

**Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**Medizinische Klinik III
(Direktor: Prof. Dr. med. A.M. Zeiher)**

**Degradation und subzelluläre Lokalisation von
p21(Cip1/Waf1) in Abhängigkeit von PCNA in
Endothelzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**vorgelegt von Yvonne Holzmann
aus Frankfurt am Main**

Frankfurt am Main 2005

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referentin: Prof. Dr. S. Dimmeler

Korreferent: Prof. Dr. J. Gille

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2006

**Ich widme diese Arbeit in Dankbarkeit und Liebe
meinen Eltern**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Abkürzungen	XI
1. Einleitung	1
1.1. Der Zellzyklus - Rolle der CDKs und des CDK-Inhibitor p21	2
1.2. Allgemeines zu den molekularen Mechanismen von Tumorentstehung	6
1.3. Zellen nach DNA-Schädigung	7
1.4. Funktion und Regulation von p21 (Cip1/Waf1)	8
1.4.1. Transkriptionelle Regulation.....	9
1.4.2. Post-translationale Regulation	9
1.4.3. Ziele und Bindungsstellen von p21	9
1.4.4. p21 und seine Funktionen	11
1.5. PCNA.....	15
1.6. Proteinkinase AKT.....	17
1.7. Ziel der Dissertation.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Zellkultur	21
2.1.1. Kultivieren von COS und HeLa.....	21
2.2. Transfektion	22

2.2.1. Plasmide	22
2.2.2. Transfektion von COS-7	24
2.2.3. Cotransfektion.....	24
2.3. Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen in Hela-Zellen	24
2.4. Pulse-chase von COS	25
2.5. Proteinanalyse	26
2.5.1. Aufarbeitung der gesamten Zellproteine	26
2.5.2. Subzelluläre Fraktionierung der Proteine mit Ultrazentrifugation	27
2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.5.4. Immunpräzipitation (IP).....	28
2.5.5. Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen....	29
2.6. Transfer von Proteinen (Western Blot)	30
2.6.1. Wet-Blot.....	30
2.6.2. Semidry-Blot.....	31
2.6.3. Immundetektion von Western Blot	31
2.7. Immunhistochemischer Nachweis der Proteinlokalisierung.....	35
3. Ergebnisse.....	39
3.1. Stabilität von p21 Waf1/Cip1.....	39
3.1.1. p21 Stabilität von Zellen im G0/G1-Arrest und in proliferierenden Zellen.....	39
3.1.2. Auswirkungen der Phosphorylierung durch AKT auf die Stabilität von p21	42
3.1.3. Stabilisierung von p21 durch PCNA.....	44
3.2. Die subzelluläre Lokalisation von p21 Waf1/Cip1	48
3.2.1. Lokalisation des p21-PCNA Komplex.....	49

3.2.2. Einfluß von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21	51
4. Diskussion	61
4.1. Bedeutung der p21 Stabilität in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zelle	61
4.2. Bedeutung der p21 Stabilität in Abhängigkeit von der Phosphorylierung an Threonin 145.....	62
4.3. p21-Stabilität durch Bindung an PCNA.....	63
4.3.1. Maskierung der Proteasom-Bindungsstelle von p21 durch PCNA.....	64
4.3.2. Stabilität von p21 in Abhängigkeit von der Cyclin/CDK- Anbindung	67
4.3.3. p21 Stabilität durch Bildung eines unlöslichen Komplexes mit PCNA.....	68
4.3.4. Schutz vor Degradation durch die subzelluläre Lokalisation von p21	68
4.4. Subzelluläre Lokalisation von p21 und PCNA	69
4.5. Bedeutung der p21-PCNA Bindung.....	72
4.5.1. Allgemein.....	72
4.5.2. Bei Tumor-assoziierten Erkrankungen	74
4.5.3. Die Rolle der p21-PCNA Bindung im Zytoplasma.....	74
4.5.4. Weitere Bedeutung der subzellulären Lokalisation von p21	76
4.6. Schlusswort / Kritik	78
5.1 Zusammenfassung.....	80
5.2 Summary	82
Literaturverzeichnis	84

Publikation	103
Lebenslauf.....	104
Danksagung	107
Ehrenwörtliche Erklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	3
Abbildung 1.2.: Schematischer Ablauf der G1-Phase des Zellzyklus mit den wichtigsten CDK/Cyclin-Komplexen und den wirksamen CDK-Inhibitoren (modifiziert nach Funk, 1997)	5
Abbildung 1.3.: Bindungsstellen von p21.....	11
Abbildung 1.4.: p21 und seine vielfältigen Funktionen.....	15
Abbildung 2.1. Plasmide zur Transfektion	23
Abbildung 2.2. Primäre Antikörper für Western Blots	33
Abbildung 2.3. Sekundär-Antikörper für Western Blots	34
Abbildung 2.4. Primäre Antikörper für Immunofluoreszenz.....	36
Abbildung 2.5. Zweitantikörper zur Immunofluoreszenz.....	37
Abbildung 3.1.: Untersuchung der Degradation von p21 in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zellen.....	40
Abbildung 3.2.: Effekte auf die Degradation von p21 in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustand	43
Abbildung 3.3.: Effekt von PCNA auf die Stabilität von p21T145A und p21T145D	45
Abbildung 3.4.: Effekt von PCNA auf die Stabilität von p21 T145A M147A	47
Abbildung 3.5.: Darstellung der Interaktion zwischen PCNA und p21T145A und subzelluläre Lokalisation des Komplexes	49

Abbildung 3.6. A+B : Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A (Immunhistochemie).....	53
Abbildung 3.6.C: Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 (Western Blot).....	55
Abbildung 3.7.: Kein Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145D.....	57
Abbildung 3.8.: Kein Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A M147A	59
Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der möglichen Maskierung der Proteasom-Bindungsstelle von p21 durch PCNA.....	65
Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung zur hypothetischen Wirkungsweise der Selbstprotektion von p21 vor Degradation mittels Aktivierung der Caseinkinase II	66
Abbildung 4.3.: Degradationsinhibition von p21 durch PCNA-Bindung und gelockerte Assoziation von p21 mit Cyclin-CDK	67
Abbildung 4.4: Schema zur Konformationsänderung der Nukleären Lokalisationssequenz von p21 durch PCNA-Bindung	70
Abbildung 4.5.: Schema zur Darstellung der möglichen Calmodulin-Bindungsinhibition an p21 durch PCNA und damit Inhibition der Exposition der Nukleären Lokalisationssequenz.....	71

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Apaf	engl. „apoptosis activating factor“ - Apoptose aktivierender Faktor
AS	Aminosäure(n)
BER	<u>B</u> asen- <u>E</u> xzisions- <u>R</u> eparatur
BSA	engl. „ <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine“ - Rinderserum-Albumin
CDK	engl.: „ <u>C</u> yclin- <u>d</u> ependent- <u>k</u> inase“
-	Cyclin abhängige Kinase
-	
COS 7-Zellen	SV40-transformierte Zelllinie von Affennierenzellen
DAPI	Diamidin-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. „Desoxyribonucleic Acid“ - Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithioerythrol
EC	engl. „ <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ell(s)“ - Endothelzellen
ECL	engl. „ <u>E</u> nanced <u>C</u> hemo <u>l</u> uminescence“ - verstärkte Chemolumineszenz

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	engl. „fluorescence activated cell sorter“
FCS	engl. „ <u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum“ - fötales Kälberserum
HeLa	Zelllinie aus einem Cervixkarzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HUVEC	engl. „ <u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ene <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell“ - Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
n	Anzahl separat durchgeführter Experimente
NER	<u>N</u> ukleotid- <u>E</u> xzisions- <u>R</u> eparatur
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl. “Phosphat Buffered Solution” - Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	engl. „ <u>p</u> roliferating <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen“ - DNA-Adaptorprotein für die DNA-Replikation - und Reparatur durch Polymerasen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
p21	p21 (Cip1/Waf1) -Zellzyklus-regulatorisches Protein

p27	p27 (Kip1/Xic1) -Zellzyklus- regulatorisches Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	engl. "Reactive Oxygen Species" - reaktive Sauerstoffspezies / Radikale
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. "Sodium Dodecyl Sulfate" - Natriumdodecylsulfat
TBS	engl. "Tris Buffered Saline" - Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Einleitung

Das Wissen über molekulare Mechanismen in der Zelle ist grundlegend für das Verständnis von biologischen Vorgängen und der Entstehung von Krankheiten. Das Protein p21, mit dem sich diese Arbeit hauptsächlich beschäftigt, gehört mit seinem Einfluß auf Zellzyklus, Zellalterung, Zelldifferenzierung und Zellmodulation zu den Schlüsselproteinen auf dem Weg, diese dynamischen Eigenschaften verstehen zu können. Zu den Regulationsmechanismen, die das Wirken von Proteinen wie p21 beeinflussen, gehört nicht nur die Herstellung (Transkription und Translation) dieses Proteins, sondern auch der Abbau (Degradation). Das Verhältnis von Translation und Degradation bestimmt die absolute Menge an Protein. Degradation von Proteinen kann auf vielfältige Weise geschehen: Die Proteine können direkt vom Proteasomkomplex erkannt werden, oder zunächst vom Ubiquitinsystem markiert und anschließend zum Proteasomkomplex gebracht werden. Proteine können diese Abbauege für eine bestimmte Zeit umgehen, indem sie sich unkenntlich machen, dazu gehören z.B. Phosphorylierungsvorgänge oder die Interaktion mit anderen Proteinen oder der Wechsel in ein anderes Zellkompartiment. In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, ob und wann p21 sich eines solchen Mechanismus bedient.

p21 spielt auch bei der Tumorgenese eine Rolle. Tumorwachstum kann durch p21-abhängige Suppression kontrolliert werden. Tumorerkrankungen sind daher häufig mit einer erhöhten Degradation von p21 assoziiert. Neue Erkenntnisse über die Degradation von p21 als posttranslationale Regulierung können dazu verhelfen, Medikamente zu entwickeln, die dieses Stadium beeinflussen und das alte Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Proteins in der Zelle wiederherstellen können.

1.1. Der Zellzyklus - Rolle der CDKs und des CDK-Inhibitor p21

Damit sich eine Zelle erfolgreich in zwei genetisch identische Tochterzellen teilen kann, muß eine Zelle zwei wichtige Phasen im Zellzyklus durchlaufen: Eine zur Verdopplung ihrer DNA, die Synthese-Phase (= S-Phase), und eine zur Verteilung der DNA auf die Tochterzellen, die Mitose (= M-Phase). Beide sind durch zwei Zwischenphasen, G1 und G2, voneinander getrennt. Dies setzt eine gute Koordination der Replikation und Segregation der Chromosomen voraus und auch die Reparatur eventuell entstandener DNA-Schäden. Die meisten Zellen eines ausgewachsenen Organismus durchlaufen keinen Zellzyklus, sondern befinden sich in der Ruhephase, der G0-Phase. Wenn sie durch Wachstumsfaktoren zur Vermehrung stimuliert werden, gelingt es ihnen, die Blockade zu überwinden und einen vollen Zellzyklus zu durchlaufen.

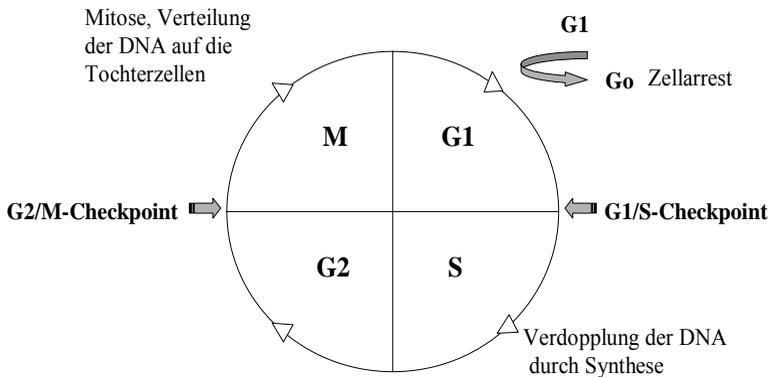


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird durch periodische Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen, gesteuert. Diese Proteinkinasen werden als Cyclin dependent kinases (CDK) bezeichnet, da sie nur aktiv sind, wenn sie in Komplexen mit ihren Partnerproteinen, den Cyclinen, vorliegen. Die CDKs sind eine Familie von heterodimeren Serin-Threonin-Kinasen, die in Größe und Sequenz nahe verwandt sind. Jede CDK enthält eine katalytische CDK Untereinheit und eine Cyclin aktivierende Untereinheit. CDKs können die Tumorsuppressor Pocket Proteine Rb, p107 und p130 phosphorylieren, wodurch eine Freisetzung von E2F Transkriptionsfaktoren resultiert. Diese Transkriptionsfaktoren ermöglichen eine Transkription der E2F-abhängigen Gene, die für den

Eintritt in die S-Phase nötig sind (Dyson, 1998). CDKs koordinieren nicht nur den Fortgang einer Zelle durch den Zellzyklus, sondern empfangen und integrieren auch wachstumsregulierende Signale, die die CDKs quasi an- und ausschalten.

Sind die CDKs aktiv, läuft der Zellzyklus durch die Phase, die diese CDK kontrollieren, sind die CDKs gehemmt, stoppt der Zellzyklus in der entsprechenden Phase (Morgan, 1997).

Die Regulation der CDKs erfolgt durch mehrere Mechanismen, darunter periodische Cyclin-Akkumulation und Degradation, nukleäre Lokalisation, Phosphorylierung der CDKs und Assoziation mit verschiedenen CDK-Inhibitoren (Reed, 1994). Von den CDK-Inhibitoren werden zwei Familien mit jeweils biochemischen und funktionellen Homologien unterschieden (Sherr, 1995). Die Cips und die INK4s. Zur Familie der Cips gehören das p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1/Xic1) (Polyak, 1996; Su, 1995) und p57 (Kip2) (Lee, 1995). Alle haben ähnliche Sequenzen in der N-terminalen Region. Das p21 (Cip1/Waf1) und das p27 (Kip1) binden und inhibieren CDK2- und CDK4-Komplexe (Massaqué, 1995) und noch viele weitere CDK-Cyclin-Komplexe (Carnero and Hannon, 1998). Das p21 Protein ist eigentlich universell, da es in niedrigen Mengen essentieller Bestandteil aller CDK/Cyclin-Komplexe ist und in höheren Mengen prinzipiell alle Komplexe stöchiometrisch hemmen kann (LaBaer, 1997). Die INK4-Familie-Inhibitoren binden spezifisch an die Kinasen CDK4 und CDK6 (Hengst, 1998).

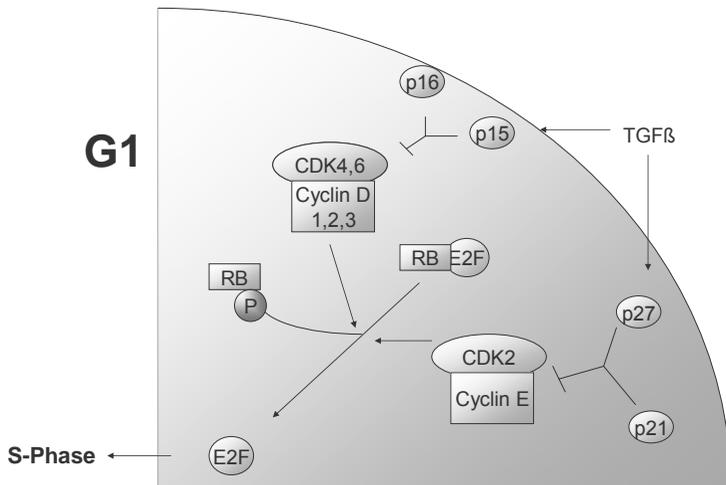


Abbildung 1.2.: Schematischer Ablauf der G1-Phase des Zellzyklus mit den wichtigsten CDK/Cyclin-Komplexen und den wirksamen CDK-Inhibitoren (modifiziert nach Funk, 1997)

CDKs steuern auch die Aktivierung von Kontrollpunkten, sog. Checkpoints, an denen die Zelle die Abläufe sowie die erreichte Zellgröße und die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen überprüft. Die Checkpoints befinden sich an mindestens zwei Stellen im Zellzyklus, am G1/S-Übergang und am G2/M-

Übergang. Checkpoints sind komplexe Signaltransduktionssysteme, die eine korrekte Wachstumskontrolle garantieren. Die DNA-Reparatur vor der S-Phase dient der Verhinderung der Replikation der geschädigten DNA und damit dauerhaften Manifestation eines DNA-Schadens, während die Reparatur vor der Mitose Chromosomenverlusten infolge Segregation gebrochener Chromosomen vorbeugt. Damit tragen diese Checkpoints wahrscheinlich wesentlich zur genetischen Stabilität einer Zelle bei (Funk, 1997). Bei vielen Formen von maligner Entartung sind diese Kontrollpunkte gestört.

