

**Identifikation und Charakterisierung von neuen
Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p57^{Kip2}**

Dissertation

der Fakultät Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Sonja Birgit Weiß

München, 8. September 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.1999 bis zum 08.09.2003 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 sowie der Firma Roche (Penzberg) finanziert.

Referent: Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop

Koreferent: Prof. Dr. Charles David

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2003

Meinen Lieben

Nicht alle Träume werden wahr,

aber jeden Tag kommt ein neuer Morgen und ein Vogel singt im Baum.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	19
2	Einleitung.....	21
2.1	Prinzipien des eukaryontischen Zellzyklus.....	21
2.2	Cyclin-abhängige Kinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation.....	23
2.3	Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt über verschiedene Mechanismen.....	25
2.3.1	Die Regulation der Cyclinuntereinheit der CDKs.....	26
2.3.2	Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen.....	27
2.3.3	Die Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen.....	29
2.3.3.1	Die INK4-Familie.....	29
2.3.3.2	Die Cip/Kip-Familie.....	30
2.4	Funktion und Regulation der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}.....	33
2.5	Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors p57^{Kip2}.....	37
2.5.1	Die p57-Expression variiert während des Zellzyklus.....	37
2.5.2	p57 zeigt einen strukturell komplexeren Aufbau als p21 und p27.....	38
2.5.3	Einzig bei p57 ist ein Funktionsverlust spezifisch mit einem Krankheitsbild assoziiert.....	40
2.5.4	p57 hat unterschiedliche Funktionen in der Zelle.....	41
2.5.5	Die p57-Regulation wird über Signale aus unterschiedliche Pathways gesteuert.....	43

2.6	Zellzyklus in Hefe.....	44
2.7	Aufgabenstellung.....	47
3	Material und Methoden.....	48
3.1	Material.....	48
3.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	48
3.1.2	Sonstige Materialien.....	48
3.1.2.1	Radiochemikalien.....	48
3.1.2.2	Materialien zur Filtration und Dialyse.....	49
3.1.2.3	Chromatographische Matrices und fertig gepackte Chromatographiesäulen.....	49
3.1.2.4	Molekulargewichts- und Längenstandards.....	49
3.1.2.5	Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)......	50
3.1.2.6	Verbrauchsmaterial.....	50
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	51
3.1.4	Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur.....	53
3.1.4.1	Medienbestandteile und Medienzusätze.....	53
3.1.4.2	Medienzusammensetzung.....	54
3.1.5	Medien für die Bakterienkultur.....	54
3.1.6	Medien für die Hefekultur.....	55
3.1.7	Antikörper.....	55
3.1.8	DNA-Oligonukleotide.....	56
3.1.9	Plasmide.....	58
3.1.10	Bakterien- und Hefestämme.....	59
3.1.11	Eukaryontische Zelllinien.....	59
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	60
3.2.1	Methoden zur Nukleinsäurechemie.....	60
3.2.1.1	Nukleinsäure-Fällung.....	60

3.2.1.2	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	60
3.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen.....	60
3.2.1.4	Restriktionsspaltung von DNA.....	61
3.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	62
3.2.1.6	Glätten überhängender DNA-Enden.....	62
3.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	63
3.2.1.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	63
3.2.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	63
3.2.1.10	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger <i>et al.</i> , 1977).....	64
3.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion.....	64
3.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	65
3.2.2.1	Herstellung chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i>	65
3.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen.....	66
3.2.2.3	Transformation elektrokompeter Bakterienzellen.....	66
3.3	Hefegenetische Methoden.....	67
3.3.1	„yeast two hybrid“-System.....	67
3.3.1.1	Das Prinzip.....	67
3.3.1.2	Amplifikation einer <i>S. cerevisiae</i> -Genbank.....	68
3.3.1.3	Transformation einer Genbank in Hefezellen.....	69
3.3.2	Transformation von Hefezellen im kleinen Maßstab.....	69
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	70
3.3.4	Herstellung stabiler Transformanten in <i>S. cerevisiae</i> und experimentelle Genzerstörung („gene disruption“)......	71
3.4	Zellbiologische Methoden.....	72
3.4.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	72
3.4.2	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen.....	72
3.4.3	Durchflußzytofluorimetrie (FACS-Analyse).....	73
3.4.4	Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen.....	73
3.4.5	Transaktivierungsassay.....	75
3.4.6	Bestimmung von Reporter-genaktivitäten.....	75

3.5	Biochemische Methoden.....	76
3.5.1	Grundlegende Standardmethoden.....	76
3.5.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	76
3.5.1.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	76
3.5.2	Präparation von Gesamt-Zellysaten.....	77
3.5.3	Gekoppelte <i>in-vitro</i> -Transkription und -Translation von Proteinen.....	78
3.5.4	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	78
3.5.5	Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen.....	79
3.5.5.1	Native Reinigung von Proteinen über Nickel-Chelat- oder Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie.....	79
3.5.5.2	Denaturierende Reinigung von Proteinen über Nickel-Chelat- oder Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie.....	80
3.5.6	Ionenaustauscherchromatographie.....	81
3.5.7	Gelfiltration.....	82
3.5.8	<i>In vitro</i> -Protein-Protein-Bindungsstudien.....	82
3.6	Immunologische und immunobiochemische Methoden.....	83
3.6.1	Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern.....	83
3.6.2	Immunopräzipitation von Proteinen.....	84
3.6.3	Immunozytologie.....	84
3.6.4	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	85
4	Ergebnisse.....	87
4.1	Etablierung eines funktionellen Hefe-Screens zur Identifizierung CKI-regulierender Faktoren.....	87
4.1.1	Prinzip des funktionellen Hefe-Screens.....	87
4.1.2	p27 hat sehr gute strukturelle Voraussetzungen für die Inhibition der Hefe-CDK.....	89
4.1.3	Episomale p27-Expression bedingt eine Wachstumsretardierung in <i>S. cerevisiae</i>	91

4.1.4	Stabile Expression von p21 und p27 arretiert das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i>	93
4.1.5	Erste Screening-Runden mit der HepG2-Genbank.....	96
4.2	Identifikation neuer Bindungspartner von p57 im „yeast two hybrid“- -Screen.....	98
4.2.1	p57-Interaktoren aus dem „yeast two hybrid“-Screen.....	100
4.2.2	Cycline und CDKs.....	101
4.2.3	FHL2, ein p57-interagierendes Protein mit mehreren LIM-Domänen.....	102
4.2.4	Cyclophilin B, Zyxin und Siah2.....	103
4.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen FHL2 und p57.....	104
4.3.1	FHL2 bindet p57, nicht aber p21 oder p27.....	104
4.3.2	<i>In vitro</i> -translatiertes p57 bindet FHL2.....	106
4.3.3	p57 bindet FHL2 endogen unter physiologischen Bedingungen.....	108
4.3.4	FHL2 bindet <i>in vitro</i> am N- und C-Terminus von p57.....	110
4.3.5	Mehrere Bindestellen auf FHL2 für p57.....	112
4.3.6	Die FHL2-p57-Interaktion <i>in vitro</i>	113
4.3.7	FHL2 und p57 kolokalisieren im Zellkern.....	117
4.3.8	p57 zeigt einen verstärkenden Einfluß auf die Koaktivatorfunktion von FHL2.....	120
4.3.9	FHL2 hebt eine durch p57 induzierte G ₁ -Arretierung der Zellen auf.....	122
5	Diskussion.....	126
5.1	Identifikation neuer Interaktionspartner von p57^{Kip2}.....	126
5.1.1	Interagierende Proteine aus dem „yeast two hybrid“-System.....	128
5.1.2	FHL2 und p57 als Interaktionspartner im „yeast two hybrid“-System.....	129
5.1.3	p57 und FHL2 als Interaktionspartner <i>in vivo</i>	131
5.1.4	Die p57-FHL2-Interaktion erfolgt über mehrere Bindestellen.....	132

5.2	Funktion der p57-FHL2-Interaktion.....	134
5.2.1	p57 und FHL2 kolokalisieren ohne wechselseitige Beeinflussung im Kern...	134
5.2.2	Untersuchung des Effektes von FHL2 auf die inhibitorische Aktivität von p57 <i>in vitro</i>	138
5.2.3	Ist p57 an transkriptioneller Aktivierung beteiligt?.....	139
5.2.4	FHL2 wirkt über p57 auf das Zellzyklusgeschehen ein.....	142
6	Literatur.....	145
7	Anhang.....	165

Abkürzungen

A	Ampère
A	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	engl.: alternative reading frame
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
cDNA	engl.: complementary-DNA
CIAP	engl.: calf intestine alkaline phosphatase
Ci	Curie
cpm	Zählereignisse pro Minute (engl.: counts per minute)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Da	Dalton
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes 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>	<i>Escherichia</i>
ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	engl.: expressed sequence tag

FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAG	Proteinsequenz DYKDDDDK
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HA	Haematoglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
k	Kilo-
KAc	Kaliumazetat
Ko-IP	Koimmunopräzipitation
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mRNA	Boten (engl.: messenger)-Ribonukleinsäure
n	Nano-
N-Terminus	Amino-Terminus
NaAc	Natriumazetat
NES	engl.: nuclear export sequence
NLS	engl.: nuclear localization sequence
NP-40	Nonidet P-40, nichtionisches Detergens
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen auf der mRNA (engl.: open reading frame)
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 (engl.: polymerase chain reaction)
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop der Massenzahl 35
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SB	Superbroth
SD	Synthetisches Hefemedium (engl.: synthetic complete)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
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
V	Volt

Ein-/Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen der Gene und ihrer Produkte

ACT	engl.: activator of CREM in testis
Akt	Proteinkinase B; Serin-Threonin-spezifische Proteinkinase
CAK	engl.: cyclin-dependent kinase activating kinase
Cdc	engl.: cell division cycle
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Cip1	engl.: CDK-interacting protein 1
CKI	CDK-Inhibitor
Cln	G ₁ -Typ Cyclin der Hefe
Clb	B-Typ Cyclin der Hefe
CREB	engl.: cAMP-responsive element binding protein
CREM	engl.: cAMP-responsive element modulator
Ctk1	Cyclin-abhängige Proteinkinase aus <i>S. cerevisiae</i>
E1A	Adenovirus 1A
Far1	CKI aus <i>S. cerevisiae</i>
FHL2 (1, 3, 4)	engl.: four and a half LIM-domain protein 2 (1, 3, 4)
GFP	engl.: green fluorescent protein
Grb2	engl.: growth factor receptor-bound protein 2

GST	Glutathion-S-Transferase
H1	Histon H1
HA	Hämatoglutinin
hCDC47	engl.: human cell division cycle protein 47
hNP220	engl.: human DNA-binding nuclear protein 220
IGF-II	engl.: insulin-like growth factor-II
IL-2	Interleukin-2
INK	engl.: inhibitor of CDK4
Jab1	engl.: Jun activation domain-binding protein 1
Kip1	engl.: kinase-inhibitory protein 1
Kip2	engl.: kinase-inhibitory protein 2
LIM	Proteindomäne, erstmalig charakterisiert in den Proteinen Lin-11, Isl-1 und Mec-3
MTS1	Multipler Tumorsuppressor 1
Myt1	membranabhängige Kinase
PCNA	engl.: proliferating cell nuclear antigen
RanGAP	engl.: Ras-like nuclear G protein-GTPase activating protein
pRB	Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein
Pho80	Cyclin-abhängige Kinase des Phosphatstoffwechsels aus <i>S. cerevisiae</i>
Pho81	Kinase-Inhibitor des Phosphatstoffwechsels aus <i>S. cerevisiae</i>
Pho85	Cyclin-Untereinheit zu Pho80 aus <i>S. cerevisiae</i>
Pin1	engl.: prolyl-isomerase 1
PLZF	engl.: promyelocytic leukemia zinc finger protein
PSTAIRE	Primärstrukturmotiv Cyclin-abhängiger Kinasen
Sic1	CKI aus <i>S. cerevisiae</i>
Siah1(2)	engl.: seven in absentia human protein 1(2)
SINA	engl.: seven in absentia from <i>Drosophila</i>
SKP1(2)	engl.: S-phase kinase associated protein 1(2)
Sp1	Transkriptionsfaktor
Src	Tyrosin-Kinase
Ssn3	Cyclin-abhängige Proteinkinase aus <i>S. cerevisiae</i>

TGF- β	engl.: transforming growth factor β
TRAF2	engl.: tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
v-myc	engl.: v- <i>myc</i> avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Waf1	engl.: wildtype p53-activated fragment 1
WEE1	Tyrosinkinase, homolog zur wee1-Kinase von <i>S. pombe</i>
YFP	engl.: yellow fluorescent protein

1 Zusammenfassung

Verschiedene Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDKs) nehmen bei der Steuerung der Phasenübergänge im eukaryontischen Zellzyklus eine Schlüsselposition ein. Die korrekte zeitliche Abfolge und Koordination dieser Ereignisse sicherzustellen erfordert eine gezielte Regulation der CDK-Aktivitäten durch mehrere komplexe Mechanismen. Negative Regulatoren sind dabei die CDK-Inhibitorproteine (CKIs), die als Antwort auf regulatorische Signale mit den CDKs komplexieren, deren Aktivität vermindern und so den Fortgang des Zellzyklus unterbinden. Der Inhibitor p57^{Kip2} bindet bevorzugt an CDKs, die in den Übergang von der G₁- zur S-Phase involviert sind, weshalb seine intrazelluläre Konzentration entscheidend für die Aktivität dieser Kinasen ist. So führt eine erhöhte Menge von p57^{Kip2} zur verstärkten Inaktivierung der CDK-Komplexe der G₁-Phase und verhindert damit die Initiation der S-Phase, wohingegen ein Funktionsverlust oder eine reduzierte p57^{Kip2}-Expression häufig in verschiedenen Tumorgeweben zu finden ist.

Ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der p57^{Kip2}-Menge und -Aktivität am G₁/S-Übergang ist die Bindung an regulatorische oder degradierende Proteine. Zur Identifizierung und Charakterisierung solcher Interaktionen wurde in dieser Arbeit zum einen ein Analysesystem in Hefe entwickelt, mit dem sich neue Proteine identifizieren lassen, die die inhibitorische Aktivität von p57^{Kip2} oder seinen verwandten Cip/Kip-Proteinen p21^{Cip1} und p27^{Kip1} aufheben können. Darüberhinaus ließ sich über einen auf dem „two hybrid“-Prinzip basierenden Hefe-Interaktionsscreen das LIM-Domänenprotein FHL2/DRAL als Bindepartner für p57^{Kip2} identifizieren und die Interaktion auch nach Überexpression in humanen Zellen und *in vitro* mit rekombinanten Proteinen bestätigen. Anhand von Koimmunopräzipitationen in 293T-Zellen mit gleichfalls überexprimiertem p21^{Cip1} und p27^{Kip1} sowie in Bindungsassays nach *in vitro*-Translation zeigte sich die Spezifität der FHL2-p57^{Kip2}-Bindung. FHL2 ist bislang als Kofaktor des Androgen-Rezeptors bekannt und hier an dessen transkriptioneller Aktivierung beteiligt. Des Weiteren wurde FHL2 als Bindepartner verschiedener Integrine und anderer Proteine aus unterschiedlichen Pathways beschrieben. Interessanterweise wird FHL2 ebenso wie p57 bevorzugt in Herzgewebe exprimiert.

Bei der Untersuchung von Art und Funktion der Wechselwirkung mit FHL2 konnte erstmalig für p57^{Kip2} in menschlichen Kardiomyozyten die Komplexbildung mit einem zellulären Bindepartner *in vivo* nachgewiesen werden. In detaillierten Studien zur Ermittlung der Interaktionsstelle ließ sich zeigen, daß die Bindung sowohl über den amino- als auch über den carboxyterminalen Proteinbereich von p57^{Kip2} erfolgen kann. Auf Seiten von FHL2 vermitteln die LIM-Domänen ¹/₂-1, 2-3 oder 2-4 die Komplexbildung.

Immunfluoreszenzstudien mit an YFP-fusioniertem p57-Protein konnten zum ersten Mal die spezifisch auf den Zellkern beschränkte Expression von p57^{Kip2} demonstrieren, wobei sich seine Lokalisation auch nach gleichzeitiger Expression von FHL2, das sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch exprimiert wird, nicht änderte.

Mittels Reporterstudien wurde der Einfluß von p57^{Kip2} auf die Koaktivatorfunktion von FHL2 für den Androgen-Rezeptor in 293T-Zellen hin untersucht. Transiente Transfektion von FHL2 gleichzeitig mit p57^{Kip2} führte zu einer Verstärkung der Androgen-Rezeptor-Aktivität auf das 2,5-fache gegenüber dem 1,4-fachen bei äquivalenten Mengen FHL2 alleine. Allerdings konnte auch für p57^{Kip2} eine Aktivierung des Reportergens auf die 1,2-fache Signalstärke beobachtet werden, was für p57^{Kip2} eine mögliche Funktion als transkriptioneller Aktivator nahelegt.

Um die physiologische Bedeutung der Wechselwirkung zwischen p57^{Kip2} und FHL2 weiter zu analysieren, wurde durchflußzytometrisch ermittelt, ob und wie transiente Expression von FHL2 den Zellzyklus in Abhängigkeit von p57^{Kip2} verändert. Die Zahl der Zellen in G₁ nimmt dabei für p57^{Kip2} im Vergleich zur Kontrolle um 37% zu, wohingegen sie sich für FHL2 um etwa ¹/₁₀ verringert. Koexpression von FHL2 mit p57^{Kip2} hebt die durch p57^{Kip2} induzierte G₁-Arretierung der Zellen nahezu vollständig auf, so daß die Zellen wieder in die S-Phase übertreten können und den Zyklus fortsetzen. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, daß FHL2 regulatorisch über p57^{Kip2}, möglicherweise infolge einer sterischen Blockade der CDK-Inhibitionsdomäne oder durch Sequestrierung von p57^{Kip2}, auf den Zellzyklus einwirkt.

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. Mitose und Synthesephase werden zeitlich und funktionell durch zwei sogenannte „gap“-Phasen voneinander getrennt: die präreplikative G_1 -Phase und die prämitotische G_2 -Phase. 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 spezifische Kontrollpunkte, sogenannte „checkpoints“, einen zeitlich korrekten und irreversiblen Ablauf des Zyklus. Beispielsweise stellt der „DNA replication checkpoint“ sicher, daß die Mitose erst erfolgen kann, wenn die Replikation der DNA abgeschlossen ist und keine Schädigung der DNA vorliegt. 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. Solche speziellen Kontrollpunkte reagieren auf DNA-Schäden mit dem Anhalten des Zellzyklus in der G_1 - oder G_2 -Phase oder einer Retardierung der S-Phase. Sie ermöglichen somit 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, sog. Stammzellen, 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 wird, wieder in den Zellzyklus eintreten. Eine Deregulation der sorgsam aufeinander abgestimmten Maschinerie der Zellteilung führt zu einer unkontrollierten Teilung der Zelle. Ein solches dereguliertes Zellwachstum ist ein prinzipielles Charakteristikum hyperproliferativer Erkrankungen wie es beispielsweise in allen Tumorgeweben vorliegen kann.

Die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt, ist je nach Zelltyp oder Zelllinie von der Präsenz verschiedener mitogener und antimitogener Faktoren abhängig (z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Signale durch Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakt). Empfänglich für diese Faktoren sind die Zellen jedoch nur, solange sie sich vor dem sogenannten Restriktionspunkt (R) in der späten G_1 -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 G_0 -Phase oder Quieszenz, überzugehen. Bei Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren können diese G_0 -Zellen wieder in die G_1 -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 G_1 -Phase. Schließlich gibt es in vielzelligen Organismen viele Zellen, die ihr proliferatives Potential eingebüßt haben. Es sind hochspezialisierte, terminal differenzierte Zellen wie beispielsweise Neuronen, 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 (Pines und Rieder, 2001; Ekholm und Reed, 2000; Morgan, 1997; Planas-Silva und 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.

Ohne die Bindung einer regulatorischen Untereinheit aus der Proteinfamilie der Cycline sind CDKs katalytisch inaktiv. Um aktiv vorzuliegen, müssen sie daher zunächst einen spezifischen Cyclin/CDK-Komplex bilden und darüberhinaus noch durch gezielte Phosphorylierung aktiviert werden. Die intrazellulären Konzentrationen vieler Cycline unterliegen während des Zellzyklus dramatischen Schwankungen. Diese Oszillation der Cyclin-Menge im Verlauf eines Zyklus 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 Zellzyklusphasenübergänge in den jeweiligen 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 etwa 100 Aminosäuren, die sogenannte Cyclin-Box, die für die Bindung und Aktivierung der 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, B, ... bis H, K und 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 (Morgan, 1997; Oelgeschlager, 2002).

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 und Roberts, 1999). D-Cycline binden und aktivieren Cdk4 und Cdk6. Im Gegensatz zu den anderen Cyclinen findet die Komplexbildung von D-Typ-Cyclinen mit der Kinase nicht spontan statt, sondern erfordert zum einen Stimulation durch mitogene Signale und zum anderen zusätzlich eine Reihe sog. „assembly“-Faktoren. Dabei kann es sich beispielsweise um p21 handeln, das in der Lage ist, INK4-Moleküle aus einem bestehenden Cyclin D/Cdk4-Komplex zu verdrängen und so deren inhibitorische Effekte aufzuheben (Parry *et al.*, 1999; Ekholm und Reed, 2000).

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 und 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 die Cyclin A/CDK-

Aktivität essentiell (Furuno *et al.*, 1999; Knoblich und Lehner, 1993; Pagano *et al.*, 1992).

Cyclin B akkumuliert dagegen später als Cyclin A in der Zelle (Pines und Hunter, 1990) und bildet zusammen mit Cdk1 einen Komplex, der auch als „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 und Rieder, 2001).

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

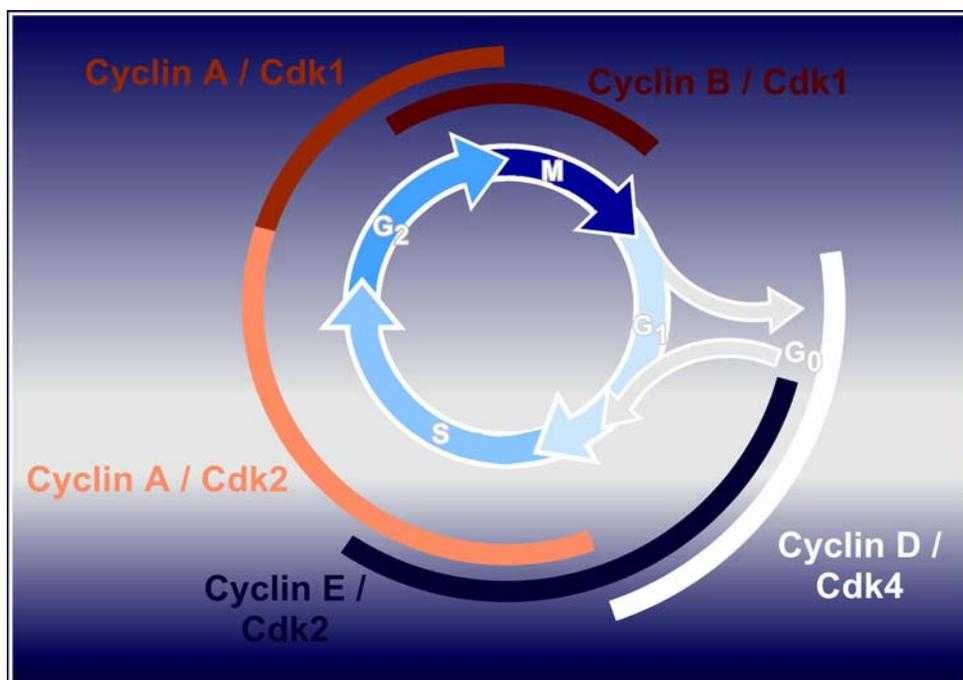


Abb. 2.1: Modell zur Regulation des Zellzyklus durch die oszillierende Aktivität unterschiedlicher Cyclin/CDK-Komplexe.

2.3 Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt über verschiedene Mechanismen

Treibender Motor des Zellzyklus ist die zeitlich streng regulierte Abfolge der Aktivierung unterschiedlicher Cyclin/CDK-Komplexe. Unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung und Inaktivierung erlauben dabei die gezielte Steuerung von Komplexmenge und -aktivität. Neben der zellzyklusphasenabhängigen Verfügbarkeit der spezifischen Cyclin-Untereinheiten, spielen aktivierende und inhibierende

Phosphorylierungen der CDK-Untereinheit, sowie Änderungen in der intrazellulären Lokalisation oder Abbau eine große Rolle. Eine spezielle Regulation erfährt die Aktivität der Kinasen darüberhinaus durch ihre Interaktion mit inhibitorisch wirkenden Proteinen, den sogenannten „cyclin-dependent kinase inhibitors“ (CKIs).

2.3.1 Die Regulation der Cyclin-Untereinheit der CDKs

Durch die kontrollierte Synthese und den kontrollierten Abbau der Cyclin-Untereinheiten 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 und Reed, 2000). Daneben wird eine translationale Induktion der D-Cycline über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg diskutiert (Muisse-Helmericks *et al.*, 1998; Sonenberg und Gingras, 1998; Takuwa *et al.*, 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 und Roberts, 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).

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 und 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 Adapteruntereinheiten, die spezifische Substrate für den SCF-Komplex rekrutieren, wobei die Interaktion zwischen F-Box-Protein und Substrat von dessen Phosphorylierungszustand abhängig sein kann (Patton *et al.*, 1998; Tyers und 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 und Rieder, 2001; Tyers und Jorgensen, 2000; Zachariae und 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 darüberhinaus 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 konnte bislang keine regulatorische Funktion nachgewiesen werden. 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 aufgeklärt (Takizawa und 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 und 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 und 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 Leucin-reiche, 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 und Hannon, 1998; Hengst und 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 und Reed, 2000; Roussel, 1999; Sherr und 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 multipler Tumorsuppressor (MTS1) qualifiziert. Allerdings betreffen die Mutationen auch den überlappenden Genlocus von p14^{ARF}/p19^{ARF}, eines Proteins, das über HDM2/MDM2 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.*, 1996). p16 akkumuliert allerdings 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, wobei Inhibitoren der Cip/Kip-Familie von Cdk4- und Cdk6-Komplexen zu Cdk2-Komplexen wechseln (Hannon *et al.*, 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 läßt (Roussel, 1999). Die Redundanz der CKIs untereinander wird weiterhin an p18-p27-Doppel-„knock out“-Mäusen deutlich, die im Vergleich mit p18- oder p27-defizienten Mäusen eine sieben- bzw. zweifach vergrößerte Hypophyse ausbilden (Lloyd *et al.*, 2002). Der gleichzeitige „knock out“ von p21 und p27 in Mäusen führt zu einer synergistischen Vergrößerung der Ovarien durch Hyperplasie. Der Verlust von p21 gleichzeitig mit p27 verlängert die proliferative Lebensspanne der Granulomzellen in den Ovarien, die normalerweise beim Eintritt in die Differenzierung hohe Mengen dieser beiden CDK-Inhibitoren exprimieren (Jirawatnotai *et al.*, 2003).

2.3.3.2 Die Cip/Kip-Familie

Charakteristisch für alle Mitglieder der Cip/Kip-Familie, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}, ist ihre Sequenzhomologie im Bereich des N-Terminus. Über diese konservierte aminoterminal Domäne („CDK inhibition domain“) erfolgt die Bindung und Inhibition ihrer Substrate. Im Unterschied zu den Inhibitoren der INK4-Familie, die lediglich mit Cdk4 und Cdk6 interagieren, zeigen die Cip/Kip-Proteine ein weites Substratspektrum: so können *in vitro* nahezu alle bekannten CDKs, wie Cdk1 bis 6, inhibieren wobei Cdk5 durch das Neuron-spezifische Protein p35 inhibiert wird, das nicht zur Klasse der Cycline gehört (Ko *et al.*, 2001). Die Aktivität von Cdk7, Cdk8 und Cdk9 hingegen ist

nicht über Cycline regulierbar. entscheidend ist hierbei jedoch, daß nur an den vollständigen Komplex aus Cyclin und Kinase gebunden wird und sich somit der Inhibitionsmechanismus deutlich von demjenigen der INK4-Familie unterscheidet.

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 aminoterminal Bereich der Inhibitor-domäne von p27 bindet die konservierte Cyclin-Box von Cyclin A, ohne die Cyclin A-Struktur wesentlich zu beeinträchtigen (Abb. 2.2). Der carboxyterminale Bereich der Inhibitor-domäne interagiert mit der aminoterminalen Domäne von Cdk2 und verändert deren Konformation. Zusätzlich ragt der Inhibitor in das aktive Zentrum hinein, wo er die ATP-Bindestelle blockiert.

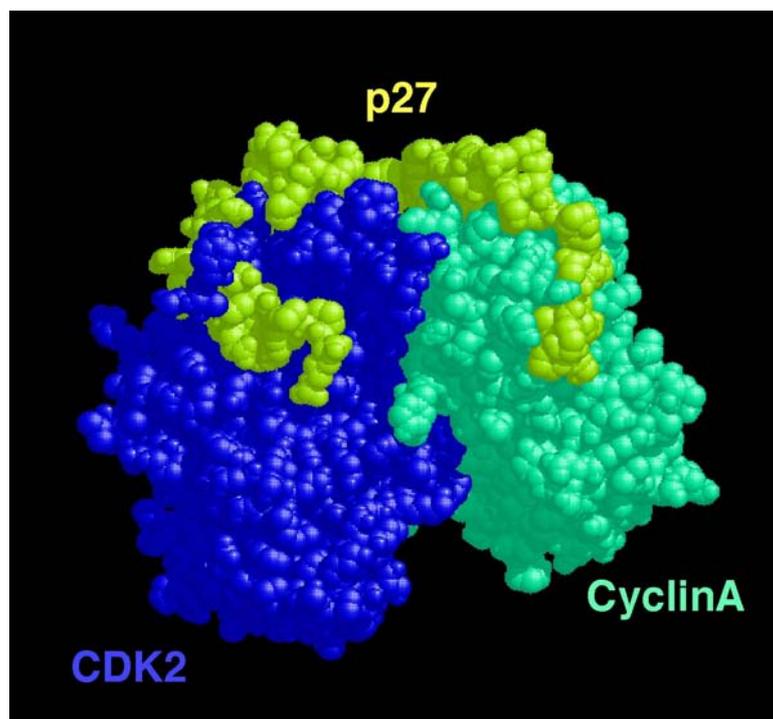


Abb. 2.2: Struktur der Inhibitor-domäne von p27 komplexiert mit dem carboxyterminalen Proteinteil von Cyclin A/Cdk2 (nach Russo *et al.*, 1996a)

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 und Reed, 2000). Aus biochemischen Untersuchungen geht hervor, daß im Falle von p57 die Cyclin- und CDK-Bindedomäne allein nicht ausreicht, um den Cyclin A- oder E-

Komplex mit Cdk2 zu inhibieren. Vielmehr konnten Hashimoto *et al.* (1998) die 3₁₀-Helixregion in p57 als ein Strukturmotiv identifizieren, das für die Kinaseinhibition unabkömmlich ist. Werden innerhalb dieser Region Mutationen eingeführt, so verliert p57 vollständig die Fähigkeit *in vivo*, den Zellzyklus in G₁ anzuhalten. Über diesen Mechanismus, wird vermutet, kann p57 im Gegensatz zu p21 und p27 seine spezifischen regulatorischen Funktionen wahrnehmen.

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 und Reed, 1998).

Paradoxerweise können Cip/Kip-Proteine Cyclin-abhängige Kinasen auch aktivieren. p27 inhibiert Cyclin D/Cdk4-Komplexe *in vitro* weniger effizient als Cyclin/Cdk2-Komplexe (Blain *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). Außerdem fördern Cip/Kip-Proteine *in vitro* die Bildung katalytisch aktiver Cyclin D/Cdk4-Komplexe (LaBaer *et al.*, 1997). Dies führte zu der Vermutung, daß Cip/Kip-Proteine auch *in vivo* als sog. „assembly“-Faktoren die Bildung aktiver Cyclin D/Cdk4 (und Cdk6)-Komplexe fördern könnten. Für diese Hypothese spricht, daß Fibroblasten von „knock out“-Mäusen, die weder p21 noch p27 exprimieren, keine detektierbaren Mengen an Cyclin D/CDK-Komplexen aufweisen (Cheng *et al.*, 1999). Möglicherweise dienen Cyclin D/CDK-Komplexe als Reservoir für p21 und p27 und machen so aktive CKI/Cyclin D/CDK-Komplexe biologisch sinnvoll, indem diese Komplexe Cip/Kip-Proteine von Cdk2 fernhalten können. Bei einer Induktion von INK4-Proteinen werden p21 bzw. p27 aus den Cyclin D/CDK-Komplexen verdrängt. Sie binden nun an Cyclin E/Cdk2-Komplexe, die dadurch inhibiert werden. Umgekehrt führt die Induktion von Cyclin D dazu, daß die beiden Inhibitoren verstärkt von Cyclin D/CDK-Komplexen gebunden und dadurch aus Cyclin E/Cdk2-Komplexen entfernt werden können, was wiederum den G₁/S-Phasenübergang kontrolliert, indem diese Komplexe Cip/Kip-Proteine von Cdk2 fernhalten können.

2.4 Funktion und Regulation der CDK-Inhibitoren

p21^{Cip1} und p27^{Kip1}

Seit zunächst p21 und wenig später auch p27 als ubiquitäre negative Regulatoren der Zellproliferation charakterisiert wurden, ist das Interesse an der Aufklärung ihrer physiologischen Funktionen stetig gewachsen. p21 ist offenbar vorwiegend in Checkpointkontrollen und die Induktion von Differenzierungsvorgängen involviert, wohingegen p27 eher eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Restriktionspunktes spielt und vornehmlich durch endogene Signale gesteuert wird.

p21^{Cip1} wurde als erster der CDK-Inhibitoren in Säugern nahezu zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert. Das Protein wurde als Inhibitor der Zellproliferation in seneszenten und p53-induzierten Zellen sowie als Cdk2-bindendes Protein beschrieben (Noda *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). Daneben wurde p21 auch aus Cyclin/Cdk2-Immunkomplexen isoliert und anschließend als CDK-Inhibitor charakterisiert (Gu *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993).

Als zelluläre Antwort auf Streß reichert sich p21 abhängig von p53 in der Zelle an und assoziiert mit den Cyclin/CDK-Komplexen (Artuso *et al.*, 1995; Bae *et al.*, 1995). Dabei wird p21 transkriptionell durch die Bindung des p53-Proteins an den p21-Promotor reguliert. 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). p21 ist offenbar ein wichtiger Vermittler der p53-abhängigen Checkpointkontrolle in der G₁-Phase. Dies spiegelt sich in der Spezifität von p21 wider: vorwiegend werden daher auch G₁-CDK-Komplexe (Cdk2, 3, 4 und 6) inhibiert.

Die Rolle von p21 als Tumorsuppressor gründet sich vor allem auf die Beobachtung, daß p21-defiziente Mäuse sich zunächst zwar normal entwickeln, später jedoch im Vergleich mit ihrer Kontrollgruppe eine erhöhte Rate spontaner Tumoren aufweisen (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 DNA-Replikation verlangsamt und dadurch der Zelle Gelegenheit zur DNA-Reparatur gibt (Hengst und Reed, 1998; Vidal und 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). Beispielsweise wird p21 induziert, sobald Myozyten aufhören zu proliferieren und zu Myotuben fusionieren (Guo *et al.*, 1995; Halevy *et al.*, 1995). 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).

In G_1 -arretierten Zellkulturen entdeckten 1994 unabhängige Arbeitsgruppen einen weiteren potenten CDK-Inhibitor, der gleichzeitig auch auf genetischem Weg als Cyclin D₁-bindendes Protein identifiziert werden konnte (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994): p27^{Kip1}.

Während im normalen Zellzyklusgeschehen p27 periodisch, mit einem Maximum im Verlauf der G_1 -Phase, exprimiert wird, können eine Reihe antiproliferative Signale in normalen Zellkulturen einen Wachstumsarrest auslösen, der auf ein signifikant erhöhtes p27-Niveau zurückzuführen ist. So akkumuliert p27 bei Gabe von Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder Mangel an IL-2, bei niedrigen Serumpegeln, Kontaktinhibition und nach Entzug der Substratverankerung (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994b; Nourse *et al.*, 1994; Coats *et al.*, 1996; Levenberg *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1996).

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. 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 gendosisabhängige 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 und 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 und Koff, 2000).

Auch für p27 wurde eine Funktion als Tumorsuppressor vorgeschlagen. Es konnte eine Korrelation von niedrigen Mengen p27 mit hoher Tumoraggressivität und schlechter Prognose demonstriert werden (Slingerland und Pagano, 2000). Widererwartend treten homozygote inaktivierende Mutationen des p27-Gens in humanen Tumoren relativ selten auf.

Die Stabilität von p27 wird beispielsweise wesentlich durch eine Phosphorylierung von Threonin 187 am carboxyterminalen Ende beeinflusst (Sheaff *et al.*, 1997; Montagnoli *et al.*, 1999). Daneben besitzt p27 in dieser Region ein „nuclear localization signal“ (NLS), das für die Lokalisation des Inhibitors ausschlaggebend ist (Reynisdottir und 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.

Obwohl p21 in eine Reihe von Checkpointkontrollen involviert ist, fehlt ein 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 und 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).

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 Induktion basiert auf verstärkter Transkription von p21, diese wird über den differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD gesteuert. Die daraus resultierende Inaktivierung von CDKs spricht für eine funktionelle Rolle von p21 bei diesem Prozeß der Zelldifferenzierung. 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 und Serrano, 1999).

Die Expression von p21 wird in den meisten Szenarien vornehmlich transkriptionell reguliert (Gartel und 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 (Macleod *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996).

Demgegenüber wird die Expression von p21 in einigen Zellkultursystemen auch transient induziert, wenn ruhende Zellen zur Proliferation stimuliert werden und in den Zellzyklus zurückkehren (Li *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1994). Darüberhinaus wurde berichtet, daß in proliferierenden humanen Fibroblasten die Mehrheit der Cdk4- und Cdk2-Komplexe mit p21 assoziiert ist, die Depletion von p21 aus dem Extrakt geht aber nicht mit einem Verlust der Kinaseaktivität einher (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).

Inzwischen werden sowohl p21 als auch p27 mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose, in Zusammenhang gebracht. Für p21 und p27 konnte dahingehend bereits gezeigt werden, daß sie als Substrate für die Spaltung durch Caspasen in Frage kommen. Diese Caspase-vermittelte Spaltung aktivierte zum einen die Cdk2-Aktivität, zum anderen induzierte sie nach Entzug von Wachstumsfaktoren Apoptose in humanen Endothelzellen (Levkau *et al.*, 1998). Andererseits kann p27 in einigen Säuger-Zelllinien nach Überexpression auch Apoptose induzieren (Eymin *et al.*, 1999; Kudo *et al.*, 2000).

2.5 Funktion und Regulation des CDK-Inhibitors

p57^{Kip2}

2.5.1 Die p57-Expression variiert während des Zellzyklus

Als drittes Mitglied der Familie der Cip/Kip-Inhibitoren konnte p57^{Kip2} zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und identifiziert werden (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995). p57 ist wie die anderen sechs humanen CKIs ebenfalls ein negativer Regulator des Zellzyklus. Dabei sind präferentiell Cycline und CDKs, die an G₁- bis S-Phasenübergängen beteiligt sind, Ziele seiner inhibitorischen Aktivität. So werden neben den Kinasekomplexen Cyclin E/Cdk2 und Cyclin A/Cdk2 auch Cyclin E/Cdk3- sowie Cyclin D₂/Cdk4-Komplexe spezifisch inhibiert. Beträchtlich geringes Potential zeigt p57 gegenüber Cyclin B/Cdc2 und Cyclin D₂/Cdk6 (Matsuoka *et al.*, 1995). p57 wird in proliferierenden Zellen periodisch exprimiert. Die p57-Konzentration ist maximal während der G₁-Phase, sinkt während der S-Phase auf ein Minimum ab und steigt erst wieder an, sobald die Zellen die nächste G₁-Phase

erreichen. Eine Überexpression von p57 führt auf Kosten der Zellen in S- und G₂/M-Phase zu einer Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus (Lee *et al.*, 1995). Eine Reihe antiproliferativer Signale sind für die Induktion der p57-Expression in vielen verschiedenen Zelltypen verantwortlich. So akkumuliert p57 z. B. in Zellen, die nach Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Kontaktinhibition oder nach Entzug der Substratverankerung den Zellzyklus verlassen und quieszent werden (Urano *et al.*, 2000). Schwarze *et al.* konnten 2001 zeigen, daß sich das p57-Expressionsniveau längerfristig während progressiver Passagen allmählich erhöht und dies in der Folge zu einem seneszenten Phänotyp führt, wohingegen sowohl p27 als auch pRB, Cyclin D und p19^{INK4d} in ihrem Expressionsniveau abnehmen. Es ist daher anzunehmen, daß p57 auch an der Einleitung der Seneszenz in humanen Zellen beteiligt ist.

2.5.2 p57 zeigt einen strukturell komplexeren Aufbau als p21 und p27

p57 unterscheidet sich von p21 und p27 in viererlei Hinsicht, beispielsweise durch seine wesentlich komplexere Domänenstruktur. So wird p57 in Säugerzellen als 316 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,3 kDa exprimiert, sein Laufverhalten während gelelektrophoretischer Auftrennung deckt sich jedoch mit der Größe eines 57 kDa großen globulären Proteins.

Der aminoterminalen CDK-inhibitorischen Region, die hohe Homologie mit p21 und p27 aufweist, folgen zwei weitere abgrenzbare Proteindomänen. Zunächst eine „saure“ Domäne („acidic domain“), die sich durch einen hohen Glutamin- und Asparaginsäuregehalt (36%) hervorhebt. Der größte Teil der sauren Domäne besteht aus einer bis dato unbekanntem tandemartigen Wiederholung eines bestimmten Aminosäure-Quartetts, weshalb diese Region zusätzlich unter der Bezeichnung „PAPA“-Region („PAPA repeats“) in der Literatur erhalten blieb. Als weiterer Sequenzabschnitt folgt die QT-Domäne, die eine hohe Konservierung zum Carboxy-Terminus von p27 aufweist. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie dieser dritten Domäne in p57 zu p27, nicht aber zu p21, wird p57 verwandtschaftlich eher p27 zur Seite gestellt und daher in zweiter Bezeichnung auch Kip2 genannt. Abschließend findet sich analog p21 und p27 eine C-terminale Lokalisationsdomäne („nuclear localization sequence“, NLS), die eine mögliche CDK-Phosphorylierungsstelle beherbergt.

Ein Sequenzvergleich von humanem p57 mit p57 aus der Maus (58% identische Aminosäuren) läßt erkennen, daß das Maus-Homologe N-terminal um 32 Aminosäurereste verlängert ist und mit 348 Aminosäuren insgesamt ein signifikant größeres Protein darstellt. Nicht zuletzt resultiert dieser Größenunterschied aus einer zusätzlichen Domäne in p57 der Maus (mp57), die neben einer prolinreichen Region („proline-rich domain“), deren Anteil an Prolinresten sich auf 28% beläuft, einen aus sauren Aminosäureresten bestehenden Bereich („acidic repeats“) umfaßt. In Maus konnten von p57 zwei Isoformen isoliert werden. Diese unterscheiden sich dadurch, daß ihnen im Vergleich mit der längeren Form 38 bzw. 41 Basenpaare am 5'-Ende fehlen, wodurch sich auch ihr jeweiliges Translationsinitiationscodon in Richtung des 3'-Endes verschiebt. Als potentieller Translationsstart bietet sich ein Methioninrest 13 Codons unterhalb des ATG der längeren Version an, wodurch aber lediglich ein 335 Aminosäuren langes Produkt vorhergesagt werden kann (Abb. 2.3).

