

1. Einleitung

Die Zelle ist die kleinste funktionelle Einheit des Organismus und in ihrem komplexen Aufbau und ihrer vielschichtigen Organisation bis heute nicht vollständig verstanden. Innerhalb der Zelle erfüllen eine große Anzahl von verschiedenen intrazellulären Kompartimenten und Proteinkomplexen spezifische Funktionen, die in ihrem Zusammenwirken den Stoffwechsel sowie den Teilungszyklus der Zelle steuern. Eine fehlerhafte Regulation von Stoffwechselwegen führt zu Fehlfunktionen innerhalb einer Zelle und hat nicht nur direkte Auswirkung auf die eigene intrazelluläre Umgebung, sondern kann auch benachbarte Zellen bzw. den gesamten Organismus maßgeblich beeinflussen. Solche Fehlregulationen sind Ursprung vieler bekannter Erkrankungen.

1.1. Zellzyklusregulation von eukaryotischen Zellen

Die Periode von einer Zellteilung bis zur nächsten wird Zellzyklus genannt und durch das zeitabhängige Zusammenwirken verschiedener Proteine und Proteinkomplexe reguliert. Der eukaryotische Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt. Die Phase der Zellteilung wird M-Phase genannt. Sie umfasst die Teilung des Zellkerns, die sogenannte Mitose, und die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen, die sogenannte Cytokinese. Die Zeitspanne zwischen zwei M-Phasen heißt Interphase und wird in drei Abschnitte unterteilt: G1-, S- und G2-Phase.

1.2. Die Funktion Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK)

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen wird durch die phasenabhängige Expression verschiedener Cycline und die Aktivität ihrer Kinasen (CDK) gesteuert (Morgan, 1997). Hierbei binden Cycline an spezifische CDKs und bilden sogenannte Holoenzymkomplexe, die mitogene Proteine und Transkriptionsfaktoren aktivieren und so den Zellzyklus steuern. Die Aktivität dieser Komplexe wird durch verschiedene Mechanismen reguliert: A. durch die phasenabhängige Transkription spezifischer Cycline (Morgan, 1997), B. durch die Phosphorylierung von CDKs (Kaldis, 1999) und C. durch die Interaktion der Komplexe mit CDK Inhibitoren (Pei and Xiong, 2005).

Die koordinierte Synthese sowie der nachfolgende Abbau der Cycline sind sowohl für die Aktivierung, als auch für die Substratspezifität der CDKs essentiell (Stevenson-Lindert et al., 2003). Die Expression der Cycline wird über zellzyklusabhängige,

mitogene Transkriptionsfaktoren gesteuert (Peeper et al., 1997; Leone et al., 1997). Sie sind in ungebundener Form in der Zelle sehr kurzlebig und besitzen am N-Terminus eine Destruction-Box (D-box), durch die die Ubiquitin vermittelte Degradation reguliert wird (King et al., 1996). Bei diesem Prozess werden die Cycline von Ubiquitin-Proteinligasen erkannt, poly-ubiquiniert und über das Proteasom abgebaut. Das koordinierte Zusammenspiel von CDK2, CDK4 und CDK6 mit Cyclin-D und -E reguliert den Ablauf der G1-Phase und den Übergang in die S-Phase (Woo and Poon, 2003; Massague, 2004).

Nach der Mitose befindet sich die eukaryotische Zelle im Ruhezustand, in der sogenannten G1-Phase. Mitogene Faktoren veranlassen dann die Zelle, ihren Ruhezustand aufzugeben, zu wachsen und sich zu teilen. Diese Faktoren binden und aktivieren verschiedene Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die anschließend ihre Informationen über verschiedene Signalwege in die Zelle weiterleiten (Peeper et al., 1997; Leone et al., 1997). Der Ras-Signalweg ist hierbei von entscheidender Bedeutung für Zellproliferation und Zellwachstum, indem er über Cyclin-Transkription die Aktivierung von CDKs mitreguliert. Die Ras-MEK-ERK-Kinase Kaskade aktiviert in der ruhenden Zelle die Transkription von Cyclin-D, das mit CDK4 und CDK6 einen aktiven Enzymkomplex bildet. Dieser bindet und phosphoryliert das Retinoblastoma Protein (Rb). Im nichtphosphorylierten Zustand binden und inaktivieren Rb oder Subproteine dieser Familie wie p107 and p130 den Transkriptionsfaktor E2F (Lipinski and Jacks, 1999). Die Phosphorylierung von Rb durch den CDK4/6/Cyclin-D-Komplex führt dagegen zur Freisetzung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. Dieser vermittelt die Transkription von Cyclin-E und anderer mitogener Proteine, die für den Fortlauf des Zellzyklus verantwortlich sind (Cdc45, DNA Polymerase α , Cyclin-A, Cyclin-B und CDK1) (Dyson, 1998; Morris and Dyson, 2001). Cyclin-E bindet und aktiviert nun CDK2, das in dieser Zellzyklusphase konstitutiv exprimiert wird, jedoch ungebunden inaktiv ist. Der aktivierte CDK2/Cyclin-E-Komplex kann seinerseits den Transkriptionsrepressor Rb phosphorylieren, was zu einem Anstieg der CDK2-Aktivierung und zur weiteren Aktivierung von E2F führt (Malumbres and Barbacid, 2005). Die Hyperphosphorylierung von Rb durch CDK4/6-Cyclin-D in der frühen und durch CDK2/Cyclin-E in der späten G1-Phase ist essentiell für den Start und weiteren Verlauf des Zellzyklus (Zhu, 2005). Zudem wird in der G1-Phase die DNA zur Replikation vorbereitet (Lei and Tye, 2001). Hierzu

binden Pre-Replikationskomplexe an die Replikationsinitiationspunkte (replication origin) auf der DNA. Bestandteile dieses Komplexes sind der ORC-Komplex (Origin recognition complex), der MCM-Komplex (minichromosome maintenance) und die Kinasen Cdc6/18 und Ctd1. Die Bindung dieser Komplexe macht die DNA kompetent für die Replikation in der S-Phase.