1.2. Allgemeines zu den molekularen Mechanismen von Tumorentstehung

Die Tumorgenese ist ein Prozeß, der in mehreren Schritten entsteht. Unter einem „Tumor“ versteht man eine abnorme Gewebsmasse, die auf eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht, sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe eingliedert und auch dann noch weiterwächst, wenn der auslösende Reiz bzw. exogene Stimulus nicht mehr wirksam ist (Riede, 1995). Gene, deren mutierte Form zur Entstehung von Tumoren führt, werden Onkogene genannt und kodieren meist für Proteine, die in mitogenen Signalwegen eine Rolle spielen, wie Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Enzyme in Second-Messenger-systemen, genexpressions- und zellzyklusregulierende Proteine. Durch Mutationen in diesen Genen werden die Produkte häufig konstitutiv aktiv, d.h. sie unterliegen nicht mehr der normalen negativen Regulation, die ihre Aktivität oder

Expression einschränkt. Wichtige Merkmale der malignen Zellen sind damit unzureichende Reaktion auf interne oder externe zelluläre Signale und Kontrollverlust der Zellteilung, Verlust von „Respekt“ vor anderen Zellverbänden, das Eindringen in bestehende Gewebeverbände und schließlich Ansiedelung in entfernten Bereichen des Körpers als Metastasen. Die Zellen können nicht mehr adäquat auf DNA-schädigende Einflüsse reagieren, wie zum Beispiel durch einen Zellzyklusblock, DNA-Reparatur oder den programmierten Zelltod, die Apoptose (Hartwell, Kastan, 1994).

1.3. Zellen nach DNA-Schädigung

In normalen Zellen führt DNA-Schädigung, z.B. induziert durch UV- oder Gammastrahlung, zu einer Inhibition einer replikativen DNA-Synthese. Diese Antwort auf DNA-Schädigung erlaubt eine optimale Reparatur des Schadens, bevor die Zelle ihr Erbgut verdoppelt und sich teilt. Wird der Schaden nicht vor dem S-Phasen Eintritt behoben, wird die Schädigung durch die Replikation quasi fixiert und führt damit zu mutagenen Läsionen. Mutagene Läsionen können an kritischen Stellen zur zellulären Transformation führen. Für die Blockade der DNA-Replikation konnte dem Tumorsuppressorgenprodukt p53 eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden (Kastan, 1991; Kuerbitz, 1992). Man geht davon aus, daß die Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung den Zellzyklus stoppt und damit den Zellen die Reparatur ihrer geschädigten DNA ermöglicht. Das p53 ist das häufigste mutierte Gen in menschlichen malignen Tumoren wie Brustkrebs, Lungen-, Dickdarm-, Blasen, Gehirn, Knochenkrebs und Tumoren des

hematopoietischen Systems und von Muskelgewebe (Kastan, 1991). P53 induziert p21 transkriptionell und führt vermutlich erst durch die Induktion von p21 zu einem G1-Block (Haffner, 1995, Hermekin, 1995). Leichte DNA-Schädigung, z.B. durch kurze UV-Belastung, führen jedoch zu einer Reduktion von p21 und damit zur PCNA-abhängigen DNA-Reparatur. p21-Reduktion scheint in diesem Fall sogar notwendig zu sein für eine effiziente PCNA-gesteuerte DNA-Reparatur (Soria, 2006).

Auch am zweiten „Checkpoint“ des Zellzyklus, dem Übergang von G2 in die Mitosephase spielt p21 eine wichtige Rolle. Damit kann ein Fehlen bzw. eine Fehlfunktion von p21 an diesen beiden wichtigen Checkpoints des Zellzyklus zur Tumorentstehung beitragen. Versuche mit Zellen, in denen das p21 ausgeschaltet wurde (p21-Null-Zellen), bestätigen, daß diese mit einem Defekt in der DNA-Reparatur assoziiert sind (McDonald, 1996).

Im Folgenden sollen die multiplen Funktionen von p21 näher beleuchtet werden.

1.4. Funktion und Regulation von p21 (Cip1/Waf1)

Das p21 aus der Cip/Kip Familie der Cyclin abhängigen Kinasen-Inhibitoren ist ein wichtiger Modulator von Zellwachstum und Zellantwort auf DNA-Schädigung (El-Deiry, 1993; Harper, 1997). Es reguliert die Zellteilung auf verschiedenen Ebenen, darunter Mediation der negativen Wachstumssignale, Funktion bei der Differenzierung und Zellalterung, Modulation der apoptotischen Antwort und als Aktivator

von bestimmten Cyclin-CDKs als Antwort auf mitogene Signale (Scott, 2000).

1.4.1. Transkriptionelle Regulation

Die Induktion bzw. transkriptionelle Regulation von p21 erfolgt zum einen direkt durch p53, aber auch indirekt durch p53-unabhängige Mechanismen, z.B. durch Wachstumsfaktoren (Gartel, 1998). Das p21 ist vorübergehend induziert bei reversiblen/irreversiblen Formen von DNA-Schäden und bei terminaler Differenzierung von postmitotischen Zellen (Scott, 2000).

1.4.2. Post-translationale Regulation

Die post-translationale Regulation von p21 kann durch C-terminale Spaltung von p21 durch Mitglieder der Caspase Familie der Proteasen erfolgen. Dies geschieht durch Induktion von Apoptose kurz nach DNS-Schädigung und bewirkt eine Bindung an PCNA und eine plasmatische Lokalisation von p21 (Park, 1998). Eine post-translationale Regulation kann auch durch eine reversible Phosphorylierung erfolgen. Phosphorylierungsstellen sind am Threonin 145 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Proteinkinase AKT, am Serin 146 und Serin 160 durch die Proteinkinase C (Scott, 2000; Rössig, 2001).

1.4.3. Ziele und Bindungsstellen von p21

Die wichtigsten Ziele von p21 sind die CDK-Cycline, welche den Fortgang von eukaryonten Zellen durch den Zellzyklus regulieren und

das Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), ein an die DNA-Polymerase Delta gebundenes Protein (Gulbis, 1996). p21 formt Komplexe mit verschiedenen CDK-Cyclinen, um deren Kinase Aktivität zu modulieren und mit PCNA, um die DNA-Synthese zu inhibieren. Diese unterschiedlichen Eigenschaften von p21 hängen mit den jeweils unterschiedlichen Bindungseigenschaften der N- und C-terminalen Regionen von p21 zusammen (Boulaire, 2000). Der N-Terminus von p21 im Bereich RKR 140-142 enthält die Nukleuslokalisationssequenz, an den Stellen 1-82 bindet p21 an CDK-cyclin-Komplexe. Die Stellen für Cyclin und CDK liegen separat. Für Cyclin liegen die Stellen an 1-28 (Fotedar, 1996) und für CDK an 28-82 (Goubin and Ducommun, 1995; Nakanishi, 1995b; Fotedar, 1996). In hohen Konzentrationen inhibiert p21 die CDK-Cyclin-Kinase Aktivität durch Bindung an beide, bzw. an die Aminosäuren 152-158 (Chen, 1996). Die DNA-Synthese wird dabei mittels Suppression von E2F gehemmt (Dimri, 1996; Rousseau, 1999; Rodriguez-Vilarrupla, 2002). Der C-Terminus von p21 enthält eine zweite Cyclin-Bindungsstelle, eine Bindungsstelle mit PCNA, eine putative nukleäre Lokalisationssequenz, eine Calmodulin-Bindungsstelle (Taulés, 1999) und zwei Spaltungsstellen für Caspase 3 (= Apoptose assoziierte. Protease).

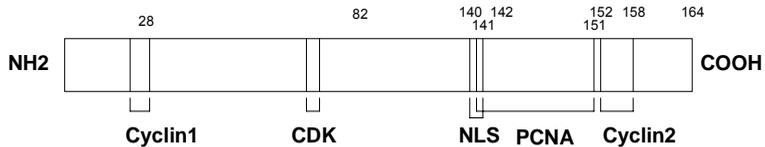


Abbildung 1.3.: Bindungsstellen von p21

Cyclin 1 = Aminosäuren 17-24: Essentielle Sequenz für die Cyclin-Bindung (Chen, 1996; Rousseau, 1999)

Cdk = Aminosäuren 53-58: Essentielle Sequenz für die Cdk- Bindung (Chen, 1996)

Cyclin 2 = Aminosäuren 152-158: Essentielle Sequenz für eine stabile Interaktion von p21 mit Cyclin-Cdk-Komplexen (Chen, 1996)

PCNA- Bindungsregion = Aminosäuren 141-151, Abrogation der Bindung an p21 durch Austausch der Aminosäuren an Threonin 145 oder Methionin 147 (Jonsson, 1998; Warbrick, 1995, Rousseau, 1999)

1.4.4. p21 und seine Funktionen

Das p21 als Schlüsselprotein im **Zellzykluseingang** und -fortgang kontrolliert die S-Phasen Initiierung und die DNA-Replikation (El-Deiry, 1993). p21 Antisense RNA in ruhenden Zellen fördert die S-Phase (Nakanishi, 1995a). Der Level von p21 mRNA sinkt vor der S-Phase und steigt in der G1 Phase (El-Deiry, 1994; Nakanishi, 1995a). Der Proteinlevel von p21 in G0 arretierten Zellen ist hoch, selbst dann, wenn man verschiedene Cycline und CDKs immunodepletiert

(Nakanishi, 1995a). Das p21 wird zudem im Überfluß exprimiert, mehr als für eine Komplexbildung mit mehreren der bekannten G1-Cycline und CDKs notwendig ist. Denn schon ein einziges Molekül von p21 kann den CDK-Cyclin Komplex vollständig inhibieren (Hengst, 1998). Erstaunlicherweise ist die p21 Expression auch dann erhöht ist, wenn man ruhende Zellen zum Proliferieren stimuliert (Li, 1994; Noda, 1994). Wenn man zum Zeitpunkt 0 in der Go-Phase arretierte Zellen stimuliert, dann findet man nach 4h einen erhöhten Level an p21 RNA und Protein. Erst nach 24h sinkt der p21 Level stark ab, und die DNA-Synthese bzw. der Übergang in die S-Phase setzt ein (Nakanishi, 1995a). Dies lässt vermuten, daß p21 als eine Art **Checkpoint** den (vorzeitigen) Übergang in die späte G1-Phase oder S-Phase verzögert und gleichzeitig durch Wachstumsfaktoren dazu stimuliert wird.

Der Zellzyklusarrest in G1 nach DNA-Schädigung wird durch p53 und p21 induziert. Da in p21^{-/-} Zellen p53 nicht mehr zu einem Zellzyklusarrest führt, ist die Hemmung der Zellzyklusprogression durch p53 via p21 vermittelt. Als ein Downstream target von p21 in durch DNA-Schaden induziertem G1-Zellarrest agiert das Retinoblastom-Protein, welches durch CDK-Cyclin Kinasen reguliert wird (Boulaire, 2000). Auch p27 scheint eine Funktion im Übergang von G0 nach G1 zu haben und könnte mit p21 zusammen agieren (Nakanishi, 1995a).

Eine ektopische Überexpression von p21 führt zu Zellwachstumsstop nicht nur in der G1 (Harper, 1995; Noda, 1994), sondern auch in der G2-Phase (Noda, 1994). Dieser integrierte G2-Checkpoint verhindert

unangemessene Zellteilung von unreparierter DNA (Winters ZE, 2002). Wodurch p21 nach DNA-Schädigung in den G2-Arrest führt, ist noch nicht geklärt, aber es gibt Hinweise darauf, daß dies mit der Bindung an das, im folgenden genauer beschriebene, Protein PCNA zusammenhängen könnte (Ando, 2001). Die p21 m-RNA hat zwei Höchstwerte, in der G1 und der G2/M-Phase (Li, 1994). Auch der Proteinlevel von p21 zeigt ein Maximum an der G2/M-Grenze (Dulic, 1998).

Es gibt Hinweise darauf, daß der Zellarrest in G1 und G2 nach DNA-Schädigung nur im Falle von G1 Arrest von p53 gesteuert ist (Kastan, 1991). Somit wird p21 im Übergang G2/M wahrscheinlich p53-unabhängig induziert.

Eine andere wichtige Rolle von p21 scheint der **Schutz** der Zellen vor **Apoptose** zu sein. p21 defiziente Zellen sind sensibler auf p53-vermittelte Apoptose (Polyak, 1996), ebenso zeigen p21 knock-out Mäuse eine 3,5 fache Apoptosesensitivität (Bruhl, 2004), und eine Inhibition von Stress-vermittelter Apoptose ist mit p21 Expression assoziiert (Guadagno, 1996; Mattiussi, 2004). Auch im Zusammenhang mit der Bindung an PCNA kann p21 mittels Prävention der Duplikation geschädigter DNA vor Apoptose schützen (Scott, 2001).

Das p21 kann durch Caspasen an einer spezifischen Caspaseschnittstelle gespalten werden; diese ist in den Aminosäuren 109 – 112 mit DXXD gegeben (Levkau, 1998). Außerdem kann p21 an die noch inaktive Procaspase-3 mit der N-terminalen Seite binden und die Aktivierung zur Caspase-3 inhibieren (Suzuki, 1998).

Das p21 reguliert viele Gene, die mit Zellalterung oder altersabhängigen Krankheiten, wie Atherosklerose, Alzheimer und Amyloidose assoziiert sind (Chang, 2000).

Das p21 wurde anfangs entdeckt als ein Gen, welches in alternden Zellen induziert ist, und es konnte gezeigt werden, daß das Protein selbst permanenten Wachstumsstillstand und **Zellalterung** hervorrufen kann. Das p21 bewirkt dieses durch einen Mechanismus, welcher zu einer Akkumulation von Reactive oxygen species (ROS) führt, einem Nebenprodukt von oxidativen Prozessen. Diese Akkumulation funktioniert ohne PCNA-Bindung und ohne p53 Induktion und ohne die CDK inhibitorischen Funktionen (Macip, 2002).

Wie das verwandte p27 ist p21 für die **Zelldifferenzierung** von intestinalen Epithelzellen, Keratinocyten, Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen, PC12 Zellen und Gliomzellen von Bedeutung (Studzinski, 1999). In den meisten differenzierten Zellen sind diese beiden Gene hoch exprimiert, während die CDKs und vermutlich PCNA herunter reguliert sind. Di Cunto (1998) zeigt in seiner Arbeit, dass die Expression von p21 am Ende des Differenzierungsprogrammes von primären Keratinozyten der Maus Proteasom-abhängig abnimmt und eine verstärkte Expression in diesen Zellen sogar einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von Markern der terminalen Differenzierung hat.

Das p21 Protein könnte ein wichtiger Gegenspieler in der Entwicklung von **Herzhypertrophie** sein. Es konnte in Versuchen gezeigt werden, daß Serum Herzzellen zu einer zweifachen Größe wachsen lässt und

dieses durch eine p21 Expression verhindert werden kann (Tamamori, 1998).

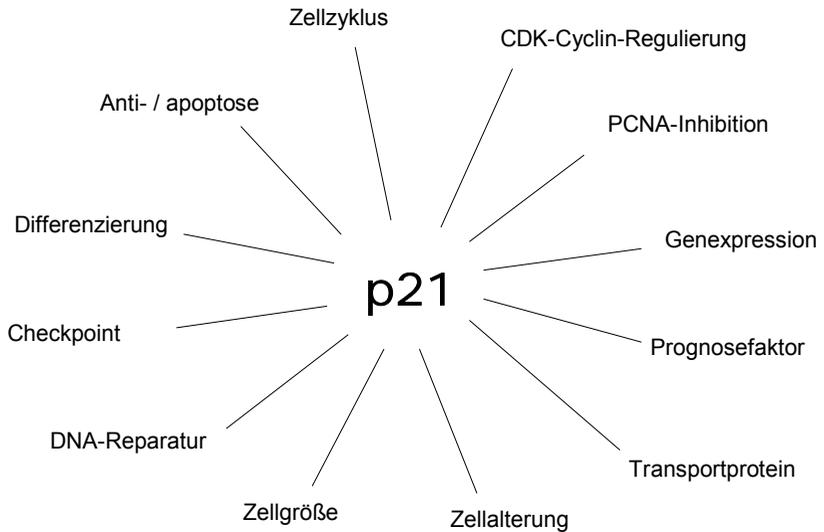


Abbildung 1.4.: p21 und seine vielfältigen Funktionen

1.5. PCNA

Das Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Protein ist eines der zentralen Moleküle, die über Proliferation und Apoptose einer Zelle entscheiden. Wie die Evolution von den Prokaryonten zu Eukaryonten, änderte sich auch die Funktion von PCNA von einer simplen ‚gleitenden Klammer‘ der DNA-Polymerase Delta und Epsilon zur Unterstützung der DNA-Replikation (Gulbis, 1996; Krishna, 1994), hin zu einem exekutiven Molekül, welches die zelluläre Determination zu

Differenzierung, Zellalterung und Apoptose kontrolliert (Paunesku, 2001).

PCNA ist nicht nur ein essentieller Faktor für die DNA Polymerasen Delta und Epsilon, sondern auch erforderlich für die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) (Nichols; 1992; Shivji, 1992 u 1994) und die Basen-Exzisions-Reparatur (BER). In höheren Eukaryonten, kann die BER über zwei Mechanismen ablaufen: Einen DNA Polymerase beta-abhängigen Weg oder den PCNA-abhängigen Weg. PCNA funktioniert dabei als ein molekularer Adaptor, um verschiedene Faktoren wie AP endonuclease, Replikationsfaktor C, Flap endonuclease1, DNA Polymerase delta und DNA Ligase I zu rekrutieren und an die Stelle der DNA-Reparatur zu bringen (Matsumoto, 2001). Ob das p21 PCNA-abhängig die NER stimulieren kann, wird noch kontrovers diskutiert. p21-Null-Zellen können zumindest bestimmte DNA-Schäden nicht effizient beseitigen (Savio, 1996; McDonald, 1996).