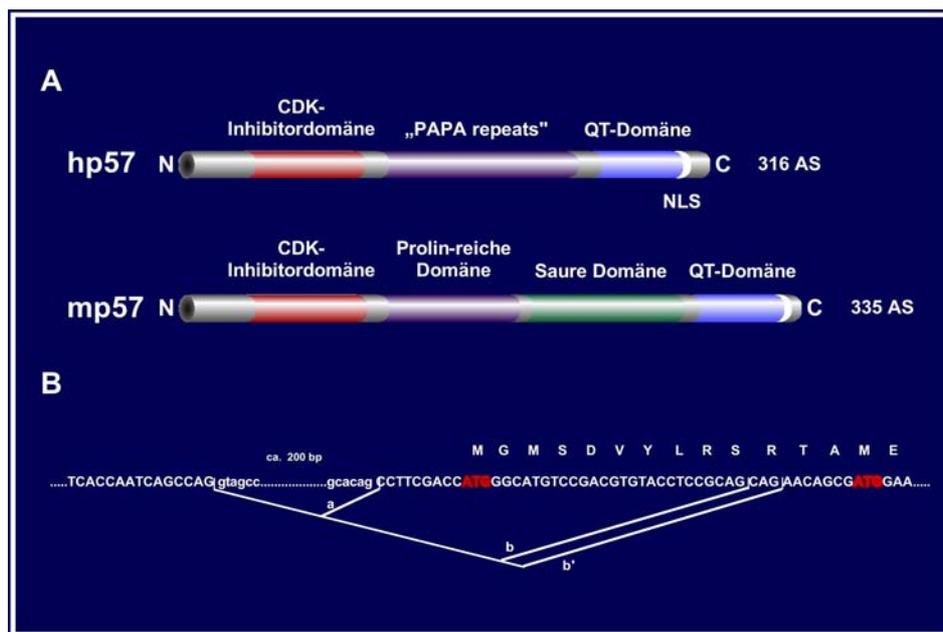


Abb. 2.3: (A) Domänenstruktur von p57 aus Mensch (hp57) und Maus (mp57) im Vergleich. Die Identität auf Aminosäureebene beträgt zwischen beiden Proteinen 58%. (B) mRNA der drei möglichen p57-Isoformen in Maus. Splicing an den Positionen *b* und *b'* resultiert aus der Verwendung alternativer Akzeptorstellen. Splicing an *b* und *b'* eliminieren eine Region, die das erste Methionin-Startcodon der vollen p57-mRNA (*a*) enthält, wodurch sich ein ORF mit einem potentiellen Translationsstart 13 Aminosäuren in Richtung 3'-Ende anbietet.

Ein großer Unterschied von p57 zu den beiden anderen Mitgliedern seiner Familie zeigt sich vor allem in seiner signifikant strikt gewebespezifischen Expression (Matsuoka *et al.*, 1995), wohingegen beispielsweise p21 relativ weitgefächert exprimiert wird

(Nagahama *et al.*, 2001). Wie aus mRNA-Expressionsstudien hervorgeht, ist die p57-mRNA besonders stark in Plazentagewebe exprimiert, zu geringerem Maße in Skelettmuskel- und Herzgewebe sowie in Niere und Bauchspeicheldrüse und schwach zu detektieren im Gehirn. In Lunge und Leber konnte kein p57-Transkript nachgewiesen werden (Park und Chung, 2001; Lee *et al.*, 1995). Dabei wird der Inhibitor vor allem in terminal differenzierten Zellen exprimiert (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995). Man kann aber p57-Expression häufig auch in Geweben beobachten, die noch nicht terminal differenziert vorliegen, die jedoch beispielsweise gerade eine Morphologieänderung durchlaufen, wie im Hypophysenvorderlappen, der Niere oder den Lungenbläschenzellen. In anderen Geweben, wie der Wachstumszone der Gliederknospe („adrenal progress zone of the limb bud“), assoziiert mit sich teilenden Zellen, ist p57 sogar während der Mitose nachzuweisen (Westbury *et al.*, 2001).

Die intrazelluläre Lokalisation begrenzt sich, wie bei p21 und p27 auch, vorwiegend auf den Zellkern. Zytoplasmatische Anfärbung von endogenem p57 wurde jedoch bei Mäusen in Skelettmuskelgewebe älterer Stadien beobachtet, dann allerdings in wesentlich geringerer Intensität als im jeweiligen Zellkern (Westbury *et al.*, 2001).

Neueste Untersuchungen geben Hinweise auf einen möglichen Mechanismus, wie in der Zelle der Übertritt von der Proliferation zur Differentiation ablaufen könnte. So führt die Unterdrückung der Expression von SFK-Proteinen („Src family kinases“) mit dem spezifischen Inhibitor PP1 in Linsenepithelzellen nachweislich zu einer Induktion von p57 und p27 und einer verminderten Proliferationsrate, die schließlich mit dem Austritt der Zelle aus dem Zellzyklusgeschehen endet (Walker *et al.*, 2002).

2.5.3 Einzig bei p57 ist ein Funktionsverlust spezifisch mit einem Krankheitsbild assoziiert

p57 ist der einzige CDK-Inhibitor, der zwingend für die normale Embryonalentwicklung erforderlich ist (Zang *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2000; Nakayama und Nakayama, 1998). p57-negative Mäuse weisen schwere Entwicklungsstörungen auf und sterben meist kurz nach der Geburt (Yan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Aus Studien mit mehrfach mutierten Mäusen geht hervor, daß sowohl p57 als auch p27 als Effektoren verschiedener Signaltransduktionswege wirken, die die Differenzierung von Zellen kontrollieren (Zhang *et al.*, 1998). So ist das p57-

Gen innerhalb eines „clusters“ stillgelegter transkriptionsinaktiver („imprinted“) Gene auf dem menschlichen Chromosom 11p15.5 (Matsuoka *et al.*, 1995) lokalisiert, entsprechend dem Maus-Chromosom 7. Dieser Genlocus wird in Zusammenhang mit der Wachstumsregulation von Mausembryonen (DeChiara *et al.*, 1991; Ferguson-Smith *et al.*, 1991) und außerdem mit dem Wilms-Tumor, einem Nierentumor (Reid *et al.*, 1996) sowie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) des Menschen in Verbindung gebracht. Bei der Untersuchung von Wilms-Tumoren konnten trotz reduzierter p57-Proteinexpression keinerlei Mutationen im p57-Gen als ursächlich für deren Auftreten erkannt werden (Reid *et al.*, 1996), so daß bislang von alternativen Methoden der Geninaktivierung („gene imprinting“) ausgegangen wird. Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist ein komplexes Krankheitsbild mit vielgestaltigen Mißbildungen und Wachstumsabnormitäten („somatic overgrowth syndrome“). Es zeichnet sich durch eine erbliche Prädisposition für embryonale Tumoren, Exomphalie, eine vergrößerte Zunge (Macroglossie) und Organe (Organomegalie), Riesenwuchs sowie eine Vielzahl kongenitaler Anomalien aus, die Hemihyperplasie und Nierenmißbildungen wie z. B. Nephromegalie oder Nierenzysten (Goldmann *et al.*, 2002), einschließen (Beckwith, 1969; Wiedemann, 1983; Elliott und Maher, 1994). Bei nahezu der Hälfte aller Patienten mit familiärer BWS lassen sich Mutationen im p57-Gen nachweisen (Engel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999). Bei der häufiger auftretenden sporadischen Form von BWS sind p57-Mutationen mit weniger als 5% wiederum relativ selten (Hatada *et al.*, 1996; O'Keefe *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Gaston *et al.*, 2000), so daß anzunehmen ist, daß die verminderte Expression von p57 auf andere Mechanismen zurückzuführen ist (Caspary *et al.*, 1999). So geben erste Untersuchungen in der Maus Hinweise auf eine über *cis*-Elemente vermittelte Disregulation der imprimierten Expression von p57 (John *et al.*, 2001).

2.5.4 p57 hat unterschiedliche Funktionen in der Zelle

Neben seiner relativ gut charakterisierten Rolle im Zellzyklus zeichnen sich in jüngster Zeit zunehmend weitere Funktionen von p57 im Zellgeschehen ab. So spielen die Proteine der Cip/Kip-Familie auch in der Tumorgenese eine Rolle (Lee und Yang, 2001). Darauf deutet eine reduzierte p57-Expression in mehreren malignen Tumoren hin (Kondo *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001; Oya *et al.*, 2000; Shin *et al.*,

2000). Anders als beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom spielen hier jedoch eher Mechanismen der transkriptionalen oder posttranskriptionalen Regulation des p57-Gens eine Rolle. Eine reduzierte p57-Expression wurde beispielsweise bei Blasenkarzinomen (Oya *et al.*, 2000) oder Magenkrebs (Shin *et al.*, 2000) nachgewiesen. In den meisten Fällen werden keine p57-assoziierten Mutationen in den Krebszellen gefunden, allerdings liegen deutlich reduzierte mRNA-Mengen von p57 vor. Dabei kann die transkriptionelle Repression mechanistisch auf DNA-Methylierung im Bereich des Promotors zurückzuführen sein. Wie das Beispiel p27 zeigt, können stöchiometrische Inhibitoren aber auch haplo-insuffizient für Tumorsuppression sein (Fero *et al.*, 1998).

Ebenso wie die beiden anderen Cip/Kip-Proteine gilt p57 aufgrund seiner Lokalisation, seiner biochemischen Aktivitäten und seiner Expressionscharakteristika als potentieller Tumorsuppressor. Unter anderem unterliegt in mehreren Formen von Krebs der p57-Genlocus häufig einem maternalen Allelverlust („loss of heterozygosity“, Verlust des 2. Allels) (Sherr und Roberts, 1995; Hatada und Mukai, 1995; Taniguchi *et al.*, 1997). Die klinische Signifikanz der Expression von p57 in Patienten mit Tumoren, bleibt aber unklar. So ist in hepatozellulären Karzinomen (HCC) p57 beispielsweise häufig vermindert exprimiert, besonders in wenig differenzierten Formen von HCC, so daß davon auszugehen ist, daß p57 bei der Differenzierung der hepatozellulären Tumoren eine Rolle spielt (Nakai *et al.*, 2002). Dennoch ist bislang der p57-Expressionsstatus lediglich ein unabhängiger prognostischer Faktor für HCC-Patienten.

Wie p21 und p27 kann auch p57 mit Apoptose in Zusammenhang gebracht werden. Bisher wurde vermutet, daß p57 z. B. im Gastrointestinaltrakt und der Augenlinse während der Embryonalentwicklung eher einen anti-apoptotischen Effekt ausübt (Yan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Aus jüngsten Untersuchungen von Samuelsson *et al.* (2002) an HeLa-Zellen ergibt sich, daß p57 einen durch Staurosporin induzierten, stimulatorischen Effekt auf die Apoptose ausübt. Behandlung mit Glucocorticoiden wiederum hat auf die Staurosporin-induzierte Apoptose eine inhibitorische Auswirkung, obwohl Glucocorticoide normalerweise die p57-Expression in HeLa-Zellen fördern. Zusammenfassend wird p57 eine Rolle bei der Antwort von Tumorzellen auf zytotoxische Substanzen zugeschrieben.

Eine weitere, möglicherweise wichtige Funktion von p57 ist seine Bindung an PCNA, wodurch die DNA-Replikation und die Zelltransformation unterdrückt werden

(Watanabe *et al.*, 1998). p57 kann des weiteren transkriptionell über Glucocorticoid-Behandlung induziert werden und ist daher in die Glucocorticoid-induzierte Antiproliferation involviert (Samuelsson *et al.*, 1999). Eine wichtige Funktion übt p57 während der Muskeldifferenzierung aus, wo es zur Stabilisierung von MyoD beiträgt (Reynaud *et al.*, 1999; 2000). Jüngst konnte außerdem durch Tsugu *et al.* (2000) gezeigt werden, daß die Überexpression von p57 sowohl einen Wachstumsarrest als auch seneszenten Phänotyp in Astrozyten verursachen kann. Die Konversion von konditional immortalen menschlichen Brustepithelzellen zu einem vollständig immortalen Phänotypen läßt sich durch die Expression von p57 inhibieren, weshalb p57 des weiteren eine Funktion als entscheidende Barriere gegen undefinierte Proliferation zgedacht wird (Nijjar *et al.*, 1999). Abbildung 2.4 gibt einen schematischen Überblick über die verschiedenen, bislang bekannten Mechanismen zur Regulation der p57-Aktivität sowie seine biologischen Funktionen.

2.5.5 Die p57-Regulation wird über Signale aus unterschiedlichen Pathways gesteuert

Der „insuline-like growth factor-II“ (IGF-II) spielt eine wichtige Rolle während des embryonalen Wachstums. Eine gestörte IGF-II-Expression wurde in mehreren menschlichen Krankheitsbildern, einschließlich dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom und einem großen Spektrum an Tumoren dokumentiert. Die p57-Expression ist nach IGF-II-Behandlung in primären embryonalen Fibroblasten stark reduziert, ebenso in Mäusen, welche hohe Serumlevel an IGF-II aufweisen (Grandjean *et al.*, 2000). Darüberhinaus wurde in Mausstudien gefunden, daß IGF-II und p57 in antagonistischer Weise agieren und so auch die Zellproliferation während der normalen Entwicklung mit kontrollieren. Ein weiterer Regulator der p57-Expression ist TGF- β_1 („transforming growth factor- β 1“). Untersuchungen zum Abbau von p57 zeigen, daß bei Osteoblasten, die nach Serumentzug einen erhöhten p57-Spiegel aufweisen, dieser durch anschließende Behandlung mit TGF- β_1 wieder auf ein normales Niveau absinkt (Nishimori *et al.*, 2001). Diese Abnahme von p57-Protein läßt sich durch gleichzeitige Gabe von Proteasom-Inhibitoren verhindern. Des weiteren konnte eine Ubiquitinierung von p57 *in vitro* gezeigt werden. Zusammengenommen legen diese Befunde nahe, daß p57 in der Zelle über das Proteasom abgebaut wird (Urano *et al.*, 2000).

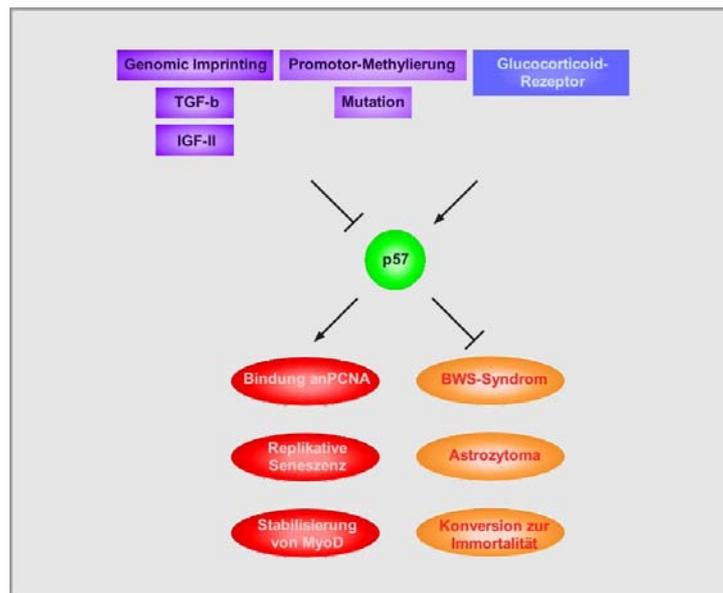


Abb. 2.4: Positive und negative Regulationsmechanismen von p53 und seine biologischen Funktionen

2.6 Zellzyklus in Hefe

Zu den Eigenschaften, die den Hefeorganismus als Modell für biologische Studien besonders geeignet machen, gehören neben einem schnellen Wachstum mit für eukaryontische Zellen kurzem Generationenzyklus auch die einfache genetische Manipulierbarkeit, Mutantenisolierung und die Möglichkeit der Integration artfremder Gene. Aufgrund ihres stabilen haploiden und diploiden Status kann die Hefe für eine Reihe unterschiedlicher Fragestellungen herangezogen werden. So lassen die nach gezielter Disruption spezifischer Gene ausgebildeten Phänotypen Rückschlüsse auf deren Proteinfunktion *in vivo* zu. Darüberhinaus wurden in der Bäckerhefe eine Reihe von Systemen zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen etabliert, wie beispielsweise das „yeast two hybrid“-Screeningsystem. Da sich Bäckerhefezellen durch sogenannte Knospung teilen, läßt sich der Verlauf eines Zellzyklus in der lebenden eukaryontischen Zelle leicht verfolgen. Früh im Zellzyklus beginnt sich eine kleine Knospe auszubilden. Zeitgleich werden das Hefegenom repliziert und die Spindelpolkörper verdoppelt. Die Knospe vergrößert sich kontinuierlich. In der Mitose bildet sich die Spindel aus und ordnet sich in der Äquatorialebene an (Metaphase). Schließlich erfolgt in der Anaphase die Trennung der Chromosomen und abschließend schnürt sich die Knospe von der Mutterzelle durch Zytokinese ab. Die Knospung

beginnt direkt nachdem die Zellen einen Punkt passiert haben, der als START bezeichnet wird. Die Mitose erfolgt erst nach Inaktivierung eines als MPF („maturation promoting factor“) bezeichneten Faktors.

Saccharomyces cerevisiae besitzt insgesamt fünf Cyclin-abhängige Proteinkinasen (Cdc28, Pho85, Kin28, Ssn3 und Ctk1). Zentraler und einziger Koordinator des Zellzyklusgeschehens in der Hefe und am besten untersuchte Kinase ist jedoch nur Cdc28. Umweltfaktoren, die die Entscheidung der Zelle beeinflussen, sich zu teilen oder nicht, sowie alle Schlüsselereignisse der Mitose sind abhängig von der Cdc28-Kinaseaktivität (Beach *et al.*, 1982; Andrews und Measday, 1998). Andere Hefe-CDKs sind in die Regulation der Genexpression und den Metabolismus der Zelle beim Durchlaufen des Zellzyklus involviert. Ebenso wie die humanen CDKs, kann auch Cdc28 mit verschiedenen Cyclinen Komplexe formen.

Insgesamt beeinflussen 22 Cycline in der Hefe das Zellgeschehen, beteiligt an der Regulation von Cdc28 sind davon jedoch lediglich neun. Die Hefe-Cycline lassen sich in mehrere Familien einteilen, darunter die G₁-Cycline (Cln1, 2, 3), S-Phase-Cycline (Cln 3, 4, 5, 6) und die B-Typ-Cycline (CLBs). Abbildung 2.5 gibt schematisch einen Überblick über die Varianten der Cyclin-Kinase-Komplexe sowie den Zellzyklus in Hefe.

Die erste Aufgabe der Cdc28-Kinase-Komplexe nach Entstehung einer Hefezelle besteht darin, den Zellzyklus in Gang zu halten, nachdem die Zelle in der späten G₁-Phase eine kritische Größe erreicht hat. Dieser Punkt, an dem sich entscheidet, ob die Zelle eine weitere Zellteilungsrunde durchlaufen wird oder nicht, bezeichnet man als START. Zu den Ereignissen, die durch START initiiert werden, gehört die Duplikation der Spindelpolkörper, Knospung und polarisiertes Zellwachstum sowie die Initiation der DNA-Synthese und die Repression derjenigen Signalkaskaden, welche die Reifung einleiten (Nasmyth, 1993). Die Familie der G₁-Cycline, bestehend aus Cln1, Cln2 und Cln3, ist essentiell für die Überschreitung des START und die Einleitung der S-Phase (Richardson *et al.*, 1989). Zwei entscheidende Beobachtungen haben eine überlappende Funktion der CLNs als essentiell Dosis-abhängige Regulatoren des START-Punktes etabliert: zum einen sind alle CLN-Gene redundant. Hefestämme, in denen jeweils zwei der CLN-Gene deletiert wurden, zeigen eine variable Zellgröße, teilen sich aber mehr oder weniger normal. Hingegen arretieren Stämme, denen alle drei CLNs fehlen, direkt

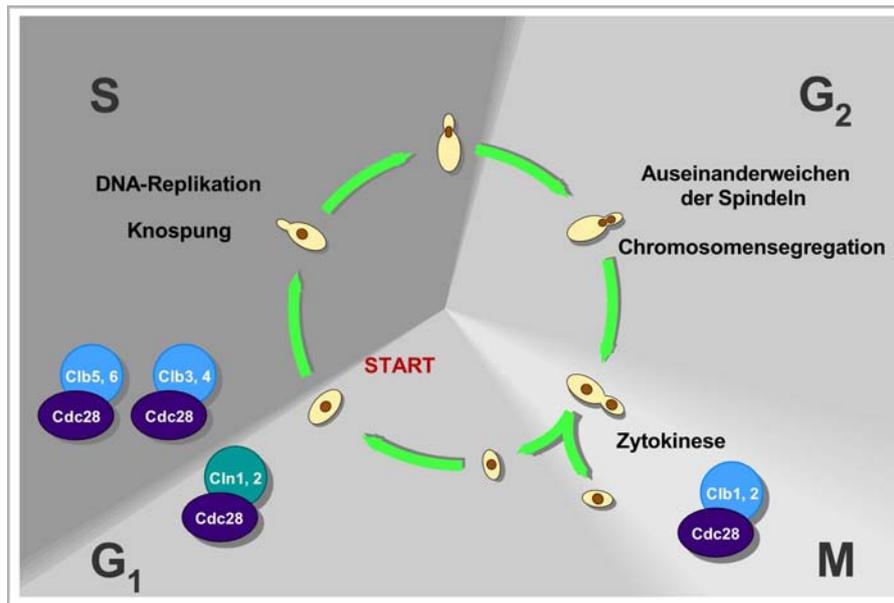


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Hefe-Zellzyklus mit seinen „Varianten“ aus CLN- bzw. CLB/Cdc28-Komplexen

vor dem START. Zweitens beschleunigt die Überexpression der CLNs die START-Phase (Nasmyth, 1993; Futcher, 1996).

CLN/Kinase-Komplexe regulieren das Einsetzen der DNA-Replikation dadurch, daß sie für den Abbau von Sic1 sorgen, einem Inhibitor, der die CLB/Cdc28-Kinasekomplexe in der G₁-Phase inaktiviert. Nach Aktivierung der Clb6-Kinase bringen sie ihrerseits die DNA-Replikation in Gang (Schwob *et al.*, 1994). In Abwesenheit von Sic1 sind die CLN-Gene für die Viabilität nicht mehr erforderlich (Schneider *et al.*, 1996; Tyers, 1996).

Die verschiedenen B-Typ-Cycline erreichen ihre Expressionsmaxima im Verlauf des Zellzyklus an unterschiedlichen Punkten: Clb1 und 2 in der späten G₂-Phase, Clb3 und 4 während der S- und Clb5 und 6 in der späten G₁-Phase (Mendenhall und Hodge, 1998).

Vergleichbar dem menschlichen Zellzyklus regulieren auch in der Bäckerhefe spezifische Inhibitoren die Aktivität der Cdc28/Cyclin-Komplexe: Far1 und Sic1 (Mendenhall, 1993; Nugroho und Mendenhall, 1994; Schwob *et al.*, 1994). Allerdings unterscheiden sich die CKIs der Hefe sowohl strukturell als auch funktionell deutlich von den humanen Inhibitoren. Far1 fungiert als spezifischer Inhibitor der CLN/Cdc28-Komplexe, wobei er seine inhibitorische Wirkung durch Substratausschluß vermittelt. Far1 selbst wird auf vielen Ebenen reguliert, unter anderem wird seine Expression nach Pheromongabe über eine heterotrimere G-Proteinkaskade induziert (Leberer *et al.*,

1993). Seine Transkription ist zellzyklusreguliert mit einem Maximum nahe des M/G₁-Überganges.

Sic1 wird während G₁ direkt nach der Mitose exprimiert und sehr schnell vor der S-Phase wieder abgebaut. Das degradierende Enzym ist Cdc34, ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Goebel *et al.*, 1988), das am Übergang von der G₁- zu S-Phase entscheidend beteiligt ist. Der Mechanismus zur proteolytischen Regulation von Sic1 konnte in den letzten Jahren aufgeklärt werden und zeigt eine sukzessive Sic1-Hyperphosphorylierung durch CDK-Komplexe, die in der späten G₁-Phase aktiv sind. Das phosphorylierte Sic1 wird ubiquitinabhängig modifiziert, löst sich aus dem assoziierten CDK-Komplex, wird anschließend degradiert und liefert so freie CDK-Komplexe, die ihrerseits den Eintritt in die S-Phase erlauben (Bai *et al.*, 1996; Hoyt, 1997).

2.7 Aufgabenstellung

Aktivierung und Inaktivierung, Stabilität und Abbau sind entscheidend für die Menge und die Aktivität des in der Zelle vorliegenden p57 und somit entscheidend für die Regulation des Zellzyklus. Mit Ausnahme einiger Hinweise auf den proteasomalen Abbau von p57 analog zu p27 (Urano *et al.*, 2000; Oyake *et al.*, 2002) und der Bindung von p57 an den Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase PCNA (Watanabe *et al.*, 1998; Hengst und Reed, 1998; Vidal und Koff, 2000), waren bis zum Beginn dieser Arbeit neben den CDK-Komplexen keine weiteren Bindungspartner für p57 bekannt. Seine im Vergleich mit p21 und p27 vielfältigen Funktionen und der ausgeprägte C-terminale Domänenteil von p57, besonders der Bereich der „PAPA repeats“, der als spezifisch Protein-Protein-Interaktionen vermittelnd diskutiert wird, lassen jedoch weitere Bindeproteine vermuten.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es daher zum einen sein, ein neues Verfahren zur gezielten Identifizierung von Proteinen oder Faktoren, die am Abbau von p57 beteiligt sind, zu entwickeln, und zum anderen mit Hilfe des „yeast two hybrid“-Systems neue Interaktionspartner von p57 zu ermitteln. Die Charakterisierung der isolierten Interagierer sollte den Einblick in die Regulationsmechanismen von p57 im Rahmen der Zellzykluskontrolle vertiefen.

3 Material und Methoden

Die aufgeführten Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, aus Sambrook *et al.* (1989) bzw. Ausubel *et al.* (1995), *Current Protocols in Molecular Biology* (1994-1998), *Current Protocols in Protein Science* (1995-1997) und *Current Protocols in Cell Biology* (2000) abgeleitet.

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle nicht im Detail aufgeführten Chemikalien und Antibiotika wurden *p. A.* bzw. in der höchsten erhältlichen Reinheit verwendet. Standard-Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen E. Merck AG (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und Carl Roth & Co. (Karlsruhe) bezogen.

Restriktionsendonukleasen und Enzyme zur Modifikation von Nukleinsäuren wurden gemeinsam mit den zugehörigen Puffern und Supplementen bezogen 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.

Das Wasser wurde über eine „Purelab Plus UV/UF“-Filteranlage der Firma USF (Ransbach-Baumbach) aufbereitet. Es wird im folgenden als ddH₂O bezeichnet.

3.1.2 Sonstige Materialien

3.1.2.1 Radiochemikalien

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

Adenosine 5'-[γ - ^{32}P]triphosphat, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

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

3.1.2.2 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
Zentrifugen Filtereinheiten 5K, 10K und 30K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.2.3 Chromatographische Matrices und fertig gepackte

Chromatographiesäulen

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
Immobilisiertes Protein A an Trisacryl	Pierce, Rockford, USA
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superose 6 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.2.4 Molekulargewichts- und Längenstandards

BenchMark Protein Ladder, Protein-Größenstandard	Life Technologies, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standards, Protein-Größenstandard	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
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

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

Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Chemiluminescent Super Signal West Pico (oder Femto)	
Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, 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, Maxi, Giga)	Qiagen, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
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

3.1.2.6 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).

Transfermembranen:

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.

3.1.3 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% (w/v) Amidoschwarz 10B, 10% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Aminosäurelösung, 10 x	je 0,02% (w/v) Adenin, Arginin, Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil, je 0,03% (w/v) Isoleucin, Lysin, Tyrosin, 0,05% (w/v) Phenylalanin, 0,1% (w/v) Leucin, 0,15% (w/v) Valin 0,2% (w/v) Threonin
Proteaseinhibitorcocktail „complete“ ohne EDTA, 50 x	1 Tablette „complete without EDTA“-Proteaseinhibitor-Mischung (Roche, Mannheim) in 1 ml ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Serva Blue R (Serva, Heidelberg)
DNA-Probenauftragspuffer, 10 x	50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
HBS 2 x	280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O; pH mit 1 M NaOH auf 7,1 einstellen; Lagerung bei -20°C
Hefe-Aufschlußpuffer	2% (v/v) Triton-X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
IP-Puffer	250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% (w/v) NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM

	PMSF, je 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, 7,15 mM β-Mercaptoethanol, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 0,05% (w/v) NP-40, 10 µM PMSF, je 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A
LiT-Lösung	100 mM Lithiumazetat, 10 mM Tris-HCl pH 7,4; autoklaviert; dann Zusatz von 10 mM DTT
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 Kaliumazetat pH 5,5
Paraformaldehydlösung	6% (w/v) Paraformaldehyd; mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt; dunkel bei 4°C gelagert; Arbeitslösung 3% (v/v) für Immunofluoreszenz oder 1% (v/v) für FACS-Analyse
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5 mit NaOH eingestellt
PBS-M	1 mM MgCl ₂ in PBS
PBS-T	0,05% (w/v) Tween-20 in PBS
PI-Färbelösung	200 µg/ml Propidiumiodid, 0,2% (v/v) Triton-X-100, 0,2 mg/ml RNase A in PBS
50% PEG/LiAc/TE	50% (w/v) Polyethylenglycol 3800, 0,1 M Lithiumazetat, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
SDS-Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10 x	209 mM Tris-HCl, 41% (w/v) Glycerin, , 17 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
SDS-Probenpuffer, 2 x	125 mM Tris-HCl, 17% (w/v) Glycerin, 4,1% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 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	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
TBS	0,05% (w/v) Tween-20 in PBS
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, 20% (v/v) Methanol, 0,037% (w/v) SDS
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium

3.1.4 Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur

3.1.4.1 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 Natriumpyruvat	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	Life Technologies, Karlsruhe
Joklik's Medium	Life Technologies, Karlsruhe
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 Stammlösung 25 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumpyruvat 100 x	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100 x	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 10 x	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.4.2 Medienzusammensetzung

Standardmedium für

adhärente HeLa, 293T, 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

Timelapse-Medium MEM-Minimum Essential Medium, mit Hanks`
Salzen, L-Glutamin, 25 mM HEPES, 0,35 g/l
NaHCO₃, 4,5 g/l Glucose und MEM Nicht-
essentielle Aminosäuren-Lösung, 10% (v/v) FCS

3.1.5 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, 20 mM Glucose,
10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Selektionsmedien enthielten sterilfiltriert 100 µg/ml Ampicillin oder 60 µg/ml Kanamycin, das den autoklavierten Medien nach Abkühlung auf ca. 60°C zugesetzt wurde.

3.1.6 Medien für die Hefekultur

YPD	2% (w/v) Difcopepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose (bzw. 2% (w/v) Galaktose oder 1% (w/v) Glucose mit 1% (w/v) Raffinose)
SD	6,7% (w/v) N ₂ -Quelle für Hefen ohne Aminosäuren, 100 ml 10 x Aminosäurelösung, 2% (w/v) Glucose (bzw. 2% (w/v) Galaktose oder 1% (w/v) Glucose mit 1% (w/v) Raffinose)

Selektionsmedien enthielten wahlweise eine oder mehrere spezifische Aminosäuren nicht. Festmedien wurden durch Zugabe von 2% (w/v) Agar hergestellt. Alle Medien wurden autoklaviert und die Supplemente erst nach vorheriger Sterilfiltration zugefügt.

3.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-Cyclin E1 (Klon HE12)	Labor Ed Harlow, Harvard, USA
anti-GST , Kaninchenantiserum gerichtet gegen GST	Labor Ludger Hengst
anti-HA.11 (Klon 16B12)	Babco, Richmond, USA
anti-FLAG	Sigma-Aldrich, München
anti-p21 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 19 C-terminalen AS von humanem p21	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p27 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 19 C-terminalen AS von humanem p27	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p57 (C-20) , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die letzten 20 C-terminalen AS von humanem p57	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p57G (C-20) , Ziegenantiserum gerichtet gegen die letzten 20 C-terminalen AS von humanem p57	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p57 (H-91) , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die AS 45-135 von humanem p57	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-FHL2 , monoklonaler Antikörper (Klon 11-134)	Labor Roland Schüle, Regensburg
anti-FHL2 , Kaninchenantiserum gerichtet gegen die ersten N-terminalen AS von humanem FHL2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

anti-PSTAIRE, monoklonaler Antikörper gerichtet gegen die PSTAIRE-Region Cyclin-abhängiger Kinasen *Dulic et al.*, 1992

Sekundäre Antikörper:

Goat anti-Mouse IgG , (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
Goat anti-Rabbit IgG , (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
Donkey 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), AlexaFluor488-gekoppelt	Mobitec, Göttingen
Goat anti-Rabbit IgG , (H+L), AlexaFluor488-gekoppelt	Mobitec, Göttingen
Goat anti-Mouse IgG , (H+L), Rhodamin-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Goat anti-Rabbit IgG , (H+L), Rhodamin-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

3.1.8 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'

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'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von FHL2 und FHL2-Fragmenten:

Primer	DNA-Sequenz
forFHL2-1-95	5'-GAAAAGCCAGTACTCCATATGACTGAGC-3'
forFHL2-97-279	5'-GACTGCGATATCCATATGTACTCATCC-3'
forFHL2-158-279	5'-GAGATATCACATATGATGCAGTGC GTTC-3'
forFHL2+ATGEcoRI	5'-GCCAGGGAATTCAATGACTGAGCG-3'
forFHL2+NdeI	5'-GCCAGAATTCATATGACTGAGCG-3'
revFHL2-1-95	5'-CATTCCTAGATCTTGGATCAGTACTCG-3'
revFHL2-1-157	5'-CATGGCAAGATCTTTCTAATAGCAGG-3'
revFHL2-Stop	5'-GTGTTGTCGACAGATGTCTTTCC-3'
revFHL2-97-216	5'-GCACAGATCTTGGCCTACAAGTCACAG-3'
revFHL2+TGABamHI	5'-CTGGGATCCATTCAGATGTCTTTC-3'
Primer für siRNA	DNA-Sequenz
forFHL2-64-2	5'-GATCCCCCAACATGCCATGCAGTGC GTTCAAGAGACGCACT GCATGGCATGTTGTTTTTGAAA-3'
forFHL2-64	5'-GATCCCCCTCAGTGGTGGACAAGCCCTTCAAGAGAGGGCTT GTCCACCAGTGAGTTTTTGAAA-3'
revFHL2-64	5'TTTCAAAAACTCACTGGTGGACAAGCCCTCTCTTGAAGGGC TTGTCCACCAGTGAGGGGGATC-3'
revFHL2-64-2	5'-AGCTTTTCCAAAAACAACATGCCATGCAGTGC GTTCTCTTGAA CGCACTGCATGG-3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von p57 und p57-Fragmenten:

Primer	DNA-Sequenz
forp57+421NdeI/BamHI	5'-CCTAGGATCCATATGCCGGCC-3'
forp57+706NdeI/BamHI	5'-GGGGATCCCGCCATATGCCTC-3'
forp57+NdeKEcoRI	5'-GCGAATTCACATATGTCCGACGCG-3'
forp57-Nt+ATG	5'-GGAATTCATATGTCCGACGCTCC-3'
forp57-Ct+320	5'-GCTGCCGAATTCATATGGCGCCGCG-3'
forp57-ATG	5'-AGCCCCGGCATATGTCCGA-3'
revp57-TAG	5'-TTGGCTCACC GCAGCCTCT-3'
revp57-Nt+330	5'-CCGCGAGGATCTACGGCGCCAGCAG-3'
revp57-Ct-TGA	5'-TCACCGCAGCCTCTTGC GCGGGG-3'
revp57+658BamHI	5'-GGGGATCCCTTGTTACGCCGC-3'
revp57+949BamHI	5'-CGCGGATCCTCACC GCAGCCT-3'
revp57-StopBamHI	5'-CGGCTGGATCCGACACC GCAGCC-3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Mutagenese von „yeast two hybrid“-Plasmiden oder Hefe-Vektoren:

Primer	DNA-Sequenz
Gal4DBfor	5'-TCATCGGAAGAGAGTAGT-3'
Gal4DBrev	5'-CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC -3'
forpACT2	5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'
revpACT2	5'-GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'
forpAS2.1	5'-TCGGAAGAGAGTAGTAA-3'
revpAS2.1	5'-TCGTTTTAAAACCTAAGAGTCA-3'
forTRP1+20	5'-GGTAGTTCTGGTCCATTGGTG-3'
revTRP1+570	5'-GCTTACATCAACACCAATAACG-3'

3.1.9 Plasmide

pACT2	Clontech, Heidelberg
pAS2.1	Clontech, Heidelberg
pBluescript SK (-)	Stratagene, Heidelberg
pCMXpl2	Labor Roland Schüle, Freiburg
pCR2.1	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII-TOPO	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCruz-HA	Santa Cruz, Heidelberg
pCruz-OctA	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,	Promega, Mannheim
pGEX-2T, -2TK, -5X2	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pYES2	Invitrogen, Groningen, Niederlande
YDp-W	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Die im „yeast two hybrid“-Screen eingesetzte Genbank „Human HeLa Matchmaker cDNA“ wurde bezogen von der Firma Clontech (Heidelberg). Im funktionalen Hefesystem fand eine humane Genbank für *S. cerevisiae* aus HepG2-Zellen Anwendung.

3.1.10 Bakterien- und Hefestämme

BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i> B; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3) (Invitrogen, Karlsruhe)
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> (Invitrogen, Karlsruhe)
c13-ABYS-86	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATa <i>pra1-1 prb1-1 prc1-1 cps1-3</i> <i>ura3-5 leu2-3, 112 his3</i> (gestellt von G. Sauer, Erlangen)
PJ69-4A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MATa <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52</i> <i>his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2</i> <i>met2::GAL7-lacZ</i> (gestellt von E. A. Craig, Madison, USA)

3.1.11 Eukaryontische Zelllinien

293	humane embryonale Nierenzellen 293 (ATTC-Nummer CRL-1573)
293T	humane embryonale Nierenzellen 293, zusätzlich mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert (ATTC-Nummer CRL-1573)
HeLa, Suspensionszellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HeLa, adhärenente Zellen	menschliche Cervix-Karzinomzelllinie
HS68	menschliche diploide Fibroblasten aus Neugeborenen- Vorhaut (ATCC-Nummer CRL-1635)
MCF7	adhärenente menschliche Brustdrüsen-Epithelialzellen, adenovirus-transformiert (ATTC-Nummer HTB-22)
PC3	humane Prostata-Karzinomzelllinie (DSZM-Nummer ACC465)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Methoden zur Nukleinsäurechemie

3.2.1.1 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 2,5-fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -80°C . Das Präzipitat wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 16000 g sedimentiert und mitausgefallenes Salz durch einmaliges Waschen mit 70% Ethanol aus dem Nukleinsäure-Präzipitat entfernt. Das Sediment wurde an der Luft oder unter Vakuum (Membran Vakuumpumpe MD8C, Vakuubrand, Wertheim) getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O bzw. TE-Puffer aufgenommen.

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung (bei pH 8,0) und sollte für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0 liegen.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die wäßrige DNA-Lösung um einen geeigneten Faktor verdünnt und die Absorption in Quarzküvetten im Spektralphotometer (Spectrophotometer DU 640, Beckman, München) bei 260 nm gemessen. Die gemessenen Werte sollten dabei nicht unter 0,15 liegen, um die Meßgenauigkeit des Gerätes zu minimieren. Eine OD₂₆₀ von 1 bei in Wasser gelöster doppelsträngiger DNA entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Kleine Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden mittels zweier unterschiedlicher Präparationsverfahren erhalten.

In einer schnellen und effizienten, aber mit größeren Verunreinigungen der Plasmid-DNA behafteten Methode wurden 4 ml LB-Medium in einem Reagenzglas mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und 14 bis 18 h bei 37°C und 220 Upm geschüttelt. Aus den Übernachtskulturen wurden schrittweise aus je 2 ml durch wiederholte Zentrifugation für jeweils 1 min bei 16000 g und RT die Zellen sedimentiert. Nach Dekantieren des Mediums wurde das Sediment in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von ebenfalls 300 µl Puffer P2 und 5-minütige Inkubation bei RT aufgeschlossen. Nach Neutralisation des Ansatzes und Abstoppen der Lysereaktion durch 300 µl Puffer P3 konnten Proteine und andere Zellbestandteile sowie die daran haftende chromosomale DNA durch Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 10 min abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 16000 g und RT sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, bei 60°C im Heizblock oder einige Minuten unter Vakuum getrocknet und in 25 µl ddH₂O gelöst. Die Ausbeuten lagen gewöhnlich bei etwa 8-10 µg/ml Bakterienkultur.

Um DNA-Präparationen mit höherem Reinheitsgrad bei jedoch geringerer Ausbeute zu erhalten, wurde zum Teil eine Isolierung nach dem „Qiagen Plasmid Spin-Prep Protocol“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Der Bakterienaufschluß erfolgte dabei ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Präparation wurde gemäß den Angaben des Herstellers bearbeitet, wobei abweichenderweise die Elution mit jeweils 30 µl TE-Puffer/Wasser (1:1) durchgeführt wurde, und erlaubte eine Ausbeute an Plasmid-DNA zwischen 2,5 und 10 µg/ml Bakteriensuspension.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde der „Midi-, Maxi- oder Giga-Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Die solcherart präparierte DNA wurde zur Transfektion von Gewebekulturzellen, zur *in vitro*-Translation und zur Transformation einer Genbank in Hefezellen eingesetzt.

3.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Standardansätze zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller für die gewählte Nuklease durchgeführt. Dabei wurden pro 1 µg DNA 1 bis 3 U Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 20-fache

der in Glyzerin gelösten Enzyme betrug. Die Restriktionsspaltung erfolgte bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur für 2 bis ggfs. 18 h. Die Reaktion wurde durch 20-minütiges Erhitzen auf 75°C oder durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 x DNA-Probenauftragspuffer beendet.

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

3.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

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 gewählte Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz zunächst 1:1 mit ddH₂O verdünnt und mit 1/10 Volumen 10 x CIAP-Puffer und 1 U CIAP („calf intestine alkaline phosphatase“, Roche, Mannheim) pro µg eingesetztem Plasmid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Dephosphorylierungsreaktion anschließend durch Zugabe von 20 mM EGTA und 20-minütiges Erhitzen auf 75°C oder durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 x DNA-Probenauftragspuffer abgestoppt.

3.2.1.6 Glätten überhängender DNA-Enden

Um die durch eine vorangegangene Restriktionsspaltung erzeugten 5'- bzw. 3'-überhängenden DNA-Enden zu glätten, wurden die DNA-Stränge nach Ausubel *et al.* (1995) mit Nukleotiden aufgefüllt bzw. Nukleotide wurden abgespalten und so in glatte Enden überführt.