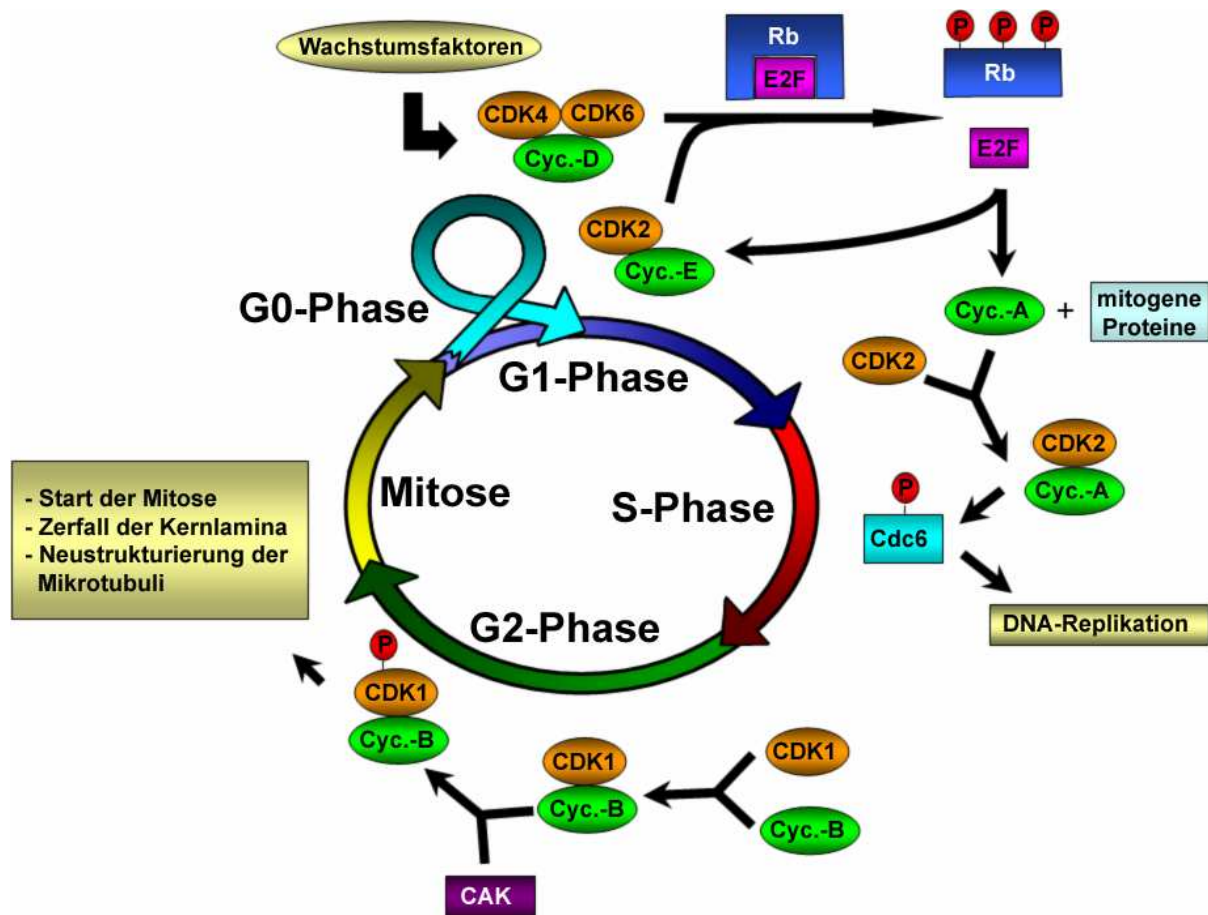


Abb. 1: Regulation des eukaryotischen Zellzyklus durch CDKs

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen wird durch die phasenabhängige Aktivierung verschiedener CDKs gesteuert. In der frühen G1-Phase veranlassen Wachstumsfaktoren die Aktivierung des CDK4/CDK6/Cyclin-D-Komplexes, der nun in der Lage ist das Retinoblastoma Protein (Rb) zu phosphorylieren. Rb setzt daraufhin den Transkriptionsfaktor E2F frei, der die Transkription verschiedener mitogener Proteine aktiviert. Die Aktivierung des CDK2/Cyclin-E-Komplexes in der späten G1-Phase kann seinerseits den Transkriptionsrepressor Rb phosphorylieren und so die Transkription mitogener Proteine verstärken. Cyclin-A bindet ebenfalls an CDK2 und bildet einen CDK2-Komplex mit neuer Substratspezifität. Dieser Komplex phosphoryliert Cdc6 und leitet die S-Phase des Zellzyklus ein. Phosphoryliertes Cdc6 dissoziiert vom Replikationskomplex und führt so zur Aktivierung der DNA-Replikation. Ein essentieller Kontrollmechanismus während der G2-Phase ist die Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes, der den Übergang von der G2-Phase in die Mitose reguliert. Erst die Dephosphorylierung des Thr-14 und Tyr-15 von CDK1 durch die Phosphatase Cdc25 sowie die Thr-161-Phosphorylierung durch den CDK7/Cyclin-H/MAT-1-Komplex (CAK) führt zur vollständigen Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes und zum Start der Mitose.

Zu Beginn der S-Phase bindet Cyclin-A an CDK2 und bildet somit einen weiteren CDK/Cyclin-Komplex mit neuer Substratspezifität, der Cdc6 phosphoryliert und so die S-Phase einleitet (Stevenson-Lindert *et al.*, 2003). Cdc6 dissoziiert vom Replikationskomplex, was zur Bindung von Cdc45 führt. Dieses Protein hat die Aufgabe, die DNA-Polymerase α an den Ort des Replikationsstartes heranzuführen und für den Aufbau der Replikationsgabel zu sorgen. Durch anschließende Rekrutierung von DNA-Helikasen und -Primasen wird die DNA entwunden, sodass die DNA-Polymerase α Zugang zu ihren DNA-Matrizen erhält und die Replikation gestartet werden kann (Kelly and Brown, 2000).