Durch Interaktion mit verschiedenen Enzymen und regulativen Proteinen ist PCNA in den Apparat der Zellzykluskontrolle eingebettet. Seine Expression ist notwendig für den Übergang des Zellzyklus vom G0-Arrest in die S-Phase (Chen, 1995; Prosperi E, 1997; Warbrick E, 2000). Außerdem wird vermutet, daß PCNA in Verbindung mit Gadd34 für das Zellüberleben in ischämischen Zonen eine Rolle spielen könnte (Imai, 2003).

Das PCNA Gen kann durch p53 induziert werden, und PCNA kann mit mehreren von p53 kontrollierten Proteinen interagieren, z.B. mit Gadd45, MyD118, CR6 und p21. Die Interaktionen haben vermutlich einen Einfluß auf den Fortgang der Zelle entscheiden. Wenn in Abwesenheit von p53 PCNA im Überfluß in der Zelle vorhanden ist, findet DNA-Replikation statt. Ist dagegen ausreichend p53 in der Zelle vorhanden bei einem ebenso hohen PCNA Gehalt, findet DNA-Reparatur statt. Es gibt Hinweise darauf, daß humane Fibroblasten-Zelllinien mit basaler p53 Expression p53 abhängig den Protein- und mRNA Gehalt von PCNA nach ionisierender Strahlung, also DNA-Schädigung, erhöhen können (Shan, 2003).

1.6. Proteinkinase AKT

Das p21 ist ein Zielprotein von der Proteinkinase AKT und wird von ihr am Threonin 145 phosphoryliert (Rössig, 2001). Die Serin/Threonin Proteinkinase AKT wird durch Insulin, eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und wachstumsfördernde Zytokine, aber auch durch Matrixadhäsion stimuliert (Datta K, 1996; Burgering, 1995; Franke, 1995; Khwaja, 1997). AKT besitzt neben seiner Kinase-Domäne auch eine am Amino-Terminus gelegene Domäne, an die das Second-messenger-Molekül der Phosphoinositid 3-Kinase binden kann. In Anwesenheit dieses Moleküls kann AKT dann von der Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase an Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert werden. Durch Phosphorylierung dieser beiden Aminosäurereste wird AKT aktiviert (Kohn, 1996, Downward, 1998). Das aktive Protein kann nun seinerseits weitere Proteine

phosphorylieren, darunter außer p21 die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (Cross DA, 1995), Bad (Datta, 1997; Del Peso, 1997), Caspase 9 (Cardone, 1998), I κ B Kinase (Romashkova, 1999), die endotheliale NO Synthase (Dimmeler, 1999; Fulton, 1999) und Forkhead Transkriptionsfaktoren (Kops, 1999).

AKT spielt eine erhebliche Rolle in der Regulation von Zellüberleben und Zellproliferation. Die Tatsache, daß AKT p21 an Threonin 145 phosphoryliert, scheint dabei wichtig zu sein, denn die Phosphorylierung verhindert die p21-PCNA-Komplexbildung (Rössig, 2001). Außerdem vermindert eine Phosphorylierung von p21 die Bindung zu den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 und beeinflußt damit die inhibitorische Funktion von p21. Beides führt zu Zellproliferation (Rössig, 2001). Eine neue Rolle für AKT könnte die Regulation der zellulären Lebenszeit sein. Es gibt Hinweise, daß AKT den Zellwachstumsstop, wie er bei Zellalterung vorkommt, über einen p53/p21 vermittelten Weg fördern könnte (Minamino, 2004).

1.7. Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Regulation der p21-Stabilität: gibt es einen Einfluß von Zellzyklus, Phosphorylierung und Bindungspartnern?

Hierfür wurden untersucht die

- ▶ Degradation von p21 in proliferierenden und ruhenden Endothelzellen
- ▶ Degradation von p21 in Abhängigkeit von der AKT-Phosphorylierung an Thr 145
- ▶ Degradation von p21 in Abhängigkeit von PCNA

Desweiteren wurde untersucht die

- ▶ Subzelluläre Lokalisation des p21-PCNA-Komplexes
- ▶ Subzelluläre Lokalisation von p21 in Abhängigkeit von PCNA

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Heraeus) durchgeführt.

2.1.1. Kultivieren von COS und HeLa

Die HeLa- und Cos7-Zellen (ATCC, Manassas, VA, USA) wurden in Zellmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Fa Bio Whittaker Europe) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Boehringer), 1x Penicillin (50.000 IU/ml), Streptomycin (50mg/ml, Gibco BRL) und 1x Glutamin (200mM, Gibco BRL) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre adhärent in Gewebekulturflaschen kultiviert.

Bei ca. 80-90% Konfluenz wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS (Dulbeccos, Fa Gibco BRL Life Technologie) gewaschen und mit 3ml Trypsin-Lösung (1:10 verdünnte gebrauchsfertige Lösung, Gibco BRL) 2 min im Brutschrank zum Ablösen inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und mit serumhaltigem Medium in gleicher Menge abgestoppt. Nach Zentrifugation, Dekantieren des Überstandes und Resuspension der Zellen in 10 ml Medium, konnten die Zellen in einer Neubauer - Kammer gezählt und für den jeweiligen Versuchsansatz in entsprechender Zelldichte in Zellkulturschalen ausgebracht werden.

2.2. Transfektion

2.2.1. Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden von Frau Professor Dr. rer. nat. S. Dimmeler zur Verfügung gestellt. Dazu wurden humane cDNA-Banken (In Vitrogen, NV Leek, Niederlande), die die entsprechenden Schnittstellen enthalten (siehe Tabelle) mittels PCR amplifiziert. Über die entsprechenden Schnittstellen wurden die PCR-Produkte dann in die Vektoren (pcDNA3.1; In Vitrogen) mit oder ohne Myc-Histidin-Markierung (Myc-His) unter der Kontrolle des CMV-Promotors kloniert. Die entsprechenden Mutationen wurden durch „site directed“ Mutagenese nach Angaben des Herstellers (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) eingeführt.

Die Cos7-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert:

Plasmid	Mutagenese / Deletion	Eigenschaft
p21 wt		Wildtyp
p21 T145Dmt	T145D	Phosphomimetisch in der AKT-Phospho-Akzeptor-Stelle, keine Bindung an PCNA
p21 T145Amt	T145A	Nicht-phosphorylierbar
p21 T145Amt M147Amt	T145A und M147A	Nicht phosphorylierbar durch AKT, keine Bindung an PCNA
PCNA		Wildtyp

Abbildung 2.1. Plasmide zur Transfektion

2.2.2. Transfektion von COS-7

Die Transfektion erfolgte mit SuperFect Reagent von Qiagen (Hilden). Pro Ansatz wurde 3 µg Plasmid-DNA in 150 µg DMEM Medium ohne Zusätze gegeben und nach Zugabe von Superfect-Reagenz (30 µl pro Ansatz) vorsichtig vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1ml Vollmedium gestoppt.

Die zu transfizierenden subkonfluenten Zellplatten wurden während der Inkubationszeit zweimal mit PBS gewaschen, um das Vormedium und tote Zellen zu entfernen, dann wurden die Zellplatten mit je einem Ansatz Lösung gefüllt und 3 h bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und die Zellen weiter in Vollmedium für 24 bis 48h kultiviert, um in dieser Zeit die gewünschte Proteinexpression stattfinden zu lassen.

2.2.3. Cotransfektion

Für die Cotransfektionen von PCNA bzw Leerplasmid und den verschiedenen p21-Mutanten wurden im Verhältnis 2:1 pro Ansatz 2µg Plasmid-PCNA bzw Leerplasmid und je 1µg der p21 Plasmide eingesetzt.

2.3. Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen in Hela-Zellen

Cycloheximid (CHX) verhindert die Translation von Proteinen. Inkubiert man Zellen in 1mg/1ml CHX über verschiedene

Zeitintervalle, läßt sich untersuchen, in welcher Geschwindigkeit die Degradation erfolgt, indem man den Proteinlevel misst, der dann von Transkription und Translation unbeeinflußt bleibt.

Für den CHX-Stock wird 1mg CHX in 1ml DMSO aufgelöst und unter sterilen Bedingungen auf die Zellplatten gegeben in einer Konzentration von 10µl auf 1ml Medium.

Die Zellen für den Nullwert wurden sofort, die anderen nach den jeweiligen Zeiten in Lysispuffer (0,32 M Sucrose D, 10mM Tris pH8, 5mM EDTA pH8, 1%Triton in Aqua dest) und 2mM PMSF für 20 min bei 4°C lysiert. Danach wurden die Proteine wie unten beschrieben mittels Gelelektrophorese und Westernblot aufgearbeitet.

Um die Degradation in verschiedenen Stadien des Zellzyklus zu untersuchen, wurde den Zellen Serum entzogen oder die pflanzliche Aminosäure Mimosin (0,5 mM, Sigma) über 24h zugegeben, um die Zellen in den G1/G0 Arrest zu bringen (Ryan, 1993). Mittels Serumentzug von 24h und anschließender Serumzugabe über 18h kann man die Zellen in die Proliferationsphase bringen. Per FACS-Analysen wurde der Zellzykluszustand kontrolliert.

2.4. Pulse-chase von COS

36 bis 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit den unter 2.2.1. beschriebenen myc-markierten Plasmiden wurden die Zellen 2x in PBS gewaschen und in DMEM-Medium ohne Methionin ausgesetzt. Anschließend wurde 200µCi/ml 35S-Methionin hinzugegeben und die Zellen für weitere 2,5 h inkubiert. In diesem Schritt fand der Einbau der

radioaktiv markierten Aminosäure in neugebildete Proteine statt (pulse). Nach Markieren der Zellen mit ³⁵S-Methionin wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und anschließend auf Vollmedium, welches zusätzlich 2 mM nicht radioaktives Methionin enthielt, gesetzt. Die so behandelten Zellen wurden entweder sofort geerntet (0 Wert) oder aber für weitere 1, 2 oder 3 Stunden inkubiert (chase). Die Lyse der Zellen erfolgte mit jeweils 500 µl Lysispuffer (0,32 M Sucrose D+, 10 mM Tris pH8, 5 mM EDTA pH8, 1 % Triton in Aqua dest) pro 60 mm Zellkulturschale und 2 mM PMSF für 20 min bei 4°C. Mit den erhaltenen Zellysaten wurde eine Immunopräzipitation mit myc-AK durchgeführt, um nur die überexprimierten Proteine aufzureinigen. Die entsprechenden Immunokomplexe wurden mit immobilisiertem Protein A präzipitiert, in 20 µl Blaupuffer aufgenommen und 10 min in einem Heizblock bei 100°C inkubiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Gel danach bei 70°C für 1,5 h getrocknet. Radioaktiv markiertes Protein wurde mittels eines Phosphorimagers oder eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

2.5. Proteinanalyse

2.5.1. Aufarbeitung der gesamten Zellproteine

Nach Abschaben und Waschen der Zellen wurden diese für mindestens 20 min bei 4°C mit Lysispuffer und 1 mM PMSF lysiert. Nach Zentrifugation (20.000 g, 10 min bei 4°C) wurde im abgenommenen Überstand die Proteinkonzentration bestimmt.

2.5.2. Subzelluläre Fraktionierung der Proteine mit Ultrazentrifugation

Nach Anweisung der Firma Pierce, Rockford (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) wurden die Zellen (je nach Versuchsaufbau mit myc-Epitop markierten p21 T145A, p21 T145D, p21 WT transfizierten COS-Zellen oder zusätzlich mit PCNA cotransfizierte COS Zellen oder native HUVEC-Zellen) in eine nukleäre Proteinfraction und eine zytoplasmatische Proteinfraction aufgetrennt.

Verwendet wurden drei verschiedene Lysesubstanzlösungen, die zum Teil mit Proteaseinhibitoren versetzt waren, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Die zytoplasmatische Lösung 1 enthielt 0,5 mg/ml Benzamidin, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Leupeptin und 0,75 mM Phenylmethylylsulfonyl-Flourid. Angaben über Lösung 2 wurden nicht vermerkt. Die nukleäre Lösung 3 enthielt gleiche Mengen an Benzamidin, Aprotinin und Leupeptin und 2 mM Phenylmethylylsulfonyl-Flourid.

Die gewaschenen Zellpellets wurden gewogen und nach Gewicht mit entsprechenden Mengen der Lysesubstanzen versetzt. Nach Zugabe der zytoplasmatischen Lösung 1 wurde das Zellpellet kurz gemixt und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde Lösung 2 zugegeben, kurz gemixt, eine Minute auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 g mindestens 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt nun nukleäre Bestandteile. Der den zytoplasmatischen Teil enthaltende Überstand wurde erneut zentrifugiert und anschließend bei 160.000 g 2 h lang in der

Ultrazentrifuge (Beckmann) von Zellwandbestandteilen befreit. Das die nukleären Bestandteile enthaltende Zellpellet wurde in der nukleären Lösung 3 gelöst, indem fünfmal hintereinander alle 10 min das Zellpellet für 15 sec in der Lösung gemixt wurde. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 14.000 g für 10 min. Der Überstand enthielt nun die reine nukleäre Fraktion und konnte bei -80°C gelagert werden.

2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

800 µl H₂O (Aqua dest.) als Referenz beziehungsweise 798 µl H₂O mit 2 µl Probe wurden mit je 200 µl Protein-Assay Färbereagenz (Bio Rad, München) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption des entstandenen Protein-Farbstoff-Komplexes im Spektralphotometer bei $\lambda = 595$ nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer zuvor mit Rinderalbumin (BSA, bovines Serumalbumin) erstellten Eichkurve ermittelt.

2.5.4. Immunpräzipitation (IP)

Mit dieser Methode kann gezeigt werden, ob Proteine mit anderen Proteinen eine Komplexbildung eingehen, und man kann markierte Proteine aufkonzentrieren.

Die zuvor transfizierten COS-Zellen wurden lysiert und subzellulär fraktioniert. Für die Immunpräzipitation wurden die Proben, die gleiche Mengen an Protein enthalten müssen, mit dem myc-Antikörper (Santa-Cruz, 7,5 µl auf 500 µl Gesamtvolumen) bei 4°C mindestens 4h lang inkubiert. Für eine gute Bindung wurden die Proben in dieser Zeit

laufend durchmischt. Anschließend wurden für eine Stunde A/G-Plus-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) hinzugegeben, die an die myc-Antikörper binden, damit die Proteine ausgefällt werden können. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment mit Lysispuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das ganze wurde dreimal wiederholt, um die gewünschten aufgereinigten Proteine zu bekommen. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel, konnten per Western-Blot die assoziierten Proteine (das PCNA) sichtbar gemacht werden.

2.5.5. Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteingemische aufgetrennt werden. Die Auftrennung ist vom Vernetzungsgrad des Gels abhängig, je höher dieser ist, desto kleinere Proteine können aufgetrennt werden.

Zwei speziell angefertigte Glasplatten wurden je nach Proteinmenge entweder durch 0,75 oder 1,5 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt und festgeklammert. Die Trenngel-Lösung (1,5 M Tris pH8; 0,4 % SDS, Acrylamidmenge nach Proteingröße) wurde eingefüllt und zum Sauerstoffabschluß mit Aqua dest überschichtet. Nach der Polymerisation erfolgte die Entfernung des destillierten Wasser, das Einfüllen der Sammelgel-Lösung (1 M Tris/HCl pH6,8; 0,4 % SDS)

und das Einsetzen des Probenkamms. Die Proteinproben wurden nun mit 2-fach Probenpuffer (125 mM Tris/HCl pH6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 10 mM DTT; 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 100°C inkubiert. Die Immunopräzipitationen wurden 10 min lang inkubiert, um die Antikörperbindung zu lösen. Nach kurzem Anzentrifugieren (13.000 g, 1 min) erfolgte die sofortige Ladung der Proben auf das Gel. Als Laufpuffer wurde eine Lösung mit 0,25 M Tris, 0,96 M Glycin und 1 % SDS verwendet. Die erste halbe Stunde wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Proben die Trenngel-Lösung erreicht hatten, konnte die Spannung auf 100 V erhöht werden. Die Laufzeit betrug im Schnitt 3,5 h.

2.6. Transfer von Proteinen (Western Blot)

2.6.1. Wet-Blot

Nach Auftrennung im Polyacrylamidgel können die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) übertragen werden, wo sie dann durch hydrophobe Wechselwirkungen festgehalten und durch Immunfärbung sichtbar gemacht werden.

Die PVDF-Membran wurde zunächst kurz in 100% Methanol, dann für 2 min in Aqua dest und zuletzt in die gekühlte Wet-blot- Puffer - Lösung (0,05M Tris; 0,380M Glycin, 0,1% SDS; 20% Methanol) gelegt.

Das Gel und sechs Whatman 3MM Papiere wurden ebenfalls kurz in die Pufferlösung gelegt. Beim Aufbau eines luftblasenfreien Sandwichkomplexes in der Wet-Blot-Apparatur (Bio Rad Transblot, Heidelberg), wurde die PVDF-Membran zwischen Anode und Gel gelegt, auf beiden Seiten je drei Whatmanpapiere und ein 'scotch pad'. Die Apparatur wurde mit 4°C kalter Wet-Blot-Pufferlösung aufgefüllt und zusätzlich mit einem Eisblock und einem Rührmagneten gefüllt und auf einer Magnetplatte für 1-1,5h je nach Proteingröße bei 20W betrieben.