Dazu wurde eine DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)-Behandlung der linearisierten DNA direkt im Restriktionsansatz durchgeführt. Die im Restriktionsansatz aktiven Enzyme wurden zunächst für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert, der Ansatz auf Eis abgekühlt und auf eine Endkonzentration von 250 µM 2'-Desoxynukleotide eingestellt. Nach Zugabe von 1 U Klenow-Fragment bzw. 1 bis 3 U T4-DNA-Polymerase pro µg eingesetzter DNA wurde der Ansatz 30 min bei 14°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms 10 min auf 75°C erwärmt.

3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragmentes mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng geschnittenes Vektor-Fragment und ein dreifacher molarer Überschuß des einzubringenden DNA-Fragmentes mit 2 µl 10 x Ligasepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Bevor die ligierten Plasmide in geeignete kompetente Zellen transformiert wurden, erfolgte ein Abstoppen der Ligationsreaktion durch Hitzedenaturierung des Enzyms bei 70°C für 10 min.

3.2.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarosekonzentration des verwendeten Gels richtete sich nach der Fragmentgröße der zu trennenden DNA-Moleküle und variierte zwischen 0,8 und 1,5% (w/v). Zur Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TBE-Puffer (mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) 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 1/10 Volumen 10 x DNA-Probenauftragspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm gemäß ihrer molaren Masse aufgetrennt (Elektrophoresis Power Supply EPS300, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Sichtbarmachung der resultierenden DNA-Banden erfolgte unter UV-Durchlicht bei 320 nm, das Bandenmuster wurde digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Restriktionsansätze, deren Spaltungsprodukte für Ligationen vorgesehen waren, wurden abweichend unter einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 365 nm ausgeschnitten.

3.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel 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-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt und die DNA-haltige Flüssigkeit durch Zentrifugation (16000 g, 5 min) aus dem Gel in das Auffanggefäß zentrifugiert. Die Agarose wurde dabei durch die Glaswolle im oberen Gefäß zurückgehalten. Die gesammelte DNA-TBE-Lösung wurde entweder direkt für Ligationen weiterverwendet oder einer Isopropanolpräzipitation unterzogen.

Alternativ fand der „Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) Anwendung. Die Effizienz der Extraktion konnte in beiden Fällen anhand der Konzentrationsabschätzung ungeschnittener Lambda-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt werden.

3.2.1.10 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der

Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR Kit“ (ABIPrism, Applied Biosystems, Warrington, UK) durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 5 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Sequenziermix 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.

3.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion

Zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz und zur gezielten Einführung von Mutationen in eine gewünschte DNA-Sequenz *in vitro* wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.

Eine Standardreaktion wurde in einem Endvolumen von 20 μl durchgeführt, enthielt stets 1 U *Taq*-DNA-Polymerase oder 1,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase, 1/10 Volumen des empfohlenen 10 x Polymerase-Puffers sowie neben 200 μM dNTPs auch je 100 pmol von jedem der eingesetzten 5'- und 3'-Primer-DNA-Oligonukleotide. Von der DNA-Matrize wurden zwischen 25 ng und 0,5 μg eingesetzt. Bis zum gewünschten Endvolumen wurde mit ddH₂O ausgeglichen. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C durchlief der Reaktionsansatz wahlweise 12 bis 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei einer vorab berechneten Anlagerungstemperatur (i. d. R. 50-65°C) und einer Synthesephase von 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 72°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt und entweder mittels gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft oder weiter enzymatisch modifiziert.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter

E. coli

50 ml LB-Medium wurden mit 500 μl einer stationären Kultur von *E. coli* DH5 α oder BL21(DE3) beimpft und mit 200 bis 250 Upm bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Der Kulturansatz wurde für 5 min bei 2000 g und 4°C sedimentiert. Das Medium wurde dekantiert und das Bakteriensediment in 2 ml eiskaltem TSS-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach einer halbstündigen Ruhephase auf Eis wurden 500 μl 80%iges (w/v) Glycerin zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Abschließend erfolgte die Aufteilung des Ansatzes in Portionen von 100 μl pro vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die kompetenten Zellen wurden augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Die kompetenten und bei -80°C gelagerten Zellen wurden für etwa 10 min auf Eis aufgetaut und nach vorsichtigem Untermischen der Plasmid-DNA bzw. der Ligationsreaktion für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Wasserbad wurde der Transformationsansatz erneut einige Minuten auf Eis gestellt. Um den Bakterien die Möglichkeit der Erholung zu geben, wurden die Ansätze auf 1 ml mit SOC-Medium aufgefüllt und im Anschluß für 45 bis 60 min bei 37°C im Thermomixer unter kräftiger Bewegung geschüttelt. Die Bakterien wurden schonend bei 2000 g und RT in der Tischzentrifuge sedimentiert, das Medium bis auf etwa 100 μl abgenommen. Die Bakterien wurden im Restmedium resuspendiert und das gesamte Volumen auf die jeweiligen vorgewärmten Selektivagarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei 37°C bis zum Erscheinen von Bakterienkolonien.

3.2.2.3 Transformation elektrokompeter Bakterienzellen

Durch Elektroporation lassen sich extrem geringe Mengen Plasmid-DNA, wie sie beispielsweise nach einer Plasmid-Präparation aus Hefezellen erhalten werden, noch effizient in Bakterien einbringen. Die tiefgefrorenen elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden für etwa 10 min auf Eis aufgetaut. Der halbe Präparationsansatz aus einer Hefe-Plasmid-Isolation, in idealerweise minimalem Volumen, wurde in jeweils ein auf Eis gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und nach Zugabe von 40 μl Zellsuspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut untergemischt. Parallel wurde als negative Kontrolle ein Ansatz mit 1-10 μl ddH₂O mitgeführt. Sofort wurden die Ansätze in spezielle, auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und in die Elektroporationskammer gestellt. Die Transformation erfolgte nach Gabe eines Strompulses hoher Frequenz (Kapazität des Kondensators: 25 μF , Gerätewiderstand: 200 Ω ; angelegte Spannung: 2,48 V). Die optimale Puls-Dauer sollte dabei 4,8 msek betragen. Sofort im Anschluß an den Puls wurde 1 ml SOC-Medium zur Zellsuspension gegeben, das gesamte Volumen mit einer Pipette aus der Küvette abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Bakterien konnten sich so für 1 h bei 37°C im Wasserbad erholen, und wurden im Anschluß als gesamtes Volumen auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.3 Hefegenetische Methoden

3.3.1 „yeast two hybrid“-System

3.3.1.1 Das Prinzip

Das Prinzip eines „yeast two hybrid“-Screens beruht auf der Möglichkeit, eukaryontischer Transkriptionsaktivatoren in ihre funktionell unabhängigen Untereinheiten - eine DNA-bindende sowie eine transkriptionsaktivierende Domäne - zu zerlegen. Die derart getrennte DNA-bindende und die aktivierende Domäne sind in der Lage, eine sogenannte „upstream activating site“ (UAS) zu binden und das Ablesen des nachgeschalteten Gens zu veranlassen, sofern beide Domänen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Werden diese beiden Domänen durch rekombinante DNA-Technologie an zwei interagierende Proteine fusioniert, und gelangen so die beiden Domänen des Transkriptionsaktivators in die notwendige räumliche Proximität, bindet der Transkriptionsfaktor an seinen spezifischen Promotor, und das nachgeschaltete Gen wird transkribiert. Kann nun die Transkription dieses Gens gemessen werden, liegt ein experimentelles System zum Widerspiegeln von *in vivo*-Protein-Protein-Wechselwirkungen vor (Fields und Song, 1989). Als Reporter Gene dienen im hier angewandten System das *ADE2*, das *HIS3* und das *LacZ*-Gen.

Für den Screen fand das „Matchmaker Two Hybrid“-System der Firma Clontech (Heidelberg) in leichter Modifikation Anwendung. Es basiert auf dem Transkriptionsaktivator *GAL4*, dessen DNA-bindende Domäne die *GAL1*-UAS erkennt. An die *GAL1*-UAS schließt sich ein minimaler Promotor und drei Reporter Gene (*ADE2*, *HIS3* und *LacZ*) an, über die die Transkription und damit die Wechselwirkung zweier Proteine getestet werden kann. Die beiden zu testenden Proteine müssen in die beiden Pendelvektoren pAS2-1 (enthält die DNA-bindende Domäne von *GAL4*) und pACT2 (enthält die transkriptionsaktivierende Domäne von *GAL4*) einkloniert und in die Hefezelle eingebracht werden, so daß die entworfenen Fusionsproteine synthetisiert werden können und eine Interaktion stattfinden kann. Grundsätzlich sind in den verwendeten „two hybrid“-Hefestämmen die Reporter Gene in das Genom integriert und die genomische Kopie von *GAL4* liegt deletiert vor.

Der in diesem Screen eingesetzte Hefestamm PJ69-4A bietet im Vergleich mit den kommerziell erwerblichen Hefestämmen den Vorteil eines weiteren Reportergens.

Neben *HIS3* und *LacZ*, dient hier auch das Gen für die Adenin-Synthese, *ADE2*, als Reporter. Es steht unter Kontrolle des *GAL2*-Promotors, an den auch die Bindedomäne von *GAL4* binden kann, und erhöht somit signifikant die Stringenz des Screens.

3.3.1.2 Amplifikation einer *S. cerevisiae*-Genbank

Die Durchführung des „yeast two hybrid“-Screens erfordert die Expression von Fusionsproteinen, bestehend aus einem humanen Protein und einem Teil des *GAL4*-Transkriptionsaktivatorproteins. Dazu wurde eine in *E. coli* BNN132 transformierte humane HeLa-cDNA-Plasmidgenbank für *S. cerevisiae* (Clontech, Heidelberg) durch Ausplattieren und Präparation der Plasmid-DNA amplifiziert. Gemäß Herstellerangaben umfaßt die Plasmidgenbank $3,5 \times 10^6$ unabhängige cDNA-Klone mit einer durchschnittlichen cDNA-Länge von 2 kb. Die cDNAs liegen im Vektor pACT2 konstruiert vor. pACT2 trägt neben den zur Propagierung und Selektion in *E. coli* notwendigen Kassetten das *LEU2*-Gen als Auxotrophiemarker, den ADH-Promotor sowie -Terminator, dazwischen die Aktivierungsdomäne des *GAL4*-Proteins und eine multiple Klonierungsstelle. Die pACT2-Plasmide mit den klonierten cDNA-Sequenzen werden im weiteren als „prey“ bezeichnet.

Durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf selektivem LB-Plattenmedium wurde der Titer der Genbank auf etwa 8×10^9 cfu („colony forming units“)/ml *E. coli* bestimmt. Zur Amplifikation von 1×10^7 Klonen mußten insgesamt 12,5 µl der *E. coli*-Suspension ausgestrichen werden. Um ein gleichmäßiges Wachstum der Kolonien zu gewährleisten und damit die Repräsentativität der einzelnen Gene innerhalb der Genbank zu erhalten, durfte die Anzahl der Kolonien pro Platte 80.000 nicht übersteigen. Entsprechend wurden die Bakterien auf 120 Platten mit einer ungefähren Dichte von 75.000 cfu ausplattiert, über Nacht bei 37°C bis zum Erscheinen eines gleichmäßigen Bakterienrasens inkubiert und mit je 2,5 ml LB-Medium von den Platten geschabt. Die vereinigten 300 ml wurden auf 18 l LB-Selektivmedium verdünnt und für 6 h bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator weiterkultiviert. Die durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 3000 g, in PBS gewaschenen und vereinigten Bakteriensedimente wurden mittels „Giga Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt und die präparierte Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 2,2 µg/µl eingestellt.

3.3.1.3 Transformation einer Genbank in Hefezellen

Die Transformation einer Genbank in Hefezellen erfordert eine optimal maximierte Transformationseffizienz, so daß hierfür die Methode zur Hefetransformation im kleinen Maßstab leicht modifiziert eingesetzt wurde.

20 ml einer Übernachtkultur in Voll- oder Selektionsmedium wurden 1:10 in entsprechendem Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 30°C unter kräftigem Schütteln kultiviert. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 g und RT sedimentiert und nachfolgend in 25 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,4 gewaschen, erneut zentrifugiert und diesmal in 10 ml 100mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl-Lösung (LiT) resuspendiert. Während 40-minütiger Rotation auf dem Überkopfschüttler bei RT konnten sich die Zellen erholen und wurden dann bei 1000 g nochmals für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 800 µl LiT-Lösung aufgenommen und die Zellen durch kräftiges Mixen („Vortexen“) voneinander getrennt. Einer frisch bereiteten sterilfiltrierten Lösung von 50 µl LiT, 50 µl denaturierte und gescherte Heringsperma-DNA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden 400 µl Zellsuspension zugefügt und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Der Ansatz wurde 10 min auf dem Drehrad bei RT inkubiert, mit 300 µl 40%igem PEG in LiT versetzt und sorgfältig durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach weiteren 10 min auf dem Drehrad erfolgte die Transformation durch Zusatz von 15 µl sterilem DMSO und Hitzeschock bei 42°C für 10 min. Die Zellen wurden anschließend kurz bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 500 µl YPD-Medium resuspendiert und so eine Stunde lang bei RT ohne Schütteln wachsen gelassen. Nach einer Zentrifugation bei 1000 g für 5 min, wurde das Sediment in 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,4 gewaschen, die Zellen nochmals abzentrifugiert, in 1,5 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,4 resuspendiert und jeweils Aliquote von 50 µl auf vorgewärmte Selektionsplatten ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte bei 30°C in Hefeinkubator bis zum Erscheinen von Einzelkolonien nach etwa 4 Tagen.

3.3.2 Transformation von Hefezellen im kleinen Maßstab

Die Transformation von Hefen wurde in leicht abgewandelter Form nach der „small-scale lithium acetate yeast transformation procedure“ der Firma Clontech (Heidelberg) durchgeführt.

Bei -80°C lagernde Glycerolstocks einzelner Hefekulturen wurden zunächst auf einer YPD- oder SD-Platte durch Ausstreichen vereinzelt und für 4 bis 6 Tage bei 30°C im Inkubator kultiviert. Mit einer Einzelkolonie der Platte wurden wahlweise 30 bis 250 ml YPD- oder Selektionsmedium beimpft und die Kultur ein bis zwei Tage bei 30°C und 160 Upm im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 angezogen, so daß sie sich in der mittellogarithmischen Wachstumsphase befanden. 5 ml der Hefezellen wurden bei 1000 g und RT für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen einmal in 1 ml 0,1 M LiAc/TE pH 7,5 gewaschen und schließlich in 100 µl 1 M LiAc/TE resuspendiert. Zwischenzeitlich wurde die zu transformierende Plasmid-DNA (1-2 µg) mit je 10 µg gescherter und für 5 min bei 96°C denaturierter Carrier-DNA („hering sperm DNA“, #D6898 der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und auf Eis abgeschreckt. 100 µl Zellsuspension wurden zu jedem Ansatz pipettiert, durch mehrfaches Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe und Untermischen von 300 µl 50%iger frisch angesetzter und sterilfiltrierter PEG/LiAc/TE-Lösung erfolgte eine einstündige Inkubation bei 30°C im Wasserbad. Die Hefezellen wurden durch vorsichtiges Zutropfen von 34 µl sterilem DMSO auf den anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 5 min vorbereitet, im Anschluß für einige Minuten auf Eis heruntergekühlt, mit 1 ml TE versetzt und dann bei 1000 g und RT für 4 min sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes erhielt jeder Ansatz 100 µl sterilen TE-Puffer und die darin resuspendierten Zellen wurden gesamt auf vorgewärmte Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation fand bei 30°C im Hefeinkubator bis zum Erscheinen von Einzelkolonien statt, was in der Regel nach drei bis fünf Tagen der Fall war. Die Transfektionseffizienz betrug durchschnittlich 10⁴-10⁶ Zellen/µg eingesetzter Plasmid-DNA.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen erfordert aufgrund der festen Zellwand der Hefe, ihrer zumeist relativ großen Plasmide, die in geringer Kopienzahl vorliegen, und der größeren Gefahr der Kontamination der Plasmid-Präparation mit genomischer Hefe-DNA eine von der DNA-Isolation aus Bakterien abweichende Methode.

5 ml einer Hefe-Übernachtskultur werden sequentiell bei 1000 g und RT für je 2 min in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß sedimentiert. Nach nicht quantitativem

Abgießen des Mediums wurden die Zellen im Restmedium durch „Vortexen“ resuspendiert und mit 400 µl Hefe-Aufschlußpuffer gemischt. Durch Zugeben von 400 µl Aqua Phenol sowie 0,6 g Glasperlen (\varnothing 0,45-0,52 mm, Roth, Karlsruhe) und zweiminütiges „Vortexen“ erreichte man den Aufbruch der Hefezellen, was sich unter dem Lichtmikroskop überprüfen ließ. Zelldebris und ausgefallene Proteine konnten durch 5-minütige Zentrifugation bei 16000 g und RT abgetrennt werden. Der wäßrige Überstand wurde quantitativ abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt und für 10 min bei 14000 Upm und RT sedimentiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und abschließend in 20 µl TE/2 aufgenommen.

3.3.4 Herstellung stabiler Transformanten in *S. cerevisiae* und experimentelle Genzerstörung („gene disruption“)

Die Entfernung eines offenen Leserahmens durch homologe Rekombination mit einem selektierbaren Marker gehört in *S. cerevisiae* zu den Standard-Methoden. Die gewünschte CDK-Inhibitor-cDNA wurde dabei jeweils aus dem Vektor für die transiente Transformation gemeinsam mit seinen flankierenden DNA-Abschnitten (*HIS3*, Amp^r, pMB1ori, Cyc1TT, p*GAL1*) ausgeschnitten und inmitten der Sequenz des Tryptophan-Gens des Vektors YDp-W über die Restriktionsschnittstellen *XbaI-HindIII* wieder eingefügt. Nach Amplifikation in *E. coli* wurde die gesamte DNA-Kassette zusammen mit den nun flankierenden Bereichen des Tryptophan-Gens wieder herausgeschnitten und direkt in kompetente *S. cerevisiae* transformiert. Im transformierten DNA-Fragment liegt der neue Selektionsmarker (*HIS3*) zusammen mit der CKI-Sequenz zwischen Sequenzen, die mit den flankierenden Bereichen des Tryptophan-Gens übereinstimmen. Nach Transformation können die flankierenden Sequenzen mit dem Tryptophan-Gen im Hefe-Genom homolog rekombinieren und dieses so disruptieren. Die Integration der Kassette wurde über die Auxotrophiemarker *HIS3* sowie *TRP1*, die Integration an der gewünschten Stelle über genomische PCR nachgewiesen. Für die PCR wurden die Primer so gewählt, daß einer innerhalb der integrierten Kassette, der andere außerhalb des deletierten Bereichs hybridisieren konnte. Die Kenntnis der Sequenzen von Marker und Gen erlaubte eine Vorhersage

über die Größe des entstehenden PCR-Produkts, weshalb die entsprechende Größe somit indikativ für die Integration der Kasette an der gewünschten Stelle war.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Adhärente Zelllinien (293, 293T, HeLa, HS68, MCF7 und PC3) wurden in Standardmedium bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% (Hera cell, Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Zellkulturschalen variabler Größe kultiviert. Das Medium für HS68-Zellen wurde zusätzlich mit 1 mM Natriumpyruvat versetzt. 293-, 293T-, HeLa-, MCF7 und PC3-Zellen wurden alle zwei bis 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, wahlweise unter Kontaktinhibition, kultiviert, wobei das Medium alle drei Tage erneuert wurde. Bei Bedarf wurden die Zellen wie beschrieben mit Trypsin/EDTA 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 angezogen. Die Zelldichte der Kulturen wurde durch tägliches Verdünnen mit frischem Medium zwischen $2,5 \times 10^5$ und 1×10^6 Zellen pro ml gehalten.

3.4.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden entweder Suspensionszellen abgenommen oder adhärenente Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in ein Einfriereröhrchen abgefüllt, langsam im Isopropanolblock auf -80°C (möglichst 1°C/min) abgekühlt und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen

Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad. 1 ml aufgetaute Zellsuspension wurde mit 50 ml Standardmedium verdünnt, die Zellen bei 300 g für 5 min sedimentiert, in einem geeigneten Mediovolumen aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gewünschter Größe zur Weiterkultivierung überführt.

3.4.3 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: erstens die einfache Färbung mit Propidiumiodid, bei der die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes fluoreszenzmarkiert werden, und zweitens die Doppelfärbung mit Propidiumiodid und anti-BrdU-FITC-Antikörperkonjugaten, bei der DNA-synthetisierende Zellen zusätzlich quantiviziert und sortiert werden können.

Zur Färbung mit Propidiumiodid wurden trypsinbehandelte adhärenente Zellen (jeweils $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen) in 2 ml Standardmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g abzentrifugiert, in PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und anschließend in 300 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Unter kontinuierlichem Mischen („Vortexen“) wurde nun 1 ml eisgekühlte 1%ige (w/v) Paraformaldehydlösung zugetropft. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmalig in 1 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 300 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von ebenfalls 300 µl PI-Färbelösung wurden die Zellen 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert und im Anschluß die Einlagerungsreaktion durch Kühlen auf Eis zum Erliegen gebracht. Schließlich konnten die Proben mit Hilfe eines Durchflußzytofluorimeters (FacsCalibur, Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm analysiert werden.

3.4.4 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Immunopräzipitationen und Reporteranalysen wurden anhand von humanen Gewebekulturzellen durchgeführt, in die vorab mittels transienter Transfektion

geeignete Plasmide eingebracht worden waren, und die somit die gewünschten Proteine oder Proteinchimären exprimierten.

Adhärente HeLa-Zellen oder PC3-Zellen wurden mit dem Reagenz „SuperFect“, „Effectene Transfection Reagent“-Kit (Qiagen, Hilden) oder dem „Lipofectamine 2000 Reagent“ (Life Technologies, Karlsruhe) gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert.

Zur Kontrolle der prozentualen Transfektionseffizienz wurden die Zellen bisweilen unter identischen Bedingungen mit pEGFP-C2 kotransfiziert, einem Plasmid das für eine Variante von GFP („green fluorescent protein“) kodiert. Der Anteil der transfizierten Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

293- und 293T-Zellen wurden gemäß der Calciumphosphat-Methode (Wigler *et al.*, 1979) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/„6-Loch“-Zellkulturschale ausgesät. 5 ng Luziferase-Reporterplasmid (Derivate von pGL3 Control), 500 ng pSV- β -Gal und 0,1 bis 2 μ g eines eukaryontischen Expressionsplasmids (pCMX) wurden auf 150 μ l mit ddH₂O verdünnt und mit 16,7 μ l 2,5 M CaCl₂ gemischt. Zu dieser Lösung wurden 167 μ l 2 x HBS unter permanentem kräftigem Mischen langsam zugetropft. Die Mischung wurde zur Bildung der Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitate mindestens 30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Vier bis sechs Stunden später wurde das Transfektionsmedium abgenommen und gegen das Standardmedium ausgetauscht. Die Ernte erfolgte gemäß dem Versuchsplan 24 bis 96 h nach der Transfektion.

Für Immunopräzipitationen wurden 293T-Zellen jeweils frisch aufgetaut und ausgesät, einen Tag vor der Transfektion etwa 1:2 bis 1:3 gesplittet und in größere Zellkulturschalen (\varnothing 15 mm) so ausgebracht, daß sie am Tag der Transfektion optimalerweise eine Konfluenz von 30 bis 40% aufwiesen. In 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 2160 μ l ddH₂O mit dem einzubringenden Plasmid (oder Plasmiden) steril vorgelegt. Der Ansatz wurde mit 240 μ l 2,5 M CaCl₂ versetzt und kurz geschüttelt. Nach Untermischen von 2,4 ml 2 x HBS-Lösung durch Zutropfen unter kontinuierlichem „Vortexen“, wurde 30 min bei RT inkubiert und dann die Transfektionslösung vorsichtig zu den Zellen pipettiert. Mediumwechsel erfolgte nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C, die Ernte der Zellen, soweit nicht anders angegeben, 48 h nach der Transfektion.

3.4.5 Transaktivierungsassay

Zur Bestimmung der Koaktivatorfunktion von Proteinen auf den Androgen-Rezeptor (AR) wurde ein sogenannter Transaktivierungsassay durchgeführt. Dabei wurden 293T bzw. PC3-Zellen in „DMEM high glucose“-Medium mit 10% „double stripped fetal calf serum“, das nur noch einen minimalen Anteil an Androgenen und Östrogenen aufwies, in „6-Loch“-Schalen bis zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Schale angezogen. Die Transfektion der Zellen erfolgte gemäß dem „Effectene Transfection Reagent“-Protokoll (Qiagen, Hilden). Jeder Ansatz wurde als Duplett bearbeitet und dabei mit den folgenden verschiedenen Plasmiden infiziert: 500 ng MMTV-Luc (Luziferase-Reporter gen unter Kontrolle des MMTV-Promotors), 30 ng pSG5hAR (Androgen-Rezeptor-Expressionskonstrukt), 500 ng pSV β -Gal (β -Galactosidase-Reporter gen unter Kontrolle des SV40-Promotors), 100 ng FHL2pCMX (Expressionskonstrukt für FHL2) sowie wahlweise 100 ng p57pCMX (Expressionskonstrukt für p57). Die Gesamt-DNA-Menge wurde in jedem Ansatz konstant bei 4 μ g gehalten, Ausgleich erfolgte mit dem Leervektor pCMX. 4 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, 1 x mit PBS gewaschen und 4 ml neues Medium zupipettiert. Jeweils einem Ansatz des Dupletts wurde das synthetische Androgen R1881 in einer Endkonzentration von 10^{-7} M zugesetzt, der verbleibende Ansatz wurde zur Kontrolle nur mit der gleichen Menge 70% Ethanol versetzt. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen unter Zugabe von Lysis-Puffer zur Bestimmung der Reporter genaktivitäten.

3.4.6 Bestimmung von Reporter genaktivitäten

Zur Präparation von Lysaten, die für die Messung von Reporter genaktivitäten vorgesehen waren, wurden transient transfizierte Zellen einer „6-Loch“-Platte zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 300 μ l Lysepuffer von der Kulturschale aufgenommen. Wenn aus der gleichen Kultur auch RNA präpariert werden sollte, wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Schale gelöst, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in zwei Aliquoten separat weiterbehandelt.

Zellen, die mit Derivaten von pGL3 Control transfiziert worden waren, wurden in „Passive Lysis Buffer“ (Promega, Mannheim) aufgeschlossen und die Aktivität der Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*)-Luziferase wurde mit dem „Luciferase Assay System“ (Promega, Mannheim) bestimmt. Dabei wurde jeweils nach den Angaben des

Herstellers verfahren. Die β -Galaktosidaseaktivität der Extrakte wurde gemessen, um Variationen der Transfektionseffizienz zu nivellieren (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 50 μ l Extrakt mit 100 μ l des jeweiligen Lysepuffers verdünnt. Nach Zugabe von 150 μ l β -Gal-Substratlösung wurden die Reaktionsansätze solange bei 37°C inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung zu beobachten war. Anschließend wurden jeweils 300 μ l 1 M Tris (uneingestellter pH) zugesetzt, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Als Maß für die β -Galaktosidaseaktivität wurde die Extinktion bei 420 nm im Luminometer gemessen.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Grundlegende Standardmethoden

3.5.1.1 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 (OD_{280} von 1 entspricht dabei 1 mg/ml). Die Konzentration und der Reinheitsgrad von gereinigten, rekombinanten Proteinen wurde auch mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels abgeschätzt. Als Standard diente BSA in definierten Mengen. In allen übrigen Fällen wurden Proteinkonzentrationen mit Hilfe des „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Pierce, Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

3.5.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen oder Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe der sogenannten 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%, 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 befüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 2 x oder 10 x SDS-Probenpuffer versetzt und die Proben zur Trennung von Dimeren oder Aggregaten für 5 min bei 97°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um die nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das SDS-Gel für 30 min bei RT auf dem Taumler in Coomassie-Färbelösung inkubiert, anschließend solange in Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) geschwenkt bis einzelne Banden erkennbar wurden. Das Gel wurde 10 bis 20 min in Geltrockenlösung geschwenkt (20% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Glycerin), in Zellophanfolie eingespannt und nach Austrocknen digital dokumentiert.

Autoradiographie von Elektrophoresegelen

Zur Sichtbarmachung radioaktiv (mit [^{32}P] oder [^{35}S]) 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}P]) oder „Transcreen LE“- (für [^{35}S]) Verstärkerfolie (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingeschlagen und bei -80°C für wenige Stunden bis mehrere Tage gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.5.2 Präparation von Gesamt-Zellysaten

Zellen, die zur Präparation von Gesamt-Zellysaten dienen, wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA oder durch Abschaben mit einem Zellschaber von der Unterlage ihrer Kulturschalen gelöst, 5 min bei 300 g abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Sediment wurde in IP-Puffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen)

mit 3 x je 7 Pulsen (0,80) auf Eis aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde anschließend für 45 min bei 100000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

3.5.3 Gekoppelte *in-vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen

Zur gekoppelten *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde der „TNT-Sp6/T7 coupled Transcription/Translation Assay“-Kit der Firma Promega (Mannheim) nach deren Angaben verwendet. Die zur Translation verwendeten Konstrukte enthielten einen T7-Promotor und leiteten sich von pBluescript SK(-), pET28a oder pT3T7U18 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 10 x TNT-Reaktionspuffer und 1µl TNT-T7-RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt, für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde ein Aliquot von 1 µl der Reaktion mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

3.5.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die entsprechenden Plasmid-Konstrukte (in pET28a) in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert und mit einer Einzelkolonie 50 ml antibiotikahaltiges Superbroth-Medium beimpft. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 4 h bei 37°C bzw. 18-22 h bei 25° wurden die Zellen bei 5000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, direkt weiter aufgearbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.5.5 Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen

Abhängig von der Art der Expression der gewünschten Proteine oder Proteinfusionskonstrukte in *E. coli*, entweder in unlöslicher Form in „inclusion bodies“ oder sezerniert in löslicher Form, wurden zwei unterschiedliche Methoden der Aufreinigung durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte jedoch bei beiden Methoden gleichermaßen.

Das gewaschene und bei -20°C gelagerte Bakteriensediment wurde in 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, je 10 μ g/ml Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin auf Eis resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall (Labsonic U, Ultraschallhomogenisator, B. Braun, Melsungen) während 3 x 15 Pulse (0,7) aufgebrochen. Anschließend wurden Zelltrümmer, Nukleinsäuren und „inclusion bodies“ bei 100000 g und 4°C für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur weiteren Bearbeitung auf Eis gehalten, das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Alternativ wurden GST-Fusionskonstrukte nach Zugabe von oben aufgeführtem Puffer auf Eis aufgetaut, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt, 1 h auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert und aufbewahrt.

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

Der von Zelldebris befreite Überstand wurde mit etwa 1 mg mit Puffer voräquilibriertem „ProBond Nickel-Chelating Resin“ (Invitrogen, Groningen, Niederlande) pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und die Aufschlammung für 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 1 min wurde das über seinen His-„tag“ an das Ni²⁺-Resin gebundene Protein dreimal mit Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, je 10 μ g/ml Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin, 10 mM Imidazol) gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, je 10 μ g/ml Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin, 300 mM Imidazol) von der Immobilisierungsmatrix eluiert. Die proteinhaltige Lösung wurde zur Abtrennung von Salzen bzw. zur Umpufferung über Nacht bei 4°C gegen ein Volumen von 3 x 0,5 l unter kontinuierlichem Rühren

dialysiert (Spectra/Por molecularporous membrane tubing, Spectrum Laboratories, USA) und gegebenenfalls eingeeengt (Centricon, Zentrifugenfiltereinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle). Die Proteinkonzentration wurde spektralphotometrisch bei einer Extinktion von 280 nm bestimmt und der Reinheitsgrad anhand gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt. Die Proteinlösung wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde analog über eine Glutathionsepharosematrix (Glutathione Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die Elution des immobilisierten Proteins erfolgte hierbei mit 20 mM Glutathion bei pH 8,0.

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

Um die unlöslichen Proteine der „inclusion bodies“ aufzureinigen, wurde zunächst das nach dem Abzentrifugieren des Zellaufschlusses entstandene Sediment gewaschen, die „inclusion bodies“ aufgeschlossen, die denaturierten Proteine affinitätsgereinigt und schließlich renaturiert.

Zur Abtrennung der „inclusion bodies“ von verunreinigenden Membranlipiden und -proteinen wurde das Sediment zunächst zweimal in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA und 0,5% (w/v) Triton-X-100, 0,5 mM PMSF für 15 min im Dunkeln auf dem Drehrad gewaschen. Zu Beginn jeder Inkubation wurden zur Unterstützung der Solubilisierung die bakteriellen Membranen mittels Ultraschall aufgebrochen, und dann jeweils 15 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM PMSF gewaschen und dabei von EDTA und Detergensresten befreit. Zur Denaturierung des Proteins wurde das Sediment in 8 M Harnstoff, 0,1 M Na-Phosphat, pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM PMSF (pH auf 8,0 eingestellt) resuspendiert und über Nacht bei RT gerührt. Der Harnstoff brachte dabei das ausgefallene p57 wieder in Lösung, so daß es durch anschließende Zentrifugation bei 20000 g und RT für 15 min von den übrigen unlöslichen Proteinen abgetrennt werden konnte.

Der Überstand wurde auf eine mit Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M Na-Phosphat, pH 8,0, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM PMSF; pH auf 8,0 eingestellt) voräquilibrierte 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.

Zur Renaturierung von denaturierend affinitätsgereinigtem p57 erfolgte entweder eine Reinigung über einen Anionenaustauscher (siehe unten) oder eine stufenweise Rückfaltung des Proteins mittels Dialyse.

Dazu wurde das Eluat in einem Dialyseschlauch jeweils mindestens 4 h bei 4°C unter Rühren gegen eine Pufferlösung dialysiert, deren Harnstoffkonzentration schrittweise um 2 M erniedrigt wurde. Der letzte Dialyseschritt erfolgte gegen 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA und 0,1% (w/v) Triton-X-100, 2,5 mM β -Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF, je 10 μ g/ml Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin. Alternativ wurde das Protein an der Chelat-Matrix immobilisiert belassen, dort mit den analog sinkenden Harnstofflösungen renaturiert und anschließend mit 300 mM Imidazol in Denaturierungspuffer von der Matrix eluiert.

3.5.6 Ionenaustauscherchromatographie

Alternativ wurde zur weiteren Aufreinigung und Anreicherung von p57 eine Ionenaustauscherchromatographie mit immobilisierter Renaturierung und anschließender Elution des renaturierten Proteins über einen Salzgradienten durchgeführt.

Für die Chromatographie wurde mit Anionenaustauschersäulen an einem Äktapurifizier FPLC/HPLC-System (beides Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Benutzung der vom Hersteller für die jeweilige Säule angegebenen Säulenlaufparametern gearbeitet. Die Auswertung unterstützte das Programm Unicorn 3.00.

Zur Renaturierung von affinitätsgereinigtem denaturiertem p57 wurde 24 h gegen Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 25 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8,0) dialysiert und die Proteinlösung dann auf eine mit Denaturierungspuffer voräquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 13 Säulenvolumina Denaturierungspuffer zum Entfernen von ungebundenem Protein gewaschen. Um zu renaturieren, wurde in einem Gradienten über 25 Säulenvolumina vom Denaturierungspuffer mit 8 M Harnstoff zu

einem Puffer ohne Harnstoff gewechselt. Die Flußrate betrug dabei 0,1 ml/min, so daß eine sehr langsame graduelle Renaturierung erfolgen konnte. Abschließend wurde das an der Säulenmatrix immobilisierte p57 mit einem Salzgradienten (25 mM bis 1 M NaCl) von 5 Säulenvolumina eluiert. Gewünschte Elutionsfraktionen zu je 0,5 ml wurden anhand von SDS-PAGE analysiert, gegebenenfalls vereinigt, eingengt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.7 Gelfiltration

Die Gelfiltrationschromatographie fand Einsatz bei der Analyse der Zusammensetzung von Proteinkomplexen (wie FHL2 mit p57) sowie als weiterer Aufreinigungsschritt bei der Reinigung von p57 im Anschluß an eine Affinitäts- und Ionenaustauscherchromatographie. Gelfiltrationen wurden mit vorgepackten Gelfiltrationssäulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung des FPLC/HPLC-Äktapurifizier-Systems durchgeführt. Eine Proteinlösung wurde auf eine mit Laufpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT) voräquilibrierte Säule aufgetragen und in einer isokratischen Elution über 1,5 Säulenvolumina größenfraktioniert. Der Säulendurchlauf wurde zu 0,5 ml-Fractionen aufgefangen und nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung oder im Immunoblot analysiert.

3.5.8 *In vitro*-Protein-Protein-Bindungsstudien

Für Bindungsstudien wurde jeweils eine Proteinkomponente rekombinant als GST- oder His-Fusion vorgelegt, während die andere Komponente 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 Protein A-Trisacryl, 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 Lämmli-Puffer (frisch mit 25 µl/0,5 ml β-Mercaptoethanol versetzt) aufgenommen. Durch 5-minütiges Erhitzen bei 97°C eluierten die an die Matrix

gebundenen Proteine, ggfs. mitsamt der Antikörper, und nach 1-minütiger Zentrifugation bei 16000 g konnte der Überstand von den „beads“ abgenommen werden. Die Analyse einer Protein-Protein-Interaktion erfolgte über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, Immunoblot-Analyse oder Autoradiographie.

3.6 Immunologische und immunobiochemische Methoden

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

Der Elektrotransfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine verlief nach dem sog. „semi-dry“-Verfahren (gemäß Protokoll der Firma Millipore, Eschborn). Das Proteingel wurde nach Abbau der Gelapparatur für etwa 10 min in Transferpuffer geschwenkt, die PVDF-Membran, um ihren hydrophoben Charakter zu verlieren, währenddessen einige Sekunden in Methanol getränkt und anschließend ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden übereinander drei Lagen von in Transferpuffer getränktem Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, drei weitere Lagen getränktes Whatman 3MM-Papier und die Kathode geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA pro cm² Trenngelfläche für 60 min. Zur Überprüfung der Transfereffizienz bzw. zum optischen Vergleich von Proteinquantitäten wurde die Membran einige Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung geschwenkt und anschließend in 90% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure entfärbt. Um die transferrierten Proteine spezifisch immunologisch detektieren zu können, wurde die entfärbte Membran zunächst für 1 bis 2 h bei RT in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert und dabei sämtliche unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Milcheiweißen abgesättigt. Es schloß sich eine zweistündige Inkubation der Membran in einer geeigneten Verdünnungslösung des ersten Antikörpers in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver an. Anschließend wurde der Filter dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit einem, gegen den ersten Antikörper gerichteten und an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000 in

TBS-T, 5% (w/v) Magermilchpulver) für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für je ein bis zwei Stunden bei RT auf dem Taumler, wurden die spezifisch detektierten Proteine über Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde die Blotmembran in ECL-Lösung (5 µl, 6,8 mM *p*-Kumarinsäure in DMSO, 5 ml 1,25 mM Luminol sowie 1,5 µl 30% (v/v) H₂O₂) geschwenkt und abschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „Super Signal West Femto“-System (Pierce, Rochford, USA) wiederholt.

3.6.2 Immunopräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt um ein bestimmtes Protein aus Gesamt-Zellextrakten (*in vitro*-Translationsansätze oder Interaktions-Untersuchungen) aufzureinigen oder um in Koimmunopräzipitationen die *in vivo* an das präzipitierte Protein assoziierten Proteine zu identifizieren.

Der proteinhaltigen Lösung wurde spezifischer Antikörper (1-8 µg) zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 30 µl 50% (v/v) Protein A (oder G)-Sepharose bzw. 30 µl 50% (v/v) Protein A-Trisacryl-Suspension (jeweils vorab in IP-Puffer äquilibriert) erfolgte eine 2- bis 12-stündige Inkubation bei 4°C auf dem Überkoprotator. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde zweimal mit IP-Puffer gewaschen, einmal mit 0,5 M LiCl und einmal mit 1% (w/v) Natriumdesoxycholat, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% (w/v) SDS, dazwischen die Matrix jeweils bei 300 g für 1 min sedimentiert. Abschließend wurden die Flüssigkeit über den „beads“ quantitativ entfernt, 30 µl 2 x Laemmli-Puffer (frisch mit 25 µl β-Mercaptoethanol/0,5 ml versetzt) zugefügt und nach 5-minütigem Kochen bei 97°C und kurzer Zentrifugation der Überstand abgenommen. Dieser konnte dann mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert werden. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt.

3.6.3 Immunozytologie

Transient transfizierte Säugerzellen (293T, HeLa, NIH3T3) wurden auf sterile und mit Polylysin beschichtete Deckgläschen in „6-Loch“-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40 bis 80% kultiviert. Die Zellen wurden direkt nach Absaugen des

Standardmediums einmal mit PBS-M gewaschen, bei RT mit je 2 ml 1%iger (w/v) Paraformaldehydlösung pro Loch für 10 min auf den Deckgläsern fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-M gewaschen, mit 2 ml einer 0,2%igen (v/v) Triton-X-100-Lösung in PBS-M für 6 min auf Eis permeabilisiert, einmal in PBS-M und zweimal in PBS-M, 2% (w/v) BSA gewaschen. Der erste Antikörper wurde standardmäßig in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS-M, 2% (w/v) BSA) für 1 h bei RT auf den Zellen belassen. Nach einmaligem Waschen in PBS-M, 2% (w/v) BSA erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa-, FITC- oder Rhodamin-konjugierter Antikörper, 1:100) für 1 h bei RT im Dunkeln. Der Einsatz von Hoechst-Färbelösung (1:2000 verdünnt in PBS-M, 2% (w/v) BSA) während der letzten fünf Inkubationsminuten erlaubte die zusätzliche Anfärbung der Zellkerne. Abschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS-M gewaschen, kurz abgetropft, vollständig getrocknet, mit 10 µl „Glow mounting medium“ überschichtet und auf Objektträgern ausgehärtet. Die Auswertung erfolgte an einem Axioskop 2-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena).

3.6.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Herstellung des Antigens wurde p57 als His-„tag“-fusioniertes Protein 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 2 bis 3 Wochen 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 1500 g abzentrifugiert und das Serum bis auf den Blutkuchen abgenommen. 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 Überkopffrotator 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-Fractionen aufgefangen und sofort mit 100 µl 1 M Tris-HCl pH 9,0 pro Fraktion neutralisiert. Die einzelnen Fractionen wurden spektralphotometrisch auf ihren Antikörpergehalt hin getestet. Die antikörperhaltigen Fractionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und eingeengt (UH 100/1 Ultrahülsenapparatur, Schleicher & Schüll, Dassel). Die Antikörperlösung wurde zu einer Endkonzentration von 0,2% (w/v) mit Gelatine und 0,1% (w/v) mit Natriumazid versetzt. Die Qualität der gereinigten Antikörper wurde mit einer Konzentrationstitration des Antikörpers gegen das spezifische Antigen und Totalzellextrakt von 293T-, HeLa-, HS68- sowie MCF7-Zellen im Immunoblot getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines funktionellen Hefe-Screens zur Identifizierung CKI-regulierender Faktoren

4.1.1 Prinzip des funktionellen Hefe-Screens

Um mögliche, an der Regulation der Cip/Kip-Proteine beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurde ein völlig neues, auf dem Zellzyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* basierendes Selektionssystem entwickelt. Die humanen CDK-Inhibitorogene wurden dabei unter die Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors gebracht und induzierbar auf hohem Proteinniveau in einem geeigneten Hefe-Stamm exprimiert. Unter der Voraussetzung, daß die menschlichen CKI-Proteine nicht nur auf ihre humanen Zielstrukturen wirken sondern ebenfalls in der Lage sind, die CDK/Cyclin-Komplexe der Hefe zu inaktivieren, wird nach Anschalten der menschlichen CKIs die Hefe-CDK-assoziierte Kinaseaktivität gehemmt. Diese Hemmung führte nachfolgend zu einem Wachstumsstillstand oder zumindest zu einer Verzögerung im Wachstum der Hefezellen, der sich optisch über die verlangsamte oder nicht mehr stattfindende Koloniebildung der Hefe verfolgen ließ. Die transformierten Hefekulturen wurden schließlich mit einer humanen cDNA-Genbank transformiert. Menschliche cDNAs, die Proteine kodieren, welche eine Reduzierung der CKI-Proteinlevel oder aber eine Neutralisation der CKI-Aktivität bewirken und somit die Zellproliferation wieder in Gang bringen, so daß in der Folge auch das Koloniewachstum wieder einsetzt, sollten mit diesem System selektioniert werden (Abb. 4.1).

