient bindende Kinase p27 phosphorylieren könnte (Montagnoli *et al.*, 1999).

Die Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 führt zur Ubiquitinierung des Inhibitors durch einen spezifischen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex. Das ubiquitinierte p27 wird über das 26S-Proteasom abgebaut (Montagnoli *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995). Erleichtert wird ein derartiger Autoregulationskreis durch die, auch nach der Tyrosinphosphorylierung von p27 weiterbestehende Bindung von p27 an die Cyclin-Untereinheit der aktiven Kinase. Die räumliche Nähe zwischen Inhibitor und Kinase könnte eine effiziente Modifikation von p27 an Threonin 187 ermöglichen. *In vivo* durchgeführte Analysen zur Ermittlung der Halbwertszeit einer nicht mehr an Tyrosin phosphorylierbaren Form von p27 bzw. einer Form, die nicht mehr von SH3-Domänenproteinen gebunden werden kann, zeigte eine Zunahme der Stabilität dieser Formen im Vergleich zu p27^{wt}. Auch die in der metabolischen Markierung detektierte Zunahme von Phosphotyrosin von p27 nach Gabe von proteasomalen Inhibitoren spricht für einen Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf den Abbau von p27. p27 scheint damit primär über seine Prolin-reiche Region von der SH3-Domäne der Tyrosinkinase gebunden zu werden. In einem anschließenden Schritt modifiziert die Kinase p27 an Tyrosin und inaktiviert den Inhibitor. Dieser inaktivierte Inhibitor bindet noch an den CDK-Komplex und wird von diesem oder einer weiteren, transient

bindenden Kinase an Threonin 187 phosphoryliert. Dies führt schließlich zur Ubiquitinierung und zum Abbau von p27.

Eine weitere Fragestellung war, wie sich die Tyrosinkinase nach der Phosphorylierung der Tyrosinreste in p27 wieder vom modifizierten Substrat ablöst. Vorstellbar ist, daß die SH3-Domäne abhängige Bindung von Lyn an p27 durch eine Phosphorylierung der Tyrosine in p27 beeinflußt wird. Die phosphorylierbaren Tyrosinreste in p27 liegen in direkter Nachbarschaft zur Prolin-reichen Domäne in p27 die die Bindung zur SH3-Domäne der Kinase vermittelt (siehe Abb. 5.3). Die Phosphorylierung dieser Tyrosinreste von p27 könnte eine mögliche sterische Umstrukturierung der gesamten SH3-Binderegion von p27 bewirken. Die Kinase könnte zudem durch Abstoßungsreaktionen des, durch die Phosphorylierung stark negativ geladenen Tyrosins von p27 abdissoziieren. Belege dafür konnten mit der isolierten SH3-Domäne von Lyn mit unphosphoryliertem und phosphoryliertem p27 erbracht werden. Auch die verstärkte Bindung der Tyrosinkinase Lyn an eine, nicht an Tyrosin modifizierbare Form von p27 *in vivo* bestärkt die Annahme, daß eine Phosphorylierung die SH3-Domänen vermittelte Interaktion zwischen p27 und der Kinase schwächt.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse läßt sich eine Tyrosinphosphorylierung von p27 funktionell in einem Modell der Inaktivierung und des nachfolgenden Abbaus von p27 zusammenfassen:

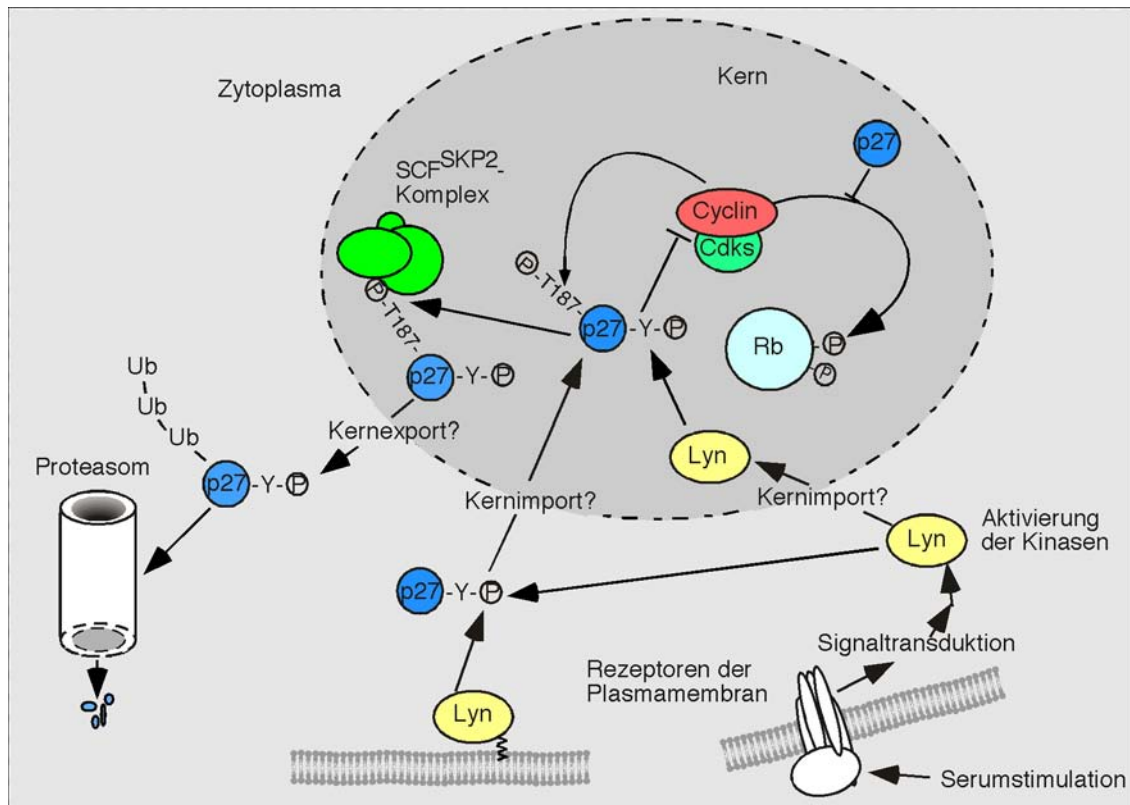


Abbildung 5.3: Modell zur Inaktivierung und Regulation von p27.

Pfeile markieren die Hauptwege der Regulation. Inhibitorische Phosphorylierungen oder Interaktionen sind durch —| dargestellt.

Demgegenüber konnte mit *in vitro* durchgeführten Phosphorylierungsstudien des CDK2/Cyclin A/p27-Komplexes gezeigt werden, daß eine Tyrosinkinase nicht in der Lage ist, komplexiertes p27 zu phosphorylieren und zu inaktivieren. Eine Tyrosinphosphorylierung von p27 könnte so nur im Zytoplasma an gerade translatiertem p27 oder während des langsamen An- und Abdiffundierens des Inhibitors vom CDK-Komplex im Kern erfolgen. Allerdings wurden für diese Studien nur Abl und Src benutzt. Die direkte Bindung der Prolin-reichen Domäne von p27 durch die SH3-Domäne von Lyn könnte *in vivo* eine Phosphorylierung des mit CDKs komplexierten p27 ermöglichen. Da Grb2 nicht an den CDK2/Cyclin A/p27-Komplex bindet, ist es sehr wahrscheinlich, daß auch Lyn nicht stabil mit diesem Komplex interagieren kann. Inwieweit eine potentielle unterschiedliche Affinität der SH3-Domänen von Lyn oder Grb2 zu p27 möglicherweise zu einer Phosphorylierung von komplexgebundenem p27 führen kann, muß noch geklärt werden. So sind mehrere Modelle der Bindung von Tyrosinkinasen an p27 denkbar:

1.) Zum einen kann die Tyrosinkinase Lyn direkt an p27 binden und p27 an Tyrosinresten phosphorylieren.

2.) Auf der anderen Seite könnte p27 in einem ersten Schritt über die Prolin-reiche Region in p27 von den C-terminalen SH3-Domänen der Adapterproteine Grb2 oder Grf40 gebunden werden. An die freie N-terminale SH3-Domäne des jeweiligen Adaptermoleküls könnte eine Tyrosinkinase, wie zum Beispiel Abl oder Src, binden. Auch in diesem Fall würde eine Tyrosinphosphorylierung von p27 erfolgen und der Adapter-Abl/Src-Kinasekomplex würde anschließend von p27 abdissoziieren.

3.) Eine weitere Möglichkeit, p27 an Tyrosinresten zu phosphorylieren, wäre die Assoziation von p27 mit der Tyrosinkinase Abl am E2F-Komplex.

CDK-Komplexe interagieren und phosphorylieren pRb. Dadurch wird die Bindung von pRB mit dem E2F-Komplex aufgebrochen (Dyson, 1998). An pRB bindet die Tyrosinkinase Abl (Welch and Wang, 1993). Durch die Interaktion der CDK-Komplexe mit pRb könnte ein, an die CDK-Komplexe assoziierter CDK-Inhibitor mit der Tyrosinkinase Abl in Kontakt kommen und modifiziert werden. Dieser Weg wäre unabhängig von der Bindung an SH3-Domänen. Außerdem kann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, CDK-gebundenes p27 nur sehr ineffizient an Tyrosinen phosphoryliert werden. Demgegenüber konnte allerdings für p21 eine Tyrosinphosphorylierung *in vivo* gezeigt werden. Da p21 keine Prolin-reiche Region zur Assoziation mit SH3-Domänen besitzt, müssen in der Zelle Möglichkeiten vorhanden sein, p21 und eventuell auch die beiden weiteren Inhibitoren p27 und p57 unabhängig von einer SH3-vermittelten Bindung an Tyrosin zu modifizieren.

Die Tyrosinphosphorylierung von p21 *in vivo* macht es wahrscheinlich, daß eine derartige Modifikation generell für alle Cip/Kip-Proteine zutrifft. Damit wäre eine Tyrosinphosphorylierung ein Mechanismus zur Inaktivierung aller Inhibitoren dieser Familie. Um diese Annahme zu bestätigen, müßte eine Tyrosinphosphorylierung auch von p57 *in vivo* nachgewiesen werden. Weiterhin müßte die inhibitorische Aktivität der modifizierten Inhibitoren p21 und p57 im Vergleich zu den unmodifizierten Inhibitoren ermittelt werden. Für p21 ergibt sich durch eine Tyrosinphosphorylierung die Möglichkeit, die Bindung an PCNA zu modulieren. So liegt das zweite Tyrosin von p21 zentral in der für die Bindung von PCNA verantwortlichen Aminosäuresequenz des Inhibitors. Eine Modifikation von p21 an diesem Tyrosin könnte die Interaktion mit PCNA verändern. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigen, daß beide Tyrosine von p21, das in der Inhibitor-domäne gelegene und das in der PCNA-Bindedomäne gelegene Tyrosin, *in vitro* phosphoryliert werden können. Eine Phosphorylierung des in der PCNA-Bindedomäne liegenden Threonin 145 und Serin

146 von p21 bewirkt eine Dissoziation des Inhibitors von PCNA (Scott *et al.*, 2000; Rossig *et al.*, 2001). Eine Modifikation an Tyrosin 151 in p21 beeinträchtigt damit wahrscheinlich ebenfalls die Assoziation mit PCNA.