2.6.2. Semidry-Blot

Die mit Methanol und Wasser vorbehandelte PVDF-Membran, das Gel und sechs Whatmanpapiere wurden in Semidry-Blotting-Puffer (0,048M Tris; 0,039M Glycin; 0,037% SDS; 20% Methanol) gewässert. Der Aufbau des luftblasenfreien Sandwichkomplexes erfolgte in der Semidry-Blot-Apparatur (Bio Rad, Heidelberg). Für die einzustellende Stromstärke-Zahl wurde die PVDF-Membran ausgemessen. Die Länge x Breite x 3 = mA-Zahl genommen und das Gerät für eine Stunde in Betrieb genommen.

2.6.3. Immundetektion von Western Blot

Für die Immundetektion wurden die Membranen nach dem elektrophoretischen Proteintransfer zunächst 2 h bei Raumtemperatur in TBS mit 0,1 % Tween-20 mit 5% Magermilchpulver auf einem

Schüttler (Heidolph) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS, 0,5% Tween-20 wurde die Bindung des ersten Antikörpers für das zu untersuchende Protein durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug entweder 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation der Membran für 1h mit einem Peroxidase-gekoppelten IgG-Antikörper. Nach nochmals dreimaligem Waschen, um überflüssige Peroxidase-gekoppelte Antikörper zu entfernen, wurde die gebundene Peroxidase mit dem ECL-System von Amersham, Braunschweig, detektiert und auf speziellen Filmen (ECL-Hyperfilm, Amersham, Braunschweig) sichtbar gemacht.

1. Anti-körper	Firma	Verdünnung	Gelöst in	Spezies
c-myc	Santa-Cruz Biotechnology	1 : 250	5% Magermilchpulver in TBS + 0,1% Tween	Maus
c-myc	Santa-Cruz Biotechnology	1 : 250	5% Magermilchpulver in TBS + 0,1% Tween	Kaninchen
p21	Pharmingen	1 : 500	5% Magermilchpulver in TBS + 0,1 % Tween	Maus
PCNA	Trans Lab	1: 2500	3% Magermilchpulver in TBS + 0,1 % Tween	Maus
Aktin	Chemicon	1 : 3000	3% Magermilchpulver in TBS +0,1% Tween	Maus
Topoisomerase I	Santa Cruz	1 : 250	5% Magermilchpulver in TBS + 0,1 % Tween	Ziege

Abbildung 2.2. Primäre Antikörper für Western Blots

Je nach Spezies des verwendeten primären Antikörpers wurde der entsprechende zweite Antikörper eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur.

2. Antikörper	Firma	Verdünnung	in
Maus- Meerrettich- Peroxidase	Amersham Life Science	1 : 4000	5 % Milchpulver in TBS + 0,1 % Tween
Kaninchen	Amersham Life Science	1 : 4000	5% Magermilchpulve r in TBS + 0,1 % Tween
Ziege	Pierce	1 : 6000	5% Magermilchpulve r in TBS + 0,1 % Tween

Abbildung 2.3. Sekundär-Antikörper für Western Blots

2.7. Immunhistochemischer Nachweis der Proteinlokalisierung

Die Zellplatten wurden zweimal bei Raumtemperatur in PBS gewaschen, bevor sie in PBS + 4 % PFA für 15 min fixiert wurden. Nach wiederholtem zweimaligem Waschen in PBS, wurden die Zellen permeabilisiert, damit die Antikörper in die Zelle gelangen können und in 5 % Pferdeserum, 3 % BSA, 0,3 % Triton in PBS geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen (als Alternative kann auch die Mischung 10 % FBS, 0,3 % Triton in PBS verwendet werden). Nach 15 min wurde nochmals kurz gewaschen und nun der erste Antikörper in PBS + 0,1 % BSA (bzw. als Alternative PBS + 1,5 % FCS) gelöst auf die Zellkulturschalen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Zellplatten dreimal in PBS gewaschen und der mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte zweite Antikörper, gelöst in PBS + 1,5 % FCS, für eine Stunde zugegeben. Ab dieser Zeit wurde der Versuch in einer abgedunkelten Kammer fortgeführt, um die mit Fluoreszenz markierten Antikörper nicht unbrauchbar zu machen.

Zusätzlich wurden im folgenden Schritt die Zellkerne mit 4,6 Diamino-2-Phenylindol (DAPI; 0,2 µg/ml in 10 mM Tris/HCL, pH7; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl) für 7 min angefärbt. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde auf jede Zellplatte ein Tropfen Fluomount gegeben und die Platte mit Objektglas abgedeckt.

Die Auswertung und Fotografie erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 486 nm.

Für das Co-Immunostaining wurde darauf geachtet, daß die zwei ersten Antikörper von verschiedenen Spezies stammen, z.B. Maus und Kaninchen.

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	
C-Myc	Maus	Santa Cruz	1 : 70	In PBS + 0,1 % BSA
c-myc	Kaninchen	Santa Cruz	1: 70	In PBS + 0,1 % BSA
P 21	Maus	Pharmingen	1 : 70	In PBS + 0,1 % BSA
PCNA	Kaninchen	Santa Cruz	1 : 70	In PBS + 0,1 % BSA
PCNA	FITC markiert	DAKO	1 : 70	In PBS + 0,1 % BSA

Abbildung 2.4. Primäre Antikörper für Immunofluoreszenz

Zweitantikörper	Spezies	Firma	Verdünnung	
Biotinylierter anti-mouse IgG (H+L) made in horse	Maus	Vector Laboratories, Burlingame CA 94010	1 : 200	In PBS + 0,1% BSA
Biotin-SP-conjugated Affini pure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-rabbit IgG (H+L)	Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories	1 : 500	In PBS + 0,1% BSA
Streptavidin-Texas Red	Für die biotinylierten Proteine	Jackson Immuno Research Laboratories	1 : 100	In PBS + 0,1% BSA
FITC	Maus oder Kaninchen	DAKO	1 : 20	In PBS + 0,1% BSA

Abbildung 2.5. Zweitantikörper zur Immunofluoreszenz

3. Ergebnisse

3.1. Stabilität von p21 Waf1/Cip1

3.1.1. p21 Stabilität von Zellen im G0/G1-Arrest und in proliferierenden Zellen

Das p21 hat abhängig von seiner Konzentration gegensätzliche Effekte auf den Zellzyklus (LaBaer, 1997). Verschiedene Studien sprechen dafür, daß der Proteinlevel von p21 in Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus besonders hoch ist und in der S-Phase sinkt (El-Deiry, 1994; Nakanishi, 1995a). Um zu überprüfen, ob der hohe Proteinlevel durch eine vermehrte Transkription und Translation oder eine erhöhte Stabilität erfolgt, wurde mittels Cycloheximid die Translation gestoppt und die Degradation von p21 in Zellen im G0/G1-Arrest bzw. in Proliferation untersucht. Durch FACS-Analysen erfolgte eine Kontrolle des jeweiligen Zellzykluszustandes. Wie unter 2.3. (Methodenteil) beschrieben, wurden die Zellen mit Cyclohexamid inkubiert und der p21-Proteingehalt gemessen.

Die Abbildung 3.1. auf der nächsten Seite zeigt den noch verbleibenden Proteingehalt von p21 (Y-Achse) nach 1,5 und 3 h (X-Achse) an. p21 ist in HeLa-Zellen, die durch Serumentzug und anschließende Serumzugabe zur Proliferation gebracht wurden, instabiler. Nach 1,5 h sind nur noch knapp über 20 % (± 9) des p21 übrig, nach 3 h tendiert die Zahl gegen 5% ($\pm 4,5$). Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die durch Mimosin oder Serumentzug (- FCS) in den Zellzyklusarrest G1/G0 geleitet wurden, einen deutlich höheren Gehalt an p21. Nach 1,5 h in der -FCS-Gruppe 55 % (± 14), in der Mimosin-Gruppe sogar knapp 70 % ($\pm 13,8$). Nach 3 h ist in den -FCS und Mimosin-Gruppen der Gehalt an p21 mit 30 % (± 14 bzw. ± 7) 6mal so hoch als in der +/- FCS-Gruppe.

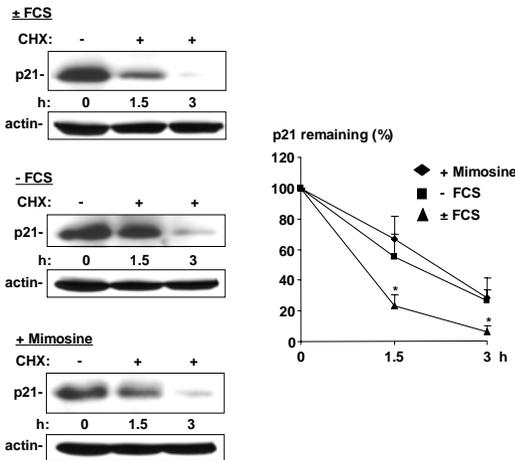


Abbildung 3.1.: Untersuchung der Degradation von p21 in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zellen

Erläuterung zur Abbildung 3.1. : Untersuchung der Degradation von p21 in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zellen

Zur Anregung der Proliferation wurden Hela-Zellen zunächst für 24h in Abwesenheit von Serum (FCS) kultiviert und anschließend für 18h mit 10% FCS-haltigem Medium stimuliert. Um den G0/G1-Arrest zu induzieren wurde nur für 24h Serum entzogen oder die pflanzliche Aminosäure Mimosin zugesetzt. Die Proteinaufarbeitung erfolgte wie unter 2.3. beschrieben. Gezeigt ist für jede Zellgruppe ein repräsentativer Westernblot mit einem gegen endogenes p21 gerichteten Antikörper. Anschließend wurde der Western Blot (s. 2.6.) mit einem Antikörper gegen Aktin behandelt, um die Gleichladung zu demonstrieren. Anschließend wurde die Dichte der Banden in Abhängigkeit zum Nullwert und der Aktinladung prozentual errechnet. Die Graphik zeigt die Degradation in drei Stunden von p21 in den drei verschiedenen Gruppen nach den Mittelwerten der errechneten Werte aus mindestens 4 Messreihen.

3.1.2. Auswirkungen der Phosphorylierung durch AKT auf die Stabilität von p21

Es gibt Mechanismen, die eine Degradation von p21 verhindern. Phosphorylierung spielt eine Hauptrolle in Ubiquitin-vermittelter Proteolyse. Um den Einfluß der Phosphorylierung auf die Stabilität von p21 zu untersuchen, wurden in Cos-7 Zellen myc Epitop-markierte p21 Konstrukte bzw. Mutanten, die die Phosphorylierung durch AKT an Threonin 145 simulieren bzw. eine Phosphorylierung durch AKT nicht zulassen, überexprimiert. Das phosphomimetische p21 Konstrukt (p21 T145D) simuliert die permanente Phosphorylierung von p21 an Threonin 145. In dem phosphorylierungsinaktiven p21 Konstrukt (p21 T145A) wurde die AKT Phosphorylierungsdomäne durch einen Austausch von Threonin mit Alanin inaktiviert. Das p21 WT stellt als unverändertes Protein den Wildtyp dar, welcher sowohl in phosphorylierter wie unphosphorylierter Form vorliegt.

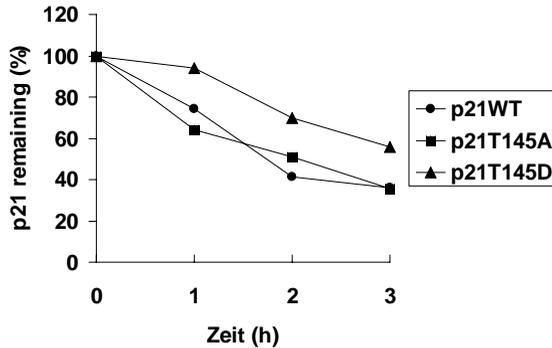


Abbildung 3.2.: Effekte auf die Degradation von p21 in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustand

Cos-7 Zellen wurden mit myc-Epitop-markierten p21 Konstrukten transfiziert. Anschließend wurde wie unter 2.4. beschrieben ein Pulse-chase durchgeführt. Aus jeweils drei unabhängig durchgeführten Experimenten pro p21 Konstrukt wurde die prozentuale Degradation in Abhängigkeit vom Nullwert errechnet. Auf der X-Achse ist der Zeitverlauf in Stunden (h) angegeben.

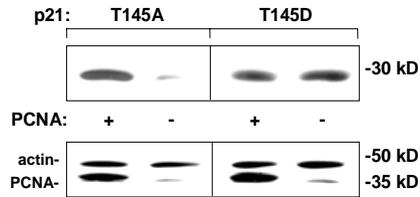
Die Abbildung 3.2. zeigt, daß nach einer Stunde 74% ($\pm 10,9$) von p21 WT, 64% ($\pm 26,5$) von p21 T145A und 94% ($\pm 34,5$) von p21 T145D übrig ist. Nach 2 Stunden sind 41,3% ($\pm 9,2$) von p21 WT, 51% (± 35) von p21 T145A und 70% (± 32) von p21 T145D vorhanden. Nach 3 Stunden sind 36,3 % (± 24) von p21 WT, 35% (± 14) von p21 T145A und 56% (± 15) von p21 T145D vorhanden. Es ergibt sich eine hohe Streuung, so daß kein signifikanter Unterschied bezüglich der Stabilität der verschiedenen p21- Mutanten zu erkennen ist.

Der Versuch zeigt, daß eine phosphomimetische oder phosphoablative Mutation an der AKT-Phosphor-Acceptor-Aminosäure Threonin 145 die Stabilität von überexprimiertem p21 in COS-7 Zellen nicht ändert.

3.1.3. Stabilisierung von p21 durch PCNA

Nicht nur Phosphorylierung, sondern auch Bindungspartner von Proteinen spielen für die Stabilität eine Rolle. Sie vermögen durch die Bindung ihre Partner vor Degradation zu schützen. Die PCNA-p21 Bindung scheint die Stabilität der beiden Proteine zu beeinflussen (Cayrol, 1996; Engel, 2003). Da in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, daß die AKT-Phosphorylierung von p21 an Threonin 145 die Interaktion mit PCNA bestimmt (Rössig, 2001), wurden für die weiteren Untersuchungen die myc-Epitop markierten p21 Mutanten p21 T145D und p21 T145A verwendet, um den Einfluß von PCNA auf die p21-Stabilität zu untersuchen. Das phosphomimetische p21 T145D kann nicht mehr an PCNA binden, die phosphorylierungsinactive Mutante p21 T145A dagegen schon. Da die endogene PCNA Konzentration bei Überexpression des Bindungspartners p21 möglicherweise limitierend ist, wurde PCNA cotransfiziert. Daher wurden COS-7 Zellen mit p21 T145D und PCNA, p21 T145A und PCNA cotransfiziert wie unter 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben. Zur Kontrolle wurde statt PCNA-Plasmid ein Leerplasmid verwendet. Um nun den Einfluß von PCNA auf die Stabilität von p21 nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen und Pulse Chase Studien durchgeführt.

A



B

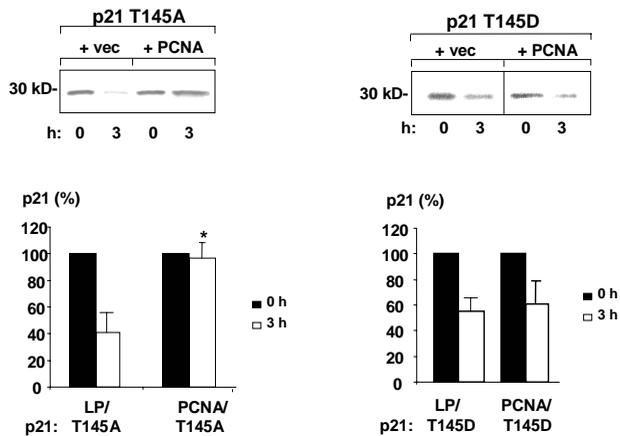


Abbildung 3.3.: Effekt von PCNA auf die Stabilität von p21T145A und p21T145D

COS-7 Zellen wurden mit den myc-Epitop-markierten p21 Konstrukten und PCNA cotransfiziert wie unter 2.2.2. beschrieben. Zur Kontrolle

wurde statt mit PCNA mit einem Leerplasmid cotransfiziert. **A** Nach der Proteinaufarbeitung wie unter 2.5. beschrieben erfolgte der Western-Blot mit einem gegen myc gerichteten Antikörper. Anschließend wurde der Western-Blot zur Kontrolle der Cotransfektion mit einem gegen PCNA gerichteten Antikörper behandelt und zur Kontrolle der Gleichladung mit einem gegen Aktin gerichteten Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot von drei unabhängigen Experimenten. **B** Anschließend wurde wie unter 2.4. beschrieben ein Pulse chase durchgeführt. Die Dichte der Banden wurden in Prozent zum Nullwert bestimmt und graphisch dargestellt. Der gezeigte Film ist repräsentativ für mindestens vier unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Abbildung 3.3. A zeigt, daß die p21 T145A Mutante durch PCNA stabilisiert wird. Die p21 T145D Mutante dagegen wird nicht durch PCNA stabilisiert. In Abbildung 3.3. B wird der Western Blot durch einen Pulse chase bestätigt. Hier zeigt sich, daß nach 3 h 56% (± 15) von p21 T145D + Leerplasmid übrig ist. In Anwesenheit von PCNA nicht signifikant mehr, insgesamt 60% (± 18). Von p21 T145A + Leerplasmid sind dagegen nach 3 h noch 40% (± 14) vorhanden, in Anwesenheit von PCNA signifikant mehr, nämlich 95% (± 7). PCNA stabilisiert die p21 T145A Mutante, hat aber keinen Einfluß auf die p21 T145D Mutante.