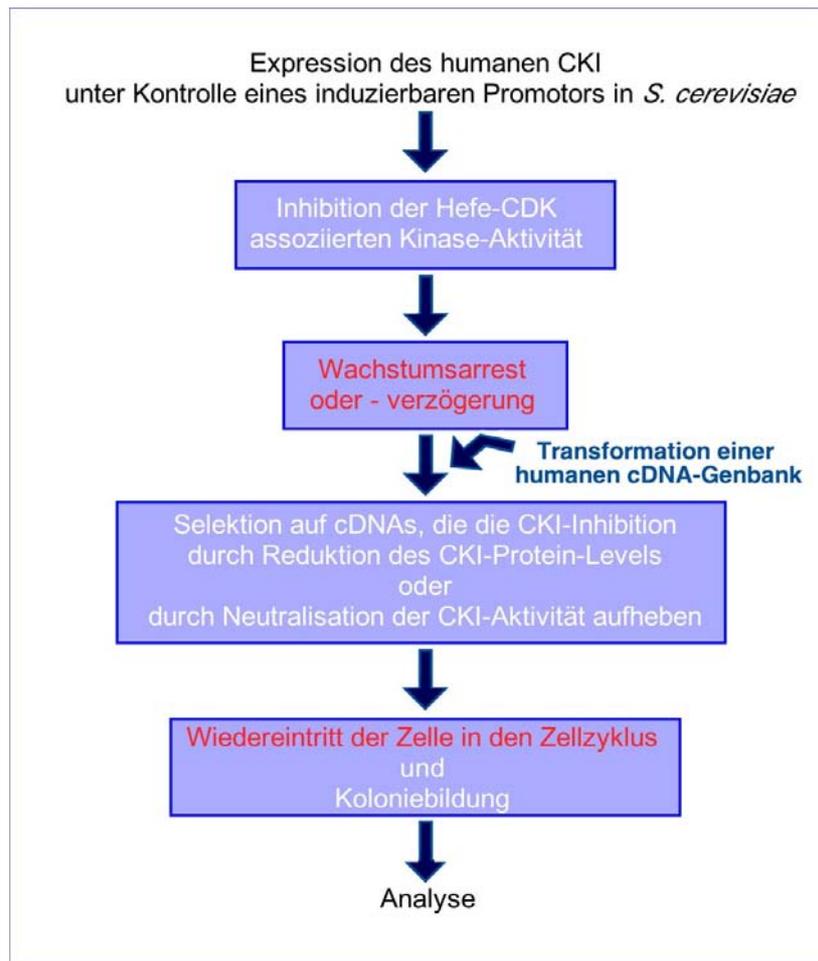


Abb. 4.1: Prinzip des funktionellen Hefe-Screens (schematische Darstellung)

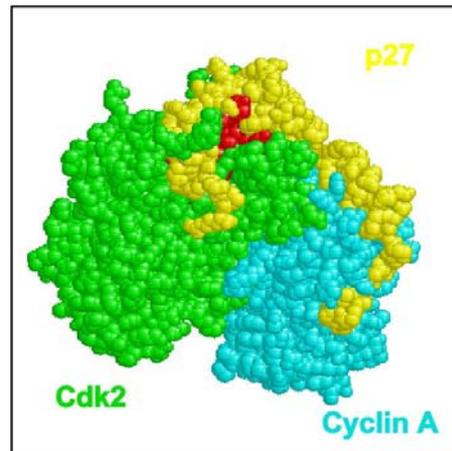
Dieses System zielt nicht nur darauf ab, eine *in vivo*-Interaktion zwischen dem CDK-Inhibitor und seinem Regulator nachzuweisen, sondern beweist gleichzeitig die Funktionalität einer solchen Proteinassoziation. Entscheidender Vorteil dieses Systems gegenüber gängigen Screening-Methoden ist, daß mit der Identifizierung des regulierenden Faktors gleichzeitig erste funktionelle Anhaltspunkte erhalten werden und damit die detaillierte Aufklärung der Physiologie der Wechselwirkung entscheidend erleichtert wird. Alle drei Cip/Kip-Mitglieder lassen sich analog untersuchen und die Analyse des gesamten menschlichen Genoms ist einfach und effizient.

Erwartet wurden vor einem Hintergrund verschiedener unspezifischer Transkriptionsfaktoren (da Hefe-Promotor-Elemente verwendet wurden) vor allem Faktoren, die die Aktivität der CDK-Inhibitoren vermindern. Beispielsweise verringert die Aktivität von c-myc über einen noch unbekanntes „Faktor X“ die Transkriptionsrate von p27 (Perez-

Roger *et al.*, 1997; Bouchard *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). Allerdings ist myc in diesem Screening-System nicht zu erwarten, da kein p27-Promotor verwendet wurde. Zu erwarten wären auch direkt am Abbau von p21, p27 oder p57 beteiligte Proteine, wie spezifische Proteasen. So ist für p27 neben dem SKP2-unabhängigen zusätzlich ein SKP2- und ubiquitinabhängiger proteasomaler Abbauweg (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) beschrieben. Die Assoziation von p27 mit dem 12S- und 13S-Protein des Adenovirus E1A führt *in vivo* zu einer Deaktivierung von p27 (Mal *et al.*, 1996; Alevizopoulos *et al.*, 1998). Tomoda *et al.* identifizierten 1999 Jab1 als Interaktionspartner von p27, womit sie eine weitere Komponente im SCF/SKP2-Abbauweg postulierten. Alle diese Proteine sind potentielle Faktoren, die im vorgeschlagenen Hefescreen identifiziert werden könnten.

4.1.2 p27 hat sehr gute strukturelle Voraussetzungen für die Inhibition der Hefe-CDK

Um sicherzustellen, daß die menschlichen CDK-Inhibitoren nicht nur auf ihre humanen Zielstrukturen wirken, sondern ebenso in der Lage sind, die Komplexe aus Cdc28 und CLN/CLBs in der Hefe zu inaktivieren, wurden die relevanten Proteine auf ihre Strukturhomologien hin verglichen. Es zeigte sich, daß die menschliche Cdk2 mit dem Funktionshomolog aus *S. cerevisiae* eine Sequenzidentität auf Proteinebene von 62% aufweist, die Sequenzähnlichkeit liegt mit etwa 80% sogar noch höher. Besonders auffällig war dabei, daß exakt diejenigen Aminosäuren, die aufgrund der Röntgenstrukturdaten des p27/Cdk2/Cyclin A-Komplexes gemäß Russo *et al.* (1996a) an der Bindung beteiligt sind, in Mensch und Hefe zu 93% konserviert oder konservativ ausgetauscht vorlagen (Abb. 4.2). Bezogen auf die Aminosäuresequenz von Cdk2 sind dies Tyr19, Ala21, Val30, Leu32, Leu67, Ile70, Tyr77, Val79, Phe80, Glu81, Phe82, Leu83 und Leu134. Einzige Ausnahme ist der nicht konservative Austausch von Alanin an Position 144 gegen Glycin in der Sequenz von Cdc28.



Cdc28	LAN Y KRL E K V G E G T Y G V V Y K ALDLRP S Q Q R V AL K KIRI E S E DE G VP S T A IR E IS L L K E	64
Cdk2	MEN F Q K V E K I G E G T Y G V V Y K ARNKLT S E--- V AL K KIRI D T E T E G V P S T A IR E IS L L K E	57
Cdc28	L K DDN I VRL Y D I V S DA H K L Y L V F E F L D L D L K R Y M E ----- G I P K D Q L G A D I V K K F M M Q	119
Cdk2	L N H P N I V K L L D V H T E - N K L Y L V F E F L H Q D L K K F M D A S A L T G I P ----- L P L I K S Y L F Q	110
Cdc28	L C K G I A Y C H S H R I L H R D L K P Q N L L I N K D E N L K L G D F G L A R A F G V P L R A Y T H E I V T L W Y R A	179
Cdk2	L L O G L A F C H S H R V L H R D L K P Q N L L I N T E G A I K L A D F G L A R A F G V P V R T Y T H E V V T L W Y R A	170
Cdc28	P E V L L G G K Q Y S T G V D I W S I G C I F A E M C N R K P I E S G D S E I D Q I F K I F R V L G T P N E A I W P D I	239
Cdk2	P E I L L G C K Y S T A V D I W S L G C I F A E M V T R R A L E P G D S E I D Q L F R I F R T L G T P D E V V W P G V	230
Cdc28	V Y L P D F K P S F E Q T R K D L S Q V V P S L D P R G I D L L D K L A Y D P I N R I S A R R A I H P Y F Q E	297
Cdk2	T S M P D Y K P S F E K T A R Q D F S K V V P L D E D E R S L L S Q M L H Y D P N K R I S A K A L A H P F F Q D	288

Abb. 4.2: Cdc28 aus *S. cerevisiae* und die humane Cdk2 sind in den an der p27-Bindung beteiligten Aminosäureresten hoch konserviert

Der Sequenzvergleich von Cdc28 aus Hefe mit menschlicher Cdk2 weist eine Sequenzidentität von 62% (grau) sowie eine Sequenzhomologie von 80% auf. Die nach Russo *et al.* (1996a) die Interaktion von Cdk2 mit p27 vermittelnden Aminosäurereste sind zwischen Cdc28 und Cdk2 konserviert (rot) oder konservativ ausgetauscht (grün). Lediglich an Position Ala144 (Cdk2) liegt mit Glycin (Cdc28) ein nicht konservativer Austausch vor (blau).

Folglich konnte davon ausgegangen werden, daß humanes p27 qualifiziert war, effektiv an Cdc28 und CLN/CLB zu binden und daher auch in Hefe als CDK-Inhibitor funktionell aktiv zu sein. Hinsichtlich der Cyclin-Komponente gab es mit Ausnahme der konservierten Cyclin-Box keine signifikanten Homologien zwischen Säugern und Hefe.

4.1.3 Episomale p27-Expression bedingt eine Wachstumsretardierung in *S. cerevisiae* Abys

Die cDNAs von p21, p27 und p57 wurden in den vorab modifizierten Hefe-Expressionsvektor pYES (Leucin-Auxotrophiemarker gegen Histidin-Auxotrophiemarker ausgetauscht) kloniert. Die Inhibitoren werden in der Hefe unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors exprimiert. Ebenfalls wurden einige p27-Mutanten als Kontrolle konstruiert: die p27^{T187A}-Mutante sollte weniger sensitiv gegenüber Abbau sein, da im Säugersystem gezeigt wurde, daß die Phosphorylierung durch die gebundene CDK am Threoninrest 187 des Inhibitors die ersten Schritte des p27-Abbaus einleitet. Eine entscheidende Kontrolle war auch die Mutante p27^{ACKI}, die an vier verschiedenen Aminosäureresten so verändert worden war (Aminosäureaustausche: L32A, F33A, F87A, Y88A), daß die CDK-Inhibitorfunktion blockiert wurde. Alle Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm Abys eingebracht und anschließend auf Transformanten hin selektiert. Die Expression der CDK-Inhibitoren ließ sich dadurch anschalten, daß Glucose-haltiges Wachstumsmedium gegen Galaktose-haltiges ausgetauscht wurde. Die Analyse der episomalen Transformanten schloß neben der phänotypischen Charakterisierung auch die Überprüfung der Plasmide mittels PCR sowie die Kontrolle des Expressionsniveaus ein (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, zeigten die p27-exprimierenden Hefekulturen im Vergleich mit der Vektorkontrolle ein stark retardiertes, teilweise sogar inhibiertes Wachstum. Erwartungsgemäß entwickelte die degradierungsinsensitive p27-Mutante darüberhinaus einen noch verstärkten Phänotyp. Wohingegen die positive Kontrolle mit p27^{ACKI} wie angenommen nicht zu verlangsamer Zellproliferation und folglich nicht zu einer Wachstumsverzögerung führte.

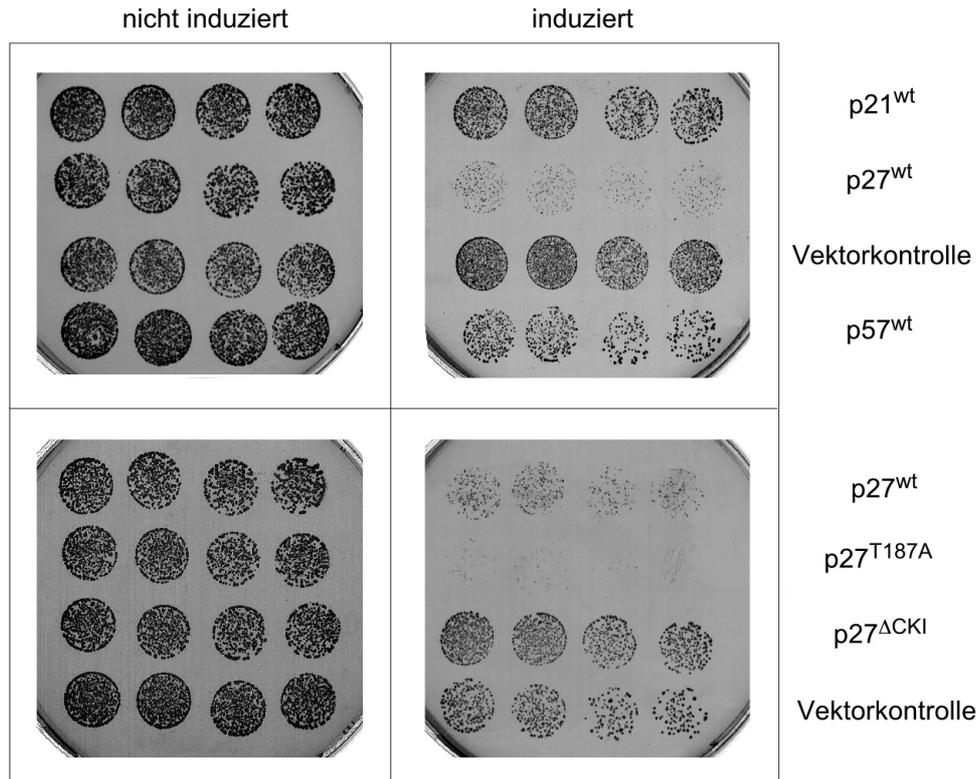


Abb. 4.3: p27^{wt} und p27^{T187A} induzieren einen Wachstumsarrest bzw. -verzögerung in Hefe
Episomale Hefetransformanten auf nicht-induktivem Medium wachsen gleichmäßig (links), wohingegen das Wachstum auf induzierendem Medium bei p27^{wt} und p27^{T187A}-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) und zur p27^{ΔCKI}-Mutante deutlich verzögert ist (rechts). p21^{wt} ist nicht signifikant im Wachstum beeinträchtigt, p57^{wt} zeigt eine leichte Retardierung des Koloniewachstums.

Der Wachstumsphänotyp von p27^{wt} in Kombination mit den parallel durchgeführten Kontrollphänotypen belegte eindeutig, daß die humanen CDK-Inhibitoren ihre Funktionalität im Organismus Hefe beibehielten und dort Cdc28 zu binden und zu inhibieren vermochten. Der Nachweis für die Anwendbarkeit dieses neu entwickelten Systems zur Identifikation neuer Bindungspartner der CDK-Inhibitoren war damit eindeutig erbracht.

Die analogen Untersuchungen für p21 und p57 wiesen im Fall von p21 nur ein minimal eingeschränktes Wachstum nach, p57 ließ nach Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls ein signifikant verlangsamtes Wachstum erkennen, nicht jedoch im gleichen Maße wie p27 (Abb. 4.3). Als Ursachen sind eine möglicherweise unterschiedliche Kopienzahl der Expressionsvektoren in den einzelnen Transformationen oder auch Variationen in den Expressionsraten der einzelnen Inhibitoren oder deren Stabilität anzuführen.

4.1.4 Stabile Expression von p21 und p27 arretiert das Wachstum von *S. cerevisiae*

Da bei der episomalen Expression der humanen CDK-Inhibitoren in Hefe zwar die Proliferation verlangsamt wird, aber noch kein vollständiger Wachstumsarrest zustande kommt, sollte zugunsten des späteren Screenings versucht werden, die Phänotypen noch stringenter zu modellieren. Dazu wurden die Fusionskonstrukte aus CKI und Galaktose-Promotor in den abermals modifizierten Vektor pYES-TRP umkloniert. Dies erforderte mehrere Klonierungsschritte, da aus den bereits vorhandenen Plasmiden verschiedene DNA-Bereiche (2 μ ori, f1 ori und Amp^r) eliminiert und andererseits das *HIS3*-Gen als Selektionsmarker eingefügt werden mußten. Die fertiggestellten Plasmide wurden in den Hefestamm *S. cerevisiae* Abys transformiert und alle Konstrukte über homologe Rekombination an den flankierenden Bereichen des *TRP1*-Genlocus stabil ins Hefegenom integriert (Abb. 4.5 A). Die korrekte Integration wurde mit Hilfe der Selektionsmarker (Disruption des *TRP1*-Gens und Erreichen einer *HIS3*-Auxotrophie) sowie zusätzlich PCR überprüft, wobei ein Primer jeweils im *TRP1*-Locus lag. Um die CKI-Proteinlevel in den p27-Transformanten zu verifizieren, wurde aus den Hefekulturen Gesamt-Protein extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und spezifisch p27^{wt} sowie seine Mutanten im Western-Blot mittels anti-p27-Antikörper detektiert (Abb. 4.4).

Immunodetektion: anti-p27

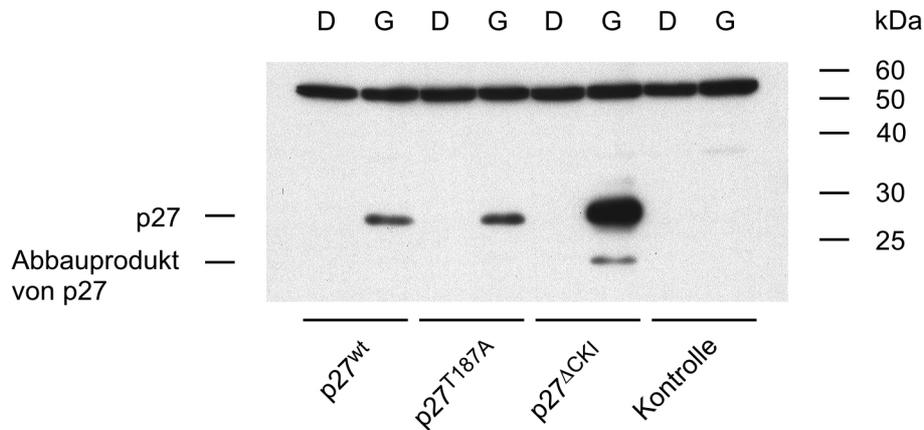


Abb. 4.4: Die stabil integrierten p27-Konstrukte werden von den Hefemutanten auf unterschiedlichem Niveau exprimiert

200 µg Gesamtprotein-Extrakten aus *S. cerevisiae* Abyn-Mutanten wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die p27-Mutanten im Western-Blot jeweils mit polyklonalem gegen p27 gerichtetem Antikörper nachgewiesen. Nach Wachstum auf Galaktose-haltigem induktivem Medium (G) ließ sich bei p27^{wt} und p27^{T187A} im Vergleich zu nicht induzierten, mit Glucose angezogenen Kulturen (D) die CKI-Expression nachweisen. p27^{ΔCKI} wurde auf deutlich höherem Niveau exprimiert, die starke Überexpression führte sogar zu einsetzendem p27-Proteinabbau in der Zelle. Die vom spezifischen Antikörper ebenfalls detektierte hochmolekulare Proteinbande in allen Ansätzen konnte nicht erklärt werden, diente aber als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 4.5 B zu sehen, war die Optimierung des Phänotyps erfolgreich. Die gezielte Induktion der CDK-Inhibitorexpression entsprach exakt den Vorhersagen und äußerte sich im Fall von p21^{wt} und p27^{wt} sowie der Kontrolle p27^{T187A} in einem eindrucksvollen Wachstumsstopp. Die für die CDK/Cyclin-Bindung defiziente Mutante p27^{ΔCKI} wächst vergleichbar der Kontrolle (Leervektor) ohne Wachstumsbeeinträchtigung. Im Fall von p57 konnte kein Arrest erzielt werden, was vermutlich auf ein zu geringes p57-Expressionsniveau zurückzuführen ist.

Die stabilen Hefemutanten erlaubten nun das vereinfachte und schnellere Wachstum in Vollmedium und die Anzucht ohne Selektionsdruck. Gleichzeitig wurden die Schwankungen im Expressionsniveau, die aus der variierenden Kopienzahl eines Plasmides bei transienter Transformation resultierten, unterbunden. Es ist damit erstmals gelungen, ein heterologes System in Hefe zu etablieren, das nicht nur die Identifizierung neuer Bindepartner für einen humanen CDK-Inhibitor erlaubt, sondern zusätzlich bereits wertvolle Informationen über seine physiologische Funktion liefert.

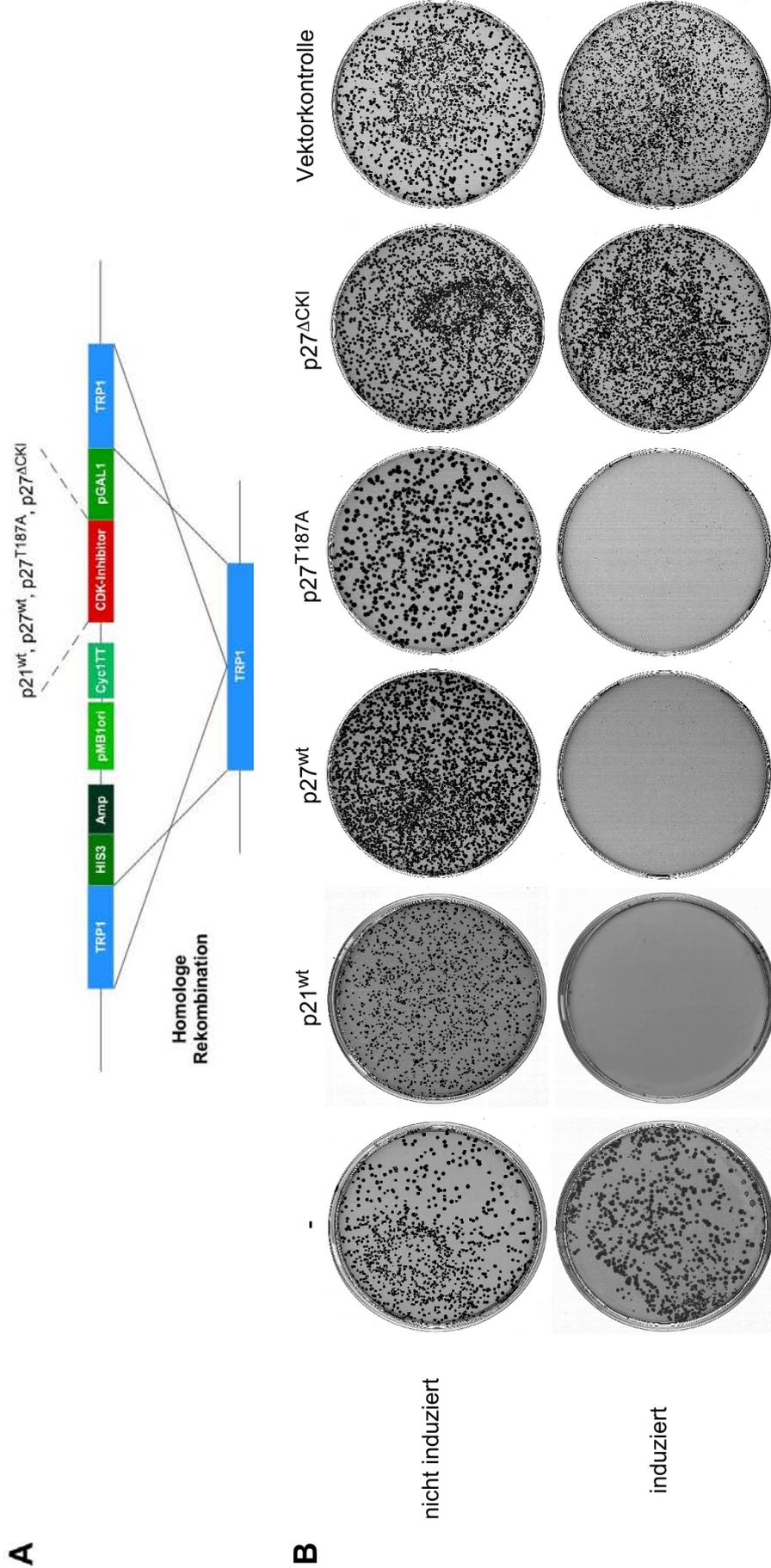


Abb. 4.5: (A) Schematische Darstellung des stabilen Integrationsvektors in *S. cerevisiae* Abys. Das humane CDK-Inhibitorgen ist unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gestellt und ermöglicht so die gezielte Induktion der CKI-Expression im heterologen System. Die Integration in das Hefegenom erfolgte über homologe Rekombination durch die flankierenden DNA-Bereiche des *TRP1*-Gens, dessen Disruption gleichzeitig als Transformationskontrolle diente. (B) Die humanen CKIs $p21$ und $p27$ sowie seine degradierungssensitive Mutante $p27^{T187A}$, führten nach induzierter Expression in Hefe zu einem Wachstumsarrest. Die für die Cyclin/CDK-Bindung insensitive $p27^{\Delta CKI}$ Mutante, wächst vergleichbar der Kontrolle (Leervektor) ohne Wachstumsverzögerung.

4.1.5 Erste Screening-Runden mit der HepG2-Genbank

Bereits die episomalen Transformanten wurden einigen Transformationsrunden mit der aus der Hepatozytenzelllinie HepG2 abgeleiteten Genbank unterzogen. Der nicht deutlich genug ausgeprägte Wachstumsphänotyp machte die Identifizierung positiver Klone jedoch unmöglich, da der Hintergrund an langsam wachsenden Kolonien mit rund 10 000 Klonen pro einer Million Transformanten für eine spätere Analyse zu umfassend war. Auch das Wachstum unter veränderten Anzuchtbedingungen, wie das Ersetzen von Galaktose durch Galaktose/Raffinose im Medium oder der Temperaturwechsel zu 25°C bzw. 38°C bei der Anzucht führten nicht zum Erfolg. Gleichfalls förderte auch die Anzucht in Galaktose-haltigem Vollmedium anstelle von Selektivmedium noch zu viele Klone zu Tage (Daten nicht gezeigt). Mit den stabilen Mutanten p21^{wt} und p27^{T187A} gelang es, erfolgreich mehrere Genbank-Screenings durchzuführen und das Problem des Hintergrundes zu verringern. Aus etwa 5×10^4 Transformanten konnten insgesamt acht Kandidaten selektiert werden. Das Genbank-Plasmid wurde jeweils isoliert und nach Amplifikation in *E. coli* in die entsprechende Hefemutante retransformiert. Bei Wiedereinbringung des Genbank-Plasmides ließ sich der Phänotyp jedoch entgegen den Erwartungen nicht reproduzieren. Als Ursache hierfür ist z. B. anzuführen, daß durchaus mehrere anderweitige Plasmide aus der Hefe in *E. coli* vereinzelt worden sein könnten.

Ein alternatives Selektionssystem, durch das sich die Stringenz der Selektion erhöhen sollte, basierte auf dem Stoffwechselweg des Phosphatmetabolismus, an dem in Hefe ebenfalls CDKs und CDK-Inhibitoren beteiligt sind. Unter Wachstumsbedingungen mit hohen Phosphatkonzentrationen formiert sich der Cyclin/CDK-Komplex Pho80/Pho85 und phosphoryliert sowie inaktiviert den nachgeschalteten Transkriptionsfaktor Pho4. Unter Phosphat-Mangelbedingungen bindet der aus sechs „ankyrin repeats“ bestehende CDK-Inhibitor der Hefe, Pho81, spezifisch den Pho80/Pho85-Komplex, woraus die Akkumulation des unphosphorylierten Pho4-Proteins resultiert. Dies wiederum führt dazu, daß phosphatgesteuerte Gene wie beispielsweise *PHO5*, das für eine saure Phosphatase kodiert, transkribiert werden (Wu *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2001). Unter der Voraussetzung, daß humane CKIs auch diesen Cyclin-Kinase-Komplex inhibieren können und daß die Level an Pho81 in der Zelle vergleichsweise gering sind, erhalten transformierte Zellen durch CKI-Überexpression die Fähigkeit, auf phosphatarmem Medium zu wachsen. Sobald durch die Genbanktransformation jedoch ein negativer

Regulator für den menschlichen CDK-Inhibitor exprimiert vorliegt, steigt die Aktivität des Pho80/Pho85-Komplexes wieder an und die Zellen verlieren die Eigenschaft auf Phosphat-Minimalmedium zu wachsen.

Es wurde versucht, die Aktivität der sauren Phosphatase *in situ* über eine Farbindikatorreaktion (mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) zu detektieren und als Reporter zu nutzen, um so auf gewünschte Klone hin zu selektieren. Die Unterschiede in den präparierten Hefeextrakten waren jedoch zu gering, um eine Aussage über deren Spezifität und Signifikanz zu machen (Daten nicht gezeigt).

In der weiteren Analyse der Kandidaten sollte die Plasmid-Abhängigkeit des Wachstumsphänotyps demonstriert werden. Dabei müßten nach längerem Wachstum ohne Selektionsdruck die Hefezellen ihr Genbank-Plasmid wieder verlieren und die Hefen dann einer FOA (5-Fluoroorotat)-Selektion unterzogen werden. FOA im Medium verhindert das Wachstum von prototrophen Hefestämmen, erlaubt jedoch Wachstum von *ura3*-Mutanten und kann somit effektiv als negativer Selektionsmarker eingesetzt werden. Das Prinzip beruht dabei darauf, daß *URA3* für das Enzym Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase kodiert, das wiederum für die Biosynthese von Uracil erforderlich ist. Da FOA in Anwesenheit dieser Decarboxylase in die toxische Komponente 5-Fluorouracil umgewandelt wird, sterben *URA3*⁺-Zellen, wohingegen *ura3*-Mutanten resistent sind. Bei der Selektion im Hefescreen können daher also nur Klone überleben, die kein Genbank-Plasmid mehr besitzen. Sie sollten dann wieder ihr ursprüngliches, retardiertes Wachstum zeigen. Auf diesem Weg ließen sich falsch-positive Klone ausschließen, die aufgrund einer Mutation der CKI-cDNA oder einer andersartig veränderten Proteinexpression schneller wachsen. Hinsichtlich des CDK-Inhibitorproteinlevels wäre davon auszugehen, daß dieser in positiven Klonen deutlich erniedrigt sein sollte bzw. gegebenenfalls sogar Abbauprodukte des Inhibitorproteins detektierbar sein sollten. Blicke das Proteinniveau unverändert, müßte dann aber zumindest die Kinaseaktivität des CDK/Cyclin-Komplexes im *in vitro*-Kinaseassay deutlich erhöht sein. Möglichkeiten, noch interessante Regulatoren zu isolieren, sind zum einen die stringendere Gestaltung des Phänotyps der p27-Mutante. Geeignet dazu ist der Austausch von Cdc28 gegen humane Cdk2, so daß das System den Bedingungen in der menschlichen Zelle immer weiter angeglichen wird. Auch die optimale Interaktion der Kinase mit der Cyclin-Komponente ist von Bedeutung, zu erreichen beispielsweise durch Einführung mehrerer CLN-Deletionen (Δ Cln1, Δ Cln2 und Δ Cln3) in die vorliegenden Hefemutanten und gleichzeitige Integration eines Säuger-Cyclins.

Als alternative Screening-Pools bieten sich sinnvollerweise Genbibliotheken an, die aus G₁/S-synchronisierten Zellen präpariert wurden. Im Fall von p21 sind Genbanken interessant, die nach Schädigung der zellulären DNA hergestellt wurden, da hierdurch die p21-Aktivität verringert wird und in diesem Zusammenhang spezifische p21-Regulatoren zu erwarten sind (Niculescu *et al.*, 1998; Sayama *et al.*, 1999).

4.2 Identifikation neuer Bindungspartner von p57 im „yeast two hybrid“-Screen

Neue Bindungspartner von p57 auf genetischem Weg zu identifizieren, erforderte, daß p57 im heterologen System der Hefe nicht toxisch auf die Zelle wirkt, sowie daß an einer möglichen Bindung eventuell beteiligte zusätzliche Komponenten eines Proteinkomplexes im Hefeorganismus in gleichem Maße vorhanden und verfügbar sind wie in der menschlichen Zelle. Um nach Proteinen zu suchen, die mit p57 interagieren, wurde in *Saccharomyces cerevisiae* ein auf dem GAL4-System basierender „yeast two hybrid“-Screen mit p57 als Köderprotein durchgeführt.

p57 wurde unter Einhaltung des Leserasters in den „yeast two hybrid“-Vektor pAS2.1 C-terminal an die DNA-bindende Domäne des GAL4-Proteins kloniert und als sogenanntes „Räuber“-Plasmid (p57pAS2.1) in den Interaktionsscreen eingesetzt. Zunächst mußte sichergestellt werden, daß an die DNA-Bindedomäne fusioniertes p57 nicht autoaktiv ist, also nicht bereits für sich selbst fähig ist, den GAL4-Promotor zu aktivieren. Bei der im Experiment verwendeten cDNA-Genbank handelte es sich um eine Plasmidgenbank, vorliegend im Vektor pACT2, der die transkriptionsaktivierende Domäne des GAL4-Proteins beherbergt. Die Bank umfaßte 0,5 bis 4,0 kb große cDNAs aus humanen HeLa-Zellen und verfügte nach einmaliger Amplifikation über $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone.

Der im Screen eingesetzte Hefestamm PJ64-4A wurde vorab bezüglich seiner Auxotrophiemarker sowie der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *LacZ* getestet (Daten nicht gezeigt). Eine Schwierigkeit des „yeast two hybrid“-Systems liegt unter anderem darin, daß der Stoffwechselweg der Histidin-Biosynthese unter Mangelbedingungen von der Zelle umgangen werden kann. Dadurch kann es neben dem Wachstum von Zellen, in denen durch die nicht-kovalente Interaktion der gewünschten Proteine das Gen zur Histidin-Biosynthese wieder transkribierbar wird, und folglich die Aminosäure aktiv

vorliegt, in einigen Fällen zum Wachstum „falsch positiver“ Klone kommen. Um die Quote solch unerwünschter Klone möglichst gering zu halten, wurde der übliche Hefestamm durch den speziell modifizierten Stamm PJ69-4A substituiert. Dieser wies eine Auxotrophie für die essentielle Base Adenin auf, deren Biosynthese von der Hefe nicht über alternative Stoffwechselwege zu erreichen ist. *Ade2*-defiziente Mutanten zeichnen sich konkret dadurch aus, daß sie ein rotes Pigment produzieren, welches durch die Polymerisation des Intermediates Phosphoribosylaminoimidazol entsteht. Die Stringenz des hier durchgeführten Screens wurde somit signifikant erhöht.

Durch Transformation von p57pAS2.1 in den Hefestamm, gezielte Selektion und Vereinzelung wurde der „bait“ (Köder)-Stamm erhalten. Dieser wurde mit der cDNA-Bank transient transformiert und auf selektivem Medium (SD, -Leu, -Trp, -Ade) ausgestrichen, das auf die Aktivierung des *ADE2*-Reportergens hin selektionierte. Aus zwei Screening-Durchläufen mit insgesamt 3×10^6 Transformanten wurden 337 Klone isoliert, die sich bezüglich des *ADE2*-Reportergens positiv zeigten. 332 dieser Klone wuchsen ebenfalls auf Selektivmedium ohne Histidin (SD, -Leu, -Trp, -His). Mit Hilfe des „colony-lift filter assay“ wurde bei allen bis dahin positiv selektierten Klonen semiquantitativ die Aktivität der β -Galactosidase, des dritten Reportergens, bestimmt. Von den 332 positiven Klonen aus den ersten beiden Selektionsrunden verfärbten sich alle Klone blau, davon 225 innerhalb der ersten drei Stunden (Daten nicht gezeigt). Aus allen 332 Klonen wurden die Plasmide präparativ aufbereitet und das „prey“ (Beute)-Plasmid nach Retransformation des Plasmid-DNA-Gemisches in *E. coli* über seine Kanamycin-Resistenz vom Köderplasmid (mit Ampicillin-Resistenzmarker) isoliert. Das „bait“-Plasmid wurde in verschiedenen Kombinationen mit den Kontrollplasmiden pAS2.1, RanGAP^(tail)pAS2.1, p57pAS2.1 sowie alleine in Wildtyp-Hefen (PJ64-4A) rücktransformiert, um dadurch die positiven Klone zu bestätigen.

Darüberhinaus wurden 100 reisolierte cDNAs ansequenziert, um einen Überblick über die Qualität der verwendeten cDNA-Bank, die Häufigkeit des Auftretens bestimmter cDNAs sowie die Art der selektierten cDNAs zu bekommen. Von allen sequenzierten cDNAs lagen lediglich 5% im korrekten Leserahmen mit der transkriptionsaktivierenden Domäne des *GAL4*-Proteins vor. Da die Translationsmaschinerie der Hefe unter Umständen jedoch in der Lage ist, einzelne Basen zu überspringen bzw. intern das Ablesen einer kodierenden Sequenz zu beginnen, konnten auch die im falschen Leseraster vorliegenden cDNAs als mögliche Interaktionspartner nicht ausgeschlossen werden.

4.2.1 p57-Interaktoren aus dem „yeast two hybrid“-Screen

Alle 19 nach Histidin- plus Adenin-Selektion erhaltenen und in der Retransformation positiven sowie im korrekten Leserahmen vorliegenden cDNAs wurden vollständig sequenziert und mit Hilfe des Programms BLAST N mit Sequenzen aus der Datenbank verglichen. Das Ergebnis sind acht Klone, die für FHL2 (Abb. 4.7) kodierten (weitere fünf cDNAs kodierten ebenfalls für FHL2, waren aber nicht im richtigen Leserahmen mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors fusioniert), zwei Klone kodierten für Cyclin B₁, einer für Cyclin D₃. Weiterhin lagen je einmal cDNAs für Zyxin, Cyclophilin B und Siah2 vor. Dabei lagen alle cDNAs mit Ausnahme der für Siah2 kodierenden cDNA in vollständiger Länge vor (Abb. 4.6).

Klon Nr.	Protein	Größe	Frequenz	Acc GI	Protein ID
2	Zyxin	573 AS	1	4508046 NM 003461	NP003452
29	Cyclophilin B	217 AS	1	4758949 NM 000942	NP000933
46	Cyclin D ₃	292 AS	1	284057 B42822	AAA51927
59	Siah-2	325 AS	1	2673967 U76248	AAC51908
230, 231	Cyclin B ₁	295 AS	2	2118515 A38977	A38977
112, 155, 169, 211, 289, 302, 312, 333	FHL2	281 AS	8	1845201 U29332	AAC52073
30, 31, 43, 89, 99	FHL2	281 AS	5	1845201 U29332	AAC52073

Klon Nr.	Protein	cDNA IF	Retransformation		
			+ p57 pAS2.1	+ pAS2.1	+ RanGAP ^(tail) pAS2.1
2	Zyxin	+	+	-	-
29	Cyclophilin B	+	+	-	-
46	Cyclin D ₃	+	+	-	-
59	Siah-2	+	+	-	-
230, 231	Cyclin B ₁	+	+	-	-
112, 155, 169, 211, 289, 302, 312, 333	FHL2	+	+	-	-
30, 31, 43, 89, 99	FHL2	-	-	-	-

Tab. 4.6: Übersicht über die Interaktionspartner von p57 im „yeast two hybrid“-Screen Neben Zyxin, Cyclophilin B, Siah2, die jeweils einmal als positive Kandidaten identifiziert wurden, waren mit ein- bzw. zweimaliger Identifikation Cyclin D₃ bzw. Cyclin B₁ auch erwartete Interagierer zu finden. FHL2 wurde mit einer Frequenz von insgesamt 13 als häufigster Interaktionspartner identifiziert, lag dabei jedoch nur achtmal im korrekten Leserahmen vor. Die Retransformationsexperimente bestätigten die positiven Klone und zeigten, daß die Interaktion von FHL2 mit p57 den richtigen Leserahmen der FHL2-cDNA voraussetzt. Zusätzliche Angaben beziehen sich auf die „accession number“ sowie die Identifikationsnummer des Proteins in den entsprechenden Datenbanken. RanGAP^(tail) ist ein Protein, das am nukleär-zytoplasmatischen Transport beteiligt ist, und diente als Negativkontrolle.

Da im durchgeführten „yeast two hybrid“-Screen etwa 3×10^6 unabhängige Klone überprüft wurden, was in etwa dem fünffachen Genom-Äquivalent einer menschlichen Zelle entspricht, kann von einer umfassenden Analyse des humanen Genoms ausgegangen werden. In Anbetracht der durch die im Screen gewählten Parameter deutlich erhöhte Stringenz, war des weiteren anzunehmen, daß bei den identifizierten Proteinen eine sehr starke Wechselwirkung mit p57 vorliegen mußte.

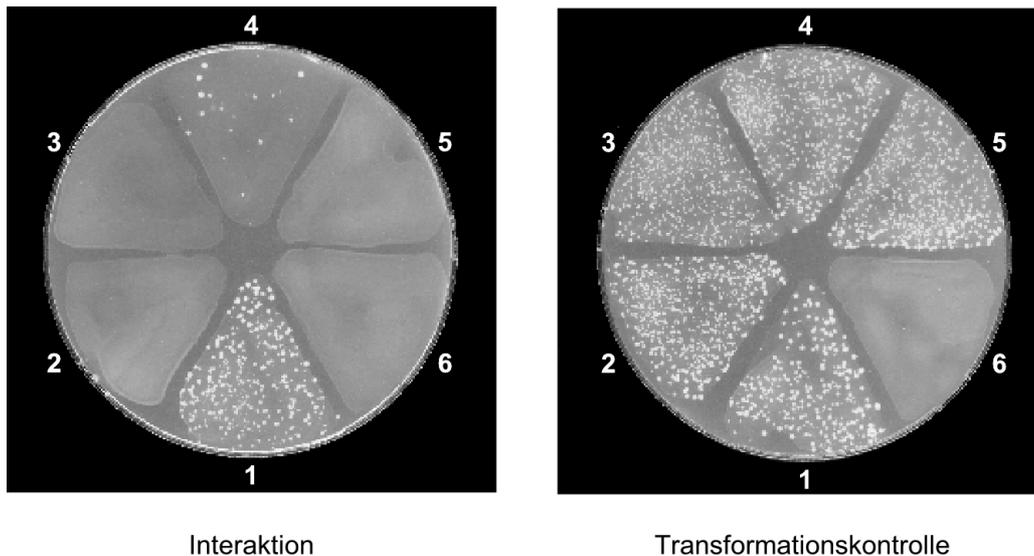


Abb. 4.7: FHL2 ist ein spezifischer p57-„yeast two hybrid“-Interagierer

Die Kotransformationen des „bait“-Plasmides FHL2pACT2 mit jeweils verschiedenen „prey“-Plasmidkonstrukten auf Interaktionsmedium demonstrierten die Spezifität der FHL2-p57-Interaktion im „yeast two hybrid“-System. Kolonienwachstum zeigte sich nur in Kombination von FHL2 mit p57 (1) und abgeschwächt p21 (4). Die Kontrolltransformationen mit RanGAP^(tail) (2), Leervektor (3) und p27 (5) ermöglichen keine Interaktion mit FHL2 und zeigen daher kein Wachstum. *S. cerevisiae* PJ69-4A (6).