Diese hier diskutierten Modelle zeigen eine mögliche wichtige Rolle der Tyrosinphosphorylierung bei der Regulation der Aktivität der Cip/Kip-Proteine. Die Aktivität der Inhibitoren der Cip/Kip-Familie spielen für die geregelte Abfolge der Zellzyklusphasen eine essentielle Rolle. Nach den hier vorgestellten Ergebnissen könnte die Aktivität der Inhibitoren in Abhängigkeit von der Aktivität verschiedener Tyrosinkinassen zu sehen sein. Diese Abhängigkeit läßt sich in einem vereinfachten Schema der Menge von p27 zu der Aktivität von Tyrosinkinassen während des Zellzyklus beschreiben.

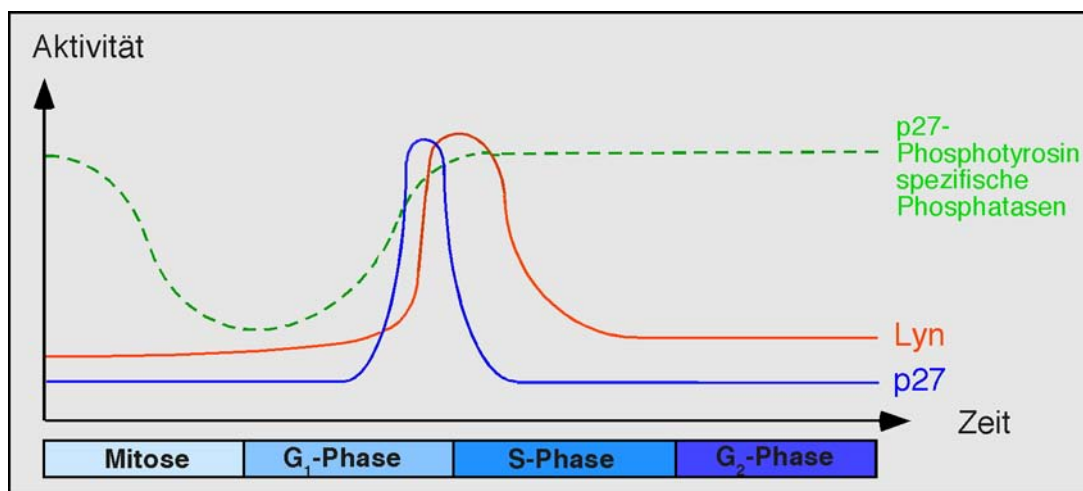


Abbildung 5.4: Modell zur Regulation von p27 in Abhängigkeit von der Aktivität der Tyrosinkinase Lyn und von spezifischen Phosphatasen.

Dabei ist das Ende der G₁-Phase und der Beginn der S-Phase durch eine drastische Abnahme der p27-Menge einer Zelle gekennzeichnet (Hengst *et al.*, 1994; Hengst and Reed, 1996; Millard *et al.*, 1997). Diese Abnahme könnte unter anderem durch die, in der Mitte der G₁-Phase ansteigende Menge der Adapterproteine Grb2/Grf40 oder der Aktivität der Tyrosinkinassen Lyn bzw. Abl oder Src vermittelt werden. Eine interessante Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Modell konnte bereits in einigen Arbeiten erbracht werden. So konnten Mou and Linnekin (1999) sowie Wang *et al.* (2000) zeigen, daß Lyn in hämatopoetischen Zellen durch SCF (Stem Cell Factor) in der späten G₁-Phase und über den G₁/S-Phasenübergang maximal aktiviert wird. Dauerhaft aktivierte Formen der Tyrosinkinassen wie die Onkogene BCR/Abl, v-Src

oder auch konstitutiv aktive Formen von Lyn könnten so zu einer anhaltenden Tyrosinphosphorylierung von p27 über ihre, eigentlich auf die späte G₁-Phase begrenzte Aktivität hinaus führen. Eine derartige, durch Tyrosinphosphorylierung von p27 bewirkte Inaktivierung des Inhibitors könnte, insbesondere in der frühen G₁-Phase, die Akkumulation von p27 verhindern. Das könnte zu einer Überschreitung des Restriktionspunktes und zur unkontrollierten Zellteilung führen. Dieses Modell bietet zudem einen möglichen Erklärungsansatz der onkogenen Wirkungsweise von Tyrosinkinase. Die Aktivität von konstitutiven Tyrosinkinase könnte so zu einer dauerhaften Inaktivierung der Cip/Kip-Inhibitorproteine beitragen.

