

Regulierung und Funktion der p27^{KIP1}-Acetylierung

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Jens Schirmmacher
aus Oberhausen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Bernhard Lüscher
Universitätsprofessor Dr. Lothar Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

**Im Herzen eines Menschen
ruht der Anfang und das Ende der Dinge.**

Leo Graf Tolstoi,
Schriftsteller (1828-1910)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Der eukaryotische Zellzyklus	3
2.2	Cyclin-abhängige Kinasen und der Zellzyklus	4
2.3	CDKs und die Progression des Zellzyklus	6
2.4	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren	10
2.4.1	Die INK4-Familie der CKIs	11
2.4.2	Die CIP/KIP-Familie der CKIs	12
2.4.2.1	p21 und die Regulierung des Zellzyklus	13
2.4.2.2	p57 und die Regulierung des Zellzyklus	14
2.5	p27 und die Regulierung des Zellzyklus	15
2.6	Die Acetylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen	20
2.7	Aufgabenstellung	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Die Verifizierung der Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27	24
3.1.1	In vivo Acetylierung von p27 durch die HATs CBP/p300	24
3.1.2	Co-Immunpräzipitation (Co-IP) von CBP mit p27	25
3.1.3	In vitro Acetylierung von p27 durch CBP	27
3.1.4	Acetylierung von p27 durch endogene HATs	28
3.1.5	Die siRNA-vermittelte Herabregulierung von endogenem CBP/p300 führt zum Verlust der p27-Acetylierung	30
3.1.6	Die endogene Acetylierung von p27	32

3.2	Identifikation der acetylierten Lysine von p27	35
3.2.1	Acetylierbare Lysine liegen im C-terminalen Teil von p27	35
3.2.2	K96 und K100 sind Kandidaten für die Acetylierung durch CBP	37
3.2.3	K190 ist ein weiterer Kandidat für die Acetylierung durch CBP	39
3.2.4	Die Flag-p27K3R-Mutante wird nicht mehr acetyliert	39
3.2.5	Massenspektrometrische Analyse der p27-Acetylierung	41
3.3	Charakterisierung eines spezifischen p27AcK100-Antikörpers	43
3.3.1	Überprüfung von Antikörpern auf spezifische Bindung an acetyliertes... K100 von p27	43
3.3.2	IP von p27 durch den 8A9-Antikörper.....	46
3.4	Analyse zur Funktion der p27-Acetylierung.....	48
3.4.1	Untersuchungen zur Funktion der K190-Acetylierung	48
3.4.1.1	<i>Colony formation</i> Assay zur Analyse der Funktion der K190-... Acetylierung	49
3.4.1.2	Inhibierung der Acetylierung von p27 nach Überexpression von CDK2/Cyclin E.....	50
3.4.1.3	<i>In vitro</i> Kinase-Assay zur Analyse der Funktion der K190- Acetylierung	53
3.4.2	Untersuchungen zur Funktion der K100-Acetylierung	54
3.4.2.1	Der p27-Abbau ist abhängig von der HAT-Aktivität von CBP	55
3.4.2.2	<i>Colony formation</i> Assay zur Analyse der Funktion der K100-... Acetylierung	56
3.4.2.3	Der Austausch von K100 zu Q führt zur verstärkten Phosphorylierung von T187	56
3.4.2.4	Analyse der K100-Acetylierung in Abhängigkeit von HDAC- Inhibitoren	59
3.4.2.5	Die Inhibierung der Sirtuine führt zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von p27	60
3.5	Die Regulierung der Acetylierung durch Kinasen	61

4	Diskussion	64
4.1	Die Verifizierung der Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27	64
4.1.1	Die <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Acetylierung von p27 durch CBP/p300	64
4.1.2	Die Acetylierung von p27 durch endogene HATs	66
4.1.3	Der fehlende Nachweis der endogenen Acetylierung von p27	68
4.2	Die Identifizierung der acetylierten Lysine von p27	70
4.3	Charakterisierung eines für die Acetylierung von K100-spezifischen Antikörpers	72
4.4	Analyse zur Funktion der p27-Acetylierung	73
4.4.1	Untersuchungen zur Funktion der Acetylierung von K190	74
4.4.1.1	<i>Colony formation</i> Assay zur Analyse der Funktion der K190 Acetylierung	75
4.4.1.2	Die Überexpression von CDK2/Cyclin E inhibiert die Acetylierung von p27 durch CBP	77
4.4.1.3	Der Kinase-Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung	80
4.4.2	Untersuchungen zur Funktion der K100-Acetylierung	82
4.4.2.1	Analyse der K100-Acetylierung in Abhängigkeit von HDAC-Inhibitoren	85
4.5	Regulation und Funktion der p27-Acetylierung: Modelle und Ausblick auf zukünftige Experimente	88
4.5.1	Modell zur Regulierung und Funktion der Acetylierung von der G0- bis zu S-Phase	91
4.5.2	Die Regulierung der Acetylierung durch Kinasen	93
5	Material und Methoden	95
5.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	95
5.2	Reaktionskits	95
5.3	Synthetische Oligonukleotide	95
5.4	Plasmide	97