4.2.2 Cycline und CDKs

Die Isolation der beiden Cycline B₁ und D₃ bestätigten die Funktionalität der Screening-Technik, da beide Proteine im Komplex mit CDKs als starke Interaktionspartner von p57 bereits bekannt sind. Weitere Cycline könnten nicht zu identifizieren gewesen sein, da sie wie beispielsweise Cyclin E bei starker Überexpression toxisch auf die Hefezellen wirken (Won und Reed, 1996). Zu erwarten gewesen wäre auch eine Auswahl verschiedener CDKs. Allerdings könnten hohe Proteinkonzentrationen der endogenen Kinase Cdc28, die in Hefe den Zellzyklus steuert, die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion trotz exprimierter humaner CDKs mit p57 verringern. Zudem wurde nicht überprüft, ob und auf welchem Niveau die Genbank repräsentativ für CDKs war.

Im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit führte Hélène Hydry analog einen „yeast two hybrid“-Screen zur Identifizierung von p27-interaktiven Proteinen durch. Auch dabei wurden mehrere Cyclin-Typen, jedoch keine CDKs erhalten.

4.2.3 FHL2, ein p57-interagierendes Protein mit mehreren LIM-Domänen

FHL2/DRAL („four and a half LIM domain protein“/„downregulated in rhabdomyosarcoma LIM protein“) wurde erstmals 1997 durch Genini und Mitarbeiter als neues LIM-Domänenprotein, das in Rhabdomyosarcomazellen herunterreguliert wird, beschrieben. FHL2 gehört zusammen mit FHL1, FHL3, FHL4 sowie dem Protein ACT zu einer Untergruppe der „LIM-only“-Domänenproteine. Mitglieder dieser Untergruppe sind stets durch ein Arrangement aus vier und einer halben LIM-Domäne [CX₂CX₁₆₋₂₃HX₂CX₂CX₂CX₁₆₋₂₁CX(C,H,D)] charakterisiert, die über Linker-Sequenzen miteinander verbunden sind. Jede Domäne stellt ein konserviertes Histidin- und Cystein-reiches Strukturmotiv aus etwa 50 Aminosäuren dar, das je zwei Zink-Finger-Motive formt (Liebhaber *et al.*, 1990). Jede Zink-Finger-Struktur kann koordiniert ein Zink-Atom binden. LIM-Domänen sind aufgrund dieser Struktur pr edestiniert für Protein-Protein-Wechselwirkungen und können sowohl homo- als auch heterodimerisieren (Feuerstein *et al.*, 1994; Schmeichel und Becherle, 1994). Sie sind beteiligt an Zell-Zell-Kontakt, Zelldifferenzierung und Wachstumskontrolle (Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994; Taira *et al.*, 1995). Kennzeichnend für die Gruppe der FHL-Proteine ist außerdem ihre gewebe- sowie zellkompartimentspezifische Expression und ihre Eigenschaft als transkriptionelle Koaktivatoren zu fungieren (German *et al.*, 1992; Valge-Archer *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000).

FHL2 zeigt ein spezifisches Expressionsmuster mit höchsten mRNA-Mengen in Skelett- und Herzmuskel und sehr viel geringeren in Prostata-, Ovarial- und Hodengewebe (Morgan und Madgwick, 1996; 1999 a, b; Chan *et al.*, 1998; Fimia *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2000). Immunfärbungen zeigen FHL2-Expression in den fokalen Kontaktstellen der Zellen (Li *et al.*, 2001), wobei FHL2 intrazellulär sowohl nukleär als auch außerhalb des Kerns im Zytoplasma lokalisiert sein kann (Müller *et al.*, 2002). Bisher konnte FHL2 in erster Linie eine Funktion als transkriptioneller Koaktivator des Androgen-Rezeptors zugewiesen werden (Müller *et al.*, 2000).

4.2.4 Cyclophilin B, Zyxin und Siah2

Cyclophilin B, auch Peptidylprolyl-Isomerase B, gehört zur Gruppe der Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerasen, die an der Isomerisierung der Peptid-Bindung in Oligopeptiden beteiligt sind. Cyclophiline stellen eine ubiquitär hochkonservierte Proteinklasse dar und haben ein Molekulargewicht zwischen 18 und 150 kDa. Verschiedene Isoformen finden sich sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma, Cyclophilin B ist speziell mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert. 1996 isolierten Lu *et al.* einen essentiellen und konservierten Mitose-Regulator, Pin1, der ebenfalls zur Gruppe der Cyclophiline gehört. Als Folge dieser Entdeckung wurde eine phosphorylierungsabhängige Prolyl-Isomerisierung als weiterer neuer Mechanismus der Zellzykluskontrolle vorgeschlagen. Pin1 reguliert negativ den Eintritt in die Mitose und positiv die Progression durch die Mitose in humanen Zellen und in Hefezellen.

Zyxin ist ein Phosphoprotein mit einer effektiven molekularen Masse von 82-84 kDa (Beckerle, 1986), bestehend aus mehreren LIM-Domänen (Sadler *et al.*, 1992). Gefunden wurde es in den fokalen Kontaktstellen der Zellen. Ein häufiger Übertritt vom Zellkern in diese Adhäsionsstellen und umgekehrt ist für Zyxin zu beobachten (Nix und Beckerle, 1997).

Siah2 („seven in absentia homolog“ 2) wurde nach seiner Entdeckung als humanes Homolog des *Drosophila*-Proteins SINA eine Beteiligung an der zellulären Apoptose zugeschrieben (Nemani *et al.*, 1996; Amson *et al.*, 1996). Siah2 ist ein 324 Aminosäuren großes Protein. Das zu 77% mit Siah1 identische Protein gilt als allgemeiner Effektor zellzyklusrelevanter Proteine wie p53 und p21 (Roperch *et al.*, 1999). Weiterhin konnte das Siah2-Protein in Immunfluoreszenz-Studien mit DCC („deleted in colon cancer“) assoziiert nachgewiesen und so seine Beteiligung am proteasomalen Abbau gezeigt werden (Hu *et al.*, 1997). Jüngste Untersuchungen belegen eine durch Siah2 vermittelte Stabilisierung von TRAF2, das seinerseits in die Reaktion auf zellulären Streß involviert ist (Habelhah *et al.*, 2002).

Für alle drei Kandidaten konnte nach Überexpression in 293T-Zellen keine Interaktion mit p57 mehr gezeigt werden, weshalb sie zugunsten der FHL2-p57-Interaktion im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert wurden.

4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen FHL2 und p57

Nicht nur die überdeutliche Frequenz, mit der FHL2 auf genetischem Weg als Interaktor für p57 identifiziert wurde, sondern auch seine strukturellen Voraussetzungen legen eine Prädisposition für nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen nahe. FHL2 setzt sich aus viereinhalb sogenannten LIM-Domänen zusammen, die jede für sich wiederum aus zwei isolierten Zink-Finger-Motiven besteht. Seine detailliertere Domänenstruktur, weitere funktionale Motive oder damit korrelierende Funktionen sind noch weitgehend unklar. Auch über die dreidimensionale Struktur von FHL2 ist bislang nichts bekannt.

FHL2-Expression findet sich nicht nur im Zytoplasma, sondern auch nachweislich im Zellkern. Gleiches gilt für p57, womit die räumlichen Voraussetzungen für eine Interaktion beider Proteine *in vivo* gegeben sind. Des weiteren zeigen sich durchaus Übereinstimmungen im zeitlichen Fenster ihrer Expression. So ist p57 beispielsweise im embryonalen Herzgewebe von Mäusen sowie im Skelettmuskel von Mausembryonen nachweisbar, dies entspricht genau den Geweben, in denen die FHL2-Expression auf mRNA-Ebene ein Maximum aufweist (Morgan und Madgwick, 1999b; Nagahama *et al.*, 2001). Von besonderem Interesse ist die Interaktion FHL2-p57 deshalb, weil damit erstmals die Mechanismen des Zellzyklus mit der Wachstumsentwicklung in Zusammenhang gebracht werden können, die in der Lage wären, den Phänotyp von p57 „knock out“-Mäusen zu erklären.

4.3.1 FHL2 bindet p57, nicht aber p21 oder p27

FHL2 bindet *in vivo* in der Hefezelle an p57. Zunächst sollte geklärt werden, ob sich dies auch nach Überexpression beider Proteine vor einem humanen Zellhintergrund bestätigen lässt. Des weiteren sollte untersucht werden, ob FHL2 spezifisch nur mit p57 oder auch mit anderen Mitgliedern der Cip/Kip-Familie in Kontakt treten kann.

FHL2 sowie p21, p27 und p57 wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pCRUZ-HA kloniert, der alle Proteine mit einem Haematoglutinin-„tag“ (Aminosäuresequenz MGSYPYDVPDYASLEF) versieht. Auf analogem Weg wurde zusätzlich eine andersartige Fusion - p57pCRUZ-FLAG - erhalten (FLAG-„tag“ Aminosäuresequenz MGSDYKDDDDKEF). FHL2-HA und p57-HA wurden in 293T-Zellen nach transients Kotransfektion überexprimiert, die Zellen ebenso wie die

mitgeführten Kontrolltransfektionen (FHL2 bzw. p57 alleine) nach 48-stündiger Inkubation geerntet und in einem geeigneten Puffer aufgeschlossen. Die Immunopräzipitation erfolgte jeweils mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers. Die interagierenden Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Eine Bindung von FHL2 an die einzelnen CDK-Inhibitoren wurde mit den spezifischen Antikörpern anti-p57 bzw. anti-HA detektiert (Abb. 4.8).

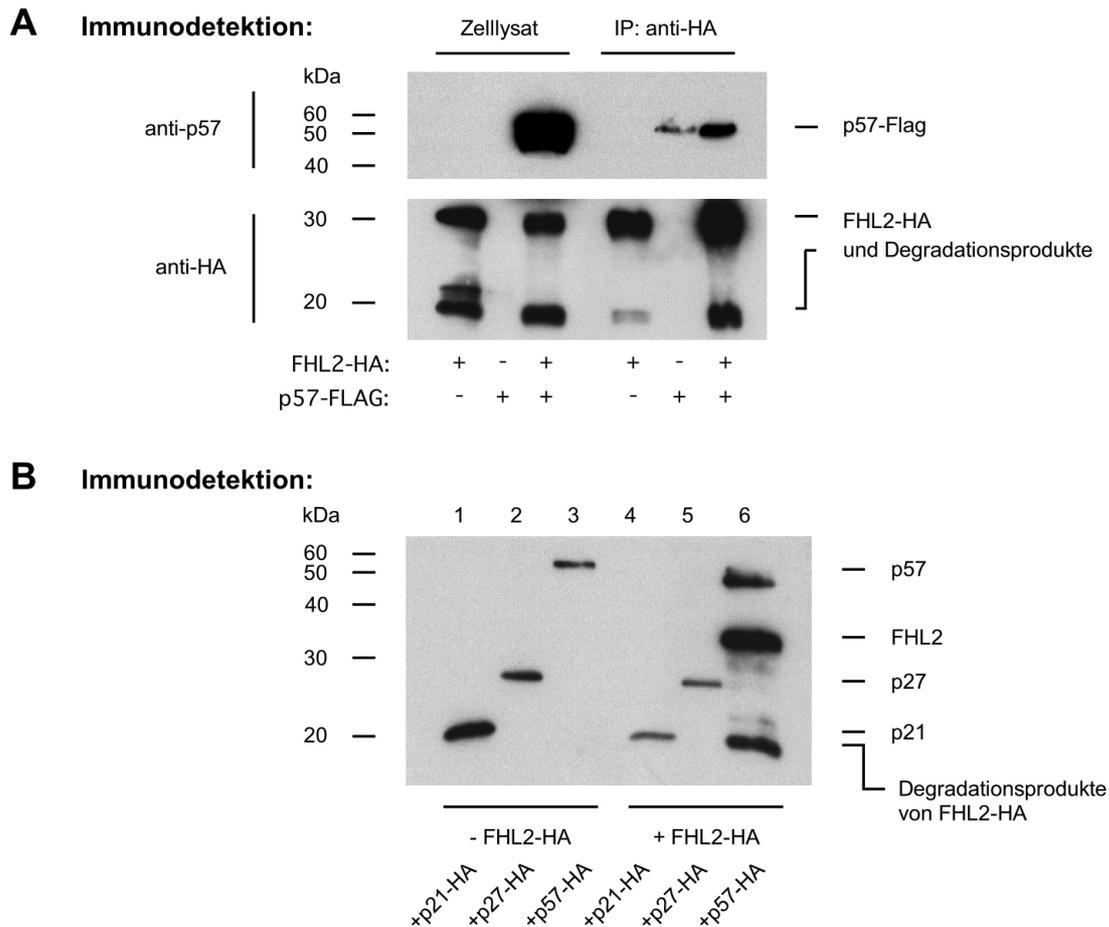


Abb. 4.8: FHL2 interagiert nach Koexpression in 293T-Zellen mit p57

(A) FHL2-HA und p57-FLAG wurden in 293T-Zellen entweder alleine oder gleichzeitig exprimiert. Aus den jeweiligen Zellextrakten wurde FHL2-HA spezifisch mit anti-HA-Antikörper immunopräzipitiert. Der an FHL2 assoziierte Inhibitor wurde nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE mittels Immunodetektion durch anti-p57 nachgewiesen. FHL2 zeigt die nach Überexpression charakteristischen Abbaubanden. (B) FHL2 bindet spezifisch an p57, nicht aber p21 oder p27. In 293T-Zellen wurde FHL2-HA mit jeweils einem der HA-fusionierten Inhibitorproteine koexprimiert. Die Immunopräzipitation aus den Zellextrakten erfolgte entsprechend mit dem spezifischen anti-CKI-Antikörper (1, 4: anti-p21; 2, 5: anti-p27; 3, 6: anti-p57). Assoziiertes FHL2 sowie auch die jeweilig präzipitierten Inhibitorproteine wurden nach SDS-PAGE im Western-Blot mittels spezifischem anti-HA-Antikörper detektiert. In den Spuren 1-3 war kein FHL2 exprimiert, sie demonstrieren die Spezifität der Antikörper-Präzipitation.

FHL2-HA ist nach Überexpression in 293T-Zellen in der Lage, ebenfalls in verhältnismäßig hohen Konzentrationen vorliegendes p57-FLAG zu präzipitieren. Im

Ansatz, in dem FHL2 alleine überexprimiert wurde, konnte kein p57 im Zelllysat nachgewiesen werden. Lag nur p57 im Zellextrakt exprimiert vor, konnte dieses nicht mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers immunopräzipitiert werden. Folglich ist in 293T-Zellen nicht ausreichend endogenes p57 vorhanden, um von FHL2 gebunden zu werden und später noch nachweisbar zu sein. Es treten für FHL2 charakteristische Abbauprodukte auf, die sich offenbar ebenfalls über den anti-HA-Antikörper präzipitieren lassen. Es muß sich demnach um N-terminal verkürzte FHL2-Proteine handeln.

Um sowohl einen Hinweis auf die Spezifität der Bindung als auch auf die stöchiometrische Zusammensetzung des FHL2-p57-Komplexes zu erhalten, wurden nachfolgend 293T-Zellen folgendermaßen transient transfiziert: p21, p27 und p57, jeweils alleine als auch in Kotransfektion mit FHL2. Die Zellen wurden 48 Stunden später geerntet, in Puffer lysiert und mit dem jeweils spezifischen CKI-Antikörper über Nacht immunopräzipitiert. An die gelelektrophoretische Auftrennung schloß sich eine Immunodetektion mit anti-HA-Antikörper an. Allein der Komplex aus p57 und FHL2 ließ sich nachweisen, p21 und p27 interagierten nicht mit FHL2 (Abb. 4.8 B). Erstens konnte mit diesem Versuch die Interaktion nach Überexpression beider Proteine in humanen Zelllinien bestätigt werden, da in diesem Fall die Immunopräzipitation *vice versa* erfolgte, nicht wie vorab mit FHL2 sondern nun mit p57 als immobilisiertem Protein. Signifikant ist auch die Spezifität der FHL2-p57-Bindung, denn weder p21 noch p27 waren dazu geeignet, mit FHL2 zu komplexieren. Durch Verwendung des HA-Anhangs an beiden Proteinen ließen sich auch erste Erkenntnisse über die molaren Verhältnisse innerhalb des FHL2-p57-Komplexes erhalten. So zeichnete sich ein leichtes Übergewicht auf der Seite von FHL2 ab. FHL2 könnte im zwei- oder dreifachem molaren Überschuß im Komplex vorliegen, was für den Mechanismus der FHL2-p57 von entscheidender Bedeutung wäre. Aufgrund seiner ausgeprägten repetitiven Domänenstruktur und seiner Fähigkeit zu homodimerisieren, bindet FHL2 möglicherweise als Dimer an p57.

4.3.2 *In vitro*-translatiertes p57 bindet FHL2

Ein heterologes Hefesystem entspricht nur *in vivo* angenäherten Bedingungen. Auch könnten Hefe-Proteine als sog. „Brückenproteine“ die Interaktion vermitteln, obwohl in

der Säugerzelle keine direkte Bindung der beiden Proteine vorliegt. Daher galt es, die auf diesem Weg identifizierten p57-Interagierer nachfolgend zu bestätigen.

Zur Untersuchung einer Assoziation von p57 und FHL2 wurden die cDNAs von FHL2, Siah2, Zyxin und Cyclin D₃ in pBluescript umklontiert, jeweils das Protein mittels gekoppelter *in vitro*-Transkription/-Translation hergestellt und zur späteren Detektion mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. p57 sowie p21 und p27 wurden in den bakteriellen Expressionsvektor pET28a kloniert und gleichermaßen *in vitro*-translatiert. Die *in vitro*-translatierten positiven Kandidaten aus dem „yeast two hybrid“-Screen wurden mit gleichen Mengen *in vitro*-translatierter His-Fusionsproteine von p57 und p21 und p27 (zur Kontrolle) inkubiert und in einem Interaktionsexperiment auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die CKIs zu binden (Abb. 4.9).

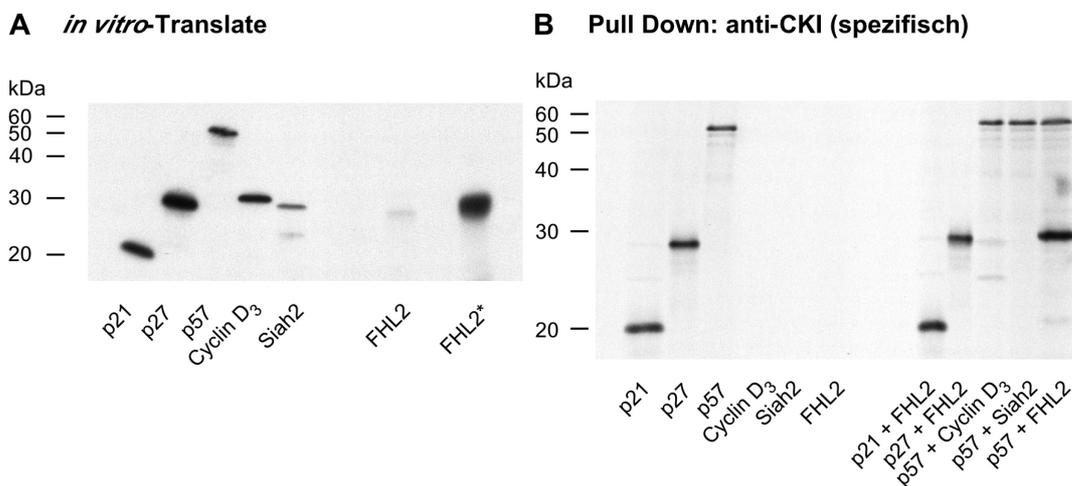


Abb. 4.9: (A) *In vitro*-Translationsprodukte humaner CKIs sowie verschiedener „yeast two hybrid“-Interagierer. (B) *In vitro*-translatiertes FHL2 ließ sich ebenso wie Cyclin D₃ spezifisch mit *in vitro*-translatiertem p57 präzipitieren, nicht jedoch mit p21 oder p27. Siah2 hingegen bindet an keinen der CDK-Inhibitoren. Für die Interaktion wurden jeweils gleiche Mengen *in vitro*-translatiertes Inhibitorprotein eingesetzt und je nach Ansatz die fünffache Menge *in vitro*-translatiertes FHL2, Cyclin D₃ oder Siah2. Die Präzipitation erfolgte mit jeweils dem spezifischen anti-CKI-Antikörper (anti-p21; anti-p27; anti-p57) an Sepharose-Beads über Nacht. Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Gels der über SDS-PAGE aufgetrennten Bead-Elutionen nach 16-stündiger Exposition. FHL2*: alternative DNA-Präparation.

Deutlich nachweisbar ist eine Bindung von FHL2 an p57. Die anderen beiden CDK-Inhibitoren sind dagegen nicht in der Lage, *in vitro*-translatiertes FHL2 zu präzipitieren (Abb. 4.9 B). Cyclin D₃, das aufgrund der beschriebenen Assoziation von Cyclin D₁ und D₂ im Komplex mit p57 ebenfalls als starker Interaktionspartner gilt (Matsuoka *et al.*, 1995), ist hier nur mit einem schwachen Signal zu sehen. Bei der Reproduktion zeigten sich mitunter aber auch vergleichbare Signalstärken wie im Fall von FHL2. Die

Variationen könnten auf unterschiedliche DNA-Präparationen zurückzuführen sein. Wurde kein CDK-Inhibitor im Assay eingesetzt, konnte wie erwartet kein FHL2 präzipitiert werden. Für Siah2 ließ sich keine Assoziation mit p57 zeigen. Siah2 benötigt möglicherweise für die Bindung an p57 zusätzliche komplexbildende Faktoren, die zwar in der Hefezelle, nicht jedoch im Retikulozyten-Extrakt vorhanden sind. Auch ist denkbar, daß Siah2 nach der *in vitro*-Translation nicht korrekt gefaltet oder nicht geeignet modifiziert vorliegt, um eine Protein-Bindung einzugehen.

4.3.3 p57 bindet FHL2 endogen unter physiologischen Bedingungen

Bisher wurde die Interaktion von p57 mit FHL2 nur für in Zellen eingebrachte (exogene), und stark überexprimierte Bindungspartner gezeigt. Eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist, nachzuweisen, daß auch zelleigenes (endogenes) p57 und FHL2 miteinander interagieren. Da Herzgewebe hohe Mengen an FHL2 aufweist und auch p57 exprimiert wird, wurde in der nachfolgend durgeführten Immunopräzipitation Kardiomyozyten-Lysat sowohl aus Mensch als auch aus Ratte (freundlicherweise von Dr. R. Wessely, Herzzentrum, München zur Verfügung gestellt) zunächst auf eine ausreichende Menge beider Proteine hin getestet. In der Immunodetektion zeigte sich, daß trotz vom Hersteller bestätigter Kreuzreaktivität des FHL2-Antikörpers mit FHL2 aus Ratte kein Protein im Rattenlysat nachzuweisen war. p57 hingegen fand sich in ausreichender Menge in humanen Kardiomyozyten, etwas weniger in vergleichbarem Rattengewebe. Als spezifisch präzipitierender Antikörper wurde anti-p57 eingesetzt, die Immunodetektion von gebundenem FHL2 erfolgte mit anti-FHL2. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß FHL2 ausschließlich im Komplex mit p57 über dessen spezifischen Antikörper präzipitierbar ist (Abb. 4.10). Daraus läßt sich ableiten, daß der Komplex aus endogenem FHL2 und p57 *in vivo* vorhanden ist. Folglich erhärtet sich die Bedeutsamkeit dieses Komplexes für das Zellzyklusgeschehen. Allerdings läßt sich anhand der Experimente noch keine Aussage darüber treffen, inwieweit die Bindung direkt oder indirekt erfolgt, ob weitere Proteine, beispielsweise CDKs, Cycline oder andere Komplexbildner, an der Bindung beteiligt sind. Ebenso wenig läßt sich ausschließen, daß Modifikationen auf Seiten beider Proteine für die Bindung *in vivo*

erforderlich sind. Auch die Bestimmung der „on-off“-Rate der Assoziation und der molaren Verhältnisse im Komplex bedarf weiterer Untersuchungen.

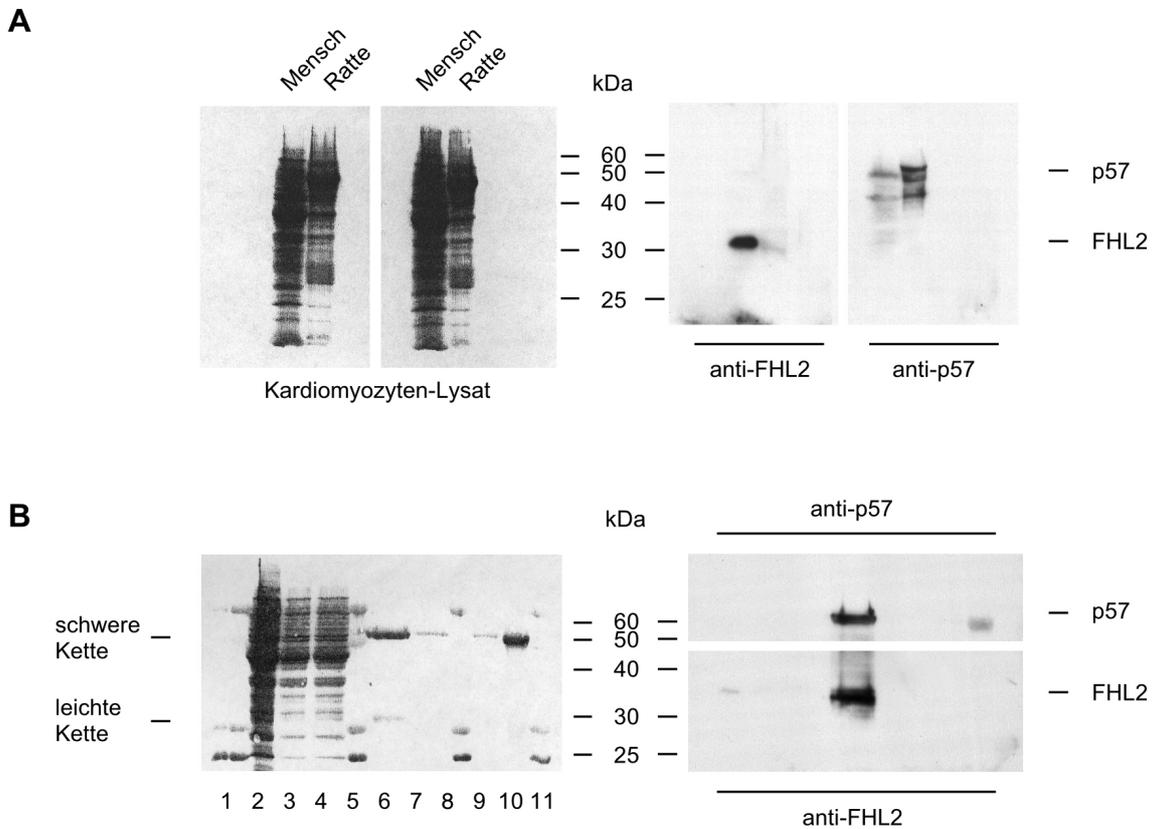


Abb. 4.10: (A) FHL2 und p57 werden endogen in humanen Kardiomyozyten exprimiert, in geringerer Menge in Ratten-Herzgewebe. Nach Zellernte und Präparation der Zelllysate wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Western-Blot analysiert. Amidoschwarz-Färbung (links). Die Immunodetektion (rechts) erfolgte mit anti-FHL2 bzw. anti-p57-Antikörpern. (B) FHL2 assoziiert mit endogem p57 in humanem Kardiomyozyten-Lysat. Die Immunopräzipitation erfolgte aus den Extrakten mit Hilfe von anti-p57-Antikörper für 4 Stunden. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblotet. Amidoschwarz-Färbung (links). Detektiert (rechts) wurde mit anti-FHL2 bzw. anti-p57-Antikörper. 1: Marker; 2: Zelllysate; 3: Überstand (nach Immunopräzipitation mit anti-p57); 4: Überstand Kontrolle (nach Immunopräzipitation mit anti-His-Antikörper); 5: Marker; 6: Immunopräzipitation; 7: Kontrolle; 8: Marker; 9: Kontrolle ohne präzipitierenden Antikörper; 10: anti-p57.

Vorab wurden ebenfalls HeLa-, HDF-, MCF7- sowie HS68-Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien untersucht. Die HS68-Zellen wurden dazu mit Thymidin (2 mM, 24 h) in früher S-Phase arretiert. Der Zellzyklusblock wurde durch FACS-Analyse bestätigt. Bei keiner der durchgeführten Immunopräzipitationen konnte jedoch eine Kopräzipitation von p57 und FHL2 *in vivo* nachgewiesen werden. Vermutlich ließ sich in den Extrakten keine Konzentration der beteiligten Partner einstellen, bei der die Interaktion stattfinden bzw. die Detektionsgrenze erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 FHL2 bindet *in vitro* am N- und C-Terminus von p57

Bereits in den vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, daß FHL2 und p57 unter angenäherten *in vivo*-Bedingungen eine Bindung einzugehen vermögen. Hinweise auf eine mögliche Interaktion von FHL2 auch mit p21 gab es bereits in den Retransformationsexperimenten im Rahmen des „yeast two hybrid“-Screens. Es sollte nun weiter geklärt werden, inwieweit die Bindung von FHL2 spezifisch für p57 ist oder ob auch die anderen CKIs als interagierende Proteine in Frage kommen.

Dazu wurden sowohl p21, p27, p57 als auch FHL2 in den eukaryontischen Expressionsvektor pCRUZ-HA kloniert (Restriktionsschnittstellen *NdeI-BglII*). 293T-Zellen wurden jeweils mit einem der CKI-Konstrukte und FHL2 kotransfiziert sowie als Kontrolle alleine transfiziert, 48 Stunden später geerntet und für die weitere Analyse aufbereitet. Jedes Lysat wurde zusammen mit seinem CKI-spezifischen Antikörper und einer Protein A-gekoppelten Matrix über Nacht inkubiert. Die Präzipitate wurden mehrfach gewaschen, die an die Matrix gebundenen Proteinkomplexe nach ihrer Elution über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert.

Daneben sollte getestet werden, in welcher Region von p57 FHL2 bindet. Zur Eingrenzung der Bindungsstelle von FHL2 in p57 wurden die verschiedenen verkürzten p57-Formen p57^{N-t} (AS 1-110) und p57^{C-t} (AS 107-317) herangezogen, welche der N- und C-terminalen Domäne von p57 entsprechen. Es wurde ein Interaktionsexperiment mit beiden trunkierten p57-Proteinen sowie dem Voll-längenprotein mit FHL2 durchgeführt. FHL2 wurde dazu über *EcoRI/XhoI* aus dem „yeast two hybrid“-Vektor FHL2pACT2 in pGEX-2x-5 umkloniert, ebenso Cyclin D₃ als Spezifitätskontrolle. Beide Proteine erfuhren dadurch eine N-terminale Fusionierung an GST. N- und C-Terminus von p57 wurden mittels PCR aus dem Mutterplasmid p57pLU1024 amplifiziert, wobei gleichzeitig durch geeignete Primerwahl über dem Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde. Die eingeführten Mutationen ermöglichten die Umklonierung der p57-Deletionen in den bakteriellen Expressionsvektor pET28a. Alle Konstrukte wurden rekombinant für vier Stunden in Bakterien exprimiert. Die bakteriellen Rohextrakte von FHL2, Cyclin D₃ und GST sowie die Histidinfusionen von p57 bzw. von seinen unterschiedlich verkürzten Proteinregionen wurden im Verhältnis 1:5 miteinander inkubiert. Die Proteine FHL2, Cyclin D₃ und GST wurden samt den potentiell interagierenden p57-Konstrukten mittels Gluthationsepharose-Matrix präzipitiert, gewaschen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt

(Abb. 4.11). Es bindet zunächst p57-His an FHL2-GST und an das Kontrollprotein Cyclin D₃-GST. Eine Interaktion ist auch zu beobachten, sobald man p57^{N-t}-His mit diesen beiden Konstrukten inkubiert. Wird jedoch p57^{C-t}-His als möglicher Interaktionspartner eingesetzt, kann lediglich noch eine Bindung an FHL2-GST stattfinden, nicht mehr jedoch an Cyclin D₃-GST. Letzteres war zu erwarten und ist daher als interne Kontrolle für die Funktionalität des Versuches anzusehen, da die Bindung von Cyclinen bei p57 wie bei allen CKIs stets über die CDK-inhibitorische Domäne am N-Terminus vermittelt wird.

IP: GSH

Immunodetektion: anti-His

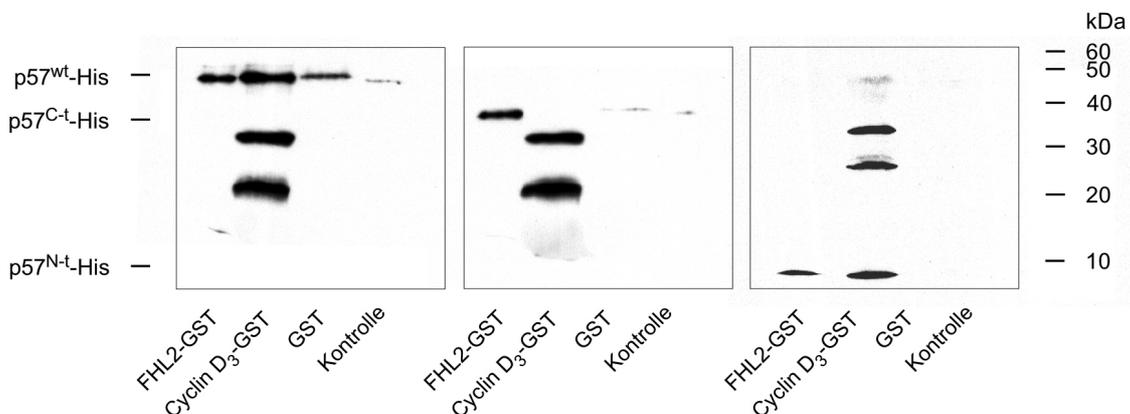


Abb. 4.11: N- und C-terminale Region von p57 binden an FHL2

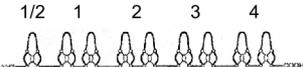
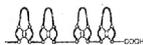
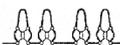
p57^{N-t}, p57^{C-t} und p57^{wt} wurden als Hexahistidin-fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. FHL2 und Cyclin D₃ wurden an GST fusioniert und ebenso wie mit GST rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die GST-Fusionsproteine wurden mit jeweils gleichen Mengen der bakteriellen Rohextrakte des jeweiligen p57-Konstruktes für vier Stunden inkubiert und anschließend über Gluthation (GSH)-Sephrose präzipitiert. Die an die GST-Fusionsproteine gebundenen p57-Fragmente wurden nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE mittels anti-His-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle diente freie Gluthation-Sephrose, die mit einer vergleichbaren Menge an p57^{N-t}-, p57^{C-t}- oder p57^{wt}-Rohextrakt inkubiert wurde.

Analog zum *in vivo*-Interaktionsexperiment wurde diesmal unter ausschließlich rekombinanten Bedingungen gezeigt, daß FHL2 an p57 ebenfalls *in vitro* binden kann. Durch die biochemische Analyse konnte ausgeschlossen werden, daß für die Interaktion zwischen p57 und FHL2 ein drittes, die Interaktion vermittelndes Protein notwendig ist. Darüberhinaus wird deutlich, daß die Bindung von FHL2 am N-terminalen CDK-inhibitorischen Teil von p57 erfolgen kann. Gleichmaßen ist jedoch auch in der C-terminalen Domäne von p57 zumindest eine weitere Bindestelle für FHL2 gegeben. Unter physiologischen Bedingungen ist zum einen eine Bindung zweier oder mehrerer FHL2-Moleküle an ein Molekül p57 denkbar. Zum anderen aber könnte ein FHL2-Molekül auch die Eigenschaft besitzen, gleichzeitig beide Bindungsstellen auf p57 zu

besetzen. Dieser Mechanismus setzt voraus, daß N- und C-Terminus von p57 in ihrer Tertiärstruktur relativ nahe beieinander liegen oder aber daß ein vermutlich sehr lang gestrecktes FHL2-Protein in einer Art „Umklammerung“ an p57 andockt. Das gleiche gilt ebenso umgekehrt für p57.

4.3.5 Mehrere Bindestellen auf FHL2 für p57

Um die Interaktionsstellen für p57 auf Seiten von FHL2 zu charakterisieren, wurden unterschiedliche Kombinationen der einzelnen LIM-Domänen konstruiert und in den Vektor pCRUZ-HA kloniert (Abb. 4.12 A). Jedes Konstrukt wurde zusammen mit p57pCRUZ-HA in 293T-Zellen transformiert und nach 48-stündiger Expression die Zellysate einer Immunopräzipitation mit anti-p57 als präzipitierendem Antikörper unterzogen. Von den verschiedenen Proteindeletionsmutanten banden nur diejenigen, die aus den Domänen $1/2$ -1 oder 2-4 oder 2-3 zusammengesetzt waren. Keine Interaktion ließ sich bei einem verkürzten FHL2-Protein, das nur noch die LIM-Domänen $1/2$ -2 oder 3-4 beherbergt, verzeichnen. Die p57-Bindung kann demzufolge an grundsätzlich allen LIM-Domänen des FHL2-Proteins ansetzen. Entscheidend für die Bindefähigkeit scheint dabei die sterische Konformation von FHL2 zu sein. Die Konstrukte $1/2$ -2 und 3-4 binden daher nicht, weil sie entweder falsch gefaltet vorliegen oder weil sie beispielsweise nicht mehr effizient in den Kern, wo die Interaktion stattfindet, transportiert werden können. Die Lokalisation der einzelnen Mutanten ließe sich anhand von Immunfluoreszenz überprüfen.

A		LIM-Domänen	Aminosäuren	Basenpaare
	1/2 1 2 3 4			
FHL2 wt		1/2 - 4	1 - 279	837
FHL2-Dom1		1/2 - 1	1 - 95	285
FHL2-Dom2		1/2 - 2	1 - 157	471
FHL2-Dom3		2 - 4	97 - 279	600
FHL2-Dom4		3 - 4	158 - 279	363
FHL2-Dom5		2 - 3	95 - 217	366

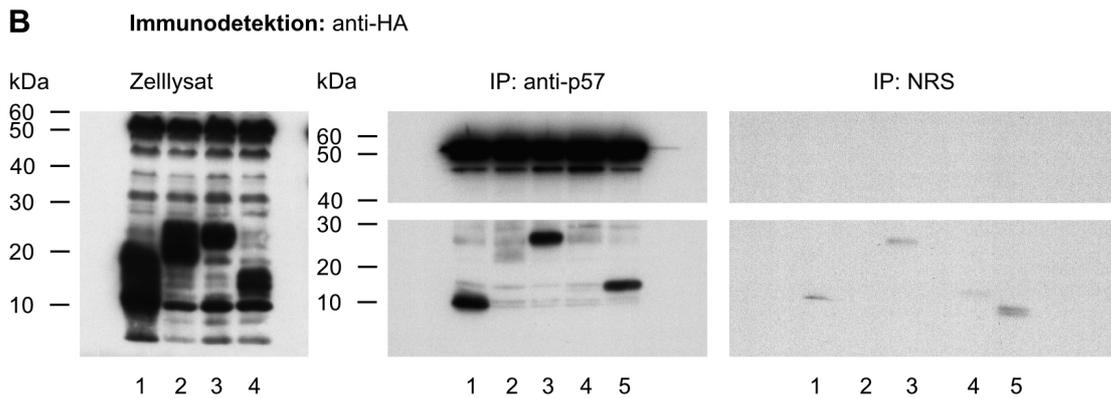


Abb. 4.12: (A) FHL2^{wt} und verschiedene Deletionsmutanten (schematische Darstellung). (B) p57 interagiert nach Überexpression in 293T-Zellen und anschließender Immunopräzipitation mit anti-p57-Antikörper nur mit den FHL2-Domänen ¹/₂-1 (Mutante 1) oder 2-4 (Mutante 3) oder 2-3 (Mutante 5).

4.3.6 Die FHL2-p57-Interaktion *in vitro*

FHL2 ist in der Lage, p57 unter anderem auch über die CDK-inhibitorische Domäne zu binden. Da zudem auch die C-terminale Region von p57 mit FHL2 interagieren kann, ist ein vorgeschlagenes Modell der Assoziation, daß FHL2 das p57-Protein womöglich sogar an beiden endständigen Bereichen in einer Art „Umklammerung“ bindet, sofern beide hypothetischen Bindestellen räumlich nahe genug zusammenliegen. Bislang liegen keine Röntgenstrukturdaten zu p57 vor. Wie für p21 und p27 vermutet man aber, daß der C-Terminus strukturlos und ungefaltet vorliegt. Über die dreidimensionale Anordnung der Domänen zueinander läßt sich bislang lediglich auf Basis der p27-Strukturdaten spekulieren, allerdings war hierbei die C-terminale p27-Region deletiert. In jeder der möglichen Bindungsvarianten könnte FHL2 sterisch die Hauptinteraktionsstelle von p57 mit der ATP-Bindetasche der Kinaseuntereinheit der CDK blockieren oder behindern. Dies hätte zur Folge, daß die Bindung eines FHL2-Proteins an p57 einen Einfluß auf die Fähigkeit ausübt, den Cyclin/CDK-Komplex zu inhibieren. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine analytische Gelfiltration mit Extrakt aus p57- und FHL2-infizierten 293T-Zellen durchgeführt, um so p57 im Komplex mit FHL2 zu erhalten und diesen dann zur Bestimmung der Kinaseaktivität einzusetzen. Die Auftrennung der Proteinkomplexe - p57 mit oder ohne assoziiertes FHL2 und eventuell anderen komplexierten Proteinen - erfolgte nach ihrem Stoke's Radius durch eine Superdex 200 HR-Gelfiltrationssäule, in einem zweiten Ansatz durch eine Superose SP6-Gelfiltrationssäule. Aus der Verteilung der Proteine in den Fraktionen der Gelfiltration wird ersichtlich, daß p57 und FHL2 durchaus in den gleichen Fraktionen

mit einem Maximum in den Fraktionen 23 bis 27 (Abb. 13 A) eluieren und daher im Komplex vorliegen können. Monomeres FHL2 erscheint im Durchlauf sehr viel später gemeinsam mit seinen charakteristischen, unter 20 kDa großen Abbauprodukten (Fraktionen 36 bis 42). Hingegen eluiert ein sehr großer Komplex (Fraktionen 13 und 14) direkt im Durchbruch (Abb. 4.13 B). Dieser Komplex, der eine Gesamtgröße von weit mehr als 670 kDa aufweist, ließe sich als Assoziation von einem oder mehreren Molekülen p57 und FHL2 zusammen mit Cyclinen und CDKs, die eventuell noch mit ribosomalen Proteinen assoziiert sind, interpretieren.