Nun stellte sich die Frage, ob PCNA durch direkte Bindung an p21 oder indirekt auf die Stabilisierung des nicht durch AKT phosphorylierten

p21 wirkt. Indirekt könnte PCNA durch Induktion von anderen Bindungspartnern von p21 Einfluß auf die unphosphorylierte Variante von p21 ausüben. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine weitere Mutante von p21 analysiert, welche an einer weiteren Stelle die PCNA-Bindung reguliert, und zwar am Methionin 147. Diese sogenannte p21 T145A M147A-Mutante kann nicht mehr an PCNA binden und ist auch nicht phosphorylierbar am Threonin 145 (Gulbis, 1996; Nakanishi, 1995b).

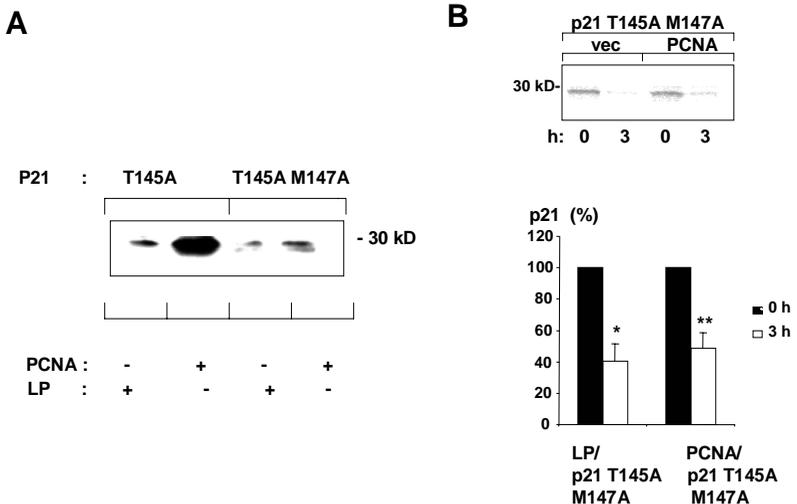


Abbildung 3.4.: Effekt von PCNA auf die Stabilität von p21 T145A M147A

COS-7 Zellen wurden mit den myc-Epitop-markierten p21 Konstrukten und PCNA cotransfiziert wie unter 2.2.2. beschrieben. Zur Kontrolle

wurde statt mit PCNA mit einem Leerplasmid cotransfiziert. **A** Nach der Proteinaufarbeitung wie unter 2.5. beschrieben erfolgte der Western Blot mit einem gegen myc gerichteten Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten. **B** Anschließend wurde wie unter 2.4. beschrieben ein Pulse chase durchgeführt. Der gezeigte Film ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Anschließend wurde die Dichte der Banden in Prozent zum Nullwert bestimmt und graphisch dargestellt.

In Abbildung 3.4. A wird dargestellt, daß PCNA p21 T145A stabilisiert. Die an Threonin 145 phosphorylierungs-inaktive Mutante p21 T145 A M147A dagegen, die nicht an PCNA binden kann, wird nicht durch PCNA stabilisiert. Die Abbildung 3.4. B bestätigt im Pulse Chase, daß nach 3h der Proteingehalt an p21 T145A M147A mit und ohne PCNA unverändert ist. Nach 3 h sind 41% (± 11) p21 T145A M147A + Leerplasmid übrig. In Anwesenheit von PCNA sind von p21 T145A M147A 49% (± 9) übrig. P21 T145A M147A bleibt von PCNA unbeeinflusst. Es ist also die direkte Interaktion zwischen PCNA und p21, die einen Einfluß auf die Stabilität von p21 hat.

3.2. Die subzelluläre Lokalisation von p21 Waf1/Cip1

Mehrere Literaturdaten (Sheaff, 2000) weisen darauf hin, daß p21 abhängig von seiner subzellulären Lokalisation und zwar hauptsächlich im Zellkern degradiert wird. Daher ist von Interesse, ob die

Stabilisierung von p21 durch PCNA und die Stabilität von p21 in arretierten Zellen mit der subzellulären Lokalisation in der Zelle zusammenhängt. Also war die erste Frage, die zu beantworten war, in welchem Zellkompartiment der PCNA-p21 Komplex liegt.

3.2.1. Lokalisation des p21-PCNA Komplex

Für diesen Versuch wurden COS-7 Zellen mit den myc Epitop-markierten p21 Konstrukten p21 T145A, p21 T145D und p21 T145A M147A transfiziert. Anschließend wurden sie aufgearbeitet und die Proben subzellulär fraktioniert. Die zellulären Kompartimente wurden daraufhin einzeln mit anti-myc Antikörpern immunopräzipitiert, die Proben anschließend mit Hilfe von SDS Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und im Immunoblotting mit PCNA-Antikörpern auf endogenes PCNA getestet.

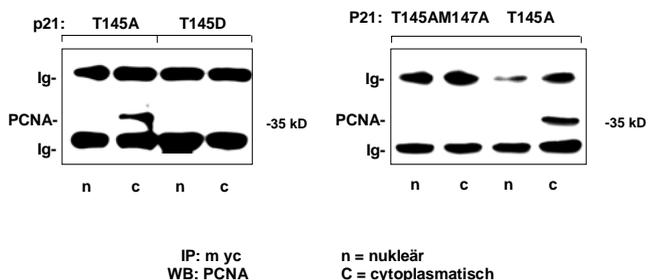


Abbildung 3.5.: Darstellung der Interaktion zwischen PCNA und p21T145A und subzelluläre Lokalisation des Komplexes

Erläuterung zur Abbildung 3.5. : Darstellung der Interaktion zwischen PCNA und p21T145A und subzelluläre Lokalisation des Komplexes

COS-7 Zellen wurden mit den myc Epitop-markierten p21 Konstrukten p21 T145A, p21 T145D und p21 T145A M147A transfiziert. Anschließend wurden die Proteine aufgearbeitet und subzellulär fraktioniert wie unter 2.5.1. und 2.5.2. beschrieben. Die zellulären Kompartimente wurden daraufhin einzeln mit anti-myc Antikörpern immunopräzipitiert wie unter 2.5.4. beschrieben. Dann wurde ein Western Blot durchgeführt, der mit Antikörpern gegen PCNA behandelt wurde. Gezeigt sind zwei repräsentative Blots von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung 3.5. bestätigt, daß die Mutante p21 T145A an PCNA bindet und nicht die Mutante p21 145D oder p21 T145A M147A. Außerdem zeigt die Abbildung, daß die Interaktion von p21 T145A mit PCNA im Cytosol stattfindet. Diese Daten überraschen zunächst, denn lange Zeit galt p21 als hauptsächlich nukleär lokalisiertes Protein. Allerdings ist p21 tatsächlich zum Teil auch im Zytoplasma gefunden worden (Engels, 2003).

3.2.2. Einfluß von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21

Mittels Immunofluoreszenzfärbung sollte im Folgenden geklärt werden, ob PCNA einen Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation von p21 haben könnte. Dazu wurden COS-7 Zellen mit den beiden myc-Epitop-markierten p21 Mutanten, der phosphomimetischen p21 T145D und der unphosphorylierbaren p21 T145A, und mit PCNA bzw. einem Leerplasmid als Kontrolle cotransfiziert.

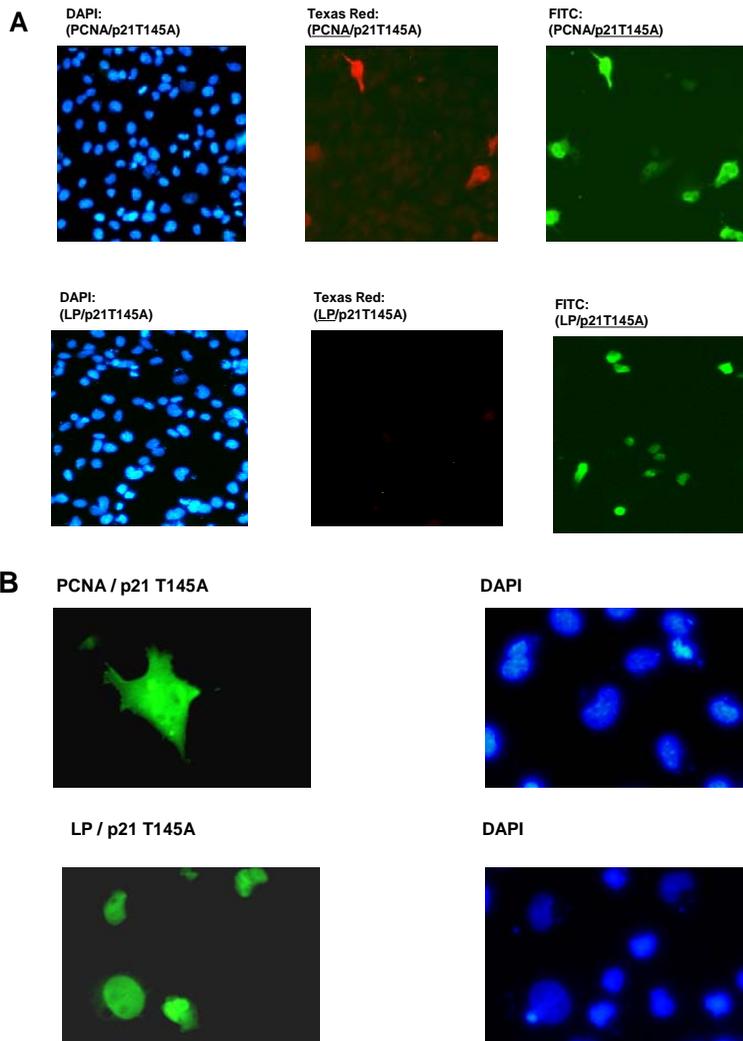


Abbildung 3.6. A+B : Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A (Immunhistochemie)

Erläuterung zur Abbildung 3.6. A+B : Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A (Immunhistochemie)

COS7-Zellen wurden mit der myc-Epitop markierten Mutante p21 T145A und mit PCNA bzw. Leerplasmid cotransfiziert. Daraufhin wurde wie unter 2.7. beschrieben ein immunhistochemischer Nachweis der Proteinlokalisierung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Im roten Kanal wurde PCNA detektiert (Texas Red), im grünen Kanal das p21 (FITC). **A** Übersicht des Co-Staining 1:400 **B** Vergrößerung 1:1000

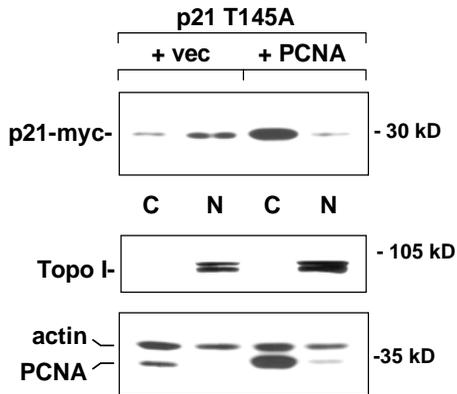
C

Abbildung 3.6.C: Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 (Western Blot)

COS-7 Zellen wurden mit der myc-Epitop markierten Mutante p21 T145A und mit PCNA bzw. Leerplasmid cotransfiziert. Darauf wurden die Proteine aufgearbeitet wie unter 2.5.1. beschrieben und eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt (2.5.2.). Anschließend wurde der Western Blot mit einem Myc-Antikörper behandelt und zunächst das p21 detektiert. Nach Entfernen des myc-Antikörpers wurde der Western Blot erneut mit einem PCNA-Antikörper, einem Aktin Antikörper behandelt. Zum Schluß wurde zur Kontrolle der subzellulären Fraktionierung dem Western Blot ein Topoisomerase Antikörper zugegeben. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

In der Abbildung 3.6. A+B ist die vorwiegend nukleäre Lokalisation von p21 T145A ohne Cotransfektion mit PCNA zu erkennen. Wenn p21 T145A dagegen mit PCNA überexprimiert wird, findet man eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. Die Immunohistochemischen Untersuchungen wurden mittels Proteinaufarbeitung und subzelluläre Fraktionierung im Western Blot bestätigt. In Abbildung 3.6. C zeigt sich ohne PCNA eine nukleäre Anreicherung von p21 T145A. Wird PCNA cotransfiziert, so ist p21 T145A vermehrt zytoplasmatisch zu finden. Der Western Blot mit einem Antikörper gegen Topoisomerase I demonstriert, dass die subzelluläre Fraktionierung erfolgreich war. Topoisomerase I findet sich nur im Nukleus. Aktin Antikörper wurden zur Kontrolle der Gleichladung eingesetzt. Aktin ist sowohl im Nukleus als auch zytoplasmatisch vorhanden.

Die folgende Abbildung 3.7. zeigt einen ähnlichen Versuchsansatz wie 3.6. A. Hier wurde statt p21 T145A p21 T145D verwendet, welches nicht an PCNA bindet.

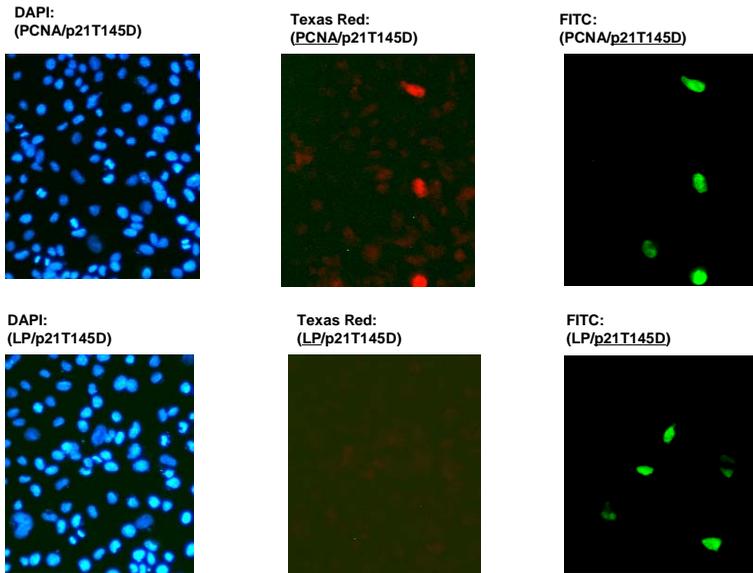


Abbildung 3.7.: Kein Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145D

COS7-Zellen wurden mit der myc Epitop-markierten Mutante p21 T145D und mit PCNA bzw. Leerplasmid cotransfiziert. Daraufhin wurde wie unter 2.7. beschrieben ein immunhistochemischer Nachweis der Proteinlokalisierung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Im roten Kanal wurde PCNA detektiert, im grünen Kanal das p21.

In der Abbildung 3.7. wird dargestellt, daß p21 T145D sowohl mit PCNA als auch ohne Überexpression von PCNA die nukleäre

Lokalisation beibehält. Die subzelluläre Lokalisation von p21 T145D bleibt von PCNA unbeeinflusst.

Diese Daten lassen vermuten, daß PCNA durch direkte Bindung an p21 an der cytosolischen Lokalisation von p21 beteiligt ist. Zwar zeigt die unphosphorylierte Mutante auch ohne PCNA eine leicht höhere zytoplasmatische Konzentration als die phosphomimetische Mutante, aber erst durch Cotransfektion mit PCNA steigt der Gehalt an zytoplasmatischem p21 deutlich an und übersteigt die Menge an nukleärem p21. Um zu klären, ob diese Translokation durch direkte Bindung von PCNA an das p21 zustande kommt oder die Phosphorylierung an Threonin 145 eine Rolle spielt, wurde der Versuch mit der p21 T145A M147A Mutante wiederholt, eine phosphomimetische Form, die nicht an PCNA binden kann.

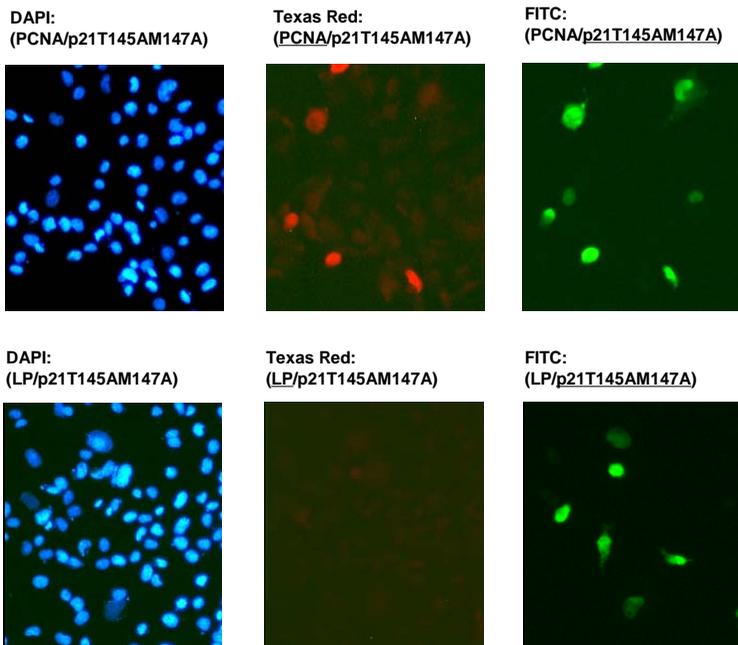


Abbildung 3.8.: Kein Effekt von PCNA auf die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A M147A

COS7-Zellen wurden mit der myc Epitop-markierten p21 T145A M147A Mutante und mit PCNA bzw. Leerplasmid cotransfiziert. Daraufhin wurde wie unter 2.7. beschrieben ein immunhistochemischer Nachweis der Proteinlokalisierung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Im roten Kanal wurde PCNA detektiert, im grünen Kanal das p21.