5.5	Antikörper	100
5.6	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	101
5.6.1	Verwendete Bakterienstämme	101
5.6.2	Verwendete Anzucht- und Selektionsmedien für Bakterien	101
5.6.3	Protokolle für das Arbeiten mit Bakterien	101
5.6.3.1	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation	101
5.6.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	102
5.7	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)	102
5.7.1	Verwendete Zell-Linien.....	102
5.7.1.1	Humane Zell-Linien	102
5.7.1.2	Murine Zell-Linien	102
5.7.1.3	Insekten Zell-Linien	103
5.7.2	Material für die Zellkultur	103
5.7.2.1	Material für die Zellkultur von humanen und murinen Zell-Linien	103
5.7.2.2	Material für die Zellkultur von Insektenzellen	103
5.7.3	Kulturbedingungen	103
5.7.3.1	Kulturbedingungen für humane und murine Zell-Linien.....	103
5.7.3.2	Kulturbedingungen für Insektenzellen.....	104
5.7.4	Protokolle für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	104
5.7.4.1	Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer	104
5.7.4.2	Transiente Transfektion der Zell-Linien HEK293 und NIH3T310.....	104
5.7.4.3	<i>Colony formation</i> Assay	105
5.7.4.4	Plaque-Assay zur Bestimmung des Baculovirus-Titers.....	106
5.7.4.5	Amplifikation des Baculovirus-Titers	106
5.7.4.6	Infektion von Sf9-Insektenzellen mit Baculoviren.....	107

5.8	Molekularbiologische Methoden	107
5.8.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	107
5.8.2	Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit	108
5.8.3	Restriktion von DNA	108
5.8.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	109
5.8.5	Präparative Agarose-Gelelektrophorese von DNA	109
5.8.6	Ligation von DNA-Fragmenten	109
5.8.7	DNA-Sequenzierung	110
5.8.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	110
5.8.8.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten	110
5.8.8.2	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	111
5.9	Proteinchemische Methoden	112
5.9.1	Aufreinigung von GST-Fusions-Proteinen aus <i>E.coli</i>	112
5.9.2	Aufreinigung von His-getagtem CBP aus Sf9-Insektenzellen	113
5.9.3	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen	113
5.9.4	Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	115
5.9.5	Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	116
5.9.6	Western-Blot	116
5.9.7	Immundetektion von Proteinen nach dem Western-Blot	117
5.9.8	Massenspektrometrie	118
5.10	Enzymatische Assays	119
5.10.1	Histon-Acetyltransferase (HAT)-Assay	119
5.10.2	Kinase-Assay	119
6	Referenzen	121
7	Anhang	148
7.1	Abkürzungen	148
7.2	Lebenslauf	152
7.3	Eidesstattliche Erklärung	153
7.4	Danksagung	154

1 Zusammenfassung

Die Entstehung von Krebs ist die Folge eines deregulierten Zellzyklus. Verantwortlich für das Durchlaufen des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Kinasen, deren Aktivität in jeder Phase des Zyklus einer Vielzahl von Regulationsmechanismen unterliegt. Zu den wichtigsten Regulatoren gehört die Tumorsuppressor-Familie der CIP/KIP-Proteine. Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p27^{KIP1} (im folgenden nur p27 genannt) fungiert als Mediator zwischen der Entscheidung, den Zellzyklus zu verlassen und in die G0-Phase einzutreten oder den Zellzyklus eine weitere Runde zu durchlaufen und mit der S-Phase zu beginnen.

Die Funktion und Stabilität von p27 wird weitestgehend durch posttranslationale Modifikationen gesteuert. In Tumoren wird p27 auf proteolytischer Ebene, nicht jedoch auf transkriptionaler Ebene inaktiviert. Die Erkenntnis, welche Modifikationen p27 regulieren, ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Entstehung von Krebs und könnte neue therapeutische Ansätze sowie prognostische Relevanz für den Verlauf der Erkrankung haben.

In dieser Arbeit konnte die Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27 identifiziert werden. Mittels Überexpression konnte gezeigt werden, dass p27 ein Substrat der beiden homolog und paralog verwandten Histon-Acetyltransferasen CBP und p300 ist. Histon-Acetyltransferasen bilden eine große Gruppe von Enzymen, die essentiell an der Regulierung der Transkription in Eukaryoten beteiligt ist. Sie katalysieren die Übertragung der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf Lysine. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass nicht nur Histone acetyliert werden, sondern die Acetylierung auch eine generelle posttranslationale Modifikation von Nicht-Histon-Proteinen ist, die in einer Vielzahl von zellulären Funktionen involviert ist. Die Acetylierung ist eine reversible Modifikation, die Deacetylierung erfolgt durch die Gruppe der Histon-Deacetylasen.

Die Acetylierung von p27 durch p300 und CBP als neue posttranslationale Modifikation konnte in weiteren Experimenten verifiziert werden. Dazu wurde CBP zunächst rekombinant in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt. In einem *in vitro* Acetylierungs-Assay konnte dann erneut die Acetylierung von GST-p27 durch CBP mit einem spezifischen Acetyl-Lysin-Antikörper nachgewiesen werden. Eine Interaktion von p27 mit CBP konnte auch mittels Co-Immunpräzipitation aus Zell-Lysaten gezeigt werden.