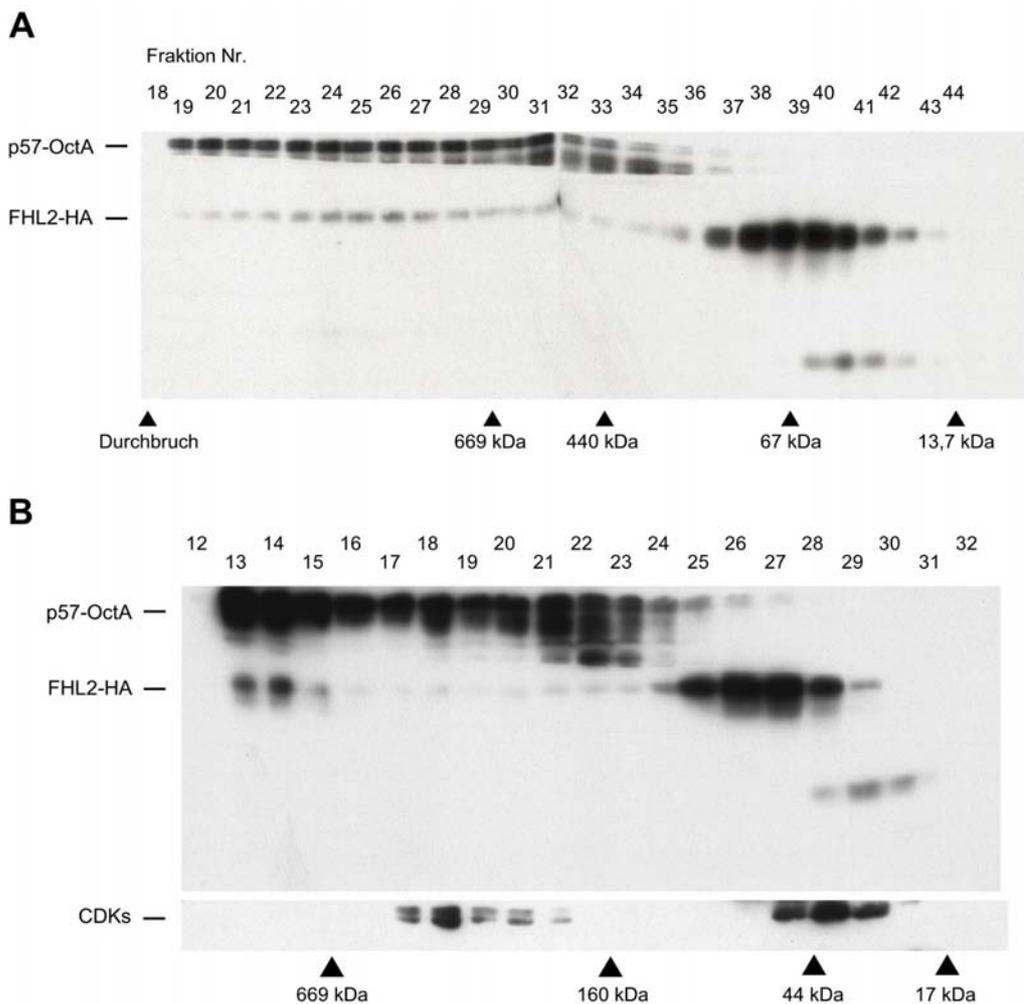


Abb. 4.13: p57 und FHL2 können nach Überexpression in 293T-Zellen im Extrakt als Komplex eluieren. 293T-Zellen wurden mit p57-OctA und FHL2-HA kotransfiziert, 48 Stunden später geerntet und die Proteine aus dem Zellextrakt über eine Superdex 200 (A) bzw. Superose 6 (B)-Gelfiltrationssäule nach ihrem Stoke's Radius aufgetrennt, über SDS-PAGE analysiert und die Proteine über spezifische Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Die Größenfraktionierung aus Zellextrakt von Zellen, die sowohl p57 als auch FHL2 überexprimierten, zeigte eine gleichmäßige Verteilung von p57-Protein über die Säulenmatrix. Das Säulenelutionsprofil des isokratischen Laufes zeigte hingegen für FHL2 zwei Maxima (Fraktionen 23-27 und 36-42) in der Proteinmenge bei einer Messung bei 280 nm. Die Detektion der CDKs mittels anti-PSTAIRE-Antikörper zeigte ein distinktes Elutionsprofil bei etwa 300 kDa und monomer bei ungefähr 30-40 kDa.

Um den Einfluß der FHL2-Interaktion auf den p57/Cyclin/CDK-Komplex weiter zu beleuchten, wurden in einem zweiten Ansatz p57 und FHL2 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die p57-Reinigung verlief dabei über mehrere Schritte: mit p57pET28a transformierte *E. coli* BL21 wurden angezogen und die Proteinexpression durch IPTG für 4 h induziert. Die Zellen wurden geerntet, in physiologischem, aber denaturierendem Puffer unterstützend mit Ultraschall aufgebrochen und die „inclusion bodies“ (IB) von den löslichen Proteinen mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Über Nickelchelate-Affinitätschromatographie wurde p57 aus der löslichen und der IB-Fraktion zunächst gezielt angereichert. Das denaturiert vorliegende p57 aus der „inclusion body“-Fraktion wurde über eine Anionenaustauscherchromatographie renaturiert. Mit beiden Fraktionen ließ sich abschließend über Ausschlußchromatographie eine Größenfraktionierung durchführen, wodurch sich noch vorhandene Verunreinigungen weitmöglichst abtrennen ließen. p57 lag für den nachfolgenden Versuch in größtmöglicher Reinheit mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml vor.

FHL2 wurde analog (FHL2pET28a) rekombinant exprimiert und die lösliche Fraktion über Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 4.14).

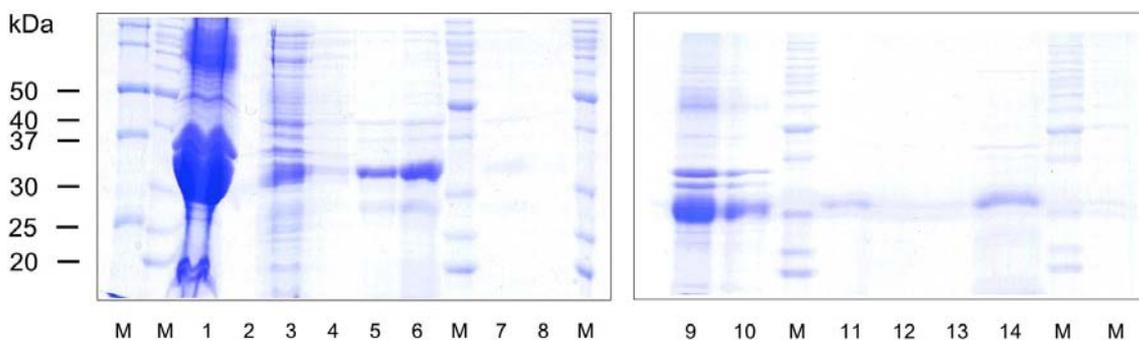
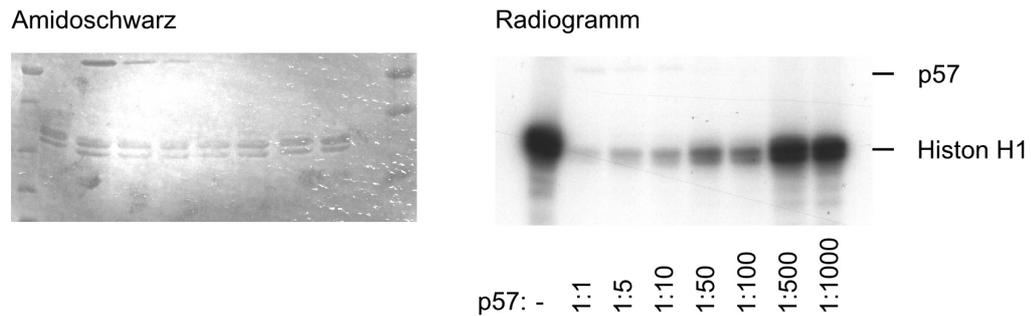


Abb. 4.14: Reinigung von rekombinant in *E. coli* exprimiertem und mit His-„tag“ fusioniertem FHL2
1: Bakterieller Rohextrakt nach 4-stündiger FHL2-Expression; 2: Überstand nach Zellaufschluß (lösliche Fraktion); 3: Sediment nach Zellaufschluß („inclusion body“-Fraktion); 4, 5, 6, 7, 8: Elutionsfraktionen der löslichen Fraktion nach Affinitätsreinigung über Nickel-Beads; 9, 10: Bakterieller Rohextrakt; 11, 12, 13, 14: Umpufferung und Aufkonzentrierung der gereinigten Proteinlösung mittels Dialyse, M: Marker

Freies und vorab mit FHL2 inkubiertes p57 wurden als Inhibitorproteine in einen Histon H1-Kinaseassay eingesetzt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Fähigkeit des Cdk2/Cyclin A-Komplexes Histon H1 zu phosphorylieren, egal ob mit p57 assoziiert oder aber mit FHL2/p57 (Abb. 4.15). Da aufgrund mangelnder Kenntnis der FHL2-Funktion und -Struktur kein Nachweis für die korrekte Faltung des

rekombinanten aufgereinigten FHL2-Proteins erbracht werden konnte, läßt sich nicht ausschließen, daß die Bindung *in vitro* an p57 nicht erfolgt ist und deshalb auch keine Revertierung der Kinase-Inhibition beobachtet werden konnte. Ein dramatischer Effekt auf die Kinase-Inhibition war insgesamt auch nicht zu erwarten, da FHL2 aus experimentellen Gründen nur im Unterschuß eingesetzt werden konnte.

A



B

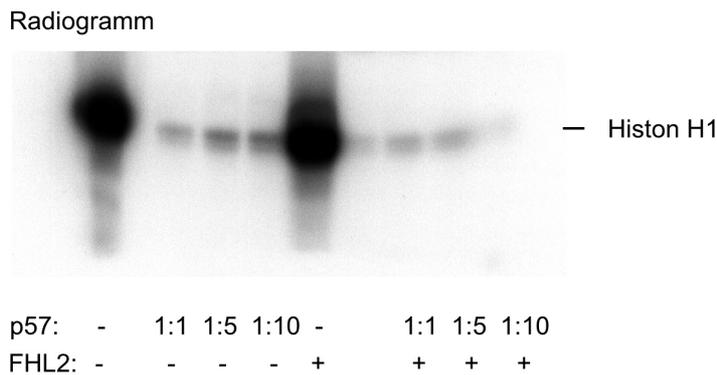


Abb. 4.15: (A) p57 inhibiert konzentrationsabhängig die Cdk2/Cyclin A-Kinaseaktivität. Die Amidoschwarz-Färbung (links) zeigt die konstante Menge an eingesetztem Cdk2/CyclinA-Komplex sowie die abnehmende Konzentration an eingesetztem rekombinatem p57-His. Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von p57 wurde ein funktioneller Histon H1-Kinaseassay mit aktivem, rekombinatem Cdk2/Cyclin A durchgeführt. p57 wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und wie beschrieben gereinigt. Bei der Kinasetitration wird die Aktivität des Inhibitors dabei über die Inkorporation von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in das Cdk2/Cyclin A Substrat Histon H1 bestimmt. Das Inhibitorpotential von p57 ist gekennzeichnet durch die Inaktivierung der Cyclin A/Cdk2-Kinase und der damit verbundenen Reduktion der Inkorporation von Phosphat in Histon H1. Die Titration wurde in sieben Punkten mit unterschiedlichen Mengen p57 (Verdünnungen 1:1 bis 1:1000) bei konstanten Mengen Kinase (50 ng) und Substrat (2 μg) durchgeführt. Gezeigt ist das Radiogramm des getrockneten Gels der über SDS-PAGE aufgetrennten Kinaseaktionen (rechts). (B) Vergleich der inhibitorischen Aktivität von FHL2-gebundenem und freiem p57. Gereinigtes freies p57 und vorab mit FHL2 inkubiertes p57 wurden nach SDS-PAGE-Auftrennung und Coomassie-Anfärbung in ihren Mengen aufeinander abgeglichen. Jeweils gleiche Mengen freies und komplexgebundenes p57 wurden zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität in einem Kinaseassay mit Cyclin A/Cdk2 verglichen. Die Titration wurde mit je vier Punkten anhand steigender 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 Kinaseaktionen.

4.3.7 FHL2 und p57 kolokalisieren im Zellkern

Neben der Identifizierung von FHL2 als Bindungspartner von p57 im genetischen System des „yeast two hybrid“-Screens, legten sowohl die nachgewiesene Interaktion beider Proteine nach *in vitro*-Translation als auch die Immunopräzipitationen endogen und nach Überexpression nahe, daß beide Proteine in der Zelle eng in Kontakt miteinander stehen. Es wurde daher versucht, im Rahmen immunozytologischer Untersuchungen eine Kolokalisation von p57 und FHL2 zu zeigen. Darüberhinaus sollte eine mögliche Lokalisationsänderung von p57 oder von FHL2 innerhalb der Zelle jeweils in Abhängigkeit vom Bindungspartner untersucht werden.

Um die intrazelluläre Lokalisation von p57 sicherzustellen, wurde ein N-terminales YFP-Fusionsprotein von p57 (in pEYFP-C1) konstruiert. Die Lokalisation wurde 24 Stunden nach der transienten Transfektion von HeLa-Zellen immunozytologisch analysiert. Für p57-YFP ist dabei eine eindeutig auf den Nukleus beschränkte Lokalisation zu beobachten (Abb. 4.16). Die nukleäre Lokalisation von p57 war in Anbetracht der bereits bekannten Lokalisationsmuster von p21 und p27 sowie einer Kernlokalisationssequenz in p57 in einer zu p27 konservierten Domäne vorauszusagen. Die Gewährleistung seiner Funktion als CDK-Inhibitor, bei der p57 in direkten Kontakt mit den verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexen treten muß, ist somit gegeben. Der mit 26 kDa verhältnismäßig große YFP-Anteil des Fusionskonstruktes könnte die Lokalisation des Proteins beeinflussen, weshalb später die nukleäre Lokalisation von p57 zusätzlich über eine weitere Immunofluoreszenz sichtbar gemacht wurde, diesmal p57 jedoch lediglich mit dem sehr viel kleineren HA-„tag“ versehen. Für die Untersuchung von endogen exprimiertem p57 ließen sich keine geeigneten Zelllinien mit ausreichendem Expressionsniveau finden.

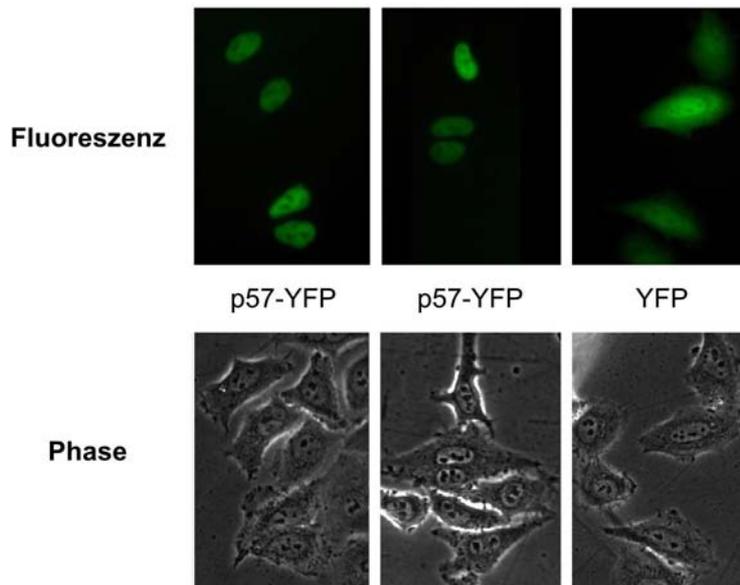


Abb. 4.16: p57-YFP lokalisiert im Zellkern

Um die subzelluläre Lokalisation von p57 in HeLa-Zellen zu untersuchen, wurde p57 N-terminal an YFP fusioniert und sein Expressionsmuster 22 Stunden nach der Transfektion im Mikroskop unter Fluoreszenzlicht (oben) im Vergleich zur Kontrolle (YFP) analysiert. Es ließ sich eine exklusive Beschränkung der p57-Expression auf den Zellkern nachweisen. Phasenkontrast (unten).

Der Einfluß von FHL2 auf die Lokalisierung von p57 *in vivo* wurde gleichfalls über Immunofluoreszenz analysiert. Beide Proteine wurden als mit N-terminal unterschiedlichem „tag“ fusionierte Proteine konstruiert (p57pCRUZ-FLAG sowie FHL2-pCRUZ-HA) und zunächst entweder alleine in HeLa-Zellen transient transfiziert oder kotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte der Nachweis mit den jeweils spezifischen Antikörpern anti-HA und anti-p57 (Abb. 4.17).

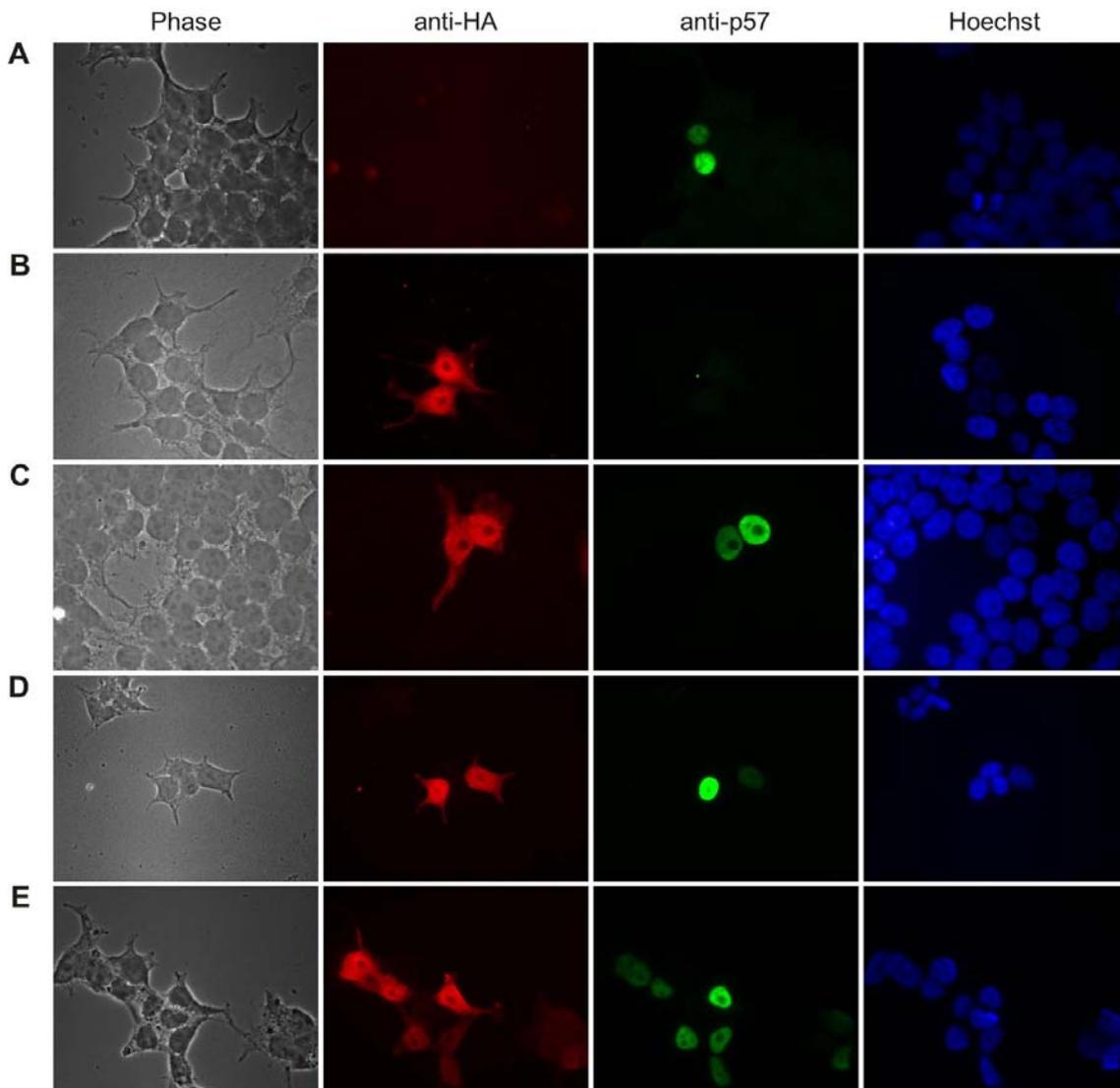


Abb. 4.17: FHL2 und p57 beeinflussen sich nicht gegenseitig in ihrer Lokalisation

Zur Untersuchung der Lokalisation von FHL2 und p57 wurden beide Proteine als N-terminale Fusion mit HA bzw. FLAG exprimiert. 48 h nach Transfektion von adhärennten 293T-Zellen wurde die Lokalisation von FHL2 bzw. p57 jeweils alleine im Fluoreszenzlicht und Phasenkontrast mikroskopiert. Um zu untersuchen, ob FHL2 eine Lokalisationsänderung von p57 verursachen kann, wurden p57-FLAG und FHL2-HA kotransfiziert und ebenfalls 48 h nach der Transfektion unter dem Mikroskop analysiert. p57 wurde dabei mit einem spezifischen anti-p57-C20-Antikörper sowie einem anti-rabbit-FITC-Konjugat als sekundärem Antikörper immunodetektiert, FHL2 dagegen mit der Kombination anti-HA/anti-mouse-Rhodamin-Antikörper. Gezeigt sind jeweils (von links nach rechts) die Aufnahme im Phasenkontrast, das Rhodamin- bzw. FITC-Signal im Fluoreszenzlicht sowie die Hoechst-Anfärbung der zellulären DNA ebenfalls im Fluoreszenzlicht. Transfektion von A: p57-FLAG; B: FHL2-HA; C, D, E: p57-FLAG mit FHL2-HA.

Die Fluoreszenzmuster bestätigten erstens die vorab gewonnene Erkenntnis über das exklusive Auftreten von p57 im Zellkern und zeigten weiterhin eine Verteilung von FHL2 über die gesamte Zelle. Es ließ sich demnach keine restriktive Kolo-kalisation beobachten. Wurden beide Konstrukte kotransfiziert, rief dies weder bei p57 noch bei

FHL2 eine Änderung in der Lokalisation hervor. Da beide Proteine auf jeden Fall eine Kernlokalisierung zeigten, bleibt anzunehmen, daß eine funktionelle Interaktion im Kern stattfand oder daß eine geringe und daher in diesem Experiment nicht nachweisbare Menge an p57 eine FHL2-Funktion im Zytoplasma beeinflussen kann bzw. umgekehrt. FHL2 übt seine anderen zellulären Funktionen beispielsweise als Bindungspartner der β -Integrine im Zytoplasma aus.

4.3.8 p57 zeigt einen verstärkenden Einfluß auf die Koaktivatorfunktion von FHL2

Eine der für FHL2 beschriebenen Funktionen ist seine gewebespezifisch koaktivierende Wirkung auf den Androgen-Rezeptor (Müller *et al.*, 2000). Dabei steigert FHL2 in Agonist- und AF-2-abhängiger Weise die transkriptionale Aktivität selektiv des Androgen-Rezeptors (AR). Es ist daher zu vermuten, daß die postulierte Interaktion mit p57 die Koaktivatorfunktion von FHL2 beeinflusst. Die transaktivierende Eigenschaft von FHL2 ließ sich quantitativ in einem Transaktivierungsassay bestimmen. Hierzu wurden 293T-Zellen mit dem Steroidhormon-Rezeptor (Androgen-Rezeptor, AR), FHL2 und MMTV-Luc als Reporter gen (alle Konstrukte wurden freundlicherweise von R. Schüle, Freiburg zur Verfügung gestellt) transfiziert. Das Luziferase-Reporter gen ist dabei unter der Kontrolle des viralen MMTV-Promotors, der mehrere ARE („androgen responsive elements“-)Elemente enthält und daher vom aktivierten AR angeschaltet werden kann. Zur späteren Normalisierung wurde zusätzlich pro Ansatz ein β -Gal-Reporter gen konstruiert und eingebracht. Alle Ansätze waren als Dupletts angelegt, von denen jeweils einer ab vier Stunden nach der Transfektion unter Androgen-Stimulation kultiviert wurde, der andere nicht. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in ihren Extrakten die Luziferase-Aktivität gemessen. Parallel wurde zu allen Ansätzen die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Bei der Berechnung der relativen Aktivitäten wurden die ermittelten Luziferase-Aktivitäten jeweils gegen ihre β -Gal-Aktivitäten abgeglichen, nachfolgend das Verhältnis aus stimulierten und nicht stimulierten Dupletts gebildet und schließlich alle Werte prozentual gegen die Leervektor-Transfektionen aufgerechnet, die dabei auf 1 gesetzt wurden. In Abb. 4.18 A, B und C ist exemplarisch ein Experiment dargestellt. Die gemittelten Werte aus

insgesamt fünf unabhängigen Reproduktionen sind in Abbildung 4.18 D zusammengefaßt.

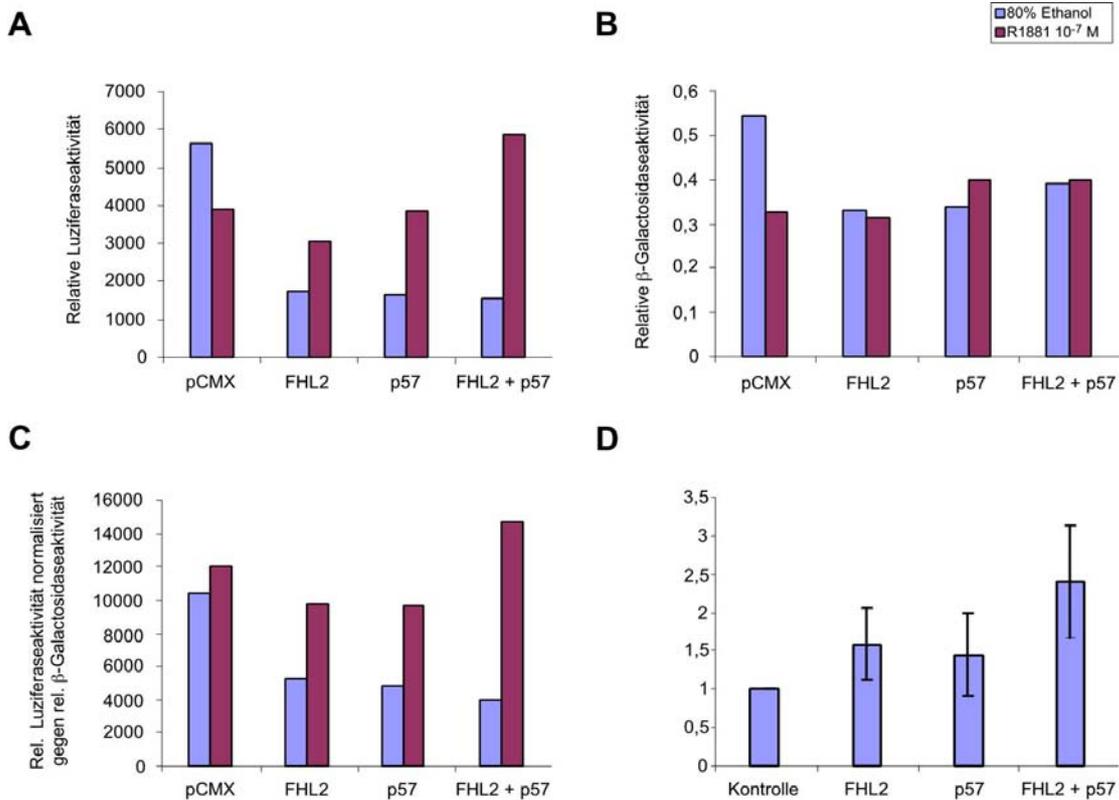


Abb. 4.18: p57 hat möglicherweise einen verstärkenden Effekt auf die transaktivierende Funktion von FHL2 als Koaktivator des Androgen-Rezeptors

(A) Relative Luziferase-Aktivitäten, (B) relative β -Galactosidaseaktivitäten sowie (C) die von A gegen B normalisierten Werte eines typischen Transfektionsansatzes. 293T-Zellen wurden bei konstanten Mengen an MMTV-Luc (500 ng), AR (30 ng) jeweils mit gleichen Mengen (100 ng) FHL2/pCMX bzw. p57/pCRUZ transfiziert. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 500 ng pSV β -Gal für die spätere Normalisierung eingebracht. Eine jeweils konstant gehaltene Gesamt-DNA-Menge von 4 μ g wurde erreicht durch Ausgleich mit entsprechendem Leervektor pCMX bzw. pCRUZ. Die Ansätze wurden als Dupletts erstellt, wobei nur eine Probe durch Androgen-Gabe (R1881, 10⁻⁷M) für 20 Stunden stimuliert wurde. Alle Ansätze wurden 24 Stunden nach der Transfektion geerntet und für die Messungen entsprechend aufbereitet. (D) Die Werte aus fünf unabhängigen Experimenten wurden jeweils gegen ihre β -Gal-Aktivität abgeglichen, dann gegen den Leervektor (Kontrolle) normiert und abschließend ihr Mittelwert berechnet. Alle Werte wurden prozentual bezogen auf die Kontrolle, die dabei auf 1 gesetzt wurde. Die Signifikanz der einzelnen Werte zueinander ist mit p-Values (T-Test) zwischen 0,002 und 0,1 hoch.

FHL2 zeigte seinen koaktivierenden Effekt auf den Androgen-Rezeptor durch eine gesteigerte relative Luziferase-Aktivität von etwa 140% gegenüber der Kontrolle. Auch p57 stimulierte den Androgen-Rezeptor, wenn mit dem 1,2-fachen auch deutlich schwächer als FHL2. Wurden die Zellen mit FHL2 und p57 gemeinsam kotransfiziert, führte dies zu einem signifikanten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität auf das

knapp 2,5-fache. Diese Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Interaktion von FHL2 mit p57 hin. Allerdings läßt sich auch ein additiver Effekt der aktivierenden Wirkung beider Proteine nicht ausschließen, denn auch p57 alleine zeigt einen leicht aktivierenden Effekt gegenüber der Kontrolle. Ein Grund dafür könnte jedoch sein, daß in den Zellen bereits eine ausreichende Menge endogenes FHL2 vorhanden ist, um den Komplex mit p57 zu bilden und so die beobachtete Aktivierung zu bewirken. Als denkbare Mechanismen einer direkten p57-FHL2-Interaktion ist vorstellbar, daß p57 durch seine Bindung eine Konformationsänderung von FHL2 hervorruft, so daß die aktive Stelle des AR, der für die Koaktivierung verantwortlich ist, besser zugänglich wird. Zum anderen könnte FHL2 durch die Assoziation mit dem CDK-Inhibitor auch stabilisiert werden, wodurch insgesamt höhere Level an aktivem FHL2 in der Zelle vorliegen, welche in der Folge die gestiegene transaktivierende Wirkung auf den Rezeptor erklären.

Sind beide Proteine, also sowohl FHL2 als auch p57 unabhängig voneinander in der Lage, den Androgen-Rezeptor zu stimulieren und beruht der beobachtete Verstärkungseffekt auf ihrer Summation, so spricht dies zumindest dafür, daß sich beide Proteine in ihrer Funktion nicht behindern, wie dies unter anderem durch Titration benötigter Faktoren vorstellbar wäre.

4.3.9 FHL2 hebt eine durch p57 induzierte G₁-Arretierung der Zellen auf

Eine überaus wichtige Frage bei der Charakterisierung von CKI-interagierenden Proteinen ist, ob sie aufgrund ihrer regulativen Eigenschaften Auswirkungen auf den Zellzyklus zeigen. Es kann ihnen dabei eine eigene unabhängige Bedeutung zukommen oder aber eine physiologische Relevanz durch die Interaktion mit dem CDK-Inhibitor.

Um zu untersuchen, ob und inwieweit FHL2 ein Protein ist, das über seine Bindung an p57 den Zellzyklus beeinflussen kann, wurde die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflußzytofluorimetrie bestimmt. Dazu wurden transient mit p57, FHL2 und p57 + FHL2 transfizierte HeLa-Zellen im Vergleich zur Kontrolle analysiert, die Konstrukte lagen dabei in den Vektoren pCRUZ-HA bzw. pCMX vor. Eine Kotransfektion von pEYFP-C1 und die Aussonderung der YFP-positiven Zellen gewährleistete, daß nur *de facto* transfizierte Zellen in die Analyse mit

einbezogen wurden. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gerettet, in Ethanol fixiert und ihre Verteilung über den Zellzyklus im FACS ermittelt.

Die einzelnen Zellzyklusprofile wurden unter Zuhilfenahme des Programmes „ModFit“ quantitativ ausgewertet und der prozentuale Anteil an G_1 - sowie S- und G_2/M -Phase-Zellen bestimmt (Abb. 4.19).

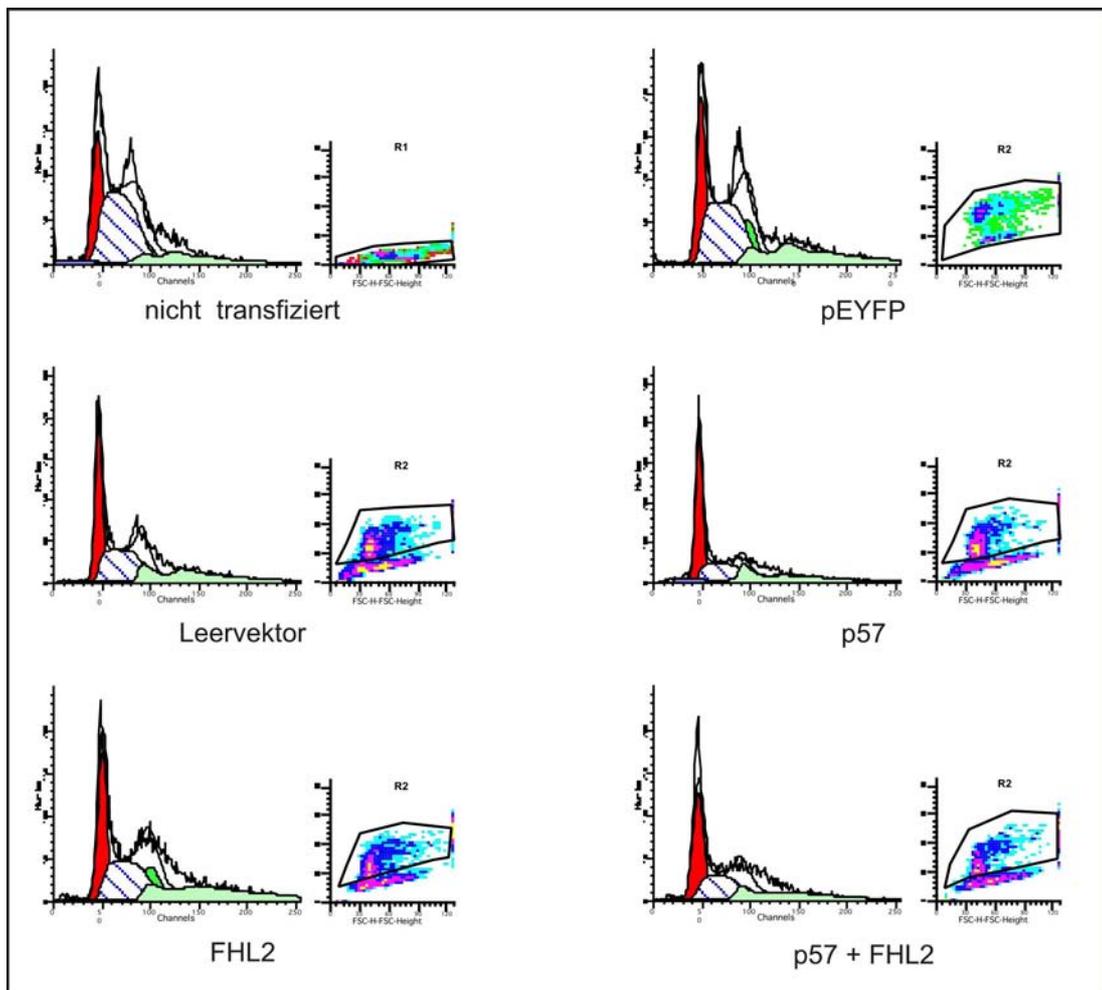


Abb. 4.19: Zellzyklusprofil von transfizierten 293T-Zellen

293T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für p57 und FHL2 alleine bzw. gemeinsam sowie jeweils mit pEYFP kotransfiziert. Die Zellzyklusverteilung der transfizierten YFP-positiven Zellen (rechts: Zellen innerhalb des markierten Bereiches R2) wurde mittels Propidiumiodidfärbung der DNA bestimmt. Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der Zellen auf G_1 - (rot), S- (schraffiert) sowie G_2/M -Phase (weiß).

Die Zu- bzw. Abnahme der G_1 -Zellzahl wurde prozentual im Bezug auf die Kontrolle berechnet, die dabei auf 100 gesetzt wurde. Abbildung 4.20 stellt schematisch den gemittelten Prozentsatz an G_1 -Zellen der einzelnen Transfektionen aus insgesamt acht unabhängigen Experimenten dar.

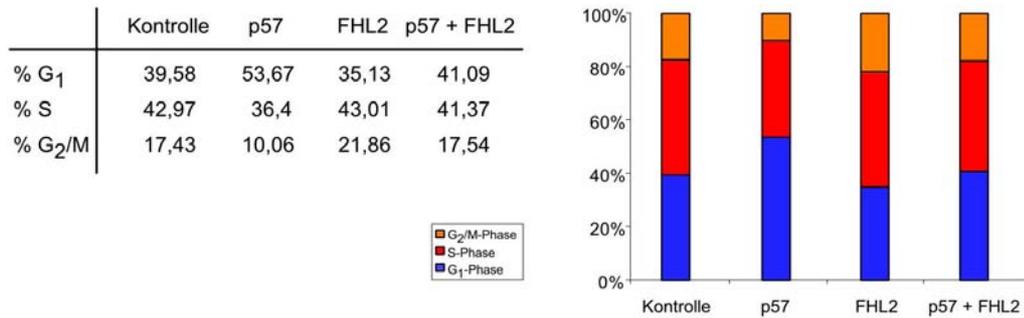
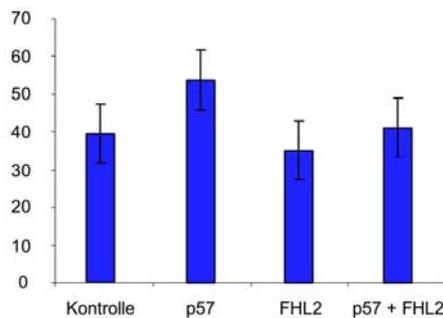
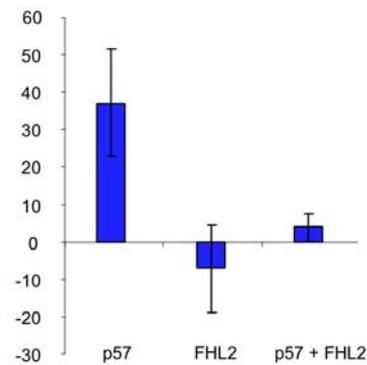
A**B****C**

Abb. 4.20: FHL2 hebt bei Koexpression den durch p57 induzierten G₁-Arrest auf (A) Verteilung der Zellen auf G₁-, S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus nach Überexpression von p57, FHL2 und Koexpression von p57 mit FHL2 in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor). (B) Prozentuale Anzahl der 293T-Zellen in G₁. (C) Prozentuale Anzahl der G₁-Zellen nach Normierung der Werte auf die Kontrolle (Leervektor). Die Werte sind das statistische Mittel aus sieben unabhängigen Experimenten. Die P-,values“ im T-Test sind mit 0,003 (für p57 mit p57/FHL2), 0,008 (für p57 mit FHL2) sowie 0,24 (für FHL2 mit p57/FHL2) hochsignifikant bzw. signifikant.

Mit einer sehr hohen Signifikanz bewirkte eine Überexpression von p57 in HeLa-Zellen erwartungsgemäß einen dramatischen Anstieg der G₁-Zellen um über 37% im Vergleich zur Kontrolle. Dieser p57-induzierte G₁-Arrest wurde durch die zeitgleiche Koexpression von FHL2 nahezu aufgehoben. Zu beachten ist dabei, daß bei alleiniger Expression von FHL2 ein leichte Abnahme an G₁-Zellen um etwa 11% zu verzeichnen war. Diese kann jedoch aufgrund ihres sehr viel geringeren Ausmaßes keinesfalls der p57-induzierten Arretierung der Zellen entgegenwirken.

Der beobachtete p57-induzierte G₁-Phänotyp, der durch gleichzeitige FHL2-Expression aufgehoben wird, attestiert somit der p57-FHL2-Interaktion erstmals eindeutig eine funktionelle Bedeutung und gibt erste Hinweise auf ihre Funktion *in vivo*.

Mit den Daten aus der FACS-Analyse kann ein Zellzyklus-bedingter Effekt, beispielsweise durch eine veränderte Länge der einzelnen Zellzyklusphasen, noch nicht

ausgeschlossen werden. Anhand einer Wachstumskurve oder einer FACS-Analyse mit gleichzeitiger BrdU-Inkorporation, in deren Folge sich die markierten S-Phasezellen später auch in G_1 und G_2/M finden lassen müßten, ließe sich diese Hypothese aber disqualifizieren.

5 Diskussion

5.1 Identifikation neuer Interaktionspartner von p57^{Kip2}

Expressionslevel von CDK-Inhibitoren sind maßgeblich daran beteiligt, ob die Zelle am G₁/S-Phasenübergang weiter proliferiert oder aber ihr Wachstum einstellt, insbesondere auch an der Option, den Zellzyklus am G₁-Checkpoint zu verlassen, um in den Prozeß der terminalen Differenzierung einzutreten. In einigen Zelltypen wird p57 als der maßgebliche Inhibitor angesehen, so findet sich besonders in Herz- und Skelettmuskelgewebe sowie der Plazenta ein sehr hohes Niveau an p57-mRNA (Matsuoka *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Aber auch bei der Osteoblastenentwicklung oder in der Niere reguliert p57 den Zellzyklus entscheidend mit, wie unter anderem diesbezügliche Fehlfunktionen in p57^{-/-}-Mäusen bzw. Analysen des Wilms' Tumors zeigten (Urano *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 1996). Die zellspezifischen Aufgaben von p57 werden durch Faktoren gesteuert, die die p57-Menge oder seine Aktivität in der Zelle regulieren. Dabei ist nicht nur die Identifizierung möglicher Interagierer von ausschlaggebender Bedeutung, sondern ebenso deren mechanistische Einbindung in die übergeordnete Physiologie der Zellzykluskontrolle.