Nach vollendeter S-Phase, in der die DNA repliziert und Proteine für den weiteren Verlauf der Zellteilung hergestellt bzw. aktiviert werden, geht die Zelle in die G2-Phase über. Sie umfasst verschiedene Kontrollmechanismen, in denen die Zelle ihre Integrität prüft, etwaige Fehler behebt oder den Zellzyklus durch Einleiten des programmierten Zelltodes (Apoptose) abbricht (Smits and Medema, 2001). Die Regulationsstelle am G2/M-Übergang wird G2/M-Kontrollpunkt genannt (Stark and Taylor, 2004). Ein essentieller Kontrollmechanismus während der G2-Phase ist die Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes, wobei CDK1 zunächst in inaktivem Zustand vorliegt. Erst die Interaktion mit Cyclin-B sowie verschiedene Phosphorylierungs- und De-Phosphorylierungsprozesse führen zur vollständigen Aktivierung von CDK1 und zum Übergang in die Mitose. Die Bindung von Cyclin-B an CDK1 verursacht bei CDK1 eine Konformationsänderung des T-Loops, bei der das Thr-161 von einer geschlossenen in eine offene Konformation wechselt und so für CAKs (CDK activating kinases) zugänglich ist (Kaldis, 1999). In dieser Konformation kann das Thr-161 vom heterotrimeren CDK7/Cyclin-H/MAT1-Komplex (CAK) phosphoryliert werden, wodurch die Cyclin-abhängige Konformationsänderung von CDK1 stabilisiert wird. Der CDK1/Cyclin-B-Komplex besitzt in dieser Konformation seine volle Enzymaktivität. Durch zusätzliche Phosphorylierung am Thr-14 und am Tyr-15 wird der Komplex jedoch in einem inaktiven Zustand gehalten. Diese inhibierende Phosphorylierung wird über die Kinasen Wee1 und Myt1 reguliert (Lundgren *et al.*, 1991; Booher *et al.*, 1997; Fattaey and Booher, 1997). Erst die De-Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren durch die Phosphatase Cdc25 führt zur Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes und zum Übergang in die Mitose (Nilsson and Hoffmann, 2000). Im Zellkern ist der aktivierte CDK1/Cyclin-B-Komplex für phosphorylierungsabhängige Prozesse verantwortlich, die zu Beginn der Mitose

essentiell sind. Dazu gehört die Neustrukturierung der Mikrotubuli und Aktinfilamente, die für den Aufbau und die Funktion der mitotischen Spindeln verantwortlich sind. Außerdem phosphoryliert der Enzymkomplex Bestandteile der Kernlamina. Dadurch wird deren Integrität zerstört und es kommt zum Zusammenbrechen der Kernhülle in der Prometaphase der Mitose (Smits *et al.*, 2001). Die Aktivität der CDK/Cyclin-Komplexe wird durch den Abbau der Cycline im weiteren Verlauf der Mitose gesteuert. Das Cyclin-A wird bis zur Metaphase und das Cyclin-B bis zur Anaphase über den Ubiquitin-Signalweg vollständig abgebaut (Girard *et al.*, 1995; Clute and Pines, 1999).

1.3. Kontrolle der CDKs durch CDK-Inhibitoren

Eine weitere Kontrollfunktion für die Aktivität von vielen CDK/Cyclin-Komplexen ist den CDK-Inhibitoren zuzuschreiben. Diese inhibitorischen Proteine werden in zwei Familien aufgeteilt: der CIP/KIP-Familie (p21, p27 und p57) und der INK-Familie (p15, p16, p18 und p19) (Harper and Elledge, 1996). Über ihren N-Terminus können diese Proteine an bestimmte CDKs koppeln. Diese Interaktion erfolgt im Bereich der katalytischen Domäne, wodurch die Bindung von ATP verhindert wird (Pavletich, 1999). Die so maskierten CDK/Cyclin-Komplexe sind enzymatisch inaktiv. Das Protein p27 ist für die allgemeine Kontrolle der CDK2/Cyclin-E-Aktivität während des G1-S-Überganges verantwortlich und wird über mitogene Signale reguliert (Massague, 2004). Die anderen CDK-Inhibitoren werden erst durch zytostatische Signale (genotoxisch, metabolisch, onkogen, oxidativer Stress), die den Zellarrest oder den Zelltod zur Folge haben, exprimiert bzw. aktiviert. Die zytostatischen CDK-Inhibitoren erfüllen eine besondere Rolle im Regulationsprozess des Zellzyklus, da sie mitogenen Prozessen übergeordnet sein müssen.

1.4. Der zytostatische CDK-Inhibitor p21

Humanes p21 hat eine Länge von 163 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18kDa und ist auf dem Chromosom 6 (6p.21.2) in drei Exons und zwei Introns kodiert. Das Protein wird in allen adulten humanen Zellen exprimiert (siehe <http://genecards.rzpd.de/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A>, (Yanai *et al.*, 2005)), wobei sich der Expressionslevel gewebespezifisch unterscheiden kann. Das Protein p21 gehört zu der Gruppe der zytostatischen CDK-Inhibitoren, und kann den Zellzyklus sowohl in der G1-, S-, als auch in der G2-Phase anhalten.