Der Nachweis der Acetylierung von p27 durch endogene Acetyltransferasen konnte durch die Inhibierung der Histon-Deacetylasen erbracht werden. Nach der Inkubation von humanen und murinen Zellen mit Trichostatin A und Nikotinamid konnte die Acetylierung von überexprimiertem p27 nachgewiesen werden. Die beiden Inhibitoren, die spezifisch auf verschiedene Klassen von Histon-Deacetylasen wirken, zeigen einen synergistischen Effekt bei der Verstärkung des Acetylierungssignals, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Deacetylierung durch unterschiedliche Deacetylasen erfolgt. Wurden keine Inhibitoren verwendet, gelang auch keine Detektion von acetyliertem p27. Eine Acetylierung von endogenem exprimierten p27 nach Immunpräzipitation konnte dagegen nicht detektiert werden.

Die Acetylierung von p27 in Zellen scheint spezifisch durch CBP und p300 zu erfolgen. Mittels RNAi erfolgte der *Knockdown* von CBP und p300 in der humanen Zell-Linie HCT116. Nach der Inkubation der Zellen mit den Deacetylase-Inhibitoren konnte keine Acetylierung von p27 mehr im Gegensatz zur Negativ-Kontrolle nachgewiesen werden.

Die Identifikation der acetylierten Lysine von p27 gelang durch den Austausch von einzelnen Lysinen gegen Arginine und der folgenden Überprüfung auf Verringerung in der Gesamtacetylierung. Dabei konnten die Lysine 100 und 190 von p27 als Substrat von CBP und p300 ermittelt werden. Die Ergebnisse konnten zum Teil durch Massenspektrometrie bestätigt werden.

Aufgrund der Nähe von Lysin 190 zu Threonin 187, dessen posttranslationale Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen entscheidend zum proteolytischen Abbau von p27 beiträgt, wurde überprüft, ob die Acetylierung den Abbau von p27 beeinflusst. Die Überexpression einer p27-Mutante, bei der Lysin 190 gegen Glutamin ausgetauscht wurde, was die Mimikry eines acetylierten Lysins darstellt, zeigte eine verstärkte Inhibierung des Zellzyklus durch p27 in einem *colony formation* Assay. Die Überexpression von Cyclin-abhängigen Kinasen zusammen mit CBP verhinderte zudem die Phosphorylierung von p27. In einem *in vitro* Kinase-Assay konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Acetylierung von Lysin 190 die Phosphorylierung von Threonin 187 durch die Cyclin-abhängige Kinase CDK2 inhibieren kann.

Erste Ergebnisse zur Funktion der Acetylierung von Lysin 100 deuten darauf hin, dass die Modifikation am Abbau von p27 beteiligt ist. Die Mimikry von acetyliertem Lysin 100 führte zu einer Verringerung der Inhibitor-Funktion von p27 auf den Zellzyklus in einem *colony formation* Assay. Zudem konnte eine verstärkte Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 durch überexprimierte und endogene Cyclin-abhängige Kinase CDK2 nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Acetylierung von Lysin 100 wurden spezifische Antikörper generiert. Die Charakterisierung der Antikörper auf Spezifität und Bindungsstärke erfolgte durch *in vivo* und *in vitro* Assays. Dabei konnte ein Antikörper ermittelt werden, der sich sowohl für den Nachweis der Lysin 100-Acetylierung auf dem Western-Blot als auch für die Immunpräzipitation eignet.

Die spezifische Inhibierung von unterschiedlichen Deacetylasen zeigte, dass die Deacetylierung von Lysin 100 durch die Klasse der NAD^+ -abhängigen Deacetylasen erfolgt. Diese werden durch den Inhibitor Nikotinamid inhibiert, wohingegen bei Trichostatin A, welches keine Wirkung auf diese Klasse hat, auch keine Acetylierung von Lysin 100 nachgewiesen werden konnte.

2 Einleitung

2.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Eine Voraussetzung für das Leben auf der Erde, die vom Einzeller bis zum Vielzeller erfüllt werden muss, ist die gleichmäßige und vollständige Weitergabe der genetischen Information, der DNA. Die Weitergabe der DNA erfolgt in der Zellteilung, bei der aus einer Zelle zwei Tochterzellen entstehen.

In eukaryotischen Zellen wird die Zellteilung durch den Zellzyklus reguliert. Der Zellzyklus gliedert sich in vier Phasen. In der Synthese- oder S-Phase wird die DNA genau einmal repliziert. In der Mitose- oder M-Phase wird die replizierte DNA an die Tochterzelle weitergegeben und es kommt zur Zellteilung, Zytokinese genannt. Die S- und M-Phase wird von zwei so genannten Gap-Phasen unterbrochen. In diesen Phasen werden die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Durchlaufen der S- oder M-Phase geschaffen. Erst wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird die S- oder die M-Phase eingeleitet. Die Gap-Phase vor der S-Phase wird als G1-Phase, die Gap-Phase vor der Mitosephase als G2-Phase bezeichnet. Der Zeitraum zwischen zwei Mitosephasen, die die zwei Gap-Phasen und die Synthese-Phase einschließt, wird als Interphase bezeichnet (Abbildung 1.1; Malumbres und Barbacid, 2001).