Demgegenüber könnte in der Mitose oder in der frühen G₁-Phase eine Dephosphorylierung der Tyrosine von p27 die Cip/Kip-Inhibitoren stabilisieren und so die zelluläre Menge von p27 auf einem hohen Niveau halten. Eine derartige, mit der Phosphorylierung von p27 in Konkurrenz stehende Demodifikation des Inhibitors könnte zum Beispiel durch die Aktivierung von, für phospho-p27 spezifische Phosphatasen erfolgen. Ein naheliegender Kandidat für eine solche spezifische Phosphatase wäre das, bei der Dephosphorylierung und Aktivierung von CDK2 und CDK4 wichtige CDC25A. Auch CDC14, das in der Lage ist, sic1, das Hefehomolog von p27, zu dephosphorylieren könnte eine Demodifikation von tyrosinphosphoryliertem p27 in Säugerzellen bewirken. Auch hier sprechen erste Arbeiten für eine Aktivität von Phosphatasen vor allem während der G₂-Phase und der Mitose. So arretiert Na-*ortho*-Vanadat, ein Inhibitor von tyrosinspezifischen Phosphatasen, Zellen am G₂/M-Phasenübergang (Hamaguchi *et al.*, 1995) und Molinari *et al.* (2000) beschreibt einen konstanten Anstieg von CDC25A von der G₁-Phase bis in die Mitose. Die Aktivität von spezifischen Phosphatasen könnte somit in der Mitose oder am Beginn der S-Phase einer Inaktivierung von p27 durch Tyrosinphosphorylierung entgegenwirken. Mit rekombinant hergestelltem cdc14 aus Hefe konnte in Vorversuchen gezeigt werden, daß tyrosinphosphoryliertes p27 wieder demodifiziert werden kann. Die Stabilisierung von p27 durch eine Dephosphorylierung an Tyrosin wäre somit eine lohnende Fragestellung zum weiteren Verständnis der Regulation des Inhibitors p27.

6 Literatur

Agrawal, D., Hauser, P., McPherson, F., Dong, F., Garcia, A. and Pledger, W.J. (1996) Repression of p27kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 4327-4336.

Alevizopoulos, K., Catarin, B., Vlach, J. and Amati, B. (1998) A novel function of adenovirus E1A is required to overcome growth arrest by the CDK2 inhibitor p27(Kip1). *Embo J*, **17**, 5987-5997.

Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T. and Sugamura, K. (1999) Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J Exp Med*, **189**, 1383-1390.

Baltensperger, K., Kozma, L.M., Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., Chawla, A., Banerjee, U. and Czech, M.P. (1993) Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science*, **260**, 1950-1952.

Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G.J. and Nabel, E.G. (2002) A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J*, **21**, 3390-3401.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J*, **18**, 5321-5333.

Bourette, R.P., Arnaud, S., Myles, G.M., Blanchet, J.P., Rohrschneider, L.R. and Mouchiroud, G. (1998) Mona, a novel hematopoietic-specific adaptor interacting with the macrophage colony-stimulating factor receptor, is implicated in monocyte/macrophage development. *Embo J*, **17**, 7273-7281.

Brandeis, M. and Hunt, T. (1996) The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *Embo J*, **15**, 5280-5289.

Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archer, S.J., Serrano, M., Brenner, S.L., Blundell, T.L. and Laue, E.D. (1998) Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature*, **395**, 244-250.

Brown, J.P., Wei, W. and Sedivy, J.M. (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, **277**, 831-834.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, **377**, 552-557.

Cantley, L.C. and Neel, B.G. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4240-4245.

Carnero, A. and Hannon, G.J. (1998) The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 43-55.

- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. and Pagano, M. (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, **1**, 193-199.
- Chamovitz, D.A. and Segal, D. (2001) JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep*, **2**, 96-101.
- Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N. and Winoto, A. (1995) Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*, **15**, 2682-2688.
- Chellappan, S.P., Giordano, A. and Fisher, P.B. (1998) Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 57-103.
- Chen, P. and Segil, N. (1999) p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development*, **126**, 1581-1590.
- Ciarallo, S., Subramaniam, V., Hung, W., Lee, J.H., Kotchetkov, R., Sandhu, C., Milic, A. and Slingerland, J.M. (2002) Altered p27(Kip1) phosphorylation, localization, and function in human epithelial cells resistant to transforming growth factor beta-mediated G(1) arrest. *Mol Cell Biol*, **22**, 2993-3002.
- Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T. and Karin, M. (1996) A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, **383**, 453-457.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M. and Roberts, J.M. (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev*, **10**, 1979-1990.
- Coats, S., Flanagan, W.M., Nourse, J. and Roberts, J.M. (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, **272**, 877-880.
- Current Protocols in Cell Biology* (2000) Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. und Yamada, K.M. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Current Protocols in Molecular Biology* (1994-1998) Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Current Protocols in Protein Science* (1995-1997) Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. und Wingfield, P.T. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.
- Denhardt, D.T. (1999) In Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. und Denhardt, D.T. (Hrsg.), *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley & Sons Inc., 225-304.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**, 3499-3511.

Diehl, J.A., Zindy, F. and Sherr, C.J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **11**, 957-972.

Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. and Beach, D. (1989) Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, **56**, 829-838.

Du, M., Sansores-Garcia, L., Zu, Z. and Wu, K.K. (1998) Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem*, **273**, 24289-24292.

Duclos, B., Marcandier, S. and Cozzone, A.J. (1991) Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods Enzymol*, **201**, 10-21.

Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.

Dulic, V., Lees, E. and Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**, 1958-1961.

Durand, B., Gao, F.B. and Raff, M. (1997) Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J*, **16**, 306-317.

Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, **12**, 2245-2262.

Eckerskorn, C. and Lottspeich, F. (1990) Combination of two-dimensional gel electrophoresis with microsequencing and amino acid composition analysis: improvement of speed and sensitivity in protein characterization. *Electrophoresis*, **11**, 554-561.

Ekholm, S.V. and Reed, S.I. (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 676-684.

Ekholm, S.V., Zickert, P., Reed, S.I. and Zetterberg, A. (2001) Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol*, **21**, 3256-3265.

el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. and et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, **54**, 1169-1174.

el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.

Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M. and Kemp, C.J. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, **396**, 177-180.

- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K. and Roberts, J.M. (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, **85**, 733-744.
- Furuno, N., den Elzen, N. and Pines, J. (1999) Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol*, **147**, 295-306.
- Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J. and Bar-Sagi, D. (1993) Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature*, **363**, 88-92.
- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L. and Dang, C.V. (2001) Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem*, **276**, 7919-7926.
- Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (1999) Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, **246**, 280-289.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N.J. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, **67**, 1169-1179.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J.D., Hbailu, A., Goode, R.G., Sandusky, G.E., Vessella, R.L. and Neubauer, B.L. (2000) Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem*, **275**, 24500-24505.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, **366**, 707-710.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C. and Walsh, K. (1995) MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol*, **15**, 3823-3829.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. and Pines, J. (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, **9**, 680-689.
- Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D. and Lassar, A.B. (1995) Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, **267**, 1018-1021.
- Hamaguchi, T., Sudo, T. and Osada, H. (1995) RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1 phase. *FEBS Lett*, **372**, 54-58.
- Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257-261.
- Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K. and Hatakeyama, S. (2001) Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem*, **276**, 48937-48943.

- Harder, K.W., Parsons, L.M., Armes, J., Evans, N., Kountouri, N., Clark, R., Quilici, C., Grail, D., Hodgson, G.S., Dunn, A.R. and Hibbs, M.L. (2001) Gain- and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity*, **15**, 603-615.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. and et al. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*, **6**, 387-400.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Helmbrecht, K., Zeise, E. and Rensing, L. (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*, **33**, 341-365.
- Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J.M., Lees, E. and Reed, S.I. (1994) A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5291-5295.
- Hengst, L. and Reed, S.I. (1996) Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, **271**, 1861-1864.
- Hengst, L., Gopfert, U., Lashuel, H.A. and Reed, S.I. (1998) Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes Dev*, **12**, 3882-3888.
- Hengst, L. and Reed, S.I. (1998) Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 25-41.
- Hibbs, M.L. and Dunn, A.R. (1997) Lyn, a src-like tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 397-400.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, **15**, 2672-2681.
- Hirama, T. and Koeffler, H.P. (1995) Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, **86**, 841-854.
- Hohfeld, J., Cyr, D.M. and Patterson, C. (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep*, **2**, 885-890.
- Howard, A. and Pelc, S.R.. (1951) Nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res*, **2**, 178-187.
- Ilyin, G.P., Rialland, M., Pigeon, C. and Guguen-Guillouzo, C. (2000) cDNA cloning and expression analysis of new members of the mammalian F-box protein family. *Genomics*, **67**, 40-47.
- Inoue, T., Kamiyama, J. and Sakai, T. (1999) Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem*, **274**, 32309-32317.

Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S. and Nakayama, K. (2000) Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J Biol Chem*, **275**, 25146-25154.

Jansen-Durr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. and Eilers, M. (1993) Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3685-3689.

Jiang, Y., Zhao, R.C. and Verfaillie, C.M. (2000) Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34+ cell proliferation: BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10538-10543.

Johnson, D., Frame, M.C. and Wyke, J.A. (1998) Expression of the v-Src oncoprotein in fibroblasts disrupts normal regulation of the CDK inhibitor p27 and inhibits quiescence. *Oncogene*, **16**, 2017-2028.

Kaldis, P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 284-296.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. and Sherr, C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, **91**, 649-659.

Kato, G. and Maeda, S. (1999) Neuron-specific Cdk5 kinase is responsible for mitosis-independent phosphorylation of c-Src at Ser75 in human Y79 retinoblastoma cells. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 957-961.

Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, C.W., Park, D., Spirin, K.S., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., Wilczynski, S. and et al. (1995) Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res*, **55**, 2266-2269.

Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V. and Pardee, A.B. (1991) Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*, **51**, 3602-3609.

Kipreos, E.T., Lander, L.E., Wing, J.P., He, W.W. and Hedgecock, E.M. (1996) cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell*, **85**, 829-839.

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. and Koff, A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, **85**, 721-732.

Knoblich, J.A. and Lehner, C.F. (1993) Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J*, **12**, 65-74.

Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.

- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*, **294**, 173-177.
- Kohda, D., Terasawa, H., Ichikawa, S., Ogura, K., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Inagaki, F. (1994) Solution structure and ligand-binding site of the carboxy-terminal SH3 domain of GRB2. *Structure*, **2**, 1029-1040.
- Krek, W. (1998) Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 36-42.
- Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I. and Wright, P.E. (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11504-11509.
- Kriwacki, R.W., Wu, J., Tennant, L., Wright, P.E. and Siuzdak, G. (1997) Probing protein structure using biochemical and biophysical methods. Proteolysis, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, high-performance liquid chromatography and size-exclusion chromatography of p21Waf1/Cip1/Sdi1. *J Chromatogr A*, **777**, 23-30.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A. and Harlow, E. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, **11**, 847-862.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I. and Massague, J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, **9**, 639-649.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Li, J., Meyer, A.N. and Donoghue, D.J. (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 502-507.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, **363**, 85-88.
- Li, S., Couvillon, A.D., Brasher, B.B. and Van Etten, R.A. (2001) Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *Embo J*, **20**, 6793-6804.
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. and Xiong, Y. (1994) Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, **9**, 2261-2268.
- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M. and Freedman, L.P. (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*, **10**, 142-153.