Eines der bis heute am besten untersuchten zytostatischen Signale wird durch den Faktor p53 vermittelt (Gomez-Lazaro et al., 2004). Nach DNA-Schädigung, verursacht durch ionisierende Strahlung, oxidativen Stress oder Replikationsfehlern, wird p53 durch mehrfache Phosphorylierung aktiviert. Hierbei erkennen Proteinkomplexe die Schädigung auf der DNA und aktivieren einen Signalweg, indem sowohl die Kinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ATM related), als auch die Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 aktiviert werden. Diese Kinasen setzen ihrerseits verschiedene Prozesse in Gang, die den Zellzyklusarrest zur Folge haben (Sancar et al., 2004). Zum einen phosphorylieren CHK2 und ATM den Transkriptionsfaktor p53 an verschiedenen Aminosäuren, der dadurch die Transkription von p21 aktiviert. Die Expression von p21 führt zum Anhalten des Zellzyklus durch Inaktivierung des CDK2/Cyclin-E- (G1-Kontrollpunkt) oder des CDK1/Cyclin-B-Komplexes (G2-Kontrollpunkt). Zum anderen inaktiviert CHK1 die Phosphatase CDC25 durch Phosphorylierung (Walworth, 2001). CDC25 ist nun nicht mehr in der Lage die inhibierende Phosphorylierung von CDK1 am Thr-14 und Tyr-15 aufzuheben. Zellzyklusarrest ist die Folge. Außerdem besitzt p21 die Fähigkeit mit dem Transkriptionsfaktor E2F über ein Sequenzmotiv innerhalb der Aminosäuren 1-90 am N-Terminus zu interagieren und so den Zellzyklus in der G1-Phase anzuhalten (Delavaine and La Thangue, 1999). Die Zelle kann nun DNA-Schäden über Reparaturmechanismen beheben oder Apoptose induzieren. In „*silicio screening*“ und „*in vitro*“ Bindungsstudien haben bis heute fünf Bindungsstellen für aktiviertes p53 im Promotorbereich von humanem p21 identifiziert (Saramaki et al., 2006). Die durch p53 vermittelte Transkription von p21 kann sowohl den Übergang von der G1- in die S-Phase (G1-Kontrollpunkt), als auch den Eintritt der Zelle in die Mitose (G2-Kontrollpunkt) steuern.

Ein weiterer zytostatischer Faktor, der seine Funktion über p21 vermitteln kann, ist TGF- β (Pardali et al., 2000). Die meisten adulten, epithelischen, endothelischen und hämatopoetischen Zellen reagieren auf TGF- β mit Zytostasis, dem Zellzyklusarrest. TGF- β bindet an membrangebundene Rezeptor-Ser/Thr-Kinasen, die ihr Signal über die Phosphorylierung der Tumorsuppressorproteine Smad-2 und Smad-3 in die Zelle weiterleiten. Phosphoryliertes Smad-2 und -3 assoziiert im Kern mit Smad-4 und weiteren Co-Faktoren zu einem Transkriptionskomplex (Gartel and Tyner, 1999; Moustakas et al., 2002). Dieser Komplex aktiviert die Expression von p21 und führt durch die oben genannten Mechanismen den Zellzyklusarrest herbei (Pardali et al.,

2005). Die Transkription des p21-Genes kann durch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Hierzu gehören neben p53 und den SMAD-Transkriptionsfaktoren die STAT-Transkriptionsfaktoren (signal transducers and activators of transcription) (Gartel *et al.*, 1999; Gartel and Radhakrishnan, 2005).

DNA-Schädigung → Aktivierung von p53 → Transkription von p21

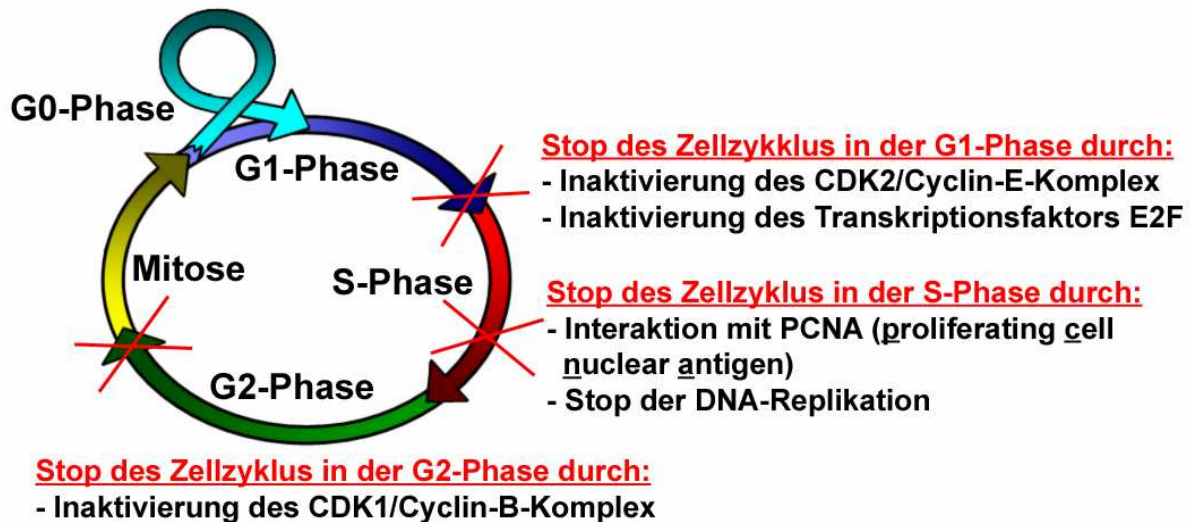


Abb. 2: Zellzyklusarrest durch p21

Der zytostatische Inhibitor p21 kann den Zellzyklus eukaryotischer Zellen in der G1-, S- und G2-Phase anhalten. Die Interaktion von p21 mit dem CDK2/Cylin-E-Komplex und dem Transkriptionsfaktor E2F führt zum Stop des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt. Während der S-Phase kann p21 an PCNA binden und so die DNA-Replikation stoppen. Die Wechselwirkung von p21 mit dem CDK1/Cyclin-B-Komplex verursacht den Stop des Zellzyklus am G2/M-Kontrollpunkt. Der durch p21 induzierte Zellzyklusarrest gibt der Zelle Zeit, etwaige Schäden zu beheben oder Apoptose zu veranlassen.