Die Abbildung 3.8. zeigt, daß die subzelluläre Lokalisation von p21 T145A M147A genauso wie das p21 T145D, die beide nicht an PCNA binden können, im Nukleus liegt. Sowohl mit PCNA als auch ohne Überexpression von PCNA ändert sich die subzelluläre Lokalisation im Nukleus von p21 T145A M147A nicht.

Damit wurde gezeigt, daß nicht der Zustand der Phosphorylierung an Threonin 145, sondern die direkte Bindung von PCNA an p21 eine Rolle in der subzellulären Translokation spielt.

Es läßt sich zusammenfassen, daß PCNA nicht nur einen Einfluß auf die Stabilität von p21, sondern auch auf die subzelluläre Lokalisation von p21 durch direkte Bindung an p21 ausübt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Stabilität von p21 in Abhängigkeit vom Zellzyklus und von seinem Bindungspartner PCNA untersucht. Anschließend wurden die subzellulären Verteilungen von p21 in Abhängigkeit von PCNA dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass PCNA durch direkte Interaktion mit p21 an seiner Stabilisierung beteiligt ist und dies vermutlich durch subzelluläre Translokation erfolgt. Bislang ist nur bekannt, daß die Funktion von p21 zum einen durch Degradation über das Ubiquitin- Proteasomsystem geregelt wird (Ciechanover, 2000; Blagosklonny, 1996) und zum anderen auch Ubiquitin-unabhängig (Sheaff, 2000). p21 werden besonders in der G1 und G2/M-Phase des Zellzyklus vielfältige Funktionen zugesprochen.

4.1. Bedeutung der p21 Stabilität in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zelle

Die experimentellen Befunde, die im Kapitel 3.1. dargestellt sind, belegen, daß p21 in Endothelzellen, die nicht proliferieren, also quasi in der G1-Phase sind, stabiler ist, als in proliferierenden Zellen. Dieses Ergebnis läuft konform mit den Aussagen anderer Studien, die erhöhte Proteinlevel von p21 in G1/G0Zellen bestätigen (El-Deiry, 1994; Nakanishi, 1995a). Die Ergebnisse zeigen, daß der erhöhte Proteinlevel

durch verminderte Degradation bedingt ist und nicht unbedingt durch gesteigerte Translation. Es scheint also Mechanismen zu geben, die eine Degradation von p21 während des Zellarrestes verhindern.

4.2. Bedeutung der p21 Stabilität in Abhängigkeit von der Phosphorylierung an Threonin 145

Phosphorylierung spielt eine Hauptrolle in Ubiquitin-vermittelter Proteolyse. Man weiß zum Beispiel von dem nahe verwandten p27, daß eine Ubiquitinierung in proliferierenden Zellen nur stattfinden kann, wenn p27 an Threonin 187 CDK-abhängig phosphoryliert wird und eine Formation mit dem Cyclin und der CDK-Untereinheit erfolgt (Montagnoli, 1999). Auch p21 wird an einem Threonin phosphoryliert. Das p21 wird PIK3-abhängig von der Threonin/Serin-Kinase AKT an Threonin 145 phosphoryliert (Rössig, 2001). Um zu sehen, ob die Phosphorylierung in ähnlicher Weise auch die Stabilität von p21 beeinflusst, wurde in Abbildung 3.2. eine Untersuchung mit transfiziertem p21 gemacht. Hierfür wurden drei verschiedene p21 Mutanten in ihrer Stabilität verglichen. Die Mutante p21 T145A ist die phosphorylierungsinactive Mutante, p21 T145D ist die phosphomimetische Mutante, welche eine AKT-Phosphorylierung an Threonin 145 simuliert und p21 WT ist der Wildtyp, welcher sowohl phosphoryliert als auch nicht phosphoryliert vorliegt. Die Abbildung 3.2. zeigt, daß die Stabilität der drei Mutanten nicht signifikant unterschiedlich ist. Unter diesen Bedingungen, bei Überexpression von p21, hat anscheinend eine Phosphorylierung durch AKT keine Wirkung

auf die Stabilität von p21. Hierin unterscheidet sich p21 deutlich von dem verwandten p27 (Chuang, 2001).

4.3. p21-Stabilität durch Bindung an PCNA

Nicht nur die Phosphorylierung, sondern auch Bindungspartner von Proteinen spielen in der Stabilität eine Rolle. Sie vermögen durch die Bindung, ihre Partner vor Degradation regelrecht zu schützen.

Die PCNA-p21 Bindung scheint die Stabilität der beiden Proteine zu beeinflussen. Cayrol und Ducommun (1998a) vermuten, daß PCNA p21 vor seiner Proteasom-abhängigen Degradation beschützt und haben gezeigt, daß die p21 turnover-Rate bei Bindung an PCNA verlangsamt ist. Umgekehrt haben Studien in adulten Kardiomyozyten gezeigt, daß zytoplasmatisches p21 PCNA destabilisiert (Engel, 2003).

Mit den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde gezeigt, daß p21 durch PCNA stabilisiert wird. Die Abbildung 3.3. zeigt, daß Anwesenheit von PCNA nur das p21 stabilisiert, an welches es direkt binden kann, in diesem Fall ist es die p21 T145A Mutante, die stabilisiert wird, im Gegensatz zur p21 T145D Mutante, die nicht mit PCNA interagiert. Die Abbildung 3.4., die den Versuch mit einer weiteren Mutante von p21, p21 T145A M147A, darstellt, unterstreicht das Ergebnis, daß nur eine direkte Bindung an PCNA eine Stabilität ermöglicht und diese Stabilisierung unabhängig von der AKT-Phosphorylierung ist. Das p21 T145A M147A kann weder an Threonin 145 phosphoryliert werden, noch an PCNA binden. Damit ist wiederum gezeigt worden, daß nicht

der Phosphorylierungszustand an Threonin 145 von p21 das p21 stabilisiert, sondern die direkte Bindung an PCNA.

Die Daten aus den Abbildungen 3.2. und 3.3. zeigen, daß p21 und PCNA im Gleichgewicht zueinander liegen müssen, damit PCNA das p21 durch direkte Bindung stabilisieren kann. Wird das p21 überexprimiert wie in Abbildung 3.2., dann liegt mehr p21 vor als PCNA und auch die p21 T145A Mutante, welche im Prinzip an endogenes PCNA binden kann, wird nicht durch PCNA stabilisiert. Erst durch Überexpression beider Proteine, gezeigt in Abbildung 3.3., läßt sich ein deutlicher Einfluß von PCNA auf die p21 Stabilität demonstrieren.

Die Mechanismen, über die PCNA das p21 stabilisieren könnte, sind vermutlich vielfältig. Im Folgenden sind mögliche Mechanismen aufgelistet.

4.3.1. Maskierung der Proteasom-Bindungsstelle von p21 durch PCNA

Wie zu Beginn der Diskussion erläutert, kann p21 Ubiquitin-unabhängig degradiert werden. Das p21 könnte direkt vom Proteasom erkannt werden. Man vermutet, daß die C8 α -Untereinheit vom 20S Proteasom mit dem C-Terminus von p21 interagiert und damit die Degradation einleitet. Dies ist ein möglicher Weg, wie nicht-ubiquitinierte Moleküle den 19S Regulierer des Proteasoms umgehen

und direkt an die 20S core Protease gebracht werden (Touitou, 2001). Genau diese direkte Bindung an das Proteasom am C-terminalen Ende von p21 könnte durch die PCNA-Bindung, die auch am C-terminalen Ende erfolgt, geblockt werden.

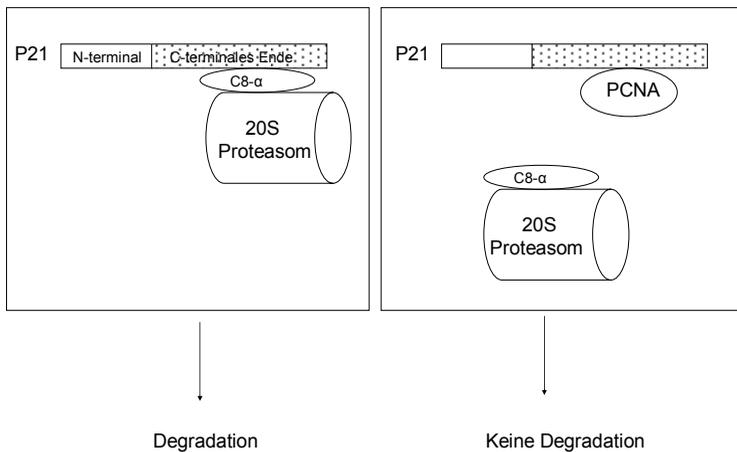


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der möglichen Maskierung der Proteasom-Bindungsstelle von p21 durch PCNA

Interessanterweise ergibt sich im Zusammenhang mit der C8-Untereinheit des 20S Proteasoms eine Vermutung, wie sich p21 zusätzlich vor direkter Proteasombindung schützen könnte. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, daß eine Akkumulation von p21 sich

selbst vor Degradation schützen kann, indem es die Proteasom-abhängige Proteolyse verhindert (Cayrol, 1998a). Noch ist hierfür kein Mechanismus beschrieben. Wenn man aber bedenkt, daß p21 die Caseinkinase II reguliert, und daß die Caseinkinase II die C8-Untereinheit vom 20S Proteasom phosphoryliert (Rivett, 2001), dann könnte es sein, daß eine Phosphorylierung des Proteasoms wiederum die Bindung an p21 verhindert, und damit p21 indirekt über den Weg der Caseinkinase II, sich selbst vor Degradation schützen kann.

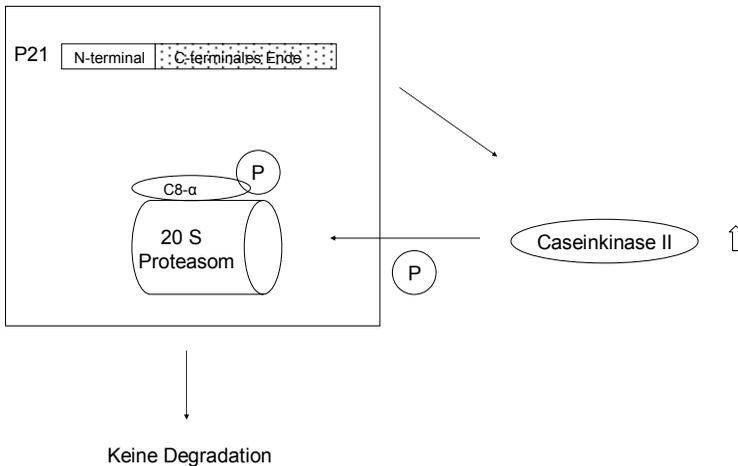


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung zur hypothetischen Wirkungsweise der Selbstprotektion von p21 vor Degradation mittels Aktivierung der Caseinkinase II

4.3.2. Stabilität von p21 in Abhängigkeit von der Cyclin/CDK-Anbindung

Die Bindung von p21 an PCNA führt zu einer verminderten Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) (Rössig, 2001). Eine verminderte Bindung von p21 an CDKs könnte die Stabilität von p21 erhöhen. p21 Mutanten, die keine Bindung mit CDKs eingehen können, zeigen eine verstärkte Stabilität und eine stark reduzierte Sensitivität zu Proteasom-vermittelter Proteolyse. Eine Assoziation mit Cyclin/CDK könnte also die p21 Degradation triggern (Cayrol, 1998a). Und umgekehrt könnte PCNA durch eine verminderte Assoziation von p21 mit den CDKs eine Degradation verhindern.

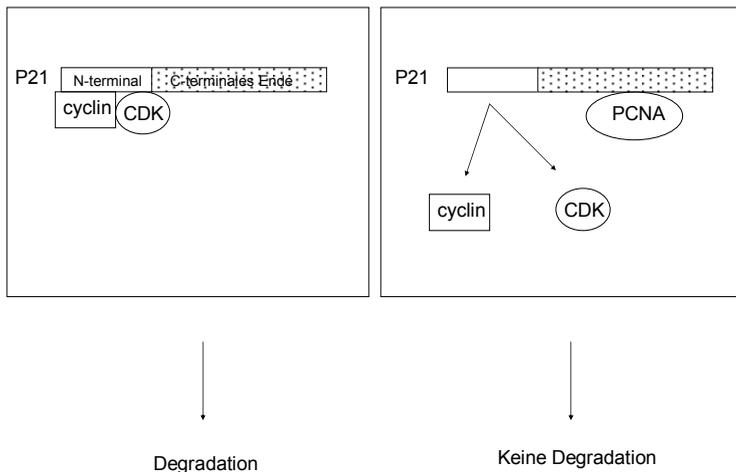


Abbildung 4.3.: Degradationsinhibition von p21 durch PCNA-Bindung und gelockerte Assoziation von p21 mit Cyclin-CDK

4.3.3. p21 Stabilität durch Bildung eines unlöslichen Komplexes mit PCNA

Die Forschergruppe um Cayrol (Cayrol, 1998a) hat schon früh vermutet, daß PCNA die proteasomale Degradation von p21 reduziert. Als möglicher Mechanismus wurde angenommen, daß p21 mit PCNA in unlöslichen Komplexen assoziiert ist und damit die Degradation blockiert.

4.3.4. Schutz vor Degradation durch die subzelluläre Lokalisation von p21

Das p21 Protein scheint im Nukleus degradiert zu werden, während es im Zytoplasma relativ stabil ist (Sheaff, 2000). Parallelen findet man hierzu beim verwandten p27, dessen nukleäre Lokalisation notwendig für eine Degradation ist (Chuang, 2001). Die Immunopräzipitationsversuche zeigen eindeutig, daß p21 mit PCNA im Zytoplasma interagiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß PCNA sogar einen Einfluß auf die zytoplasmatische Lokalisation von p21 hat. Es könnte also sein, daß die Interaktion von PCNA mit p21 im Zytoplasma zu einer Hemmung der p21 - Degradation im Nukleus führt.

Weitere Versuche müssten diese verschiedenen Möglichkeiten untersuchen. Mit den im Moment zur Verfügung stehenden Daten erscheint die Regulation der Degradation durch die im Folgenden beschriebene subzelluläre Lokalisation am wahrscheinlichsten.

4.4. Subzelluläre Lokalisation von p21 und PCNA

In der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von p21 in Abhängigkeit von PCNA und dem Phosphorylierungszustand von p21 untersucht. An der Abbildung 3.5. lässt sich anhand der Immunopräzipitation beweisen, daß der p21-PCNA-Komplex im Zytoplasma liegt. Die Immunofluoreszenzuntersuchungen in der Abbildung 3.6. zeigen, daß PCNA einen direkten Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation von p21 ausübt. Die Interaktion von PCNA mit Proteinen im Zytoplasma wurde zuvor von anderen Arbeiten beschrieben. Das CHL12 z.B. ist ein Faktor, der in Checkpoint-Antwort und Chromosomkohäsion involviert ist, und sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma an PCNA bindet (Ohta, 2002).

Eine Erklärung dafür wie zwei Proteine, die bislang hauptsächlich im Nukleus gefunden wurden, im Zytoplasma interagieren können, könnte sich aus der Überlegung ergeben, daß die Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) ganz in der Nähe der PCNA-Bindungsstelle liegt und durch bestimmte Konformationsänderungen, die auch die Nachbarschaft betreffen, quasi ausgelöscht werden könnte.

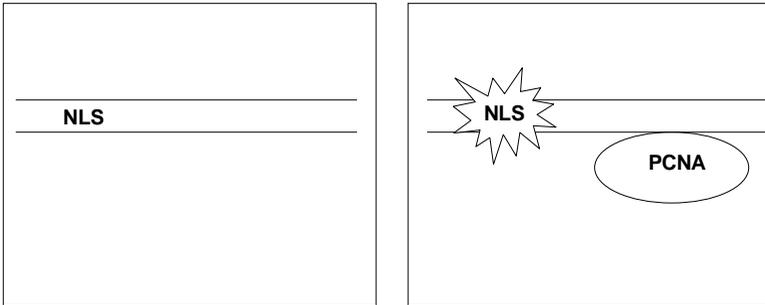


Abbildung 4.4: Schema zur Konformationsänderung der Nukleären Lokalisationssequenz von p21 durch PCNA-Bindung

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die p21- Calmodulin Interaktion porträtiert.