Die exakte Replikation und Weitergabe der DNA auf die Tochterzellen unterliegt strengen internen Qualitätskontrollen. Diese Kontrollen, *checkpoints* genannt, sorgen dafür, dass jede Phase des Zellzyklus nur einmal pro Zyklus durchlaufen wird und erst dann beginnt, wenn die vorhergegangene Phase vollständig abgeschlossen wurde. Am Ende der G1-Phase, in der S-Phase und am Übergang der G2-Phase in die Mitose wird die DNA auf Vollständigkeit und Integrität überprüft. Werden dabei Fehler festgestellt, wird durch die *DNA damage checkpoints* ein Stopp des Zellzyklus erreicht. Der Stopp des Zellzyklus erfolgt solange, bis die Vollständigkeit und Integrität der DNA wieder hergestellt ist und der Zellzyklus weiter durchlaufen werden kann. Kann dies nicht erreicht werden, wird in der Regel die Seneszenz oder der programmierte Zelltod, die Apoptose eingeleitet (Pietenpol und Stewart, 2002). Auch die Mitosephase selbst unterliegt verschiedenen Kontrollinstanzen. Der *spindle assembly checkpoint* sorgt dafür, dass eine gleichmäßige Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen erfolgen kann. Erst wenn alle Chromosomen gleichmäßig an ihren Kinetochoren mit der mitotischen Spindel verbunden sind, erfolgt der Übergang von der Metaphase in die Anaphase (Holland und Cleveland, 2009).

Für einen Einzeller wie die Hefe oder für komplexe vielzellige Lebewesen ist es jedoch nicht nur entscheidend, den Zellzyklus rasch zu durchlaufen und die Weitergabe der DNA zu sichern, sie müssen auch in der Lage sein, den Zellzyklus zu verlassen. Beispielsweise darf eine Hefezelle sich nicht teilen, wenn das Nährstoffangebot für zwei Tochterzellen zu gering ist (Barberis und Klipp, 2007). Für die Embryogenese eines Menschen ist es wiederum entscheidend, dass spezialisierte Zellen eines Organs sich nicht mehr teilen, wenn die Entwicklung eines Organs abgeschlossen ist. Verlassen Zellen den Zellzyklus nach der Zytokinese, so treten diese in die G0-Phase des Zellzyklus ein (Abbildung 1.1). Der Eintritt in die G0-Phase kann von vorübergehender Natur sein und wird als zelluläre Quieszenz bezeichnet (Coller et al., 2006). Die zelluläre Quieszenz wird hervorgerufen durch Verlust der Zelladhäsion, durch Kontaktinhibierung oder durch den Entzug von Nährstoffen, die die Zelle für das Durchlaufen des Zellzyklus benötigt. Werden diese

antiproliferativen Signale jedoch wieder aufgehoben und die Zelle erhält Signale für die Proliferation, wird eine erneute Runde des Zellzyklus in der G₁-Phase begonnen (Coller, 2007).

Ein Eintritt in die G₀-Phase kann jedoch auch von finaler Natur sein. Diese tritt ein, wenn es zur Differenzierung von Zellen kommt. Erreichen Zellen den Zustand der Differenzierung, so sind diese auch nicht mehr empfänglich für proliferative Signale. Der Eintritt und der Erhalt der Differenzierung sind entscheidend für vielzellige Lebewesen. Der Verlust der Differenzierung und das ungehinderte Durchlaufen des Zellzyklus ist eine Ursache für Krebserkrankungen.