Ziel dieser Arbeit war es, neue mit p57 wechselwirkende Proteine zu identifizieren. Dafür wurde zum einen ein neues funktionelles Analysesystem in Hefe zur systematischen Identifikation von mit CDK-Inhibitoren wechselwirkenden Proteinen entwickelt und erste Analysen durchgeführt. Des Weiteren konnten durch die Etablierung der Hefe-Interaktionsscreening-Methodik mehrere mit p57 assoziierte Proteine ermittelt und FHL2 als spezifischer Interaktor von p57 charakterisiert werden. Es sollten insbesondere Interaktionspartner ermittelt werden, die unabhängig von den bekannten CDKs und Cyclinen an p57 binden können. Beide experimentellen Screening-Ansätze waren dabei gezielt darauf ausgelegt, gleichzeitig mit der Identifikation *in vivo* die physiologische Relevanz zu demonstrieren sowie erste Hinweise auf die Funktion der Protein-Protein-Interaktion zu liefern.

Bislang ist für p57 lediglich eine vergleichsweise geringe Anzahl interagierender Faktoren bekannt, was mitunter daran liegt, daß p21 und p27 bereits seit sehr viel längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung sind. Dabei bietet p57 als einziger CDK-Inhibitor den Vorteil, direkt als ursächlich für ein Krankheitsbild, das Beckwith-

Wiedemann-Syndrom, erkannt worden zu sein (Matsuoka *et al.*, 1995; Hatada *et al.*, 1995). p57 zeigt auch den deutlichsten Phänotyp einer „knock out“-Maus. So fielen Mausembryonen, die kein p57-Protein mehr exprimierten, nicht nur durch eine gestörte Zellproliferation und -differenzierung auf sondern entwickelten mit fortschreitendem Alter auch eine ganze Palette weiterer Defekte. Die meisten Tiere starben kurz nach der Geburt infolge gravierender Muskelmißbildungen und an Defekten in der Knochenentwicklung oder im Gastrointestinaltrakt. Des weiteren führten stark vergrößerte Organe, Zytomegalie, Linsenzellhyperproliferation und Apoptose (Zhang *et al.*, 1997) sowie Gaumenspalten mit dadurch bedingter Atemnot zu schwersten Entwicklungsstörungen. Yan *et al.* (1997) und Takahashi *et al.* (2000) berichteten von einer 10%igen Überlebensrate ihrer „knock out“-Mäuse, die alle ebenfalls schwerwiegende Retardierungen im Wachstum aufwiesen, weshalb anzunehmen ist, daß p57 insgesamt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und zellulären Differenzierung spielt. Jedoch wiesen sie darauf hin, daß sich bei von überlebenden Mausembryonen entnommenen Fibroblasten kein Unterschied in der Proliferationsrate oder der saturierenden Zelldichte beobachten ließ, was wiederum darauf hindeutet, daß in diesem Zelltyp ein G₁-Wachstumsarrest und die Zellzykluskontrolle womöglich weitgehend unabhängig von der p57-Funktion zustande kommt.

Im Gegensatz dazu weisen p21-defiziente Mäuse keinerlei Entwicklungsstörungen auf. Lediglich Zellen von p21-Null-Mutanten offenbaren Fehler am G₁-Kontrollpunkt nach Induktion von DNA-Schäden. p27-defiziente Mäuse zeigen bereits erkennbare Phänotypen. So sind p27^{-/-}-Mäuse sehr viel größer als ihre Kontrollgruppe. Ursache dafür ist eine Multiorganhyperplasie. Zudem entwickeln sie weibliche Unfruchtbarkeit, Nierendysplasie sowie eine Reihe weiterer Defekte und sind durchweg taub (Kiyokawa *et al.*, 1996; Fero *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996).

Basierend auf der Isolierung aus dem heterologen Hefesystem sowie in *in vitro*-„pull down“-Experimenten, präsentierten Watanabe und Mitarbeiter 1998 mit PCNA den bislang einzigen C-terminalen Bindepartner von p57. Da bei Überexpression der die PCNA-Bindedomäne beherbergende C-Terminus für sich alleine in der Lage war, die DNA-Replikation *in vitro* sowie den Eintritt in die S-Phase *in vivo* zu verlangsamen, so daß es zu einer Akkumulation der Zellen in G₁ kam, wurde neben der CDK-inhibitorischen zusätzlich eine PCNA-inhibitorische Aktivität von p57 postuliert.

Die bisher ungekannten über das „yeast two hybrid“-System als mit p57 assoziierende Proteine klassifizierten Faktoren (FHL2, Zyxin, Cyclophilin B und Siah-2) wurden untersucht und schließlich FHL2 als spezifischer Interaktor von p57 näher charakterisiert. Es gelang dabei, den Komplex aus FHL2 und p57 nicht nur biochemisch *in vitro*, sondern ebenfalls *in vivo* unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen. Studien zum Mechanismus der Interaktion ergaben, daß sowohl in der Proteinstruktur von FHL2 als auch auf Seiten von p57 mehrere Bindestellen zur Verfügung stehen. Reporterstudien an 293T-Zellen unter den Bedingungen der Überexpression von FHL2 und p57 unterstützen die Hypothese, daß p57 als transaktivierender Faktor in Wechselwirkung mit FHL2 an der Aktivierung des Androgen-Rezeptors beteiligt sein könnte. Untersuchungen zur Klärung der Frage, inwieweit die Interaktion zwischen p57 und FHL2 den Zellzyklus beeinflußt, offenbarten einen deutlichen Effekt: die durch p57 in HeLa-Zellen induzierte Wachstumsarretierung in G₁ wird bei gleichzeitiger Koexpression von FHL2 revertiert.

5.1.1 Interagierende Proteine aus dem „yeast two hybrid“-System

Die umfassende Analyse des humanen Genoms über die Hefehybrid-Technik förderte neben erwarteten Interagierern (verschiedene Cycline) auch eine Reihe bislang nicht mit p57 in Zusammenhang gebrachte Faktoren als Bindepartner zu Tage. Die Identifikation von Cyclin B₁ und Cyclin D₃ bestätigte die Funktionalität des durchgeführten Screenings bzw. der gewählten Parameter. Allerdings war die Ausbeute an interagierenden Cyclinen vergleichsweise gering. Ebenfalls wäre eine Auswahl verschiedener CDKs oder im Idealfall PCNA als bereits bekanntes p57-Bindeprotein zu erwarten gewesen. Möglicherweise wirken manche Cycline, wie beispielsweise Cyclin E, bei starker Überexpression toxisch auf die Hefezellen (Won und Reed, 1996). Hohe Proteinkonzentrationen der endogenen Hefe-Kinase Cdc28 könnten die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen p57 und einer humanen CDK-Untereinheit verringern, selbst wenn deren cDNA in der Hefezelle exprimiert wird. Der Vorteil des von uns modifizierten und in seiner Stringenz dadurch extrem erhöhten Systems beinhaltet andererseits, daß sich relativ schwach interagierende Proteine nur schwer nachweisen lassen. Auch gelingt es kaum, Faktoren, die mit p57 lediglich eine

transiente Bindung eingehen und schnell wieder dissoziieren, zu isolieren. Das Fehlen putativer Faktoren in Hefezellen, die bei einer Interaktion als Adapter fungieren oder für die Bildung eines größeren Komplexes aus p57 und dem Zielprotein essentiell sind, verhindert ebenfalls, daß bestimmte Interagierer aufgespürt werden können. Auch ist das Expressionsniveau der heterolog exprimierten cDNAs variabel und kann in einigen Fällen zu gering sein, um ein ausreichend signifikantes Kolonienwachstum zu gewährleisten. Weitere Ursache für das Ausbleiben bestimmter erwarteter Interaktionspartner kann ein von den Bedingungen in der humanen Zelle abweichendes physiologisches Milieu in der Hefe sein. So wäre vorstellbar, daß eine bestimmte Interaktion nur in spezifischen Zellkompartimenten der menschlichen Zelle mit den dort herrschenden pH- oder osmolaren Bedingungen zustande kommen kann. Allgemein ist das Ausbleiben eines erwarteten Interaktionsproteins möglicherweise auch darauf zurückzuführen, daß der entsprechende Faktor nicht als cDNA in der eingesetzten Genbank vorhanden ist.

5.1.2 FHL2 und p57 als Interaktionspartner im „yeast two hybrid“-System

Seit seiner erstmaligen Beschreibung durch Genini *et al.* (1997) als Protein, das spezifisch in der Rhabdomyosarkom-Zelllinie RD transkriptionell herunterreguliert wird und der LIM-Proteinfamilie angehört, konnte FHL2 mehrfach als Bindepartner unterschiedlicher Proteine identifiziert werden. In vielen Fällen tauchte FHL2 zunächst in Form eines „yeast two hybrid“-Partners auf, um dann in zellbiologischen oder biochemischen Analysen bestätigt zu werden. Auf diese Weise wurde FHL2 von Chan *et al.* (2000) als Bindepartner für hCDC47, ein Protein, das an der Stabilisierung von Minichromosomen beteiligt ist, identifiziert. Diese Interaktion bestätigt sich anschließend in einem *in vitro*-Bindungsassay mit immobilisiertem FHL2 bestätigt. Ebenso als Partnerprotein im Hefesystem zeigte sich FHL2 für Presenilin-2 (Tanahashi *et al.*, 2000). Die *in vitro*-Interaktion wurde dabei über Affinitätsbindung demonstriert, die physiologische Interaktion endogen im „pull down“-Experiment mit Extrakten der humanen Lungenfibroblastenzelllinie MRC5. Desgleichen wurde FHL2 als Bindepartner für mehrere α - und β -Integrine bzw. deren zytoplasmatische Domänen erkannt und die Komplexe in einer Koimmunopräzipitation nachgewiesen (Wixler *et al.*, 2000). IGFBP5

(„insulin-like growth factor-binding protein 5“) wurde 2002 von Amaar und Mitarbeitern analog identifiziert und via Koimmunopräzipitation nach Überexpression beider Interaktionspartner in U2-Osteosarkom-Zellen belegt. Aus dem Hefesystem resultierte FHL2 ebenfalls als neuer Bindepartner für hNP220 („human DNA-binding nuclear protein 220“). Die Visualisierung der FHL2-hNP220-Interaktion erfolgte in lebenden Säugerzellkulturen im „fluorescence resonance energy transfer (FRET)“-Assay, wobei FHL2 als GFP- und hNP220 als BFP-„two fusion“-Proteine vorlagen (Ng *et al.*, 2002). FHL2 mit TUCAN/CARDINAL, gezeigt durch die Identifizierung im Hefehybridsystem und mittels Kopräzipitation aus bakteriellem Extrakt sowie durch Koimmunopräzipitation unter Überexpressionsbedingungen *in vivo*. TUCAN/CARDINAL reduziert die Aktivierung von NF- κ B. Obwohl die Expression von FHL2 keinen Effekt auf die NF- κ B-Aktivierung zeigte, erhöhte FHL2 jedoch in dosisabhängiger Weise die TRAF-2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B (Stilo *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde TRAF-2 in einem „yeast two hybrid“-Screen mit p27 als Köderprotein von Hélène Hydry im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit als Kandidat für ein p27-assoziiertes Protein erkannt. Bei Bestätigung dieser Daten wäre demnach eine von TRAF-2 vermittelte Funktion von FHL2 auch für p57 denkbar.

Mit FHL3 konnte im Hefesystem sogar ein weiteres Mitglied der „LIM-only“-Unterfamilie als Interaktionspartner von FHL2 ermittelt werden. Die LIM-LIM-Interaktion ließ sich anschließend via FRET-Assay bestätigen (Li *et al.*, 2001). Des weiteren interagiert FHL2 mit und ist ein Korepressor von PLZF, dem „promyelotic leukemia zinc finger“-Protein (McLoughlin *et al.*, 2002). Jüngere Untersuchungsergebnisse weisen FHL2 - neben anderen LIM-Domänenproteinen wie ACT und FHL3 für CREM/CREB - eine Rolle als Koaktivator des Androgen-Rezeptors zu (Fimia *et al.*, 2000, 2002; Müller *et al.*, 2000). Ebenso soll FHL2 an der Vermittlung bestimmter Rho-Signale von der Zellmembran in den Nukleus beteiligt sein (Müller *et al.*, 2002), womit ein erster Hinweis auf eine Beteiligung von FHL2 an der Signaltransduktion vorliegt.

Zusammenfassend unterstützen verschiedene, jüngst charakterisierte Interaktionen von FHL2 mit beispielsweise FHL3, hCDC47 oder dem Androgen-Rezeptor die Hypothese, daß FHL2 als ein Adapter-Modul dienen und somit am Aufbau funktioneller Multiproteinkomplexe beteiligt sein könnte. Eine solche Steuerung könnte zur Rekrutierung von p57 in einen bestimmten Komplex beitragen.

p57 wurde bis zum Ende der vorliegenden Arbeit lediglich einmal erfolgreich als Köderprotein im „yeast two hybrid“-Screen eingesetzt, infolgedessen sich PCNA als Bindeprotein charakterisieren ließ (Watanabe *et al.*, 1998). Für die übrigen CKIs liegen bereits mehrere Untersuchungen über heterolog identifizierte Bindungspartner von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vor. Darunter fallen für p27 Grb2 (Sugiyama *et al.*, 2001), Jab1 (Tomoda *et al.*, 1999), mNPAP60 (Muller *et al.*, 2000) und die Kinase hKIS (Boehm *et al.*, 2002). Für p21 konnte neben einer Vielzahl von Faktoren zuletzt TOK-1 über die Interaktion in Hefe identifiziert werden (Ono *et al.*, 2000).

5.1.3 p57 und FHL2 als Interaktionspartner *in vivo*

Die Assoziation von p57 mit seinem auf genetischem Weg in Hefe gefundenen Interaktionspartner FHL2 konnte auch im Bindungsassay mit *in vitro*-translatierten Proteinen eindeutig nachgewiesen werden. Gab die „yeast two hybrid“-Analyse noch Hinweise auf eine FHL2-Interaktion mit p57 und abgeschwächt mit p21, so ließ sich die Spezifität der Interaktion im *in vitro*-Bindungsassay eindeutig auf p57 beschränken. Im Retikulozyten-Lysat liegen andere Proteine und Faktoren als in der Hefezelle vor, die für eine mögliche Interaktion von FHL2 auch *in vitro* mit p21 notwendig sein könnten. Im Gegensatz hierzu sind in der Hefe offenbar sämtliche regenerierenden oder modifizierenden Systeme für die p21-FHL2-Interaktion vorhanden. Durch die starke Überexpression in der Hefe besteht die Gefahr einer stöchiometrischen Überdosierung der Bindepartner, d. h. die eingesetzten Proteine liegen zueinander nicht in physiologischen Konzentrationen vor. Sowohl dadurch als auch durch die teilweise vorhandenen Strukturähnlichkeiten zwischen p21 und p57 kann es dazu kommen, daß auch p21 mit FHL2 im genetischen System interagiert, unter Bedingungen wie dem *in vitro*-Bindungsassay diese Interaktion jedoch nicht mehr zustande kommt.

Die Interaktionsfähigkeit beider Proteine wurde des weiteren unter Überexpressionsbedingungen in 293T-Zellen untersucht und bestätigt.

Entscheidend für die physiologische Relevanz der p57-FHL2-Interaktion war es darüberhinaus, zu zeigen, daß der Komplex aus beiden Partnern auch *in vivo* und bei endogenen Proteinmengen vorliegt. Da aufgrund der mRNA-basierten Expressionsmuster von p57 und FHL2 lediglich in Herzmuskelzellen äquivalente und ausreichend hohe Proteinmengen zu erwarten waren (Lee *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1998), wurde die

Immunfällung in Extrakten aus humanen Kardiomyozyten durchgeführt. Bereits bekannt ist, daß in primären Ratten-Kardiomyozyten p21 so wie auch p27 reguliert werden, beispielsweise durch transiente Expression von E2F-1 (von Harsdorf *et al.*, 1999), so daß analog auch eine Regulation von p57 in Kardiomyozyten naheliegt. Während unter Bedingungen der Überexpression noch eine Interaktion trotz ungleicher stöchiometrischer Proteinmengen anzunehmen war, zeigte sich *in vivo* ein Komplex aus annähernd gleichen Mengen FHL2 und p57, wobei berücksichtigt werden muß, daß die Affinität der zum jeweiligen Nachweis verwendeten Antikörper zu ihrem spezifischen Protein variieren kann.

Die molaren Verhältnisse zwischen beiden Interagierern ließen sich jedoch anhand von Immunopräzipitationen in Säuger-Zellen klären, bei denen für die Detektion beider Proteine jeweils der gleiche spezifische gegen eine angefügte Peptidsequenz (hier: HA-„tag“) gerichtete Antikörper verwendet wurde. FHL2 lag dabei in mindestens zweifachem molarem Überschuß im Komplex mit p57 vor.

5.1.4 Die p57-FHL2-Interaktion erfolgt über mehrere Bindestellen

Um die Bindestellen von p57 an FHL2 und umgekehrt von FHL2 an p57 einzugrenzen, wurden jeweils sowohl auf der Seite von p57 als auch von FHL2 Deletionsmutanten in zwei verschiedene Bindungsassays eingesetzt. Im Falle der verkürzten und bakteriell exprimierten p57-Proteine wurde klar, daß FHL2 sowohl an den N-terminalen als auch gleichermaßen an den C-terminalen Teil von p57 binden kann. Die mitgeführte Kontrolle Cyclin D₃ vermag wie erwartet ausschließlich mit dem aminoterminalen Ende von p57 zu assoziieren. Dies führt zu der Annahme, daß unter zellulären Bedingungen zwei oder mehrere FHL2-Moleküle an monomeres p57 binden könnten. Bislang gibt es keine Daten zur dreidimensionalen Struktur von p57, lediglich für p27 liegt eine Röntgenstrukturanalyse vor. Einschränkend ist dahingehend aber festzuhalten, daß nur eine verkürzte Form des CDK-Inhibitors kristallisiert werden konnte, die außerdem bereits mit Cyclin A/Cdk2 im Komplex gebunden vorliegt (Russo *et al.*, 1996a). p21 ist gemäß Kriwacki *et al.* (1996, 1997) in ungebundenem Zustand ein Monomer ohne definierte Faltungsstruktur. Diese wird teilweise durch die CDK-Bindung induziert. Falls dies für p57 ebenfalls gilt und sein C-terminaler Bereich größtenteils ungefaltet

vorliegt, könnte p57 gegebenenfalls eine Konformation annehmen, die es einem einzigen FHL2-Molekül erlaubt, in einer Art „Umklammerung“ an ein Molekül p57 anzudocken. Es ist von einer Reihe anderer Proteine her bekannt, daß auch in der Primärstruktur getrennt lokalisierte Peptidsequenzen durchaus in ihrer Quartärstruktur eine gemeinsame Bindedomäne gestalten können. Bislang liegen noch keine Strukturanalysen zu LIM-Domänenproteinen vor, dennoch gibt es bereits Untersuchungen, die zeigen, daß mehrere Domänen von FHL2 so gefaltet sein können, daß sie an einer Bindung mit dem Zielprotein beteiligt sind (Wixler *et al.*, 2000).

Vergleicht man unterschiedlich lange Proteindeletionsmutanten von FHL2, die jeweils eine Kombination aus bestimmten LIM-Domänen beherbergen, nach Überexpression in 293T-Zellen über Immunfällung bezüglich ihrer Bindefähigkeit gegenüber p57, so stellt sich folgendes heraus: die Interaktion findet statt via die LIM-Domänen $1/2-1$ als auch über 2-4 und ebenso über 2-3. p57 bindet jedoch nicht an ein verkürztes FHL2-Protein, das nur noch aus den LIM-Domänen $1/2-2$ oder 3-4 besteht. Ein derart differenziertes Bindungsmuster erhielten auch andere Arbeitsgruppen bei dem Versuch, eine FHL2-Bindestelle zu bestimmen. So ermittelten Wixler *et al.* (2000) für die Interaktion von FHL2 mit der zytoplasmatischen Domäne von α_{7A} oder β_{1A} -Integrin-Untereinheiten, daß die LIM-Domänen $1/2-3$ oder 1-4 oder 2-4 wechselwirken können, nicht aber $1/2-1$ oder 3-4, und sehr viel schwächer $1/2-2$. Des weiteren erkannten sie, daß die Selbstassoziation von FHL2 über LIM3 und LIM4 erfolgt. Im Falle der hCDC47-FHL2-Interaktion konstatierten Chan *et al.* (2000), daß eine zunehmende Verkürzung des FHL2-Proteins vom C-terminalen Ende her zu einer sukzessiven Abnahme der Bindefähigkeit an den Partner führte. Allerdings wurden erwähnte Studien in Hefe mit Hilfe der „yeast two hybrid“-Technik durchgeführt, weshalb ein direkter Vergleich mit den Säuger-Experimenten nicht zulässig ist, da im Hefeorganismus andere Expressionsniveaus für die Mutanten, unterschiedliche Modifizierungsmöglichkeiten und Milieubedingungen herrschen. Wird FHL2, wie von Müller *et al.* (2002) beschrieben, infolge der Stimulation des Rho-Signalweges vom Zytoplasma in den Nukleus transloziert, könnte dies begründen, warum die Konstrukte mit LIM-Domäne $1/2-2$ oder 3-4 überraschenderweise nicht mit p57 interagieren. Denn bestimmte verkürzte Peptide könnten in der Säugerzelle ineffizienter an den Ort der Interaktion, also den Zellkern, transportiert werden als andere. Da die Interaktionsanalyse nur durch Expression der LIM-Domänen in Säugerzellen durchgeführt wurde, könnte ein Fehlen der Interaktion mit einer

Mißlokalisierung im Zytoplasma zu begründen sein. Um dies auszuschließen, sollten alle Proteine durch Immunfluoreszenz auf ihre Lokalisation hin überprüft werden und gegebenenfalls durch Anfügen einer nukleären Lokalisierungssequenz an die zytoplasmatischen Fragmente in den Kern dirigiert werden.

Um die genaue Bindestelle zu ermitteln, ist die Konstruktion weiterer Mutanten nötig, mit denen sich die Bindestelle sukzessive eingrenzen läßt. Mit Konstrukten einer p57-bindungsdefizienten Mutante ist schließlich die exakte Bindestelle für FHL2 definiert.

Zusammenfassend ist anzunehmen, daß die dreidimensionale Struktur von FHL2 ausschlaggebend für seine spezifischen Interaktionen mit Partnern unterschiedlichster Stoffwechselwege ist.

5.2 Funktion der p57-FHL2-Interaktion

5.2.1 p57 und FHL2 kolokalisieren ohne wechselseitige

Beeinflussung im Kern

Für FHL2 wurde sowohl eine subzelluläre Lokalisation im Kern als auch im Zytoplasma beschrieben: in RD-Zellen, einer speziellen Rhabdomyocarcinoma-Zelllinie und in NIH3T3-Zellen, in geringerem Ausmaß in COS-1-Zellen zeigt sich hauptsächlich eine nukleäre Färbung von FHL2 (Genini *et al.*, 1997; Scholl *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde in einigen wenigen Zellen eine uniforme Anfärbung beobachtet. In allen Zelllinien ließ sich darüberhinaus FHL2 auch in der zellulären Peripherie, in der die Abflachung der Zellen stattfindet, detektieren. In der Tat konnte mit Hilfe einer Kolokalisation von Vinculin bestätigt werden, daß es sich bei den angefärbten Zellstrukturen um die sogenannten Fokalkontakte, also die Verbindungspunkte zu benachbarten Zellen, handelt (Scholl *et al.*, 2000). Interessanterweise ist die beobachtete duale Lokalisation in Fokalkontakten und gleichzeitig im Kern von anderen Proteinen mit oftmals Funktionen in der Signaltransduktion her bekannt, beispielsweise von Zyxin, Hic-5 und β -Catenin (Miller *et al.*, 1999). Da diese fokalen Adhäsionskontakte bekanntermaßen transmembrane Verbindungen zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix herstellen, wurde spekuliert, ob womöglich die Lokalisation von FHL2 durch externe Signale beeinflusst werden kann,

analog beispielsweise zu β -Catenin. Durch die Präsenz von FHL2 in den Kontaktstellen könnte FHL2 in eine Vielzahl von Signalwegen impliziert sein (Scholl *et al.*, 2000).

FHL2 konnte ebenso in zytoplasmatischen Extrakten sowohl von normalen humanen Osteoblasten als auch von U2-Osteosarkomzellen über eine Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Amaar *et al.*, 2002).

In Serum-depletierten NIH3T3-Zellen war endogenes FHL2 zunächst ebenfalls in den Kontaktstellen zu finden bzw. diffus im Zytoplasma verteilt. Im Kern lag vorerst nur eine geringe Immunreaktivität vor. Innerhalb von zwei Stunden nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat, einem Aktivator des Rho-Signalweges, ließ sich eine signifikante Immunreaktion für FHL2 auch im Zellkern demonstrieren. In diesem Fall erfolgte also eine Translokation von FHL2-Protein aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Diese Lokalisationsänderung von FHL2 innerhalb der Zelle konnte mit physiologischen Auswirkungen korreliert werden. So ergaben Untersuchungen zur Lokalisation von FHL2 während der Prostatakarzinom-Progression, daß in benignen Tumoren mit knapp 5% nur noch ein sehr kleiner Anteil an Zellen eine nukleäre FHL2-Färbung aufwiesen, in weiter fortgeschrittenen Stadien (Gleason Grad 3 und Grad 5) stieg der Anteil an Zellen, bei denen FHL2 im Nukleus zu finden ist, auf weit über 40% (Müller *et al.*, 2002).

Als Interaktor und Korepressor für das PLZF („promyelotic leukemia zinc finger“-) Protein kolokalisiert endogenes FHL2 mit PLZF in adulten Ratten-Kardiomyozyten. Dies wurde mit Hilfe spezifischer anti-PLZF- sowie anti-FHL2-Antikörper in immunohistochemischen Analysen gezeigt. PLZF wird dabei lediglich nukleär exprimiert, FHL2 zusätzlich auch in den Z-Scheiben und M-Banden der Kardiomyofibrillen (McLoughlin *et al.*, 2002). In den Myoblastenzelllinien C2C12 und H9C2 ist FHL2 hauptsächlich in den Kontaktstellen exprimiert. In genaueren Untersuchungen ließ sich sogar die LIM2-Domäne als verantwortlich für die spezifische Lokalisierung von FHL2 in den „focal adhesions“ definieren. In der Interaktion mit PLZF ist FHL2 dort vermutlich an der Regulation der Myofibrillogenese beteiligt (Li *et al.*, 2001).

Auf transkriptioneller Ebene konnte die FHL2-Expression in menschlichem Gewebe mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen bestimmt werden. Ein sehr starkes Signal zeigte sich in humanem Herzgewebe. Sehr viel schwächere Signale konnten in Plazenta, Skelettmuskel und Ovarialgewebe nachgewiesen werden. Optisch nicht detektierbar war

ein FHL2-Signal in Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Pancreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Dünndarm, Enddarm oder in Leukozyten. Der FHL2-mRNA-Nachweis in adulten Mäusen via Northern Blot-Analyse ergab FHL2-Expression nur in Herz-, nicht jedoch in Skelettmuskel, Gehirn, Milz, Leber, Niere oder Hoden (Du *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung humaner Krebszelllinien verschiedenen Ursprungs konnten via Northern Blot-Analysen in HeLa S3-Zellen sowie Kolorektaladenocarcinoma SW480 die höchsten Level an FHL2-mRNA nachgewiesen werden, geringe Mengen fanden sich bei chronisch myelogenen Leukämie K-562-Zellen, Lungenkarzinom A549- und Melanom G361-Zellen. Nicht nachweisbar ist die FHL2-Expression beispielsweise in der Burkitts Lymphoma Raji-Tumorzelllinie (Chan *et al.*, 2000).

In situ-Hybridisierung demonstriert die Präsenz von FHL2-Transkripten in Kardiomyozyten (Kong *et al.*, 2001). Allerdings deutet die Analyse von homozygoten FHL2^{-/-}-Mäusen darauf hin, daß FHL2 nicht für eine normale geregelte Entwicklung des Herzens essentiell ist.

FHL2 ist demnach ein „LIM-only“-Protein, das präferenziell in fötalem und adultem Herz exprimiert wird. Sucht man in der Datenbank mit der FHL2-cDNA nach ESTs, erhält man insgesamt 17 Treffer, überwiegend aus fötalem und adultem Herz, Ovarium sowie auch aus seneszenten Fibroblasten. Die überdurchschnittliche FHL2-Expression im Herz wird außerdem eindrucksvoll durch die Untersuchung der Quellen von EST-Sequenzen in den Datenbanken reflektiert, bei denen etwa ein Fünftel der für FHL2 kodierenden ESTs Herz-cDNA-Bibliotheken entstammt (Scholl *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse unterstützen die These, daß FHL2 im Herzen differentiell exprimiert vorliegt (Chan *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunozytologischen Experimente zeigten eine überlappende Lokalisierung von p57 und FHL2 im Zellkern. Da Kardiomyozyten bislang als einzige Zellen mit endogen gleichermaßen detektierbaren Leveln sowohl an p57 als auch an FHL2 dokumentiert sind, davon aber keine kultivierbare Zelllinie zur Verfügung stand, mußten die Lokalisationsstudien unter Überexpressionsbedingungen in 293T-Zellen analysiert werden. Die Expression von p57 konnte dabei in zwei unterschiedlichen Konstrukten, einmal als YFP-fusioniertes Protein sowie auch versehen mit dem sehr viel kleineren FLAG-„tag“, exklusiv dem Kern zugeordnet werden. FHL2 dagegen wurde als FHL2-HA in den Zellen exprimiert und nur in dieser

Form überexprimiert immunologisch nachgewiesen. Dabei zeigte sich, daß abweichend von der p57-Lokalisation FHL2 nicht nur im Zellkern sondern signifikant auch im Zytoplasma zu finden war. Bei Koexpression beider Proteine änderte sich weder die Lokalisation von p57 noch diejenige von FHL2. Diese Beobachtungen schließen jedoch eine Wechselwirkung beider Proteine im Kern nicht aus. Eine Fraktion von Zellen, die bereits in erste Stadien der Apoptose überzugehen schien (Verlust der Kernülle mit einsetzender DNA-Fragmentierung, Abrundung der Zellen sowie membranöse Ausbuchtungen), ließ den Übertritt von p57 auch ins Zytoplasma erkennen, was auf eine verstärkte Kolokalisation von FHL2 und p57 in bestimmten Phasen der zellulären Entwicklung hindeuten könnte. Einen weiteren Hinweis auf eine möglicherweise dennoch vorhandene Kolokalisation gaben auch folgende vorläufige Beobachtungen: mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen im Zeitraffermodus demonstrierten eine Subfraktion von p57 in den subzellulären Strukturen der Lamellopodien, in denen auch FHL2 unter natürlichen Bedingungen in der Zelle exprimiert wird. Diese Translokation vom Kern ins Zytoplasma, in der FHL2 koexprimiert wurde, wurde in einer Zelle beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die wechselseitige Beeinflussung der Proteinverteilung von FHL2 und p57 innerhalb der Zelle könnte durch die Bedingungen der Überexpression schlecht nachweisbar sein oder über Fusionsanteile blockiert werden: so bewirkt möglicherweise eine der fusionierten Aminosäureketten (HA- bzw. FLAG-„tag“), daß die Interaktion unter den gewählten Bedingungen nicht mehr in ausreichendem Maße stattfindet, beispielsweise weil die Bindestellen der Interaktion nicht mehr zugänglich sind. Weiterhin könnte es durch die „tags“ zu einer Konformationsänderung der Proteine gekommen sein, was in der Folge zu einer Blockade der Interaktion führt oder aber das Andocken wichtiger „shuttling“-Faktoren verhindert, wodurch ein Transport von p57 aus dem Kern ins Zytoplasma oder von FHL2 in den Kern verhindert würde.

Eine entscheidende Rolle spielen auch die exprimierten Proteinmengen und ihr stöchiometrisches Verhältnis zueinander. So kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine übernatürlich hohe Menge an p57-Protein die Zelle in einen G₁-Arrest führt, weshalb eine möglicherweise in späteren Zellzyklusstadien stattfindende Interaktion mit FHL2 und putative Änderung der Lokalisation nicht mehr stattfinden kann. Ebenso würde eine zu deutliche Präsenz von FHL2 möglicherweise apoptotisch wirken, noch bevor p57 aus dem Kern ins Zytoplasma übertreten kann, um dort an FHL2 zu binden.

Durch Titration von posttranslational modifizierenden oder demodifizierenden Faktoren könnte eine Teilfraktion der Interaktionspartner aufgrund der infolge der Überexpression hohen Proteinmenge nicht im geeigneten Zustand für die Interaktion vorliegen und daher die Kolo-kalisierung verhindern.

Würde eine Interaktion von p57 und FHL2 ausschließlich von einer Kolo-kalisation beider Proteine abhängen, so würde man annehmen, daß die Interaktion primär im Kern stattfindet, weil p57 dominant nukleär exprimiert wird. Wie jedoch Untersuchungen von Connor *et al.* (2003) zu p27 belegen, findet durchaus eine zellzyklusabhängige Translokation der CDK-Inhibitoren statt. So ist für die Bindung von p27 an Jab1 bekannt, daß dadurch p27 ins Zytoplasma wechselt, infolgedessen es dann auch dort für den Abbau markiert wird (Tomoda *et al.*, 1999). p27 ist zudem nukleär in G₀- und früher G₁-Phase, erscheint aber transient im Zytoplasma während des G₁/S-Überganges. Falls dieses Phänomen auch für p57 zutrifft, wäre vorstellbar, daß p57 zunächst aus dem Kern ins Zellplasma transportiert wird und dort an FHL2 bindet. Oder aber die Assoziation von FHL2 an p57 im Kern führt zu dessen Ausschleusung ins Zytoplasma. Bislang ist ungeklärt, ob p57 für die Interaktion mit FHL2 an Cyclin-CDKs gebunden vorliegen kann oder muß. Die Größenfraktionierung zur Isolation eines Gesamtkomplexes, in dem p57 und FHL2 gemeinsam vorhanden sind, gab Hinweise auf einen sehr großen Proteinkomplex von über 660 kDa, in dem möglicherweise zusätzlich auch Cycline und CDKs an p57 bzw. FHL2 assoziiert sind. Allerdings könnte eine Wechselwirkung p57-FHL2 auch nur mit ungebundenem monomeren p57 möglich sein oder aber erst nach vorheriger Modifikation von p57 im Zytoplasma. Dann wäre eine Kolo-kalisation beider Proteine *in vivo* nur möglich, wenn p57 vorab ins Zytoplasma transportiert worden wäre.

5.2.2 Untersuchung des Effektes von FHL2 auf die inhibitorische Aktivität von p57 *in vitro*

Eine mögliche Funktion der FHL2-p57-Interaktion bezieht sich auf die CDK-inhibitorische Aktivität von p57. Diese kann in einem *in vitro*-Kinaseassay nachgewiesen werden. Rekombinant in *E. coli* exprimiertes und anschließend aufgereinigtes p57-Protein verhindert *in vitro* die Phosphorylierung des Substrates Histon H1 durch den Komplex Cyclin A/Cdk2. Dabei nahm die Fähigkeit zur

Inhibierung der Kinase-Aktivität mit steigender p57-Konzentration zu. Die Zugabe von ebenso rekombinant hergestelltem FHL2 führte jedoch nicht zum Verlust der p57-inhibitorischen Aktivität, was bei der zugegebenen Menge FHL2 aber auch nicht zu erwarten gewesen war, da FHL2 im molaren Unterschuß zu p57 gegeben wurde. Bei Annahme einer stöchiometrischen Interaktion zwischen p57 und FHL2 und Bindung von FHL2 als Dimer wäre mindestens ein zweifacher molarer Überschuß von FHL2 notwendig, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu ermöglichen. Entscheidend limitierend war dabei jedoch die Menge des rekombinanten FHL2, das aufgrund von Aufreinigungsschwierigkeiten nur im Unterschuß eingesetzt werden konnte. Es ist daher nicht zu klären, ob die Bindung beider Interaktionspartner über die CDK-inhibitorische Domäne erfolgt. Geht man davon aus, daß für die Interaktion von FHL2 mit p57 eine oder mehrere Modifikationen voraussetzend sind, oder daß *in vivo* noch weitere Faktoren an der Bindung beteiligt sind, so erklärt dies die fehlende Reversion des inhibitorischen Phänotyps. Selbstverständlich ist auch die korrekte Faltung beider Proteine zwingend notwendig. Diese kann allerdings nach der Aufreinigung aus Bakterien nur bedingt gewährleistet sein und konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht gesichert werden, zumal bisher weder zu p57 noch zu FHL2 Strukturdaten vorliegen. Bei den im Rahmen der Ermittlung der Bindestelle von FHL2 an p57 durchgeführten „pull down“-Experimenten, gelang der Interaktionsnachweis auch mit jeweils rekombinanten Proteinen. Diese waren im Unterschied zu den Kinaseassays jedoch nicht aufgereinigt. Vielmehr wurde im ersten Fall bakterieller Rohextrakt eingesetzt, der noch die für die Interaktion entscheidenden Proteine oder modifizierenden Faktoren enthalten könnte.

Sieht man FHL2 als p57-interagierendes Protein, welches nicht über die CDK-inhibitorische Domäne bindet und somit auch keinen Einfluß auf dessen inhibitorische Aktivität ausübt, so kann FHL2 als zweites Protein betrachtet werden, das nicht in der CDK-Inhibitor-domäne von p57 bindet. Bisher ließ sich in diesem Bereich von p57 lediglich eine Bindestelle für PCNA lokalisieren (Watanabe *et al.*, 1998).

5.2.3 Ist p57 an transkriptioneller Aktivierung beteiligt?

Ausgehend von den beiden bis heute beschriebenen Funktionen von FHL2 galt es, den Einfluß von p57 im Zuge seiner Interaktion mit FHL2 auf dessen biologische Funktion

in der Zelle zu hinterfragen. Unlängst wurden eine ganze Reihe von LIM-Proteinen als an der transkriptionellen Aktivierung beteiligte Regulatoren charakterisiert. FHL2 kommt dabei gemäß Müller *et al.* (2000) die Rolle eines Koaktivators des Androgen-Rezeptors zu. Mit den durchgeführten Luziferaseassays konnte zum einen der koaktivierende Effekt von FHL2 auf den Androgen-Rezeptor reproduziert werden, zum anderen zeigte sich aber unerwarteterweise auch ein stimulierender Effekt von p57 auf den Rezeptor um das 1,2-fache. Letzterer fiel zwar etwas geringer aus als derjenige von FHL2. Da aber eine Aktivitätssteigerung des Androgen-Rezeptors um das rund 1,4-fache durch FHL2 dieses bereits als starken Koaktivator klassifiziert, müssen die Ergebnisse zu p57 ebenfalls als signifikant angesehen werden. Diese leichte Aktivierung via p57 kann ein Hinweis darauf sein, daß bereits endogene Mengen an FHL2 in den 293T-Zellen für die Aktivierung des Androgen-Rezeptors ausreichend sind. Da aber die FHL2-Expression in 293T anhand einer Western Blot-Analyse als verhältnismäßig niedrig eingestuft wurde, ist die Aktivitätssteigerung durch p57 ursächlich eher auf andere Mechanismen zurückzuführen. p57 ist keineswegs der erste CDK-Inhibitor, der einen Einfluß auf transkriptionelle Prozesse ausübt, wie man anhand des Beispiels von p27 sehen kann, das über die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Sp1 die Promotoraktivität von MBP („myelin basic protein“) steigert (Wei *et al.*, 2003).

p57 in Kombination mit FHL2 schließlich aktiviert den Rezeptor um das 2,5-fache. Der Gesamteffekt kann sich nun sowohl als additiver Effekt beider Proteine ergeben, kann aber genauso durch die funktionelle Interaktion von p57 mit FHL2 bedingt sein. Sind beide Einzelstimulationen unabhängig voneinander und summieren sie sich demzufolge zu dem beobachteten Gesamteffekt, so beweist dies gleichzeitig, daß sich FHL2 und p57 nicht gegenseitig in ihrer Rezeptoraktivierung behindern, wie dies beispielsweise durch Austitrieren von wichtigen Zellfaktoren der Fall sein könnte. Es ist davon auszugehen, daß der Gesamteffekt in diesem Szenario dann maximal das Ausmaß beider Einzelereignisse zusammen annehmen kann. Wirkt p57 über FHL2, müßte der Einfluß auf den Androgen-Rezeptor sättigbar sein, dann aber durch Erhöhung von FHL2 gesteigert werden können. Titrationsexperimente würden dazu beitragen, zwischen beiden Modellen zu unterscheiden.

Im Fall einer Interaktion von p57 mit FHL2 ist der beobachtete Effekt entweder direkt oder indirekt. Bei einer direkten Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung am FHL2-Protein die leichtere Zugänglichkeit der aktiven Stelle, die für die Koaktivierung des Androgen-Rezeptors notwendig ist. Auch eine verbesserte Stabilität von FHL2

durch die Bindung des p57-Moleküls kann dazu führen, daß höhere FHL2-Level in der Zelle vorliegen und dadurch die Koaktivierung positiv beeinflusst wird. Dafür ist allerdings voraussetzend, daß die Menge endogenen FHL2s insgesamt sehr gering ist.

Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit der Effekt zellzyklusabhängig oder -unabhängig ist. Einen wichtigen Hinweis auf möglicherweise eine generelle Eigenschaft der CKIs transkriptionell aktivierend zu sein, liefern Untersuchungen zu p27. Wie Miskimins *et al.* (2002) zeigen konnten, ist p27 bereits als Transaktivator charakterisiert.

Ein zellzyklusabhängiger Effekt ist eher wahrscheinlich, da FHL2 in der G₁-Phase allgemein eine höhere Aktivität aufweist als in den übrigen Phasen des Zyklus. Damit korrelieren auch die durchflußzytometrischen Daten zur Apoptose.

Die Schwankungsbreite in den Luziferase-Auswertungen aus den Einzelexperimenten fiel trotz jeweils eindeutigem Trend, sprich jeweiliger Ab- oder Zunahme der Koaktivatorfunktion, relativ hoch aus. Dies ist in erster Linie auf die unterschiedlichen Transfektionsraten zurückzuführen, die mit bis zu 90% transfizierten Zellen im Allgemeinen recht hoch lag, in einzelnen Fällen jedoch auch deutlich nach unten schwankte. Die zur Transfektion eingesetzten DNA-Mengen lagen durchweg in der Größenordnung von Nanogramm, so daß auch hierdurch aufgrund von Pipettierungenauigkeiten eine gewisse Varianz zustande gekommen sein dürfte.

Die auf das 1,4-fache gesteigerte Luziferase-Aktivität durch Transfektion alleine von FHL2 demonstrierte die Funktionalität der Luziferaseassay-Meßmethodik und die Aussagekraft der Experimente. Denn die ermittelten Werte stimmten exakt mit den bereits für FHL2 von Müller *et al.* (2000, 2002) veröffentlichten sowie durch Gobinet *et al.* (2001) reproduzierten Daten überein. Ausschlaggebend für die Reproduzierbarkeit der Daten war neben der Wahl der geeigneten Zelllinie - die Prostatakarzinomzelllinie PC3 erzielte abweichende Meßwerte - die Verwendung des synthetischen Androgen-Analogons R1881. In Vorversuchen stellte sich heraus, daß natives Dihydrotestosteron nicht in gleichem Maße in der Lage ist, den Rezeptor zu stimulieren. Der Effekt, eine Aktivitätssteigerung um das 1,4-fache, fällt jedoch vergleichsweise gering aus.

Weiterhin mangelt es bislang auch an Daten über die Mechanistik der FHL2-Funktion als Koaktivator oder Indizien für deren physiologische Relevanz. Die Frage, inwieweit die gezeigte Steigerung der Koaktivatorfunktion auf eine direkte Interaktion zurückzuführen ist, ließe sich eindeutig mit einer bindungsdefizienten FHL2-Mutante klären.