- Lowenheim, H., Furness, D.N., Kil, J., Zinn, C., Gultig, K., Fero, M.L., Frost, D., Gummer, A.W., Roberts, J.M., Rubel, E.W., Hackney, C.M. and Zenner, H.P. (1999) Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4084-4088.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431-442.
- Lukas, C., Sorensen, C.S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindenege, C., Peters, J.M., Bartek, J. and Lukas, J. (1999) Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature*, **401**, 815-818.
- Lundberg, A.S., Hahn, W.C., Gupta, P. and Weinberg, R.A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 705-709.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev*, **9**, 935-944.
- Mal, A., Poon, R.Y., Howe, P.H., Toyoshima, H., Hunter, T. and Harter, M.L. (1996) Inactivation of p27Kip1 by the viral E1A oncoprotein in TGFbeta-treated cells. *Nature*, **380**, 262-265.
- Malek, N.P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T.R., Roberts, J.M. and Kyriakidis, T.R. (2001) A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, **413**, 323-327.
- Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P. and Serrano, M. (2001) Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res*, **61**, 6234-6238.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*, **9**, 650-662.
- Matsuoka, S., Thompson, J.S., Edwards, M.C., Bartletta, J.M., Grundy, P., Kalikin, L.M., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Feinberg, A.P. (1996) Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3026-3030.
- Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, **71**, 323-334.
- Millard, S.S., Yan, J.S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H. and Koff, A. (1997) Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem*, **272**, 7093-7098.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F. and Draetta, G.F. (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep*, **1**, 71-79.

- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A. and Pagano, M. (1999) Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev*, **13**, 1181-1189.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-291.
- Morgan, D.O., Kaplan, J.M., Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1989) Mitosis-specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. *Cell*, **57**, 775-786.
- Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R. and Yasuda, H. (2000) Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 1093-1096.
- Morosetti, R., Kawamata, N., Gombart, A.F., Miller, C.W., Hatta, Y., Hirama, T., Said, J.W., Tomonaga, M. and Koefler, H.P. (1995) Alterations of the p27KIP1 gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, **86**, 1924-1930.
- Mou, S. and Linnekin, D. (1999) Lyn is activated during late G1 of stem-cell-factor-induced cell cycle progression in haemopoietic cells. *Biochem J*, **342**, 163-170.
- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tschlis, P.N. and Rosen, N. (1998) Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 29864-29872.
- Muller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W. and Eilers, M. (1997) Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene*, **15**, 2561-2576.
- Muller, D., Thieke, K., Burgin, A., Dickmanns, A. and Eilers, M. (2000) Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *Embo J*, **19**, 2168-2180.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*, **2**, 1133-1138.
- Nakamura, S., Tatuno, I., Noguchi, Y., Kitagawa, M., Kohn, L.D., Saito, Y. and Hirai, A. (1999) 73-kDa heat shock cognate protein interacts directly with P27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, during G1/S transition. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 340-343.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I. and Loh, D.Y. (1996) Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, **85**, 707-720.
- Nguyen, H., Gitig, D.M. and Koff, A. (1999) Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol*, **19**, 1190-1201.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, **211**, 90-98.

O'Hagan, R.C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I.M., Alt, F.W., Kaelin, W.G., Jr. and DePinho, R.A. (2000) Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev*, **14**, 2185-2191.

Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. and Pagano, M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, **15**, 2612-2624.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*, **11**, 961-971.

Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. and Rolfe, M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 [see comments]. *Science*, **269**, 682-685.

Pantoja, C. and Serrano, M. (1999) Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*, **18**, 4974-4982.

Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.

Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-608.

Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1995) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, **267**, 1024-1027.

Patton, E.E., Willems, A.R. and Tyers, M. (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet*, **14**, 236-243.

Perez-Roger, I., Solomon, D.L., Sewing, A. and Land, H. (1997) Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene*, **14**, 2373-2381.

Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K. and Eilers, M. (1994) Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol*, **14**, 4032-4043.

Pietenpol, J.A., Bohlander, S.K., Sato, Y., Papadopoulos, N., Liu, B., Friedman, C., Trask, B.J., Roberts, J.M., Kinzler, K.W., Rowley, J.D. and et al. (1995) Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res*, **55**, 1206-1210.

Pines, J. and Hunter, T. (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, **346**, 760-763.

Pines, J. and Rieder, C.L. (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol*, **3**, E3-6.

Planas-Silva, M.D. and Weinberg, R.A. (1997) The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 768-772.

- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K.A., Kazlauskas, A. and Pendergast, A.M. (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev*, **13**, 2400-2411.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. and Koff, A. (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, **8**, 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. and Massague, J. (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- Puri, P.L., MacLachlan, T.K., Levrero, M. und Giordano, A. (1999) In Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. und Denhardt, D.T. (Hrsg.), *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley & Sons Inc., 15-79.
- Qiu, M., Hua, S., Agrawal, M., Li, G., Cai, J., Chan, E., Zhou, H., Luo, Y. and Liu, M. (1998) Molecular cloning and expression of human gap-2, a novel leukocyte-specific SH2- and SH3-containing adaptor-like protein that binds to gab-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **253**, 443-447.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*, **7**, 1559-1571.
- Reed, S.I. (1997) Control of the G1/S transition. *Cancer Surv*, **29**, 7-23.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. and Reed, S.I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, **14**, 1669-1679.
- Resnitzky, D., Hengst, L. and Reed, S.I. (1995) Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol*, **15**, 4347-4352.
- Resnitzky, D. and Reed, S.I. (1995) Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol*, **15**, 3463-3469.
- Reynisdottir, I. and Massague, J. (1997) The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev*, **11**, 492-503.
- Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J. and Pouyssegur, J. (1996) Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem*, **271**, 18337-18341.
- Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G.F., Pagano, M. and Meloche, S. (2001) p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J*, **20**, 6672-6682.
- Roginskaya, V., Zuo, S., Caudell, E., Nambudiri, G., Kraker, A.J. and Corey, S.J. (1999) Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth. *Leukemia*, **13**, 855-861.

Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 5644-5657.

Roussel, M.F. (1999) The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, **18**, 5311-5317.

Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. and Bowtell, D. (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, **363**, 83-85.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1996a) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex [see comments]. *Nature*, **382**, 325-331.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1996b) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, **3**, 696-700.

Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1998) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature*, **395**, 237-243.

Saha, P., Eichbaum, Q., Silberman, E.D., Mayer, B.J. and Dutta, A. (1997) p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **17**, 4338-4345.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.

Scott, M.T., Morrice, N. and Ball, K.L. (2000) Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21(Waf1/Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem*, **275**, 11529-11537.

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. and Massague, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*, **3**, 400-408.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. and DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, **85**, 27-37.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E. (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*, **11**, 1464-1478.

Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**, 1059-1065.

Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.

Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.

Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.J., Jr., Backer, J.M., Ullrich, A., White, M.F. and et al. (1993) The SH2/SH3 domain-

- containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *Embo J*, **12**, 1929-1936.
- Slingerland, J. and Pagano, M. (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, **183**, 10-17.
- Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.R. and Reed, S.I. (1994) A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 3683-3694.
- Sonenberg, N. and Gingras, A.C. (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 268-275.
- Sparks, A.B., Rider, J.E., Hoffman, N.G., Fowlkes, D.M., Quillam, L.A. and Kay, B.K. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1540-1544.
- Spirin, K.S., Simpson, J.F., Takeuchi, S., Kawamata, N., Miller, C.W. and Koeffler, H.P. (1996) p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res*, **56**, 2400-2404.
- Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A.P., Ryan, A., Krek, T.W. and Reed, S.I. (2001) A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell*, **7**, 639-650.
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mitnacht, S., Bartek, J. and Eilers, M. (1995) Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J*, **14**, 4814-4826.
- Stokoe, D. and McCormick, F. (1997) Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *Embo J*, **16**, 2384-2396.
- Strohmaier, H., Spruck, C.H., Kaiser, P., Won, K.A., Sangfelt, O. and Reed, S.I. (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*, **413**, 316-322.
- Sugiyama, Y., Tomoda, K., Tanaka, T., Arata, Y., Yoneda-Kato, N. and Kato, J. (2001) Direct binding of the signal-transducing adaptor Grb2 facilitates down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J Biol Chem*, **276**, 12084-12090.
- Sun, J., Marx, S.O., Chen, H.J., Poon, M., Marks, A.R. and Rabbani, L.E. (2001) Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation*, **103**, 2967-2972.
- Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. and Krek, W. (1999) p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 207-214.
- Takizawa, C.G. and Morgan, D.O. (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 658-665.
- Takuwa, N., Fukui, Y. and Takuwa, Y. (1999) Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19**, 1346-1358.

- Tautz, D. and Renz, M. (1983) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem*, **132**, 14-19.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N. and Kato, J.Y. (2002) The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem*, **277**, 2302-2310.
- Tomoda, K., Kubota, Y. and Kato, J. (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, **398**, 160-165.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M. and Nishida, E. (1998) Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *Embo J*, **17**, 2728-2735.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**, 67-74.
- Tsai, L.H., Harlow, E. and Meyerson, M. (1991) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, **353**, 174-177.
- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H. and Zhang, H. (1999) p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol*, **9**, 661-664.
- Tyers, M. and Jorgensen, P. (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 54-64.
- van der Geer, P. and Hunter, T. (1993) Mutation of Tyr697, a GRB2-binding site, and Tyr721, a PI 3-kinase binding site, abrogates signal transduction by the murine CSF-1 receptor expressed in Rat-2 fibroblasts. *Embo J*, **12**, 5161-5172.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Rijksen, G. and Vroom, T.M. (1997) Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol*, **183**, 195-203.
- Vidal, A. and Koff, A. (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, **247**, 1-15.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.
- Vlach, J., Hennecke, S. and Amati, B. (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J*, **16**, 5334-5344.
- Wang, Q.M., Studzinski, G.P., Chen, F., Coffman, F.D. and Harrison, L.E. (2000) p53/56(lyn) antisense shifts the 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced G1/S block in HL60 cells to S phase. *J Cell Physiol*, **183**, 238-246.
- Wei, N., Tsuge, T., Serino, G., Dohmae, N., Takio, K., Matsui, M. and Deng, X.W. (1998) The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol*, **8**, 919-922.