Ein weiterer Mechanismus, der zum Zellzyklusarrest führt, wird durch die Interaktion von p21 mit PCNA (proliferting cell nuclear antigen) verursacht (Waga *et al.*, 1994). Das Protein PCNA ist am Aufbau der Replikationsgabel während der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus beteiligt. Es dient der eukaryotischen DNA-Polymerase δ als sogenannter Prozessivitätsfaktor. Die DNA-Polymerase δ ist für sich genommen wenig effizient und kann erst in Gegenwart von PCNA lange Strecken eines DNA-Matrizenstranges mit hoher Prozessivität kopieren. Zusätzlich ist PCNA in eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen, wie Mismatch-Reparatur, Basenexzisionsreparatur als auch Nucleotidexzision involviert (Tsurimoto, 1999;

Warbrick, 2000). Das Protein p21 kann im Zellkern über seinen C-Terminus an PCNA binden und so die DNA-Replikation stoppen (Gulbis et al., 1996). Hierbei werden jedoch nur Prozesse der Replikation beeinträchtigt, nicht jedoch DNA-Reparaturmechanismen. Die Interaktion von PCNA mit p21 beeinflusst nicht die Fähigkeit von PCNA, an die DNA zu binden und an ihr entlangzuwandern, sondern vielmehr die Interaktion mit Proteinen, die für die Replikation essentiell sind. Ein Beispiel hierzu ist die 5'-3'-Exonuclease Fen1 (Flap endonuclease 1), die mit PCNA interagiert. Sie sorgt für die Verbindung der Okazaki-Fragmente sowie für das Entfernen von 5'-DNA-Überhängen während der Replikation (Matsumoto, 2001). Zentrale Aminosäurereste der PCNA-Bindungsdomäne von p21 und Fen1 sind in beiden Proteinen identisch. Es wird angenommen, dass die Funktion von Fen1 durch die PCNA-p21-Bindung inhibiert wird und es so zu einem Arrest der DNA-Replikation kommen kann (Warbrick, 1998).

Es wird also deutlich, dass p21 als wichtiger zytostatischer Inhibitor den Zellzyklus zu allen Zeiten der Interphase, in der G1-, S- und G2-Phase, anhalten kann. Dieser Arrest gibt der Zelle Zeit, etwaige Schäden zu beheben oder Apoptose zu veranlassen.

1.5. Regulation der Funktion und Lokalisation von p21 durch Phosphorylierung

Die Funktion von p21 kann nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auch durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, gesteuert werden. Heute ist bekannt, dass neben den Regulationsmechanismen auf Transkriptionsebene auch posttranslationale Prozesse die Funktion von p21 steuern. Hierbei spielt der Phosphorylierungszustand von p21 eine wichtige Rolle (Child and Mann, 2006). Von der Aminosäuresequenz lassen sich mehrere Konsensussequenzen für unterschiedliche Kinasen ableiten. Zu diesen gehören AKT, PKA, PKC, CDK2 und Pim-1 für die gezeigt wurde, dass sie p21 an unterschiedlichen Stellen phosphorylieren (Scott et al., 2000; Rossig et al., 2001; Wang et al., 2002; Dash and El Deiry, 2005; Agell et al., 2006).

AKT, PKA und Pim-1 phosphorylieren p21 am Thr-145. Sie nehmen so Einfluss auf dessen Funktion und Interaktion mit anderen Proteinen. Hierzu gehört die Wechselwirkung mit PCNA, die durch diese Phosphorylierung unterbunden wird. Das Anhängen einer Phosphatgruppe an das Ser-146 durch AKT oder PKC erhöht indessen die Stabilität von p21 (Li et al., 2002). Beide Phosphorylierungsstellen

liegen innerhalb der Aminosäuresequenz, die für die Bindung an PCNA (141-160) verantwortlich ist, bzw. in der NLS-Sequenz (140-155) (nuclear localisation signal) von p21. Neben dem Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktion hat die Phosphorylierung am Thr-145 im Gegensatz zur Phosphorylierung am Ser-146 auch einen Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von p21 (Zhou et al., 2001; Rodriguez-Vilarrupla et al., 2005). Aufgrund der NLS-Sequenz ist endogenes p21 während der Interphase des Zellzyklus im Zellkern lokalisiert und kann hier zellzyklusabhängig mit verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexen und mit PCNA interagieren. Heute ist bekannt, dass p21 nicht nur Funktionen innerhalb des Kernes erfüllt, sondern auch im Zytosol (Blagosklonny, 2002; Coqueret, 2003). Der genaue Transportmechanismus für die Translokation von einem Kompartiment in ein anderes Kompartiment der Zelle ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 durch AKT führt jedoch zu dessen Akkumulation im Zytosol. Ob hierbei ein Exportmechanismus ausgelöst oder ein Importprozess inhibiert wird, ist nicht bekannt. Auch die Phosphorylierung des Ser-153 durch PKC führt zur Ansammlung von p21 im Zytosol (Agell *et al.*, 2006). Der Translokationsprozess wird durch die zusätzliche Phosphorylierung von Thr-145 durch z.B. AKT noch verstärkt. Dieser synergistische Effekt lässt vermuten, dass nicht unbedingt eine einzelne Phosphorylierung, sondern vielmehr ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster auf der p21-Sequenz zur Akkumulation von p21 im Zytosol führt. An dieser mehrfachen Phosphorylierung können unterschiedliche Kinasen beteiligt sein. Die Phosphorylierungen am Thr-145 bzw. am Ser-153 scheinen aber für diesen Prozess essentiell zu sein. Phosphospezifische p21-Mutanten, in denen das Thr-145 oder das Ser-153 mit einem Asp-Rest ausgetauscht wurden, bestätigen diesen Befund. Die molekulare Struktur der Asparaginsäure imitiert dabei eine Phosphorylierung an entsprechenden Stellen durch negative Ladung. Beide p21-Mutanten zeigen eine stark erhöhte Ansammlung im Zytosol, wohingegen die Ser-146-Asp-Mutante diesen Effekt nicht aufweist (Zhou *et al.*, 2001; Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2005).