5.2.4 FHL2 wirkt über p57 auf das Zellzyklusgeschehen ein

Überexpression von p57 als zellzyklusregulierendem Protein führt zu einer signifikanten Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase, wie auch ältere Beobachtungen von Matsuoka *et al.* (1995) und Lee *et al.* (1995) deutlich machen. Die zeitgleiche Expression von FHL2 ist in der Lage, den beobachteten Phänotyp zu revertieren und die Verteilung der transfizierten Zellen über die Zellzyklusphasen wieder dem der Kontrolle anzugleichen. Dabei kann FHL2 entweder direkt mit p57 in Kontakt treten und beispielsweise seinen Transport vom Kern ins Zytoplasma forcieren. Dadurch stünde p57 nicht mehr in ausreichender Konzentration für die Inhibition der Cyclin-Kinase-Komplexe zur Verfügung, in dessen Folge die Phosphorylierung von Effektorsubstraten sowie die Zellzyklusprogression wieder einsetzen würde. In einem alternativen Szenario bindet FHL2 ebenfalls direkt an p57, bewirkt aber in der Folge nicht dessen Ausschleusung aus dem Kern, sondern führt zu einer Konformationsänderung von p57, so daß in der Folge durch die sterische Veränderung des Proteins die Bindung an den Cyclin-CDK-Komplex nicht mehr möglich ist. Dagegen spricht zwar die Fähigkeit von p57 *in vitro* im Kinaseassay selbst in Anwesenheit von FHL2 noch inhibitorisch auf Cyclin A/Cdk2 wirken zu können. Jedoch konnte für diesen Versuch die korrekte Faltung und somit volle Funktionalität des eingesetzten FHL2-Proteins nicht überprüft werden. Ein weiterer denkbarer Mechanismus geht von einer durch FHL2-vermittelten bevorzugten Degradierung des p57-Proteins aus, wodurch es zwar im Kern weiterhin noch präsent sein würde, jedoch nicht mehr in Mengen, die befähigt sind, die Cyclin-CDK-Komplexe ausreichend zu inhibieren.

Die Expression von FHL2 alleine zeigt ebenfalls einen Effekt auf die Zellzyklusverteilung und äußert sich in einer leichten Abnahme der G₁-Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Diese Abweichung vom regulären Zellzyklusprofil kann darauf zurückzuführen sein, daß FHL2 auf den verhältnismäßig geringen Anteil an endogenem p57 einwirkt. Genau zu klären wäre dies anhand von p57^{-/-}-Zellen oder durch Einsatz einer p57-spezifischen siRNA. Hier sollte eine FHL2-Überexpression den Zyklus nicht verändern. Da FHL2 eine Funktion als Koaktivator des Androgen-Rezeptors zugewiesen wurde, ist nicht auszuschließen, daß FHL2 auch auf Gene anderer „pathways“ transkriptionell aktivierend wirken könnte, um dadurch auf einem alternativen Weg ins Zellzyklusgeschehen einzugreifen. Bislang gibt es dafür jedoch weiter keinerlei Hinweise. Inwieweit die Bindung von FHL2 an p57 das entscheidende

Ereignis für die G₁-Arretierung ist, kann eine bindungsinsensitive Mutante von FHL2 oder eine bindungsdefiziente p57-Mutante klären. Wird durch diese Mutation der Arrest der Zellen in der G₁-Phase nicht mehr wieder aufgehoben, so würde dies bedeuten, daß FHL2 über andere an der Zellzyklusregulation beteiligte Faktoren, beispielsweise Cyclin E, wirkt und nicht die direkte Bindung an p57 dafür verantwortlich ist. Eine Problematik beim Einsatz eines bindungsinsensitiven FHL2-Proteins ist jedoch, daß nicht gewährleistet werden kann, ob durch die eingeführten Mutationen die native Struktur von FHL2 noch erhalten bleibt, was folglich die Aussagekraft einer solchen Mutantenstudie limitiert. Alternativ kann p57 so moduliert werden, daß es nicht mehr an FHL2 binden kann. Für beide Ansätze ist jedoch eine genaue Kenntnis der Bindestelle im Protein nötig, die sich bisher jedoch noch nicht eindeutig ermitteln ließ.

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Effekte der p57-FHL2-Interaktion gleichermaßen unter nicht-Überexpressionsbedingungen demonstrieren lassen, ist es wichtig, Zelllinien einzusetzen, in denen p57 eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt und gleichzeitig FHL2 stark exprimiert wird. Allerdings wären unter anderem auch Zellen in der Differenzierung, beispielsweise Linsenfibroblasten und Trophoblasten der Plazenta sowie Zellen während der Knochenentwicklung (Zhang *et al.*, 1998; Urano *et al.*, 2000) geeignet. Als problematisch erweisen sich dabei die nicht detektierbaren Mengen an FHL2-Protein.

Eine möglicherweise veränderte Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen, das bedeutet unterschiedliche Verdoppelungsraten könnten zu einer vergleichbaren Verschiebung der Zellen im Zellzyklus führen. Dann ließe sich der beobachtete Effekt nicht auf p57 bzw. seine Interaktion mit FHL2 zurückführen, sondern lediglich mit einer zum Beispiel verkürzten S-Phase korrelieren, was mit einem Anstieg der G₁-Fraktion einhergeht. Anhand einer Wachstumskurve oder durch BrdU-Inkorporation ließe sich dies aber ausschließen. Ergänzend ist bislang in höheren Eukaryonten noch kein Beispiel bekannt, bei dem die Schwankungen von Zellen in der G₁-Phase auf eine variierende Anzahl der S-Phase-Zellen zurückzuführen waren.

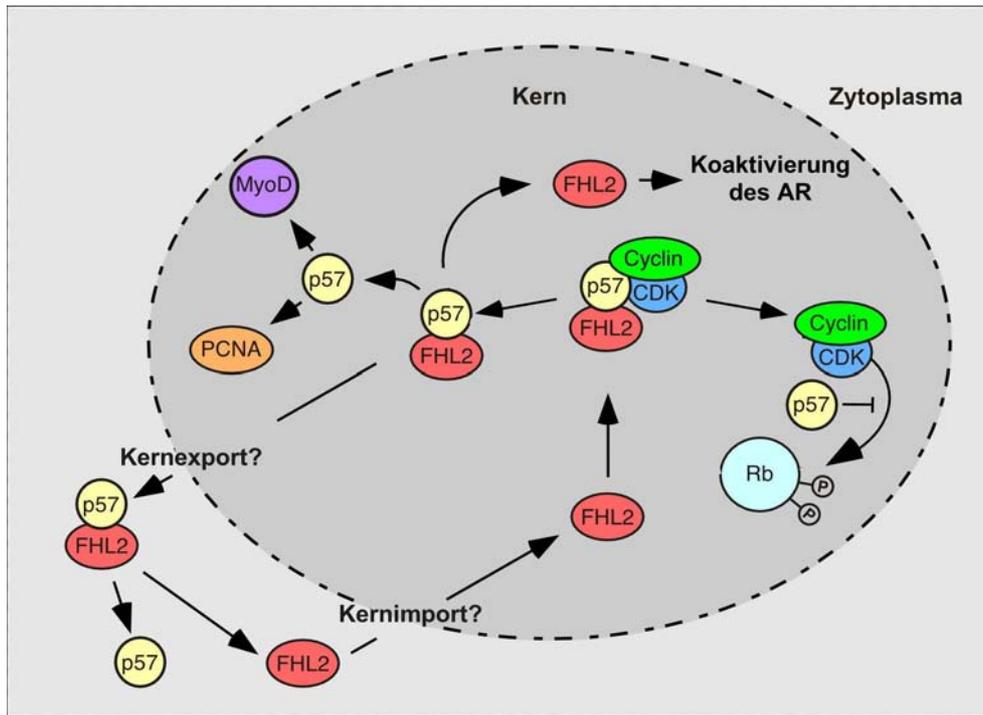


Abb. 5.1: Modell zur Regulation des CDK-Inhibitors p57 durch FHL2

Zusammenfassend lässt sich ein Modell entwickeln, wie FHL2 über die Interaktion mit p57 in die Steuerung des Zellzyklus eingreifen kann. Dabei bindet freies FHL2, nachdem es aus dem Zytoplasma in den Kern importiert worden ist, an den inaktiven p57/Cyclin/CDK-Komplex. Die Interaktion mit FHL2 führt bei p57 zu einer Konformationsänderung, so daß der CDK-Inhibitor aus dem Komplex dissoziiert. Der Cyclin/CDK-Komplex liegt wieder aktiv vor und ist infolgedessen in der Lage, seine Substrate zu phosphorylieren. Die Zelle tritt von der G₁- in die S-Phase über und setzt den Zellzyklus fort. Die Bindepartner FHL2 und p57 verlassen als Komplex (oder einzeln) den Kern und werden ins Zytoplasma transportiert. Dort wird der Zerfall des möglicherweise noch vorliegenden Komplexes initiiert, so daß sowohl p57 als auch FHL2 ihre Aufgaben als Monomer im Zytoplasma übernehmen können.

6 Literatur

Alevizopoulos, K., Catarin, B., Vlach, J. und B. Amati. 1998. A novel function of adenovirus E1A is required to overcome growth arrest by the CDK inhibitor p27(Kip1). *Embo J.* **17**: 5987-97.

Amaar, Y. G., Thompson, G. R., Linkhart, T. A., Chen, S. T., Baylink, D. J. und S. Mohan. 2002. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J Biol Chem.* **277**: 12053-12060.

Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J. P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., Piouffre, L., Prieur, S., Susini, L., Alvaro, V., Millasseau, P., Guidicelli, C. *et al.* 1996. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* **93**: 3953-3957.

Andrews, B. und V. Measday. 1998. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* **14**: 66-72.

Artuso, M., Esteve, A., Bresil, H., Vuillaume, M. und J. Hall. 1995. The role of the Ataxia telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1(p21)- and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene* **11**: 1427-1435.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und K. Struhl. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley Sons, New York, USA.*

Bach, L. A., Salemi, R. und K. S. Leeding. 1995. Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II-induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology* **136**: 5061-5069.

Bae, I., Fan, S., Bhatia, K., Kohn, K. W., Fornace, A. J. Jr. und P. M. O'Connor. 1995. Relationships between G₁ arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res.* **55**: 2387-2393.

Bai, C., Sen P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., und S. J. Elledge. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263-274.

Beach, C., Durkacz, B. und P. Nurse. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in fission yeast and budding yeast. *Nature* **300**: 706-709.

Beckerle, M. C. 1986. Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion. *J Cell Biol.* **103**: 1679-1687.

Beckwith, J. B. 1969. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects* **5**: 188-196.

Blain, S. W., Montalvo, E. und J. Massague. 1997. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem.* **272**: 25863-25872.

Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J. und E. G. Nabel. 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. und M. Eilers. 1999. Direct induction of cyclin D₂ by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J.* **18**: 5321-5333.

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. und E. D. Laue. 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. und J. M. Sedivy. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21/Cip1/Waf1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**: 831-834.

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

Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A. und M. Pagano. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* **1**: 193-199.

Caspary, T., Cleary, M. A., Perlman, E. J., Zhang, P., Elledge, S. J. und S. M. Tilghman. 1999. Oppositely imprinted genes p57^{Kip2} and Igf2 interact in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes Dev.* **13**: 3115-3124.

Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., und A. Winoto. 1995 Identification of human and mouse p19, a novel Cdk4 and Cdk6 inhibitor with homology to p16Ink4. *Mol Cell Biol.* **15**: 2682-2688.

Chan, K. K., Tsui, S. K. W., Lee, S. M. Y., Luk, S. C. W., Liew, C. C., Fung, K. P., Wayne, M. M. Y. und C. Y. Lee. 1998. Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. *Gene* **210**: 345-350.

Chan, K. K., Tsui, S. K. W., Ngai, S.-M., Lee, S. M. Y., Kotaka, M., Wayne, M. M. Y., Lee, C.-Y. und K.-P. Fung. 2000. Protein-protein interaction of FHL2, a LIM domain protein preferentially expressed in human heart, with hCDC47. *J Cell Biochem.* **76**: 499-508.

Chellappan, S. P., Giordano, A. und P. B. Fisher. 1998. Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr Top Microbiol Immunol.* **227**: 57-103.

Chen, P. und N. Segil. 1999. p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* **126**: 1581-1590.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., und C. J. Sherr. 1999. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J.* **18**: 1571-1583.

Clurman, B. E. Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M. und J. M. Roberts. 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., und J. M. Roberts. 1996. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* **272**: 877-880.

Connor, M. K., Kotchetkov, R., Cariou, S., Resch, A., Lupetti, R., Beniston, R. G., Melchior, F., Hengst, L. und J. M. Slingerland. 2003. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27^{Kip1} involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell.* **14**: 201-213.

DeChiara, T. M., Robertson, E. J. und A. Efstratiadis. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**:849-859.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. und P. Leder. 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 D. T. Denhardt (Hrsg.), *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. Wiley & Sons Inc., 225-304.

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

Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. und C. J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase 3beta regulates cyclin D₁ proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**: 3499-3511.

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

Du, X., Hublitz, P., Gunther, T., Wilhelm, D., Englert, C. und R. Schüle. 2002. The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochem Biophys Acta* **1577** (1):93-101.

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

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

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

Ekhholm, S. V., Zickert, P., Reed, S. I. und A. Zetterberg. 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., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.

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. und *et al.*, 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G₁ arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**: 1169-1174.

Elliott, M. und E. R. Maher. 1994. Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* **31**: 560-566.

Engel, J. R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M. J., Oshimura, M., Reik, W., Schofield, P. N. und E. R. Maher. 2000. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* **37**: 921-926.

Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Munsch, B., Haugg, M., Van de Craen, M., Vandenabeele, P. und E. Solary. 1999. Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene* **18**: 4839-4847.

Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T. und E. Ruoslahti. 1996. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science* **271**: 499-502.

Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V. und M. A. Surani. 1991. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* **351**: 667-670.

Fero, M. I., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L-H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., Kaushansky, K. und J. M. Roberts. 1996. A syndrome of multi-organ hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* **85**: 733-744.

Fero, M. L., Randel, E., Gurley, K. E., Roberts, J. M. und C. J. Kemp. 1998. The murine gene p27^{Kip1} is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**: 177-180.

Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cooke, N. E. und S. A. Liebhaber. 1994. The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**: 10655-10659.

Fields, S. und O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.

Fimia, G. M., De Cesare, D. und P. Sassone-Corsi. 1999. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* **398**: 165-169.

Fimia, G. M., De Cesare, D. und P. Sassone-Corsi. 2000. A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol.* **20**: 8613-18122.

Furunu, N., den Elzen, N. und J. Pines. 1999. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol.* **147**: 295-306.

Futcher, B. 1996. Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* **12**: 1635-1646.

Gartel, A. L. und A. L. Tyner. 1999. Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res.* **246**: 280-289.

Gaston, V., Le Bouc, Y., Soupre, V., Vazquez, M. P. und C. Gicquel. 2000. Assessment of p57^{Kip2} gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Horm Res.* **54**: 1-5.

Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F. A., Remppis, A., Mattei, M. G. und B. W. Schafer. 1997. Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell Biol.* **16**: 433-442.

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B. und W. J. Rutter. 1992. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* **6**: 2165-2176.

Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez., A. und N. J. Lamb. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**: 1169-1179.

Gobinet, J., Auzou, G., Nicolas, J-C., Sultan, C. und S. Jalaguier. 2001. Characterisation of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochem.* **40**: 15369-15377.

Goebel, M. G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J. P., Varshavsky A. und B. Byers. 1988. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**: 1331-1335.

Goldman, M., Smith, A., Shuman, C., Caluseriu, O., Wei, C., Steele, L., Ray, P., Sadowski, P., Squire, J., Weksberg, R. und N. D. Rosenblum. 2002. Renal abnormalities in Beckwith-Wiedemann syndrome are associated with 11p15.5 uniparental disomy. *J Am Soc Nephrol.* **13**: 2077-2084.

Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P. N. und A. C. Ferguson-Smith. 2000. Increased IGF-II protein affects p57^{Kip2} expression *in vivo* and *in vitro*: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci. USA* **97**: 5279-5284.

Greene, W. K., Baker, E., Rabbitts, T. H. und U. R. Kees. 1999. Genomic structure, tissue expression and chromosomal location of the LIM-only gene, SLIM1. *Gene* **232**: 203-207.

Gu, Y., Turck, C. W. und D. O. Morgan. 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. und K. Walsh. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol.* **15**: 3823-3829.

Habelhah, H., Frew, I. J., Laine, A., Janes, P. W., Relaix, F., Sassoon, D., Bowtell, D. D. L. und Z. Ronai. 2002. Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *Embo J.* **21**: 5756-5765.

Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. und J. Pines. 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. und A. B. Lassar. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**: 1018-1021.

Hannon, G. J. und D. Beach. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**: 257-261.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und S. J. Elledge. 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. und *et al.*, 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**: 387-400.

Harsdorf von, R., Hauck, L., Mehrdorf, F., Wegenka, U., Cardoso, M. C. und R. Dietz. 1999. E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21^{Cip1} and p27^{Kip1} and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I. *Circ Res.* **85**: 128-136.

Hashimoto, Y., Kohri, K., Kaneko, Y., Morisaki, H., Kato, T, Ikeda, K. und M. Nakanishi. 1998. Critical role for the 310 helix region of p57(Kip2) in cyclin-dependent kinase 2 inhibition and growth suppression. *J Biol Chem.* **273**: 16544-16550.

Hatada I. und T. Mukai. 1995. Genomic imprinting of p57/Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet.* **11**: 204-206.

Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., Kaneko, Y., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Ohishi, S., Nabetani, A. und H. Morisaki. 1996. An imprinted gene p57 (Kip2) is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* **14**: 171-173.

Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J. M., Lees, E. und S. I. Reed. 1994. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994 **91**: 5291-5295.

Hengst, L., Göpfert, U., Lashuel, H. A. und S. I. Reed. 1998. Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21 (Cip1). *Genes Dev.* **12**: 3882-3888.

Hengst, L. und S. I. Reed. 1998. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol.* **227**: 25-41.

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. und C. J. Sherr. 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. und H. P. Koeffler. 1995. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* **86**: 841-854.

Howard, A., und S. R. Pelc. 1951. Nuclear incorporation of ³²P as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res.* **2**: 178-187.

Hoyt, M. A., Totis, L., und B. T. Robert. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**: 507-517.

Hoyt, M. A. 1997. Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* **91**: 149-151.

Hu, G., Zhang, S., Vidal, M., La Baer, J., Xu, T. und E. R. Fearon. 1997. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**: 2701-2714.

Huang, S., Jeffery, D. A., Anthony, M. D., und E. K. O'Shea. 2001. Functional analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor Pho81 identifies a novel inhibitory domain. *Mol Cell Biol.* **21**: 6695-6705.

Ito, Y., Yoshida, H., Nakano, K., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Hirai, K., Matsuzuka, F., Matsuura, N., Kuma, K. und A. Miyauchi. 2002. Expression of p57/Kip2 protein in normal and neoplastic thyroid tissues. *Int J Mol Med.* **9**: 373-376.

Jirawatnotai, S., Moons, D. S., Stocco, C. O., Franks, R., Hales, D. B., Gibori, G. und H. Kiyokawa. 2003. The cyclin-dependent kinase inhibitors p27^{Kip1} and p21^{Cip1} cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cell. *J Biol Chem.* **278**: 17021-17027.

John, R. M., Ainscough, J. F-X., Barton, S. C. und M. A. Surani. 2001. Distant *cis*-elements regulate imprinted expression of the mouse p57^{Kip2} (Cdkn1c) gene: implications for the human disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genetics* **10**: 1601-1609.

Kaldis, P., Russo, A. A. Chou, H. S, Pavletich, N. P. und M. J. Solomon. 1998. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs): from yeast to mammals. *Cell Mol Biol.* **9**: 2545-2560.

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

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

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

Ko, J., Humbert, S., Bronson, R. T., Takahashi, S., Kulkarni, A. B., Li, E. und L. H. Tsai. 2001. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci.* **21**: 6758-6771.

Koepp, D. M., Schaefer, L. K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J. W. und S. J. Elledge. 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**: 173-177.

Kondo, M., Matsuoka, S., Uchida, K., Osada, H., Nagatake, M., Takagi, K., Harper, J. W., Takahashi, T., Elledge, S. J. und T. Takahashi. 1996. Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57KIP2 gene at 11p15.5. *Oncogene* **12**: 1365-1368.

Kong, Y., Shelton, J. M., Rothermel, B., Li, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. und S. Williams. 2001. Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to β -adrenergic stimulation. *Circulation* **22**: 2731-2738.

Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I. und P. E. Wright. 1996. Structural studies of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci. USA* **93**: 11504-11509.

Kriwacki, R. W., Wu, J., Tannant, L., Wright, P. E. und G. Siuzdak. 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 p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}. *J Chromatogr A.* **777**: 23-30.

Kudo, Y., Takata, T., Ogawa, I., Kaneda, T., Sato, S., Takekoshi, T., Zhao, M., Miyauchi, M. und H. Nikai. 2000. p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* **6**: 916-923.

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. und E. Harlow. 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.

Leberer, E., Dignard, D., Harcu, D., Hougan, L., Whiteway, M. und D. Y. Thomas. 1993. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* STE5 as a suppressor of a Ste20 protein kinase mutant: structural and functional similarity of Ste5 to Far1. *Mol Gen Genet.* **241**: 241-245.

Lee, M., Reynisdottir, I. und J. Massague. 1995. Cloning of p57^{Kip2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**: 639-649.

Lee, M. P., DeBaun, M., Randhawa, G., Reichard, B. A., Elledge, S. J. und A. P. Feinberg. 1997. Low frequency of p57^{Kip2} mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet.* **61**: 304-349.

Lee, M. P., DeBaun, M. R., Mitsuya, K., Galonek, H. L., Brandenburg, S., Oshimura, M. und A. P. Feinberg. 1999. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KvLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**: 5203-5208.

Lee, M. H. und H. Y. Yang. 2001. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 1907-1922.

Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z. und B. Geiger. 1999. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* **18**: 869-876.

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.

Levkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J. M. und R. Ross. 1998. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* **1**: 553-563.

Li, H. Y., Kotaka, M., Kostin, S., Lee, S. M. Y., Kok, L. D. S., Chan, K. K., Tsui, S. K. W., Schaper, J., Zimmermann, R., Lee, C. Y., Funk, K. P. und M. M. Y. Waye. 2001. Translocation of a human focal adhesion LIM-only protein, FHL2, during

myofibrillogenesis and identification of LIM2 as the principal determinants of FHL2 focal adhesion localization. *Cell Motil Cytoskeleton* **48**: 11-23.

Li, J., Meyer, A. N. und D. J. Donoghue. 1997. Nuclear localization of cyclin B₁ mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci. USA* **94**: 502-507.

Li, Y., Millikan, R. C., Newman, B., Conway, K., Tse, C. K. und E. T. Liu. 1999. p57 (KIP2) polymorphisms and breast cancer risk. *Hum Genet.* **104**: 83-88.

Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. und Y. Xiong. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**: 2261-2268.

Liebhaber, S. A., Emery, J. G., Urbanek, M., Wang, X. K. und N. E. Cooke. 1990. Characterization of a human cDNA encoding a widely expressed and highly conserved cysteine-rich protein with an unusual zinc-finger motif. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3871-3879.

Lloyd, R. V., Ruebel, K. H., Zhang, S. und J. Long. 2002. Pituitary hyperplasia in glycoprotein hormone alpha subunit-, p18^{INK4C}-, and p27^{Kip1}-null mice. *Am J Pathology* **160**: 1171-1179.

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. und H. P. Zenner. 1999. Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**: 4084-4088.

Lu, K. P., Hanes, S. D. und T. Hunter. 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**: 544-547.

Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E. Santoni-Rugiu, E. Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J. und J. Lukas. 1999. Accumulation of cyclin B₁ requires E2F and cyclinA-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**: 815-818.

Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P. und R. A. Weinberg. 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. und T. Jacks. 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* **9**: 935-944.

Mal, A., Piotrkowski, A. und M. L. Harter. 1996. Cyclin-dependent kinases phosphorylate the adenovirus E1A protein, enhancing its ability to bind pRb and disrupt pRb-E2F complexes. *J Virol.* **70**: 2911-2921.

Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Garcia-Palencia, P. und M. Serrano. 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. und S. J. Elledge. 1995. *Genes Dev.* **9**: 650-662.

Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F. und C. J. Sherr. 1992. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for mammalian D type G₁ cyclins. *Cell* **71**: 323-334.

McLoughlin, P., Ehler, E., Carlile, G., Licht, J. D. und B. W. Schäfer. 2002. The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* **277**: 37045-37053.

Mendenhall, M. D. 1993. An inhibitor of p34^{CDC28} protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **259**: 216-219.

Mendenhall, M. D. und A. E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 1191-1243

Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. und R. T. Moon. 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* **18**: 7860-7872.

Miskimins, R., Srinivasan, R., Marin-Husstege, M., Miskimins, W. K. und P. Casaccia-Bonofil. 2002. p27(Kip1) enhances myelin basic protein gene promoter activity. *J Neurosci Res.* **67**: 100-105.

Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A. und M. Pagano. 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, M. J., Madgwick, A. J., Charleston, B., Pell, J. M. und P. T. Loughna. 1995. The developmental regulation of a novel muscle LIM-protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **212**: 840-846.

Morgan, M. J. und A. J. Madgwick. 1996. Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* **225**: 632-638.

Morgan, M. J. und A. J. A. Madgwick. 1999. The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**: 245-250.

Morgan, M. J. und A. J. Madgwick. 1999b. The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**: 245-250.

Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R. und H. Yasuda. 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.

Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N. und N. Rosen. 1998. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* **273**: 29864-29872.

Muller, D., Thieke, K., Burgin, A., Dickmanns, A. und M. Eilers. 2000. Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *Embo J.* **19**: 2168-2180.

Müller, J. M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R. und R. Schüle. 2000. FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J.* **19**: 359-369.

Müller, J. M., Methger, E., Greschnik, H., Bosserhoff, A-K., Mercep, L., Buettner, R. und R. Schüle. 2002. The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *Embo J.* **21**: 736-748.

Nagahama H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K. und K. Nakayama. 2001. Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27^{Kip1} and p57^{Kip2} during mouse development. *Anat Embryol.* **203**: 77-87.

Nakai, S., Masaki, T., Shiratori, Y., Ohgi, T., Morishita, A., Kurokohchi, K., Watanabe, S. und S. Kuriyama. 2002. Expression of p57(KIP2) in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol.* **20**: 769-775.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y. und K-I. Nakayama. 1996. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**: 707-720.

Nakayama, K-I. und K. Nakayama. 1998. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* **20**: 1020-1029.

Nasmyth, K. 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol.* **5**: 166-179.

Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J.-P., Tuynder, M., Bouguleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., Der Sarkissan, H., Cazes, L., Le Paslier, D., Le Gall, I., Israeli, D., Dausset, J., Sigaux, F., Chumakov, I., Oren, M., Calvo, F., Amson, R. B., Cohen, D. und A. Telerman. 1996. Activation of the human homologue of the Drosophila SINA gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci. USA* **93**: 9039-9042.

Ng, E., K. O., Chan, K. K., Wong, C. H., Tsui, S. K. W., Ngai, S., M., Lee, S. M. Y., Kotakta, M., Lee, C. Y., Waye, M. M. Y. und K. P. Fung. 2002. Interaction of the heart-specific LIM domain protein, FHL2, with DNA-binding nuclear protein, hNP220. *J Cell Biochem.* **84**: 556-566.

Niculescu, A. B. 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. und S. I. Reed. 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G₁/S and the G₂/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* **18**: 629-643.

Nijjar, T., Wigington, D., Garbe, J. C., Waha, A., Stampfer, M. R. und P. Yaswen. 1999. p57^{Kip2} expression and loss of heterozygosity during immortal conversion of cultured human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **59**: 5112-5118.

Nishimori, S., Tanaka, Y., Chiba, T., Fujii, M. Imamura, T., Miyazono, K. *et all.* 2001. Smad-mediated transcription is required for transforming growth factor- β 1-induced p57 (Kip2) proteolysis in osteoblastic cells. *J Bio. Chem.* **276**: 10700-10705.

Nix, D. A. und M. C. Beckerle. 1997. Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol* **138**: 1139-1147.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., und J. R. Smith. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* **211**: 90-98.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massague, J., Crabtree, G. R. und J. M. Roberts. 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**: 570-573.

Nugroho, T. T. und M. D. Mendenhall. 1994. An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Mol Cell Biol.* **14**: 3320-3328.

Oelschlager, T. 2002. Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol.* **190**: 160-169.

O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G., Jr. und R. A. DePinho. 2000. Mye-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 und M. Pagano. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G₁-to-S phase transition. *Mol Cell Biol.* **15**: 2612-2624.

O'Keefe, D., Dao, D., Zhao, L., Sanderson, R., Warburton, D., Weiss, L., Anyane-Yeboah, K. und B. Tycko. 1997. Coding mutations in p57^{Kip2} are present in some cases of Beckwith-Wiedemann syndrome but are rare or absent in Wilms tumors. *Am J Hum Genet.* **61**: 295-303.

Ono, T., Kitaura, H., Ugai, H., Murata, T., Yokoyama, K. K., Iguchi-Ariga, S. M. M. und H. Ariga. 2000. TOK-1, a novel p21^{Cip1}-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. *J Biol Chem.* **275**: 31145-31154.

Oya, M. und W. A. Schulz. 2000. Decreased expression of p57 (Kip2) mRNA in human bladder cancer. *Br J Cancer* **83**: 626-631.

- Oyake, D., Nishikawa, H., Koizuka, I., Fukuda, M. und T. Ohta. 2002. Targeted substrate degradation by an engineered double RING ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**: 370-375.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. und G. Draetta. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J.* **11**: 961-971.
- Pantoja, C. und M. Serrano. 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. USA* **71**: 1286-1290.
- Pardee, A. B. 1989. G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-608.
- Park, C. W. und J. H. Chung. 2001. Age-dependent changes of p57^{Kip2} and p21^{Cip1/Waf1} expression in skeletal muscle and lung of mice. *Biochimica et Biophysica Acta* **1520**: 163-168.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W. und S. J. Elledge. 1995. p53-independent expression of p21^{Cip1} in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**: 1024-1027.
- Parry, D., Mahony, E., Willis, K., und E. Lees. 1999. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol.* **19**: 1775-1783.
- Patton, E. E., Willems, A. R. und M. Tyers. 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. und H. Land. 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.
- Pines, J. und T. Hunter. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**: 760-763.
- Pines, J. und C. L. Rieder. 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol.* **3**: E3-6.
- Planas-Silva, M. D. und R. A. Weinberg. 1997. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* **9**: 768-772.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. und A. Koff. 1994a. p27^{Kip1}, 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. und J. Massague. 1994b. Cloning of p27^{Kip1}, 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 A. Giordano. 1999. In Stein, G. S., Baserga, R., Giordano, A., und D. T. Denhardt (Hrsg.), *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. Wiley & Sons Inc., 15-79.

Reed, S. I. 1997. Control of the G₁/S transition. *Cancer Surv.* **29**: 7-23.

Reid, L. H., Crider-Miller, S. J., West, A., Lee, M-H., Massague, J. und B. E. Weissman. 1996. Genomic organization of the human p57^{Kip2} gene and its analysis in the G401 Wilms' tumor assay. *Cancer Res.* **56**: 1214-1218.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und S. I. Reed. 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. und S. I. Reed. 1995. Different roles for cyclins D₁ and E in regulation of the G₁-to-S transition. *Mol Cell Biol.* **15**: 3463-3469.

Reynaud, E. G., Pelpel, K., Guillier, M., Leibovitch M. P. und S. A. Leibovitch. 1999. p57 (Kip2) stabilizes MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts. *Mol Cel. Biol.* **19**: 7621-7629.

Reynaud, E. G., Leibovitch, M. P., Tintignac, L. A., Pelpel, K., Guillier, M. und S. A. Leibovitch. 2000. Stabilization of MyoD by direct binding of p57 (Kip2). *J Bio. Chem.* **275**: 18767-18776.

Reynisdottir, I. und J. Massague. 1997. The subcellular locations of p15(INK4b) and p27 (Kip1) coordinate their inhibitory interactions with Cdk4 and Cdk2. *Genes Dev.* **11**: 492-503.

Richardson, H. E., Wittenberg, C., Cross, F. und S. I. Reed. 1989. An essential G₁ function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* **59**: 1127-1133.

Roperch, J.-P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pasturaud, P., Gendrons, M-C., Dausset, J., Oren, M., Amson, R. B. und A. Telerman. 1999. Siah1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21^{Waf1}. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**: 8070-8073.

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

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J. und N. P. Pavletich. 1996a. Crystal structure of the p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**: 325-331.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D. und N. P. Pavletich. 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. und N. P. Pavletich. 1998. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**: 237-243.

Sadler, I., Crawford, A. W., Michelsen, J. W. und M. C. Beckerle. 1992. Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J Cell Biol* **119**: 1573-1587.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory*

Samuelsson, M. K., Pazirandeh, A., Davani, B. und S. Okret. 1999. p57^{Kip2}, a glucocorticoid-induced inhibitor of cell cycle progression in HeLa cells. *Mol Endocrinol.* **13**: 1811-1822.

Sanchez-Garcia, I. und T. H. Rabbitts. 1994. The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* **10**: 315-320.

Sanger, F., Nicklen, S. und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Sayama, K., Shirakata, Y., Midorikawa, K., Hanakawa, Y. und K. Hashimoto. 1999. Possible involvement of p21 but not of p16 or p53 in keratinocyte senescence. *J Cell Physiol.* **179**: 40-44.

Schmeichel, K. L. und M. C. Beckerle. 1994. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **79**: 211-219.

Schneider, B. L., Yang, Q-H. und A. B. Futcher. 1996. Linkage of replication to Start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* **272**: 560-562.

Scholl, F. A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. und B. W. Schäfer. 2000. DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol.* **151**: 495-505.

Schwarze, S. R. , Shi, Y., Fu, V. X. , Watson, P. A. und D. F. Jarrard. 2001. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* **20**: 8184-8192.

Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D. und K. Nasmyth. 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{SIC1} controls the G₁ to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**: 233-244.

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. und J. Massague. 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. und R. A. DePinho. 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. und B. E. Clurman. 1997. Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27^{Kip1}. *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. und J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**: 1149-1163.

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

Shin, J. Y., Kim H. S., Lee, K. S., Kim, J., Park, J. B., Won, M. H. *et al.* 2000. Mutation and expression of the p27^{Kip1} and p57^{Kip2} genes in human gastric cancer. *Exp Mol Med.* **32**: 79-83.

Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C. H., Alexander, D., Stampfer, M. R. und S. I. Reed. 1994. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol.* **14**: 3683-3694.

Slingerland, J. und M. Pagano. 2000. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* **183**: 10-17.

Sonnenberg, N. und A. C. Gingras. 1998. The mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* **10**: 268-275.

Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W. und S. I. Reed. 2001. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* **7**: 639-650.

Stilo, R., Leonardi, A., Formisano, L., Di Jeso, B., Vito, P. und D. Liguoro. 2002. TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF- κ B activation. *FEBS* **521**: 165-169.

Strohmaier, H., Spruck, C. H., Kaiser, P., Won, K. A., Sangfelt, O. und S. I. Reed. 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. und J. Kato. 2001. Direct binding of the signal-transducing adaptor Grb2 facilitates down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *J Biol Chem.* **276**: 12084-12090.

Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. und W. Krek. 1999. p45SKP2 promotes p27^{Kip1} degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol.* **1**: 207-214.

Taira, M., Evrard, J. L., Steinmetz, A. und I. B. Dawid. 1995. Classification of LIM proteins. *Trends Genet.* **11**: 431-432.

Takahashi, K., Kobayashi, T. und N. Kanayama. 2000. p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Mol Hum Reprod.* **6**: 1019-1025.

Takahashi, K., Nakayama, K. und K. Nakayama. 2000. Mice lacking a CDK inhibitor, p57^{Kip2}, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J Biochem.* **127**: 73-83.

Takizawa, C. G. und D. O. Morgan. 2000. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B₁-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Biol.* **12**: 658-665.

Takuwa, N., Fukui, Y. und Y. Takuwa. 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.

Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. und T. Taniguchi. 1996. Cooperation of the tumour suppressor IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* **382**: 816-818.

Tanahashi, H. und T. Tabira. 2000. Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet.* **9**: 2281-2289.

Taniguchi, T., Okamoto, K. und A. E. Reeve. 1997. Human p57(KIP2) defines a new imprinted domain on chromosome 11p but is not a tumour suppressor gene in Wilms tumour. *Oncogene* **14**: 1201-1206.

Tautz, D. und M. Renz. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* **132**: 14-19.

Tomoda, K., Kubota, Y. und J. Kato. 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27^{Kip1} is instigated by Jab1. *Nature* **398**: 160-165.

Toyoshima, H. und T. Hunter. 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. und M. Meyerson. 1991. Isolation of the human Cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* **353**: 174-177.

Tsugu, A., Sakai, K., Dirks, P. B. Jung, S., Weksberg, R., Fei, Y. et al. 2000. Expression of p57 (Kip2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol.* **157**: 919-932.

Tsvetkov, L. M., Yeh, K. H., Lee, S.J., Sun, H. und H. Zhang. 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. 1996. The cyclin-dependent kinase inhibitor p40^{SIC1} imposes the requirement for Cln G₁ cyclin function at Start. *Proc Natl Acad Sci. USA* **93**: 7772-7776.

Tyers, M. und P. Jorgensen. 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev.* **10**: 54-64.

- Urano, T., Hosoi, T., Shiraki, M., Toyoshima, H., Ouchi, Y. und S. Inoue. 2000. Possible involvement of the p57(Kip2) gene in bone metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* **269**: 422-426.
- Valge-Archer, V. E., Osada, H., Warren, A. J., Forster, A., Li, J., Baer, R. und T. H. Rabbitts. 1994. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**: 8617-8621.
- Vidal, A. und A. Koff. 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. und K. Helin. 1999. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol.* **19**: 6379-6395.
- Walker, J. L., Zhang, L. und A. S. Menko. 2002. Transition between proliferation and differentiation for lens epithelial cells is regulated by Src family kinases. *Dev Dyn.* **224**: 361-372.
- Watanabe, H., Zhen-Qiang, P., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., Hurwitz, J. und Y. Xiong. 1998. Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57^{Kip2} requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci. USA* **95**: 1392-1397.
- Wei, Q., Miskminis, W. K. und R. Miskimins. 2003. The Sp1 family of transcription factors is involved in p27^{Kip1}-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol.* **23**: 4035-4045.
- Weinert, T. 1997. Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv.* **29**: 109-132.
- Westbury, J., Watkins, M., Ferguson-Smith, A. C. und J. Smith. 2001. Dynamic temporal and spatial regulation of the cdk inhibitor p57(kip2) during embryo morphogenesis. *Mech Dev.* **109**: 83-89.
- Wiedemann, H. R. 1983. Tongues and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Eur J Paediatr.* **141**: 129.
- Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A. und M. Paulsson. 2000. The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several α and β integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem.* **275**: 33669-33678.
- Won, K-A. und S. I. Reed. 1996. Activation of cyclinE/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J.* **15**: 4182-4193.
- Wu, J. S., Xu, L. und S. Z. Ao. 1996. Funktional domains of the regulatory factor PHO81 of *Saccharomyces cerevisiae* **5**: 507-515.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. und D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**: 701-704.

Yan, Y., Frisen, J., Lee, M. H., Massague, J. und M. Barbacid. 1997. Ablation of the CDK inhibitor p57^{Kip2} 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. und S. Kornbluth. 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. und G. E. Sonenshein. 2001. Repression of transcription of the p27 (Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**: 1688-1702.

Zachariae, W. und K. Nasmyth. 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **11**: 973-983.

Zeng, Y., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J. und H. Kanaide. 2000. Minimal requirements for the nuclear localization of p27 (Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* **274**: 37-42.

Zhang, H., Xiong, Y. und D. Beach. 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. und S. J. Elledge. 1997. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57^{Kip2} indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**: 151-158.

Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J. W. und S. J. Elledge. 1999. p21 (Cip1) und p57 (Kip2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* **13**: 213-224.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Ludger Hengst, Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der für die Arbeit benötigten Mittel, die Betreuung dieser Doktorarbeit sowie seine jederzeit freundliche Unterstützung in allen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt des weiteren Herrn Prof. Dr. H.-U. Koop für sein motivierendes Interesse am Fortgang der Arbeit, für zahlreiche kritische Anmerkungen, die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät und einige sehr nette Gespräche über dies und das.

Ich danke unserem Postdoc Dr. Michael Kullmann, der vom ersten Moment dieser Arbeit an ein unverrückbarer Baum am Ufer der Turbulenzen war, und dies hoffentlich auch noch lange bleiben wird.

Ich danke Dr. Matthias Grimmler, durch den ich, wie selten zuvor, erfahren habe, was die Worte "besser spät als nie" bedeuten.

Dank ebenso allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ sowie den Arbeitsgruppen von Dr. Frauke Melchior und Dr. Utz Fischer für die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Dr. Claudia Bieber, Andrea Romaniuk und Brigitte Anders-Titze für all die Jahre und dafür, daß jedem von uns dieses Kleeblatt gleichermaßen viel bedeutet sowie meinen Freundinnen Melanie und Katja, die in jeder Lebenslage den richtigen Ton und die richtige Flasche Prosecco auswählen und ohne die ein Leben nur halb so bunt wäre.

Für eine inzwischen 20 Jahre andauernde Freundschaft, die alles kennt, danke ich Dr. Regine Seiser aus Ostfildern.

Ich danke meinem tapferen Zinnsoldat, der keine Träne weint und in all den Jahren nie von meiner Seite gewichen ist - in unserem Schiff aus Zeitungspapier.

Ich danke dem einen Menschen, der es nie mehr erfahren wird, für alles, was er gegeben hat als er noch bei mir war.

Gott würfelt doch, Herr Einstein!

Lebenslauf

Sonja Birgit Weiß

geboren am	30. Mai 1973
Eltern	Priv. Doz. Dr. Helmut Weiß und Brigitte Weiß, geb. Kraus
1979-1983	Grundschule Graf-Spee, Essen
1983-1992	Mathem.-nat. Gymnasium Grafing, Grafing b. München
1992	Allgemeine Hochschulreife
1993-1995	Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
1995	Vordiplom
1995-1998	Fortsetzung des Studiums an der Ludwig-Maximilians- Universität München
1998	Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität in der Abteilung Biologie I unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Anton Schäffner, Insitut für Biochemische Pflanzen- pathologie an der GSF Neuherberg Thema: Untersuchung der Genexpression und Regulation von <i>plasma membrane intrinsic proteins</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>
1998	Diplom in Biologie
1999-2003	Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ unter Anleitung von Herrn Dr. Ludger Hengst Thema: Identifikation und Charakterisierung von Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p57 ^{Kip2}

Ich versichere, daß ich meine Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

München, 19.12.2003

Sonja Birgit Weiß

...

Derrière les ennuis et les vastes chagrins
Qui chargent de leur poids l'existence brumeuse,
Heureux celui qui peut d'une aile vigoureuse
S'élançer vers les champs lumineux et sereins!

Celui dont les penses, comme les alouettes,
Vers les cieux le matin prennent un libre essor,
Qui plane sur la vie, et comprend sans effort
Le langage des fleurs et des choses muettes!

aus *Elévation, Les Fleurs Du Mal*, Charles Baudelaire