- Weinert, T. (1997) Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv*, **29**, 109-132.
- Welch, P.J. and Wang, J.Y. (1993) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*, **75**, 779-790.
- Weng, L.P., Brown, J.L. and Eng, C. (2001) PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*, **10**, 599-604.
- Winston, J.T., Koepp, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol*, **9**, 1180-1182.
- Won, K.A. and Reed, S.I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J*, **15**, 4182-4193.
- Xaus, J., Comalada, M., Cardo, M., Valledor, A.F. and Celada, A. (2001) Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood*, **98**, 2124-2133.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704.
- Yan, Y., Frisen, J., Lee, M.H., Massague, J. and Barbacid, M. (1997) Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev*, **11**, 973-983.
- Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A. and Kornbluth, S. (1998) Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev*, **12**, 2131-2143.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L.P. and Sonenshein, G.E. (2001) Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*, **20**, 1688-1702.
- Yaroslavskiy, B.B., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Alber, S.M., Bradbury, N.A. and Steinman, R.A. (2001) p27Kip1 localizes to detergent-insoluble microdomains within lymphocyte membranes. *Mol Med*, **7**, 49-58.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Kharbanda, S. and Kufe, D. (1996) Interaction of cyclin-dependent kinase 2 and the Lyn tyrosine kinase in cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Oncogene*, **13**, 939-946.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zeng, Y., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J. and Kanaide, H. (2000) Minimal requirements for the nuclear localization of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**, 37-42.

- Zhang, H., Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*, **8**, 1750-1758.
- Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell*, **4**, 897-906.
- Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A. and Elledge, S.J. (1997) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, **387**, 151-158.
- Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1999) p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev*, **13**, 213-224.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W. and Pavletich, N.P. (2002) Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, **416**, 703-709.
- Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M. and McIntosh, J.R. (1980) Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res*, **126**, 397-405.

Danksagung

Herrn Dr. Ludger Hengst danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, für die Überlassung des Themas und die allzeitige Diskussionsbereitschaft sowie die, für das Gelingen der Arbeit wichtigen Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Schartau für seine Betreuung und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät, ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Lottspeich und Herrn Dr. Josef Kellermann danke ich für Rat und Tat bei der Identifikation von Proteinen über Massenspektroskopie und für die Hilfe bei der Etablierung der 2-D-Gelelektrophorese. Desweiteren gilt Marcus Buschbeck besonderer Dank für das Licht, das er in die dunklen Wege der Signaltransduktion gebracht hat.

Schließlich Dank an die endemische Bevölkerung des 'Bauteils L' am MPI:

Der AG Fischer für ihre jahrelangen Heuschrecken-gleichen Aktivitäten. Insbesondere Gunter („Erfolg fängt bei der Nahrungsaufnahme an“) für seine Hilfe/die kleinen alltäglichen Boshaftigkeiten und Utz für dessen ständige Diskussions-/Lästerbereitschaft.

Der AG Melchior für ihre „geschwisterliche“ Anteilnahme:

Besonders Marion für ihre Geduld/Resignation?, Floh („Tobias“, „Fritz“) für seine Geschichten vom Flughafen und von der Wohnungssanierung sowie Kaska für ihren Schnellkursus in Polnisch.

Der AG Hengst:

Sonja („Shakira“) dafür, daß eine Dr.-Arbeit auch mal ein Wechselbad der Gefühle darstellen darf. Ansgar, „Ansi“, „Dr. med. A.R.“) für die gemeinsam verbrachten unvergesslichen Stunden im Isolab und für die Hilfe bei der Mikroinjektion, sowie Irina („Die Wieselflinke“) für ihre einzigartige Weise, Dinge behend auf den Punkt zu bringen. Basil („Dschuranga“) für die Unruhe, die er in die Herde (besonders die weibliche) gebracht hat und schließlich Raffaella für ihre italienische Lebensphilosophie und die gute Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Uli („Winz-Zigeuner-Troubadour“) und Michael („Watson“) ohne deren Hilfe diese Arbeit schlicht nicht möglich gewesen wäre. Selbiges gilt für Tanja-, „Ich bin n i c h t schwierig!!!!“ und Gerrit („Jerry“) für ihren unermüdlichen Einsatz zur Bekämpfung/Förderung?? aufkeimender Depression und Demenz.

Allenthalben Dank an alle, die zu dieser Arbeit auf mehr oder minder fachbezogene Art beigetragen haben oder mir klargemacht haben, daß es auch noch ein Leben neben der Promotion gibt.

„Muß!“

Lebenslauf

Matthias Josef Grimmmler

geboren am	31. Juli 1972
Eltern	Erwin Grimmmler und Hannelore Grimmmler, geb. Geyer
1979-1983	Bürgermeister-Prandl-Volksschule in Penzberg
1983-1992	mathe.-nat. Gymnasium Penzberg
1992	Allgemeine Hochschulreife
1992-1998	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1994	Vordiplom
1998	Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität in der Abteilung Biologie II und an der Universität Osnabrück unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Wieczorek Thema: Promotorstruktur der für V-ATPase-Untereinheiten kodierenden Gene des Tabakswärmers <i>Manduca sexta</i>
1998-2002	Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Schartau Thema: Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27 ^{Kip1}

Caminante, no hay camino
Se hace camino al andar.

Antonio Machado