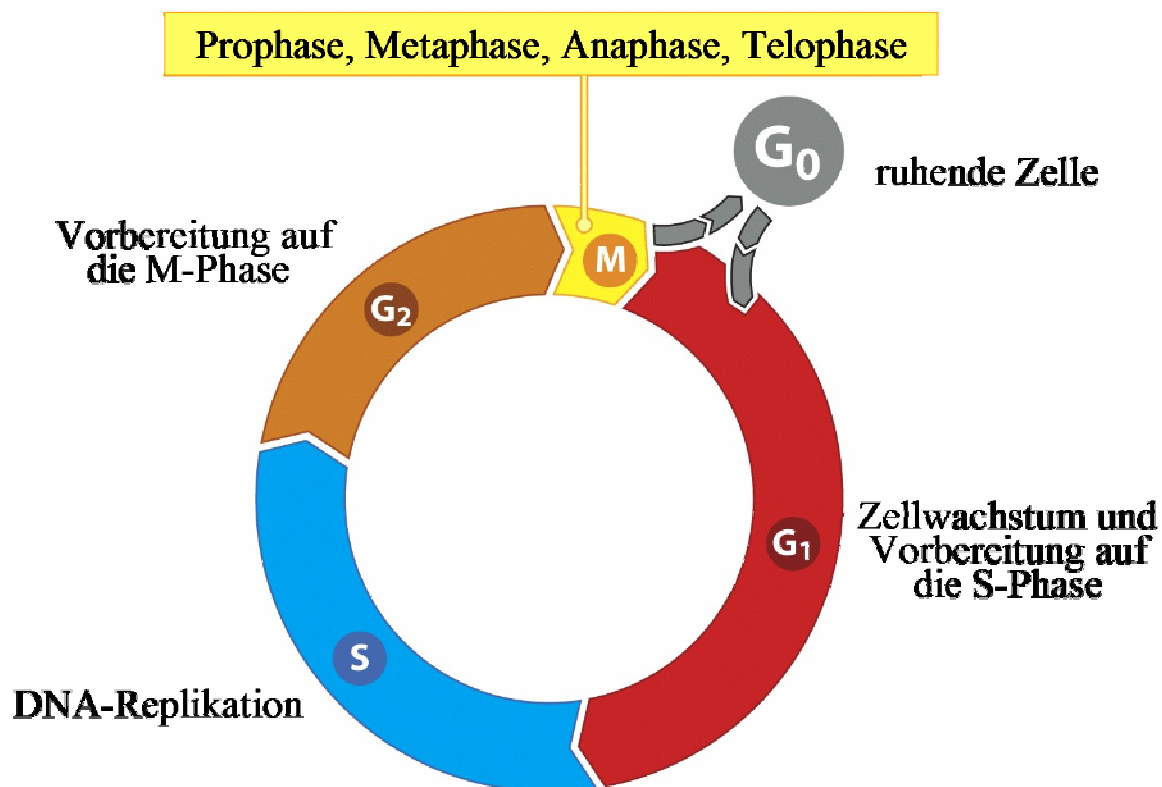


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus

Dargestellt sind die fünf Phasen des Zellzyklus sowie die Funktionen. Die Mitosephase gliedert sich in vier weitere Unterphasen (Abbildung modifiziert nach (Weinberg, The Biology of Cancer, Garland Science-Verlag 2007)).

2.2 Cyclin-abhängige Kinasen und der Zellzyklus

Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, cyclin-dependent kinases) sind die zentralen Elemente der Zellzyklus-Kontrolle. CDKs fungieren im Zellzyklus als Signalübermittler und übertragen die abgespaltene Phosphoryl-Gruppe von ATP auf die Aminosäuren Serin oder Threonin in einem Protein. Dabei ist die Aktivität der Kinasen entscheidend für einen geordneten und störungsfreien Ablauf des Zellzyklus. Andererseits müssen die Kinasen selbst reguliert werden, um ein fortlaufendes Durchschreiten des Zellzyklus zu verhindern. Versagen die Kontrollen, kommt es zur Hyperproliferation, welche die Transformation der Zelle zur Folge haben kann. (Malumbres und Barbacid, 2001; Malumbres und Barbacid, 2005).

Die erste CDK wurde 1986 in den beiden Hefe-Modellsystemen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* in einem genetischen Screen von proliferationsdefekten Stämmen identifiziert (Russell und Nurse, 1986). Die Kinase wird in *Schizosaccharomyces pombe* als *cdc2*, in *Saccharomyces cerevisiae* als *cdc28* bezeichnet. Bald wurden im Menschen weitere homologe Mitglieder der CDKs identifiziert, die in der Lage waren, die Proliferationsdefekte in den Hefestämmen zu kompensieren. Mittlerweile sind 13 CDKs des Menschen bekannt, die eine Sequenzhomologie von 40% auf Aminosäureebene aufweisen. Die homologe Kinase zu *cdc2* und *cdc28* der Hefe wird in humanen Zellen als CDK1 bezeichnet (Malumbres und Barbacid, 2005).

Zeitgleich zur Entdeckung der Hefe-Kinasen wurden durch Untersuchungen an Seeigelleiern Proteine identifiziert, die in jeder Runde der Zellteilung periodisch exprimiert und wieder abgebaut werden. Aufgrund der oszillierenden Eigenschaft wurden diese Proteine als Cycline bezeichnet (Evans et al., 1983).

Die biochemische Verbindung zwischen CDKs und Cyclinen wurde 1989 identifiziert. Durch Untersuchungen am Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass Cycline mit CDK1 interagieren und die Meiose regulieren (Hunt, 1989; Nurse, 1990). Sowohl Hunt als auch Nurse erhielten 2001 den Nobelpreis für Ihre Entdeckungen.

Wie der Terminus ausdrückt, ist die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase strikt abhängig von der Interaktion mit der Cyclin-Untereinheit. Ohne die Untereinheit ist die Kinase *per se* katalytisch inaktiv. Beispielsweise wurde für CDK2 gezeigt, dass eine Assoziation mit Cyclin A mit einer 400000-fachen Steigerung der Kinase-Aktivität einhergeht (Malumbres und Barbacid, 2005). Gleichzeitig stellt die Abhängigkeit der Aktivität der Kinase mit der Cyclin-Untereinheit einen wichtigen regulatorischen Mechanismus des Zellzyklus dar. CDKs interagieren nur mit bestimmten Cyclin-Subtypen. Da einzelne Cycline spezifisch in bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert und wieder abgebaut werden, stellt dieser Mechanismus sicher, dass eine Phase des Zellzyklus nur einmal pro Runde durchschritten werden kann (Abbildung 1.2).