Calmodulin bindet an p21 und ist in der Regulation von der Nukleären Lokalisation von p21 involviert. Calmodulin ist ein Calcium-bindendes Protein, welches als Transduktor von intrazellulären Calciumsignalen agiert. Wenn es an Calcium gebunden ist, kann es auch andere Proteine an sich binden. Ohne Calmodulin kann p21 nicht in den Zellkern translozieren. Es wird vermutet, daß die Bindung von Calmodulin an p21 eine NLS von p21 exponiert (Tuales, 1999). Interessanterweise liegt die Calmodulin-Bindungsdomäne im Bereich von 145-164, also überlappend mit der PCNA-Bindungsdomäne von p21. Es könnte sein, daß PCNA verhindert, daß Calmodulin an p21 binden kann, und die NLS somit maskiert bzw. funktionslos gemacht wird. Es gibt Hinweise darauf, daß p21 seine vielfältigen Liganden erst durch seine Fähigkeit,

verschiedene Konformationen anzunehmen, erkennt. Für die Bindung an PCNA nimmt die C-terminale Domäne von p21 eine ausladende Struktur an, für die Bindung an Calmodulin eine Alphahelix (Esteve, 2003).

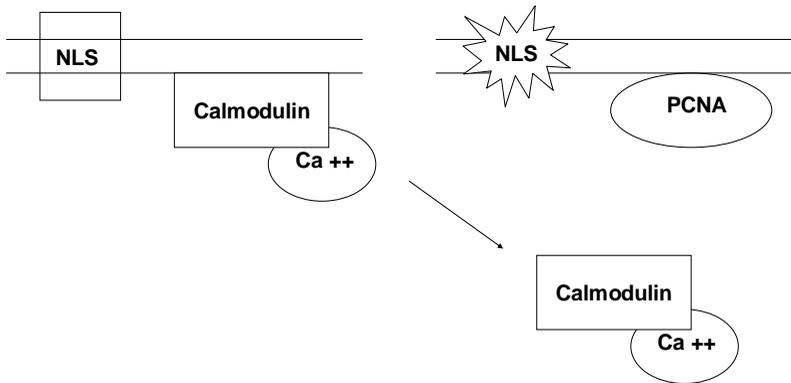


Abbildung 4.5.: Schema zur Darstellung der möglichen Calmodulin-Bindungsinhibition an p21 durch PCNA und damit Inhibition der Exposition der Nukleären Lokalisationssequenz

4.5. Bedeutung der p21-PCNA Bindung

4.5.1. Allgemein

Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern der CDK-Inhibitor-Proteine ist p21 zur direkten Inhibition der DNA -Replikation durch PCNA-Bindung fähig (Waga, 1994; Flores-Rozas, 1994; Gulbis, 1996). p21 und PCNA können in proliferierenden Zellen in einem Viererkomplex mit Cyclin D-CDK4 vorliegen (Zhang, 1994), und sie können direkt aneinander binden. Das C-terminale Ende von p21 enthält die Interaktionsstelle mit PCNA (Warbrick, 1995; Scott, 2000). Es handelt sich um eine direkte chemisch strukturelle Bindung (Flores-Rozas, 1994; Waga, 1994). Die Molare Ratio p21: PCNA in humanen diploiden Fibroblasten ist 1:1, dies lässt vermuten, daß die direkte inhibitorische Interaktion biologisch relevant ist (Li, 1996).

Das p21 scheint weder das Aufladen von PCNA auf die DNA durch den RF-C-Komplex zu beeinflussen, noch die Fähigkeit von PCNA, sich entlang der DNA zu bewegen (Gibbs, 1997; Podust, 1995). Das p21 führt vielmehr dazu, daß sich der PCNA-Ring nicht mehr an die DNA-Polymerase δ und ϵ heften kann, damit blockiert p21 die PCNA-Fähigkeit als Prozessfaktor für die DNA-Polymerase δ und ϵ und inhibiert die DNA-Replikation in vitro (Scott, 2000; Waga, 1994). Diese Inhibition kann durch einen PCNA-Überschuß aufgehoben werden (Waga, 1994; Shivji, 1994; Flores-Rozas, 1994). Man geht davon aus, daß die Inhibition der DNA-Replikation eine Schutzfunktion

vor DNA-Synthese von geschädigter DNA oder Endoreduplikation ist. Die zweite wichtige Funktion von PCNA ist die Nukleotid-Exzisionsreparatur. In wieweit p21 in die Regulation der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) eingreifen kann, und ob p21 PCNA-abhängig die NER stimulieren kann, wird noch kontrovers diskutiert. p21-Null-Zellen können bestimmte DNA-Schäden nicht effizient beseitigen (Savio, 1996; McDonald, 1996). Andererseits gibt es Studien, die vermuten lassen, daß p21 die NER sogar inhibieren kann, wenn es in fünfzigfachem Überschuss zu PCNA vorliegt. Die Zellen bleiben aber weniger sensibel auf die Inhibition der NER als auf die Inhibition der Replikation (Cooper, 1999). Daß andere Proteine durch direkte Bindung an PCNA und p21 in die DNA-Replikation und Reparatur involviert sein können, zeigt eine neuere Studie mit der poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) (Frouin, 2003). Es gibt Hinweise darauf, daß die Fähigkeit von p21, Zellen in der G2-Phase zu arretieren auch PCNA-abhängig ist (Cayrol, 1998b; Niculescu, 1998; Rigberg, 1999; Dulic, 1998). Studien mit p53 defizienten Kolonkarzinomzellen nach induziertem DNA-Schaden zeigen, daß nur Wildtyp p21, gebunden an Cdc2, Cyclin B1 und PCNA, zu G2 Arrest führt, aber nicht eine p21 Mutante, die nicht an PCNA binden kann (Cayrol, 1998b). Zusätzlich konnte p21WT kompetitiv die Bindung von PCNA zu Cdc25C hemmen. Diese Bindung spielt vermutlich in der G2/M - Transitionsphase eine Rolle (Ando, 2001). Hier könnte die Bedeutung für die Stabilisierung von p21 durch PCNA liegen, die zu einem G2/M - Arrest durch p21 führt.

4.5.2. Bei Tumor-assoziierten Erkrankungen

Die besondere Bedeutung des p21-PCNA-Komplexes bei Tumoren liegt darin, daß die Komplexbildung nach einem DNA-Schaden erfolgt. Vermutlich spielt diese Verbindung eine Rolle in der Prävention von Endoreduplikation, Inhibition der S-Phasen Progression und der Unterstützung der DNA-Reparatur (Scott, 2000).

Daß die PCNA-p21 Bindung auch bei viralen Erkrankungen, die mit einer Tumorentwicklung assoziiert sind, eine Rolle spielt, zeigt eine Studie mit dem Hepatitis C-Virus (Wang, 2000). Das Coreprotein von HCV kann mit p21 interagieren, wobei die C-terminale Region von p21 (Aminosäuren 139-164) involviert ist. Die Bindung von HCV mit p21 scheint mit PCNA zu kompetitieren und man vermutet, daß die Bindung des HCV-Core-Protein mit p21 im Zytoplasma stattfindet. Ein weiteres Indiz, daß p21 mit mehreren Bindungspartnern gerade im Zytoplasma interagiert und dort eine ebenso wichtige Funktion hat wie im Nukleus.

4.5.3. Die Rolle der p21-PCNA Bindung im Zytoplasma

Außer dem Schutz vor Degradation im Nukleus von p21 kann die p21-PCNA- Bindung auch Auswirkung auf PCNA haben. p21 verhindert damit die Funktion von PCNA an die DNA-Polymerasen zu binden. Diese Funktion von PCNA findet normalerweise im Nukleus statt und kann durch die zytoplasmatische Lokalisation von PCNA nicht mehr erfolgen. Damit wäre der Mechanismus erklärt, wie p21 die Funktion von PCNA hemmt.

Eine wichtige Rolle von p21 scheint der Schutz der Zellen vor Apoptose zu sein. p21 defiziente Zellen sind sensibler auf p53-vermittelte Apoptose (Polyak, 1996), ebenso zeigen Endothelzellen aus p21 knock-out Mäusen eine 3,5 fache Apoptosesensitivität (Bruhl, 2004), und eine Inhibition von Shear-Stress-vermittelter Apoptose ist mit p21 Expression assoziiert (Guadagno, 1996; Mattiussi, 2004). Die antiapoptotischen Effekte werden dem zytoplasmatischen p21 zugeschrieben. Zytoplasmatisches p21 formt z.B. einen physikalischen Komplex mit der Apoptose Signal regulierenden Kinase 1 (ASK1) (Asada, 1999).

Außerdem hat man im Bronchialepithel von Asthmapatienten einen erhöhten p21-Gehalt gefunden, welcher hauptsächlich im Zytoplasma zu finden war (Puddicombe, 2003). Bronchialepithelzellen von Asthmapatienten leiden unter Sauerstoffmangel. Es wurde gezeigt, daß p21 in sauerstoffgestressten Zellen vorwiegend zytoplasmatisch ist, und es wird vermutet, daß zytoplasmatisches p21 als Onkoprotein antiapoptotisch aktiv sein kann (Blagosklonny, 2002). p21 kann mittels Prävention von Duplikation geschädigter DNA vor Apoptose schützen (Scott, 2001). Ob p21 nun in Verbindung mit PCNA antiapoptotische Effekte hat oder diese Verbindung durch Inhibition von p21 zu Apoptose führt, ist noch unklar. Eine erst kürzlich erschienene Studie zeigt auf, daß die Bindung p21-PCNA bei Karzinomzellen Apoptose induzieren kann. Hier wurde im Zusammenhang mit dem Zytostatikum Natrium-butyrat die induzierte Apoptose von MCF-7 Brustkrebszellen untersucht und gezeigt, daß dies nur mittels p21 und seine Interaktion mit PCNA möglich ist (Chopin, 2004).

Eine andere Rolle von p21 und PCNA im Zytoplasma könnte in der Inhibition von dem nukleären Transport von CDK/Cyclin-Verbindungen durch Calmodulin liegen. Calmodulin reguliert die nukleäre Translokation von CDK4 und Cyclin D1 (Tales, 1998). Dabei interagiert es allerdings nicht alleine mit diesen Zellzyklusproteinen, sondern ein weiteres Protein wird als Bindungsprotein gebraucht. P21 scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der nukleären Translokation von CKD4-Cyclin D1 zu haben (LaBaer, 1997; Cheng, 1999). p21 fördert wahrscheinlich die Assoziation von CDK4 mit D-typ Cyclinen mit dem Ziel, CKD4 und cyclin D1 in den Zellkern zu bringen (LaBaer, 1997). Hier liegt die Vermutung nahe, daß p21 dieses wichtige Verbindungsprotein zwischen Calmodulin und CKD4-Cyclin D1 sein könnte. Damit würde p21 durch eine zytoplasmatische Lokalisation und Bindung an PCNA nicht mehr als Verbindungsprotein für CKD4-CyclinD1 und Calmodulin zur Verfügung stehen. Die Translokation von CKD4-CyclinD1 könnte dadurch inhibiert sein, und ein weiterer Mechanismus des Zellarrestes wäre dadurch erklärbar.

4.5.4. Weitere Bedeutung der subzellulären Lokalisation von p21

Ursprünglich wurde gedacht, daß p21 hauptsächlich nukleär liegt. Inzwischen wurde gezeigt, daß die Lokalisation zwischen

verschiedenen Zellkompartimenten streng reguliert ist. Seine zytoplasmatische Lokalisation scheint dabei mindestens ebenso wichtig zu sein wie seine nukleäre Funktion. Schon früh wurde vermutet, daß p21 zu verschiedenen Zykluszeiten entweder im Nukleus oder Zytoplasma akkumuliert (Nakanishi, 1995a).

Zwar korreliert die inhibitorische Aktivität auf den Zellzyklus von p21 häufig mit seiner nukleären Lokalisation in Fibroblasten und Epithelzellen und diese Eigenschaft scheint verantwortlich für die frühen Stadien des Differenzierungsprogrammes zu sein (Jiang, 1994; Steinman, 1994), aber auch ein Teil des zytoplasmatischen p21, wenn es überexprimiert ist, führt zu 20% in den Zellarrest (Rodriguez-Vilarrupla 2002). Die Funktion von p21 als ein Zellzyklusinhibitor oder als Gegenspieler der Apoptose wird vermutlich durch seine subzelluläre Lokalisation mitbestimmt.

Es bleibt nicht auszuschließen, daß die Bindung PCNA - p21 eine Rolle vor allem an den Checkpoints G1/S und G2/M spielt als im G0/G1-Arrest. Im weiteren Verlauf bleibt zu untersuchen, ob der prozentuale zytoplasmatische Anteil von p21 in diesen Phasen deutlich höher ist.

4.6. Schlusswort / Kritik

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, daß PCNA durch direkte Interaktion mit p21 an seiner Stabilisierung beteiligt ist. Durch die subzellulären Fraktionierungen wird deutlich, daß diese Stabilisierung mit der subzellulären Lokalisation im Zusammenhang steht.

Kritisieren an dieser Arbeit könnte man, dass nur mit Zellen von Tumorlinien gearbeitet wurde. Die Überexpression lässt sich in diesen Zellen besser durchführen, da die Effizienz und Menge der Proteinexprimierung deutlich höher als in primären Zellen ist. Es gibt Hinweise darauf, dass p21 in Tumorzellen gehäuft zytoplasmatisch gefunden wurde (Winters ZE, 2001). Dies könnte die Ergebnisse verfälschen. Andererseits lässt sich gerade durch Überexpression das Gleichgewicht und Ungleichgewicht zwischen den Proteinen p21 und PCNA und die Folgen daraus demonstrieren. Überexpression von p21 zeigte auch in den untersuchten Tumorzelllinien eine nukleäre Lokalisation. Physiologisch liegen p21 und PCNA vermutlich im Gleichgewicht zueinander vor.

5.1 Zusammenfassung

Das Protein p21 (*Cip1/Waf1/Sdi1*), ein Mitglied der Familie der Cyclin abhängigen Kinasen-Inhibitoren, ist ein wichtiger Modulator des Zellwachstums und der Reaktion auf DNA-Schädigung. Die Funktion von p21 hängt von der Stabilität des Proteins ab. p21 ist besonders stabil in der Phase G0/G1 des Zellzyklus. Phosphorylierungsvorgänge sowie Interaktionen mit anderen Proteinen spielen in der Stabilität von Proteinen eine wichtige Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, herauszufinden, ob die Phosphorylierung von p21 durch die Proteinkinase AKT oder die durch diese Phosphorylierung beeinflusste Interaktion mit dem Proliferating cell nuclear antigen, kurz PCNA, einen Einfluß auf die Stabilität von p21 hat.

Mittels Proteinhalbwertszeitbestimmung konnte demonstriert werden, daß die Phosphorylierung am Threonin 145 durch AKT keinen signifikanten Einfluß auf die Stabilität von p21 aufwies. Durch Pulse chase und Western-Blot Versuche konnte aber nachgewiesen werden, daß die Anwesenheit von PCNA das Protein p21 stabilisierte und die Degradation beeinflusste. Es konnte mittels p21 Mutanten, deren PCNA- Bindung durch Austausch der Aminosäure (M147) inhibiert ist, gezeigt werden, daß nur eine direkte Bindung von PCNA an p21 die Degradation beeinflussen konnte. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von p21, die zur weiteren Abklärung der erhöhten p21-

Stabilität durch PCNA diente, zeigte in Immunopräzipitationsversuchen nach subzellulärer Fraktionierung eine Interaktion von p21 mit PCNA vorwiegend im Zytoplasma. Dies ließ sich auch durch Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigen. Schließlich zeigten die Untersuchungen, daß die subzelluläre Lokalisation von der direkten Bindung an PCNA abhängig war.

Zusammenfassend zeigte die Arbeit auf, daß die Stabilität von p21 durch seinen Bindungspartner PCNA beeinflusst werden konnte, und dies vermutlich durch subzelluläre Translokation erfolgt.

5.2 Summary

p21 (*Cip1/Waf1/Sdi1*), a family member of Cyclin-dependent kinase-inhibitors, is an important modulator of cell-growth and cell-response to DNA damage. The action of p21 depends on its stability. It is known that p21 is more stable in G0/G1 phase of the cell's cycle. Its stability is regulated by post-translational mechanisms including phosphorylation and protein-protein interactions.

The aim of the study was to investigate, if p21 stability depends on its phosphorylation by protein kinase AKT or by interaction with PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen, which depends on the AKT phosphorylation.

Pulse-chase and Western blot analysis showed that phosphorylation of p21 on Threonine 145 by AKT did not have a significant stabilisation effect. However, p21 was stabilized by the presence of PCNA. Moreover, p21 constructs, abrogated in their binding capacity to PCNA, showed that the direct binding of PCNA to p21 caused an inhibition of p21 degradation.

Investigation of the subcellular localisation of both proteins helped to understand the increased stability. Furthermore, subcellular fractionation and immunoprecipitation demonstrated the localisation of p21-PCNA complex in the cytoplasm. Finally, immunofluorescence-methods confirmed the subcellular localisation of p21 and PCNA as

well as the dependency of the p21 subcellular localisation on a direct binding to PCNA.

In conclusion, the results of the present work proved that stability of p21 was influenced by its binding protein PCNA. As a matter of fact, subcellular translocation was supposed to be the mechanism.