Es ist offensichtlich, dass nicht allein die Transkriptionsaktivierung bzw. -inaktivierung von p21 regulierende Prozesse im Zellkern steuert, sondern auch der Phosphorylierungszustand. Am Thr-145 oder Ser-153 phosphoryliertes p21 transloziert in das Zytosol und kann so seine Funktionen im Zellkern nicht mehr erfüllen. Stattdessen ist es an verschiedenen Signalprozessen im Zytosol beteiligt.

1.6. Funktion von p21 während der Apoptose

Eukaryotische Zellen, die DNA-schädigenden chemischen Substanzen oder radioaktiver Bestrahlung ausgesetzt waren, reagieren im allgemeinen mit Zellzyklusarrest. Damit verhindern sie eine Vervielfältigung von beschädigtem Erbmateriale und haben Zeit, die Beschädigung durch entsprechende Reparaturmechanismen zu beheben. Sollte der DNA-Schaden zu groß sein, so wird die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten, um die Akkumulation von schadhafte Zellen innerhalb eines Zellverbandes zu verhindern. Wie in Kapitel 1.4 schon beschrieben, wird dieser Prozess über die Aktivierung von p53 gesteuert. Der Zellzyklusarrest wird hierbei über die Transkriptionsaktivierung von p21 geregelt. Es gibt einige Hinweise darauf, dass das Protein p21 den Prozess der Apoptose inhibieren kann (Dotto, 2000). Zellen, die einen Defekt im p53-Signalweg aufweisen, der nicht zur Transkription von p21 nach DNA-Schädigung führt, reagieren meist mit einem starken Anstieg der Apoptose. Künstliche p53-Mutanten, die p21 nicht mehr aktivieren können, lösen zum Beispiel weit häufiger Apoptose aus als der Wildtyp (Okaichi et al., 1999; Kaneuchi et al., 1999). A431 Zellen, die solche inaktiven p53-Mutanten exprimieren lösen Apoptose aus nachdem sie UV-Strahlung ausgesetzt waren. Induziert man bei den gleichen Zellen die Expression von p21 durch Mimosine ist deren Rate an apoptotischen Zellen stark reduziert (Bissonnette and Hunting, 1998). Wie der Prozess der Apoptose inhibierenden Funktion von p21 im einzelnen gesteuert wird, ist wenig bekannt. Suzuki et al. haben beschrieben, dass p21 im Zytosol mit der Procaspase-3 interagiert und diese dadurch inhibiert (Suzuki et al., 2000). Die Procaspase-3 ist ein wichtiger Bestandteil des Fas-kontrollierten Apoptoseweges. Caspase-3 liegt im Zytoplasma der Zelle als inaktives Proenzym vor und wird im Verlauf des Fas-Apoptoseweges von der Caspase-8 proteolytisch gespalten und somit aktiviert (Zhivotovsky et al., 1997). In humanen Hepatomazellen (HepG2) wurde festgestellt, dass p21 an Procaspase-3 binden kann und so den Fas-Apoptoseweg unterbricht. Diese Interaktion wird über die ersten 33 Aminosäuren des N-Terminus von p21 vermittelt und findet wahrscheinlich an der Membran der Mitochondrien statt (Suzuki et al., 1999). Neben der Procaspase-3 wurden noch einige andere Proteine identifiziert, mit denen p21 interagieren und so Einfluss auf die Regulation der Apoptose nehmen kann. Man hat festgestellt, dass p21 im Zytosol auch an ASK1 (apoptosis signal regulating kinase) binden und so dessen Apoptose auslösende Funktion inhibieren kann (Asada et al., 1999). Hierzu wurde die

Lokalisation und Funktion von p21 im Zytosol peripherer Blutmonozyten in einem zellulären Modellsystem, der Differenzierung von U937-Zellen (myeloische Leukämiezellen), näher untersucht. p21-Mutanten, die ausschließlich im Zytosol lokalisiert sind, binden an ASK1 und schützen diese Zellen vor Apoptose, wenn sie mit apoptotischen Substanzen behandelt werden.

Es kann zusammengefasst werden, dass nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis, im Zytoplasma lokalisiertes p21 anti-apoptotische Funktionen erfüllt, während im Zellkern befindliches p21 zellzyklusinhibierend wirkt.

1.7. p21 als Tumormarker in der Krebsdiagnose

In Proteomanalysen von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Gewebezellen, konnten starke Unterschiede im Expressionslevel verschiedener Proteine festgestellt werden (Srinivas et al., 2002). Man vermutet, dass diese Proteine bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnten. Welche Faktoren die Tumorgenese direkt auslösen ist noch nicht bekannt, da die bis jetzt genutzten experimentellen Ansätze zumeist nur den Endzustand der Proteinverteilung in der Tumorzelle aufzeigen. Zwischen Primärprozessen und Sekundärprozessen der Tumorgenese kann daher nicht unterschieden werden. Unterschiedliche Faktoren scheinen jedoch signifikant für bestimmte Tumorarten und dessen Krankheitsverläufe zu sein. Solche Proteine werden Tumormarker genannt (Srinivas et al., 2001). Dabei ist nicht nur deren Expressionslevel, sondern auch deren intrazelluläre Verteilung entscheidend.

In verschiedenen primären Tumorgeweben von Brustkrebspatientinnen konnte p21 als Tumormarker identifiziert werden (Winters et al., 2001). Dazu wurden 130 verschiedene klinische Brustkrebsproben untersucht und der Expressionslevel, die Lokalisation und der Phosphorylierungszustand von p21 bestimmt (Xia et al., 2004). Verschiedene Krankheitsverläufe wurden protokolliert und mit den gefundenen p21-Parametern korreliert. p21 war in diesen Tumorzellen vermehrt im Zytosol lokalisiert und am Thr-145 phosphoryliert (Zhou et al., 2001). Diese Ergebnisse korrelierten zudem mit einem schlechten Verlauf der Tumorerkrankung. Als mögliche Ursache für die intrazelluläre p21-Verteilung wurde folgender Mechanismus vorgeschlagen (Zhou et al., 2001): In Brustkrebszellen ist häufig die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Her2/neu) überexprimiert, die ihrerseits über Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase AKT aktivieren kann. Wie oben beschrieben, kann AKT das Protein p21 am Thr145 phosphorylieren, was zu einer Akkumulation von phosphoryliertem p21 im Zytosol führen kann.