Neben den 13 CDKs sind mittlerweile 29 Cycline im Menschen bekannt (Malumbres und Barbacid, 2005; Bloom und Cross, 2007). Nicht alle CDKs und Cyclin-Untereinheiten sind jedoch an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt. An der Regulierung der Interphase sind CDK2 und CDK4 sowie CDK6 beteiligt. Die Mitose wird nur durch eine Kinase, CDK1, reguliert (Abbildung 1.2). Die drei Interphase-Kinasen sind im Laufe der Evolution der Eukaryoten dazugekommen. Sie liegen nicht in der Hefe vor. Hier wird der Zellzyklus nur von einer Kinase vorangetrieben, *cdc2* in *Schizosaccharomyces pombe* und *cdc28* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Die vier CDKs des Menschen interagieren während des Zellzyklus mit insgesamt 10 Cyclin-Untereinheiten. Die Interaktion erfolgt über die Cyclin-Box, eine 150 Aminosäuren lange konservierte Domäne. Im Folgenden werden die einzelnen Kinasen, ihre Cyclin-Untereinheiten und Ihre wichtigsten Substrate im Zellzyklus vorgestellt.

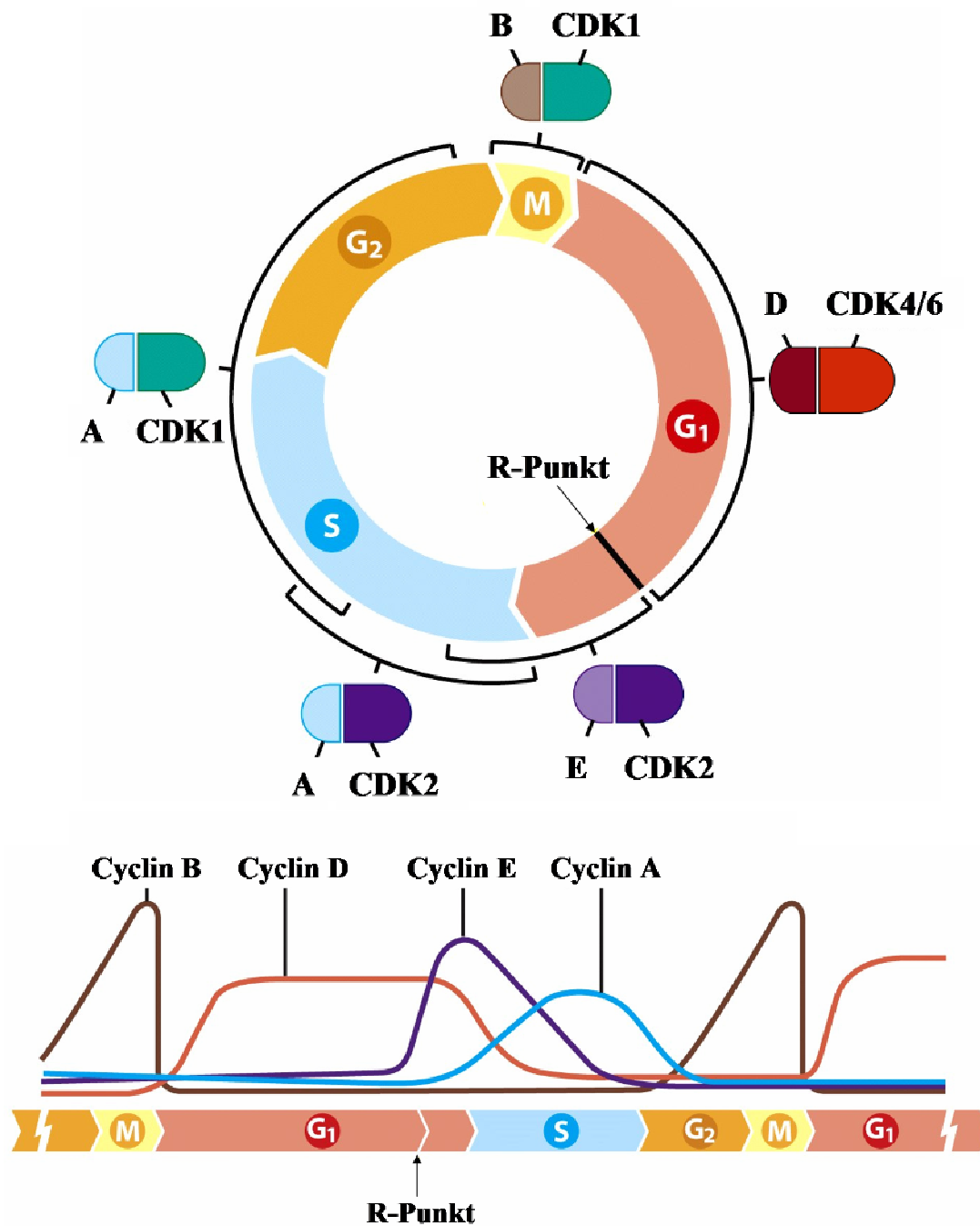


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus

Angegeben sind die einzelnen Phasen des Zellzyklus und die CDKs mit den oszillierenden Cyclin-Untereinheiten. Der Restriktionspunkt (R-Punkt) ist hervorgehoben (Abbildung modifiziert nach (Weinberg, The Biology of Cancer, Garland Science-Verlag 2007)).