Literaturverzeichnis

Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T, 2001, Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage, *J Biol Chem* 276:42971-42977

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S, 1999, Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/Waf1 in monocytic differentiation. *EMBO Journal* Vol.18 No.5: 1223-1234

Blagosklonny MV, 2002, Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle* 1:391-393

Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, el-Deiry WS, 1996, Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression. *Biochem Biophys Res Comm* 227:564-569

Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R, 2000, The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21Waf1. Review *Pathol Biol (Paris)* 48:190-202

Bruhl T, Heeschen C, Aicher A, Jadidi AS, Haendeler J, Hoffmann J, Schneider MD, Zeiher AM, Dimmeler S, Rossig L, 2004, p21Cip1 levels differentially regulate turnover of mature endothelial cells,

endothelial progenitor cells, and in vivo neovascularization. *Circ Res.* 94:686-692

Burgering BMT, Coffey PJ, 1995, Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376:599-602.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Grisch S, Reed JC, 1998, Regulation of cell death by protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321

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

Cayrol C, Ducommun B, 1998a, Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* 17:2437-44

Cayrol C, Kniebiehler M, Ducommun B, 1998b, p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16:311-320

Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB, 2000, Effects of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) on cellular gene expression: Implications for carcinogenesis, senescence and age-related diseases. *PNAS* vol.97, no.8, 4291-4296

Chen IT, Smith ML, O'Connor PM, Fornace AJ, 1995, Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene* 11:1931-1937

Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A, 1996, Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21 Cip1. *Molecular Cell Biology* 16:4673-82

Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ, 1999. The p21Cip1 and p27Kip1 CDK'inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18:1571-1583

Chopin V, Toillon RA, Jouy N, Le Bourhis X, 2004, p21(Waf1/Cip1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 23:21-29

Chuang LC, Yew PR, 2001, Regulation of nuclear transport and degradation of the Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Xic1. *J Biol Chem* 276:1610-1617

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL, 2000, Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22:442-451

Cooper MP, Adayabalam SB, Bohr VA, 1999, the C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair in vitro and in vivo. 10:2119-2129

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA, 1995, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789

Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis P, 1996, Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 271:30835-30839.

Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G, 1997, Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689

Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK, Dotto, GP, 1998, Inhibitory function of p21Cip1/Waf1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280:1069-1072

Dimmeler S, Fisslthaler B, Fleming I, Hermann C, Busse R, Zeiher AM, 1999, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells via Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605

Dimri GP, Nakanishi M, Desprez PY, Smith JR, Campisi J, 1996, Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 16:2987-2997

Downward J, 1998, Lipid-regulating kinases: some common themes at last. *Science* 279:673-674

Dulic V, Stein G, Far D, Reed S, 1998, Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 18:546-557

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

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B, 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825

El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, 1994, WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research* 54:1169-1174

Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R, 2003. p21 Cip1 controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes, *Molecular and Cellular Biology* 23:555-565

Esteve V, Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Aligue R, Agell N, Mingarro I, Bachs O, Perez-Paya E, 2003, The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition, *Chembiochem.* 4:63-869

Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J, 1994, Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the CAN polymerase Delta holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:8655-8659

Fotadar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Doree M, Messier H, Fotadar A, 1996. p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* 12:2155-2164

Franke TF, Yang S-I, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN, 1995, The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogen is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* 81:727-736.

Frouin I, Maga G, Denegri M, Riva F, Savio M, Spadari S, Prosperi E, Scovassi AI, 2003, human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose)polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners. *J Biol Chem.* 278:39265-39268

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC, 1999, Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601

Funk JO, Kind P, 1997, Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Der Hautarzt* 48:157-165

Gartel AL, Tyner AL, 1998, Molecular and Subcellular Biology, ed. Macieir-Coelho A, Springer Berlin 20:43-71

Gibbs E, Kelman Z, Gulbis JM, O'Donnell M, Kuriyan J, Burgers PMJ, Hurwitz J, 1997, The influence of the proliferating cell nuclear antigen-interacting domain of p21Cip1 on DNA Synthesis catalyzed by the human and *Saccharomyces cerevisiae* Polymerase δ holoenzymes, *The journal of biological chemistry* 272: 2373-2381

Goubin F, Ducommun B, 1995, Identification of binding domains on the p21Cip1 Cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogen* 10:2281-2287

Guadagno TM, Newport JW, 1996, Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* 84:73-82

Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J, 1996. Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87:297-306

Harper JW, 1997, Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 29:91-107

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell CL, Swindell E, et al. ,1995, Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol. Cell* 6:387-400

Hartwell LH, Kastan MB, 1994, Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1928

Haffner R, Oren M , 1995, Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Gen. Dev* 5:84-90

Hengst L, Göpfert U, Lashuel HA, Reed SI, 1998, Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21 Cip1. *Genes & Development* 12:3882-3888

Hermeking H, Funk JO, Reichert M, Ellwart JW, Eick D, 1995
Abrogation of p53 induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an
inhibitor of p21 WAF1/Cip1, *Oncogene* 11:1409-1415

Imai H, Harland J, McCulloch J, Graham DI, Brown SM, Macrae IM,
2002, Specific expression of the cell cycle regulation proteins,
GADD34 and PCNA, in the peri-infarct zone after focal cerebral
ischaemia in the rat. *Eur J Neuroscience* 15:1929-1936

Jiang H, Lin J, Su ZZ, Collart FR, Huberman E, Fisher PB, 1994,
Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia
cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53.
Oncogene 9:3397-34

Jonsson ZO, Hindges R, Hubscher U, 1998, Regulation of DNA
replication and repair proteins through interaction with the front side of
proliferating cell nuclear antigen, *Embo Journal* 17:2412-25

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW,
1991, Participation of p53 protein in the cellular response to DNA-
damage, *Cancer Res.* 51:6304-6311

Khwaja A, Rodriguez-Viciano P, Wennström S, Warne PH, Downward
J, 1997, Matrix adhesion and Ras transformation both activate a
phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular
survival pathway. *EMBO J* 16:2783-2793.

Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA, 1996, Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem* 271:21920-21926

Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smiths AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM, 1999, Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398:630-634

Krishna TSR, Kong X-P, Gary S, Burgers P, Kuriyan J, 1994, Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA, *Cell* 79:1233-1243

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB, 1992, Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7491-7495

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattley A, Harlow E, 1997, New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11:847-862

Lee MH, Reynisdottir I, Massagué J, 1995, Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9:639-649

Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R, 1998, Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1

mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*. 1:553-63.

Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B, 1996, Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr. Biol*. 6:189-199

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

Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson SA, 2002, Inhibition of p21-mediates ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO Journal* 21:2180-2188

Massaqué J, Polyak K, 1995, Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opinion Genetics Cev* 5:91-96

Matsumoto Y, 2001, Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. Review *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68:129-138

Mattiussi S, Turrini P, Testolin L, Martelli F, Zaccagnini G, Mangoni A, Barlucchi LM, Antonini A, Illi B, Cirielli C, Padron J, Nicolo C, Testi R, Osculati F, Biglioli P, Capogrossi MC, Gaetano C, 2004, p21(Waf1/Cip1/Sdi1) mediates shear stress-dependent antiapoptotic function. *Cardiovasc Res*. 61:693-704

McDonald ER 3rd, Wu GS, Waldman T, El-Deiry WS, 1996, Repair defect in p21 WAF1/CIP1 $-/-$ human cancer cells. *Cancer Res.* 56:2250-2255

Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Kunieda T, Komuro I, 2004, Akt-induced cellular senescence: Implication for human disease. *Cell Cycle* 2004 Apr; 3(4)

Morgan DO, 1997, Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu.Rev. Cell Dev. Biol.* 13:261-291

Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M, 1999, Ubiquitination of p27 is regulated by CDK-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes & Development* 13:1181-1189

Nakanishi M, Adami GR, Robetorye RS, Noda A, Venable SF, Dimitrov D, Pereira SO, Smith JR, 1995a, Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing p21Sdi1 antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:4352-4356

Nakanishi M, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR, 1995b, The C-terminal region of p21Sdi1/Waf1/Cip1 is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition. *J Biol Chem* 270:22008-22016

Nichols AF, Sancar A, 1992, Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucl. Acids Res.* 20:2441-2446

Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI, 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

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira SO, Smith JR, 1994, Cloning of senescent cell- derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211:90-98

Ohta S, Shiomi Y, Sugimoto K, Obuse C, Tsurimoto T, 2002, A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. Identification of the human CHL12/ RFCs2-5 complex as a novel PCNA-binding protein. *J Biol Chem* 277:40362-40367

Park JA, Kim KW, Kim SI, Lee SK, 1998. *Eur J Biochem* 257:242-248

Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE, 2001, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. Review. *Int J Radiat Biol* 77:1007-1021

Podust VN, Podust LM, Goubin F, Ducommun B, Hübscher U, 1995, Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry* 34:8869-8875

Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B, 1996, Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 10:1945-1952

Prosperi E, 1997, Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog. Cell Cycle Res.* 3:193-210

Puddicombe SM, Torres-Lozano C, Richter A, Bucchieri F, Lordan JL, Howarth PH, Vrugt B, Albers R, Djukanovic R, Holgate ST, Wilson SJ, Davies DE, 2003, Increased expression of p21 (waf) cyclin-dependent kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:61-8

Reed SL, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J, 1994, G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 18:69-73

Riede UN, Schaefer HE, 1995, Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*, pp:344-392

Rigberg, DA, Blinman TA, Kim FS, Cole MA, McFadden DW, 1999, Anitsense blockade of p21/WAF1 decreases radiation-induced G2 arrest in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Res* 81:6-10

Rivett AJ, Bose S, Brooks P, Broadfoot, 2001. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie* 83:363-366

Rodriguez-Vilarrupla A, Diaz C, Canela N, Rahn HP, Bachs O, Agell N, 2002, Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett* 531:319-323

Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S, 2001, Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 21:5644-5657

Romashkova JA, Makarov SS, 1999, NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401:86-90

Rousseau D, Cannella D, Boulaire J, Fitzgerald P, Fotedar A, Fotedar R, 1999, Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 18:3290-3302

Ryan JJ, Danish R, Gottlieb CA, Clake MF, 1993, Cel cycle analysis of p53 induced cell death in Murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell Biol.* 13(1):711-719

Savio M, Stivala LA, Scovassi AI, Bianchi L, Prosperi E, 1996, p21waf1/cip1 protein associates with the detergent- insoluble form of PCNA concomitantly with disassembly of PCNA at nucleotide excision repair sites. *Oncogene* 13:1591-1598

Scott MT, Morrice N, Ball KL, 2000, Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21(Waf1/Cip1) modulates Proliferating cell nuclear antigen binding. *The Journal of Biological Chemistry* 275:11529-11537

Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert F-M, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K, 2001, UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *Journal of Cell Science* 114, 3455-3462

Shan B, Xu J, Zhuo Y, Morris CA, Morris GF, 2003, Induction of p53-dependent activation of the human proliferating cell nuclear antigen gene in chromatin by ionizing radiation. *J Biol Chem.* 278: 44009-44017

Sheaff RJ, Singer, JD; Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE, 2000, Proteasomal turnover of p21(Cip1) does not require p21(Cip1) Ubiquitination. *Molecular Cell* Vol.5:403-410

Sherr CJ, Roberts JM, 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev.* 9:1149-1163

Shivji MKK; Kenny MK, Wood RD, 1992, Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:367-374

Shivji MKK, Grey SJ, Strausfeld UP, Wood RD, Blow JJ, 1994, Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr. Biol.* 4:1062-1068

Soria G, Podhajcer O, Prives C, Gottifredi V, 2006, p21 (Cip/WAF1) downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene*, Epub ahead of print 2006 Jan 9

Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, El-Houseini ME, 1994, Induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9:3389-3396

Studzinski GP, Harrison LE, 1999, Differentiation-related changes in the cell cycle traverse. *Int. Rev. Cytol.* 198:1-58

Su JY, Rempel RE, Erikson E, Maller L, 1995, Cloning and characterization of the *Xenopus* cyclin-dependent kinase inhibitor p27(xic1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10187-10191

Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M, 1998, Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogen*, Aug 27;17(8):931-9.

Tamamori M, Ito H, Hiroe M, Terada Y, Marumo F, Ideda MA, 1998, Essential roles for G1cyclin-dependent kinase activity in development of cardiomyocyte hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 275:H2036-H2040

Taulés M, Rodriguez-Vilarrupla A, Rius E, Estanyol JM, Casanovas O, Sacks D, Pérez-Payá E, Bachs O, Agell N, 1999. Calmodulin binds to p21Cip1 and is involved in the regulation of its nuclear localization. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.274 No.35 pp24445-24448

Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ, 2001, A degradation signal located in the C-terminus of p21 WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 20:2367-75

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B, 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574-578

Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H, 2000, Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21 Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun*, 273:479-484

Warbrick E, 2000, the puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22:997-1006

Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS, 1995, A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1 and the proliferating cell nuclear antigen. *Curr. Biol.* 5:275-282

Winters ZE, 2002, p53 pathways involving G2 checkpoint regulators and the role of their subcellular localisation. Review *J R Coll Surg Edinb* 47:591-598

Winters ZE, Hunt, 2001, Subcellular Localisation of cyclin B, Cdc2, p21 in breast cancer. *Eur J Cancer* 37:2405-2412

Zhang H, Hannon GJ, Beach D, 1994, p21-containing cyclin-kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8:1750-1758

Publikation

Ein Teil der Arbeit wurde im folgenden Organ teilpubliziert:

The Journal of Biological Chemistry

Vol. 277, No.12, Issue of March 22, pp. 9684-9689, 2002

Glycogen Synthase Kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21 (Cip1) degradation

Lothar Rössig, Cornel Badorff, Yvonne Holzmann, Andreas M. Zeiher,
and Stefanie Dimmeler

Lebenslauf

Yvonne Morijana Dorothea Holzmann

geboren 1976 in Frankfurt am Main

Berufsausbildung

Seit 10/2004	Assistenzärztin, Med. Klinik III, Nephrologie (Prof. Geiger), Klinikum der J. W. Goethe – Universität, Frankfurt
22.05.2004	A-Diplom in Akupunktur (DÄGfA)
06/2003-09/2004	Ärztin im Praktikum, Med. Klinik III, Nephrologie (Prof. Geiger)
03.12.2002	Drittes Staatsexamen, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt
11/ 2001-10/ 2002	Praktisches Jahr, Wahlfach Neurologie in Lausanne (Prof. Bogousslavsky), Schweiz, Chirurgie in New York (Dr. Beaton), N.Y., USA

17.09.2001	Zweites Staatsexamen
08/ 2000	Praxis Famulatur in Pädiatrie, Frankfurt
07-08/ 1999	Famulaturen in Endokrinologie und in Neurochirurgie, Lyon, Frankreich
09/ 1998-07/1999	Zwei Semester Humanmedizin an der Universität Claude-Bernard, Lyon, Frankreich. Anerkennung der Fächer: Pädiatrie, Psychiatrie, Gynäkologie, Dermatologie, Augenheilkunde, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.
27.08.1998	Erstes Staatsexamen
03/ 1998	Famulatur im Herzzentrum (Kardiochirurgie), Frankfurt am Main
22.09.1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
10/ 1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt
Sonstiges	Studentische Hilfwissenschaftliche Tätigkeit im Kurs der makroskopischen Anatomie

Schulbildung

- 20.06.1995 Abitur mit Graecum und Latinum,
Leistungskurse: Mathematik, Kunst
- 08/ 1986- 06/1995 Heinrich-v.-Gagern-Gymnasium,
humanistisches Gymnasium, Frankfurt am
Main, Schüleraustausch nach Dublin und
Lyon
- 08/ 1982- 07/ 1986 Riedhofschule, Grundschule, Frankfurt am
Main

Weiteres / Hobbies:

Französisch und Englisch, Koreanisch, Klavierspielerin, Zeichnen und Malerei, Rudern, Alpin-Ski.

Frankfurt am Main, April, 2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe der Molekularen Kardiologie, Medizinische Klinik III des Zentrums der Inneren Medizin, an der Johann-Wolfgang Goethe Universität unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler.

Ich danke dem Direktor der Klinik III, Herrn Prof. Dr. Andreas Zeiher, welcher mit großem Engagement die Projekte unterstützt hat und immer ein aufmunterndes Wort parat hatte.

Ich danke Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die hervorragenden technischen Arbeitsbedingungen, die ich genießen durfte, für die Einbindung in interne Fortbildungen und ganz besonders danke ich ihr für die konstruktiven Ideen, Kritiken und Unterstützung im Gelingen dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Kristin Breitschopf für die Einführung in die Materie, ihre Ideen, für das von ihr vermittelte theoretische und technische Wissen, das für den Beginn der Arbeit maßgeblich war.

Ich danke Frau Alexandra Bittner, für die wunderbare Einführung in die Welt der molekularbiologischen Methoden und die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke Frau Meike Stahmer, Frau Isabel Lassotta-Klasen, Frau Barbara Lafferton für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Laune, die sie verbreiteten.

Ich danke Herrn PD Dr. Cornel Badorff, Herrn Dr. Lothar Rössig, Frau PD Dr. Händler und Herrn Dr. Hoffman für diverse Unterstützung, besonders in Computerfragen.

Schließlich danke ich all den übrigen aus der Arbeitsgruppe der Molekularen Kardiologie. Ich konnte immer auf Hilfsbereitschaft hoffen und habe die Zeit trotz mancher Anstrengungen sehr genossen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und Freunde Frau Dr. H. Kim und Herrn Dr. B. Wittekindt, die mich unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Degradation und subzelluläre Lokalisation von P21 (Cip1/Waf1) in
Abhängigkeit von PCNA in Endothelzellen“

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik III, molekulare Kardiologie, unter Betreuung und Anleitung von Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler mit Unterstützung durch Frau Dr. Kristin Breitschopf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, im April 2005