Dadurch verliert p21 seine zytostatische Funktion im Zellkern und kann Apoptoseprozesse im Zytosol inhibieren. Neben Brustkrebs wird p21 auch in multiplen Myelomen als potentieller Biomarker beschrieben (Ohata et al., 2005).

1.8. Pim-1

Das Protein Pim-1 gehört zu der Gruppe der Ser/Thr-Kinasen und ist an verschiedenen Signaltransduktionswegen von eukaryotischen Zellen beteiligt. Pim-1 ist auf dem humanen Chromosom 6p12-21 in sechs Introns und fünf Exons kodiert und hat eine Länge von 313 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 35.7kDa (Friedmann et al., 1992). Das Enzym besteht aus einer Proteinkinasedomäne, die sich von Aminosäure 38 bis 290 erstreckt. Als funktionelle Sequenzen innerhalb dieser Domäne gelten die ATP-Bindungsstelle im Bereich des Lys-67 sowie die Protonenakzeptorstelle im Bereich des Lys-169 (Qian et al., 2005). Neben Pim-1 wurden in eukaryotischen Zellen noch Pim-2 und Pim-3 identifiziert. Diese drei Proteine bilden zusammen eine Familie mit ähnlicher Substratspezifität (Konietzko et al., 1999). Das Pim-1-Gen wurde 1984 als bevorzugter Ort der proviralen Insertion des Mäuseleukämievirus (proviral integration site for murine leukemia virus) entdeckt und wurde schon damals als möglicher Faktor bei der Entstehung von virusabhängigen Tumoren diskutiert (Cuypers et al., 1984; Selten et al., 1985). Pim-1 wurde dabei zunächst als zytoplasmatische Kinase identifiziert. Heute ist jedoch bekannt, dass Pim-1 sowohl im Kern als auch im Zytosol an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Ionov et al., 2003), wobei die Lokalisation wahrscheinlich zelltyp- und zellzyklusabhängig variiert. Neueste Befunde in Prostatakrebszelllinien belegen zwei Isoformen von Pim-1, wie es von Mäusezellen schon länger bekannt ist (Xie et al., 2006). Hierbei exprimieren die Zellen die bisher bekannte 33 kDa große Pim-1-Variante und eine neu entdeckte 44kDa große Isoform von Pim-1, die mit der Plasmamembran assoziiert sein soll.

Die Transkription von Pim-1 kann über eine Reihe von Cytokinen stimuliert werden (Liang et al., 1996). Der Jak/STAT (Janus Kinasen/signal transducer of transcription) Signalweg spielt dabei eine entscheidende Rolle. Sowohl STAT3 als auch STAT5 können direkt an die Promotorsequenz des Pim-1-Gens binden und dessen Transkription hervorrufen (Stout et al., 2004). Beide STAT-Proteine können durch eine große Anzahl von Interleukinen aktiviert werden.

Als Konsenssubstratsequenz für Pim-1 wurde folgende Aminosäuresequenz identifiziert: (K/R)₃-X-S/T-X, wobei X weder eine basische noch eine große hydrophobe Aminosäure sein darf (Ionov *et al.*, 2003; Bullock *et al.*, 2005). Diese Aminosäuresequenz wird auch bevorzugt von AKT phosphoryliert (Obata *et al.*, 2000) und es könnten somit AKT und Pim-1 um selbe Substrate konkurrieren. Heute ist eine große Anzahl von Proteinen bekannt, die diese Konsensussequenz aufweisen und sowohl in der Regulation des Zellzyklus, als auch in Prozessen der Apoptose eine Rolle spielen (Wang *et al.*, 2001; Bachmann and Moroy, 2005). Die große Anzahl verschiedener Substrate spiegelt hierbei die komplexe Funktionalität wider, die Pim-1 in der Zelle erfüllt.

Es ist experimentell belegt, dass Pim-1 die Phosphatase Cdc25A, einem G1-spezifischen positiven Regulator des Zellzyklus, bindet, phosphoryliert und aktiviert (Mochizuki *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Cdc25A unterstützt und erhöht dessen Phosphataseaktivität und stimuliert so den Übergang von der G1 in die S-phase des Zellzyklus. Außerdem wurde beschrieben, dass Pim-1 das Protein p21 phosphoryliert und so dessen Funktion als negativer Regulator am G1/S-Übergang, sowie in der S-Phase des Zellzyklus inhibieren kann (Wang *et al.*, 2002). Auch Substrate, deren Funktion den Ablauf des Zellzyklus in der G2- und in der M-Phase mitregulieren, wurden identifiziert. Die Kinase C-TAK1 ist an der Regulation der Phosphatase Cdc25C während der G2-Phase beteiligt, indem sie Cdc25C phosphoryliert und so inhibiert. Cdc25C wiederum entfernt die inhibierenden Phosphatreste von CDK1, das dadurch aktiviert wird und die Mitose einleitet. Pim-1 kann sowohl C-TAK1, als auch Cdc25C phosphorylieren (Bachmann *et al.*, 2004; Bachmann *et al.*, 2006). Dies führt zum einen zur Inaktivierung von C-TAK1 und zum anderen zur Aktivierung von Cdc25c. Neben den Funktionen in der G1-, S- als auch G2- Phase ist Pim-1 auch in Prozesse während der Mitose involviert. Das Protein NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) ist mitverantwortlich für die Organisation des Spindelapparates während der Mitose und kann ebenfalls von Pim-1 phosphoryliert werden (Bhattacharya *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von NuMA durch Pim-1 eine Rolle bei der Komplexbildung mit HP1 β , Dynein und Dynactin spielt und so zur Organisation des Spindelapparates beiträgt.