2.3 CDKs und die Progression des Zellzyklus

Die G₁-Phase in humanen Zellen ist die längste Phase des Zellzyklus und unterliegt einer Vielzahl von Regulationen. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen muss überprüft werden, ob die genomische Integrität nach dem komplizierten Zellteilungsprozess erhalten geblieben ist und eine neue Replikationsrunde in der S-Phase durchlaufen werden kann. Um die nächste Mitosephase durchlaufen zu können, muss zudem eine bestimmte physiologische Größe der Zelle erreicht sein.

Dadurch wird sicher gestellt, dass die Tochterzellen nicht nach jeder Runde des Zellzyklus kleiner werden. Eine stark erhöhte Proteinbiosynthese dient auch der Vorbereitung auf die Replikation der DNA. Beispielsweise muss für die späte G1-Phase und S-Phase eine ausreichende Anzahl von Ribosomen für die Synthese von Histonen vorliegen. Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden Proteinoktamere, um die die replizierte DNA gewickelt wird. Ein weiterer Grund ist, dass die G1-Phase einer Vielzahl von proliferativen und antiproliferativen äußeren Signalen unterliegt, deren Stärke und Dauer den Zellzyklus entweder in die S-Phase oder in die G0-Phase treiben. Die Entscheidung, in die G0-Phase einzutreten oder die Replikation der DNA zu beginnen, wird durch alle drei Interphase-Kinasen reguliert. Diese aktivieren in sequentieller Reihenfolge die molekularen Schalter der G1-Phase, die einen Übergang in die S-Phase ermöglichen (Abbildung 1.2; Ekholm und Reed, 2000; Barberis et al., 2007; Malumbres und Barbacid, 2009).

An der Regulation der frühen G1-Phase sind die drei D-Typ-Cycline (D1, D2 und D3) beteiligt. Die Expression der D-Typ-Cycline erfolgt nach Stimulation der Zellen durch mitogene Wachstumssignale und wird durch eine Vielzahl von mitogenen Signalwegen wie dem RAS/RAF/MAPK-Signalweg gesteuert. Die Signalwege aktivieren eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, STAT, c-MYC oder NF- κ B, die zur raschen Akkumulation der D-Typ-Cycline beitragen (Ekholm und Reed, 2000). Bricht in dieser frühen Phase die Stimulation der Zellen mit mitogenen Wachstumssignalen jedoch ab, erfolgt die rasche proteolytische Degradation der D-Typ-Cycline. In Zellkultur-Experimenten haben D-Typ-Cycline nach Serumentzug nur eine Halbwertszeit von etwa 20 Minuten (Diehl et al., 1998). Die Degradation von Cyclin D1 wird beispielsweise durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3- β (GSK3- β) gesteuert. Nach der Phosphorylierung wird Cyclin D1 aus dem Kern exportiert und durch den SCF (*S-phase kinase associated protein (Skp1)/Cullin/F-Box protein*)-Ubiquitin-Ligase-Komplex ubiquitiniert. Dies führt zum Abbau durch das Proteasom. In rasch proliferierenden Zellen bleibt dagegen ein Pool von D-Typ-Cyclinen erhalten (Malumbres und Pellicer, 1998). Dies stellt sicher, dass D-Typ-Cycline nicht nach jeder Runde des Zellzyklus neu exprimiert werden müssen und die folgende G1-Phase kürzere Zeit in Anspruch nimmt.

Die D-Typ-Cycline interagieren in der frühen G1-Phase mit CDK4 und CDK6. Die beiden Kinasen beginnen mit der Phosphorylierung der Retinoblastoma-Proteinfamilie (Abbildung 1.3). Dazu gehört das Retinoblastoma-Protein (RB), p107 und p130 (Burkhart und Sage, 2008).

RB war das erste Tumorsuppressor-Protein, das identifiziert wurde (Weinberg, 1995). Der homozygote Verlust von RB führt im jugendlichen Alter zum Retinoblastom, einer malignen Erkrankung der Netzhaut. Die Entdeckung, dass ein homozygoter Verlust von RB die Ursache des Retinoblastoms ist, bestätigte das „two-hits“ Modell von Knudson, wonach beide Allele eines Tumorsuppressor-Proteins ausgeschaltet sein müssen, um die Entwicklung eines Tumors einzuleiten (Knudson, 1971).

Auf molekularer Ebene fungieren RB und die beiden verwandten Proteine p107 und p130 als Wächter der G1-Phase, die darüber entscheiden, ob die S-Phase eingeleitet wird. Alle drei Proteine reprimieren eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die entscheidend am Fortschreiten der G1-Phase in die S-Phase beteiligt ist, die E2F-Familie. Die humane E2F-Familie setzt sich aus acht Mitgliedern (E2F1–E2F8) zusammen (van der Heuvel und Dyson, 2008). Die Mitglieder E2F1–E2F6 transkribieren Gene, die spezifisch an der Regulation der späten G1-Phase und S-Phase beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise die Gene

für die E-Cycline, die für die Aktivierung von CDK2 entscheidend sind. Auch Gene, die für die Nukleotid-Synthese essentiell sind, wie das Gen der Dihydrofolat-Reduktase und Thymidin-Kinase, werden durch E2F-Transkriptionsfaktoren reguliert (Abbildung 1.3).