Neben der Einflussnahme auf den Verlauf der Zellteilung, ist Pim-1 auch in Prozesse der Apoptose eingebunden und gilt hier als anti-apoptotischer Faktor (Lilly

et al., 1999; Wang *et al.*, 2001). Die Literatur beschreibt die Interaktion von Pim-1 mit Bad (Bcl2-antagonist of cell death), in dessen Verlauf Bad am Ser112 phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird (Yan et al., 2003; Aho et al., 2004). Die Inaktivierung von Bad hat eine erhöhte Aktivität von Bcl-2 zur Folge, was die Ausschüttung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien verhindern und somit einen wichtigen Schritt im Prozess der Apoptose inhibieren kann.

1.9. Pim-1 als Tumormarker in der Krebsdiagnose

Pim-1 gehört zu der Gruppe der Proto-Onkogene und ist in diversen Tumorarten fehlerhaft reguliert. Die Charakterisierung von Genexpressionsprofilen mittels cDNA-Microarray-Analysen von gutartigen und bösartigen Prostataprobe n zeigten unterschiedliche Expressionslevel von Pim-1 (Dhanasekaran et al., 2001). Hohe Pim-1-Expressionslevel wurden hierbei in bösartigem Prostatatumorgewebe festgestellt und korrelierten mit einem tödlichen Krankheitsverlauf. Gutartige Prostatahyperplasien wiesen dahingegen nur sehr schwache Expressionslevel auf (Xu et al., 2005). Diese Befunde wurden durch Analysen mittels RT-PCR sowie an Gewebeschnitten immunohistochemisch bestätigt. Heute wird der Expressionslevel von Pim-1 als potentieller Tumormarker für die Prostatakrebsdiagnose diskutiert (Valdman et al., 2004; Xu *et al.*, 2005). Weiterhin zeigten Genexpressionsanalysen (Affymetrix) an B-Zell-Lymphomen, dass Pim-1 auch in diesen Tumoren stark überexprimiert ist (Hoefnagel et al., 2005). Zusätzlich ist Pim-1 kooperativ mit dem Proto-Onkogen c-Myc an der Tumorgenese von Mäuseleukämievirus-induzierten T-Zell-Lymphomen (Selten *et al.*, 1985) und an der Entstehung von Burkitt's Lymphomen (Ionov *et al.*, 2003), einem hochgradig bösartigen Lymphomkrebs aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome, beteiligt.

1.10. Fragestellung und Ziel der Doktorarbeit

In der Vergangenheit hat sich eine Vielzahl von Studien mit den Effekten der p21-Phosphorylierung während der unterschiedlichen Zellzyklusphasen beschäftigt. Die Phosphorylierung von p21 wurde hierbei durch Substanzbehandlung oder durch Proteintransfektion der Zellen künstlich induziert. Dabei wurde festgestellt, dass der induzierte Phosphorylierungszustand von p21 die intrazelluläre p21-Lokalisation und Funktion mitbestimmt (Child *et al.*, 2006). Zudem wurde eine abnormale Phosphorylierung von p21 in Tumorgewebe festgestellt, wobei der

Phosphorylierungszustand mit der Überexpression und Fehlregulierung von Kinasen korrelierte (Zhou *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur induzierten Phosphorylierung ist über die natürliche, zellzyklusabhängige Phosphorylierung von p21 nichts bekannt. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel:

- Den Phosphorylierungszustand von p21 im endogenem Zellzyklus eukaryotischer Zellen zu analysieren. Zu diesem Zweck wird der Phosphorylierungszustand von p21 in eukaryotischen Zellen mithilfe von phosphospezifischen Antikörpern detektiert und in den einzelnen Zellzyklusphasen untersucht.
- Des Weiteren sollen Effekte der induzierten Phosphorylierung durch fehlregulierte Kinasen am Beispiel von Pim-1 untersucht werden (Abb. 3). Hierzu werden p21 und Pim-1 mit autofluoreszierenden Proteinen (AFP) markiert, so dass die Pim-1-AFP abhängige Phosphorylierung von endogenem p21 und kotransfiziertem p21-AFP in lebenden Zellen analysiert werden kann.

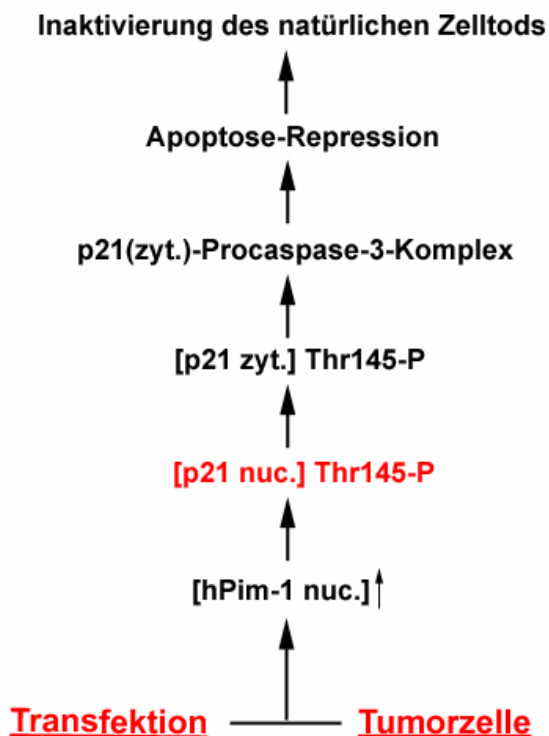


Abb. 3: Induzierte Phosphorylierung von p21 durch Pim-1

Diese Abbildung zeigt einen möglichen Mechanismus indem die induzierte Phosphorylierung von p21 durch fehlregulierte Pim-1-Enzymaktivität den Prozess der Apoptose inhibiert und so unkontrolliertes Zellwachstum fördert. Dieser Mechanismus kann an der Entstehung verschiedener Tumorarten beteiligt sein und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.