Zu Beginn der G1-Phase liegen RB, p107 und p130 unphosphoryliert oder hypophosphoryliert an den E2F-Transkriptionsfaktoren gebunden vor. Durch die Komplexbildung mit weiteren Proteinen wie Histon-Deacetylasen wird sichergestellt, dass die Chromatinstruktur geschlossen und damit für Transkriptionsfaktoren unzugänglich bleibt (Burkhardt und Sage, 2008). Nach Aktivierung durch die D-Typ-Cycline phosphorylieren CDK4 und CDK6 die RB-Familie spezifisch an Serin- oder Threoninresten. Dies führt zur teilweisen Aufhebung der Reprimierung der E2F-Transkriptionsfaktoren, die nun in der Lage sind, einzelne Gene zu transkribieren. Dadurch wird der so genannte Restriktionspunkt der G1-Phase überschritten. Hinter dem Restriktionspunkt ist das Fortschreiten der G1-Phase autonom von äußeren mitogenen Signalen. Zu den ersten Genen, die nach dem Überschreiten des Restriktionspunktes transkribiert werden, gehören die Gene für die beiden E-Typ-Cycline (E1 und E2). Die Aktivierung von CDK2 im Komplex mit Cyclin E führt zur Hyperphosphorylierung der RB-Familie. Die Folge ist der totale Verlust der Interaktion der Retinoblastoma-Familie mit der E2F-Familie. Die E2F-Familie ist nun in der Lage, weitere Proteine an die DNA heranzuziehen, die zur Auflockerung der Chromatinstruktur beitragen und mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie c-MYC zu interagieren. Am Ende dieser molekularen Kette von Ereignissen steht der Beginn der S-Phase (Sherr und Roberts, 2004; Abbildung 1.3).

CDK2 ist von der späten G1-Phase über die S-Phase hinaus bis in die G2-Phase aktiv. Die Aktivität wird zunächst reguliert durch die Interaktion mit Cyclin E1 und Cyclin E2, in der späten S-Phase und G2-Phase durch Cyclin A2. CDK2 dimerisiert auch mit Cyclin A1, die Interaktion erfolgt jedoch aufgrund der spezifischen Expression von Cyclin A1 nur in Keimzellen (Berthet et al., 2003; Aleem et al., 2004). Die beiden E-Typ-Cycline werden bereits zu Beginn der S-Phase durch den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex wieder abgebaut. Es kommt zur Komplexbildung mit Cyclin A2. Die Kinase phosphoryliert in der S-Phase eine Reihe von Substraten, die an der Replikation der DNA beteiligt sind. Dazu gehören Proteine des prä-replikativen Komplexes und der Replikations-Maschinerie. Dadurch wird sichergestellt, dass eine Replikation der DNA, ausgehend von den *origins of replications*, nur einmal pro Runde des Zellzyklus erfolgen kann (Hwang und Clurman, 2005).

CDK1 reguliert die G2-Phase und die Mitosephase. Interessanterweise konnte auch an murinen *Knockout*-Modellen gezeigt werden, dass CDK1 die einzige essentielle Kinase des Säuger-Zellzyklus ist. Ein gleichzeitiger *Knockout* von CDK4, CDK6 und CDK2 konnte durch CDK1 kompensiert werden und ermöglichte ein Durchschreiten des Zellzyklus (Santamaria et al., 2007). CDK1 interagiert zu Beginn der G2-Phase mit Cyclin A2 und am Übergang zur Mitosephase mit Cyclin B1, B2 und B3. CDK1 und CDK2 im Komplex mit Cyclin A2 haben in der G2-Phase redundante Substrate, ob jedoch beide Kinasen auch unterschiedliche Substrate im mitotischen Zellzyklus besitzen, ist unbekannt (Malumbres und Barbacid, 2009). Da Cyclin A2 im Laufe der G2-Phase abgebaut wird, interagiert CDK1 am Ende der G2-Phase ausschließlich mit den B-Typ-Cyclinen. Für diesen Kinasekomplex sind mittlerweile über 70 Substrate bekannt. In der G2-/Prophase der Mitose reguliert CDK1 die Centrosomen-Trennung und die Chromatin-Kondensation. Das Fortschreiten der Mitose wird durch die Phosphorylierung der Kern-Lamina erreicht, die daraufhin in kleine Membranvesikel zerfällt (Malumbres und Barbacid, 2005). Der Komplex

CDK1/Cyclin B ist auch an der Regulation des *spindle assembly checkpoints* am Übergang der Metaphase zur Anaphase beteiligt (Musacchio und Salmon, 2007). Der *checkpoint* verhindert die vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden, bis diese sich in gegensätzlichen bipolaren Richtungen zu den Spindelpolen ausgerichtet haben. Eine Fehlregulation kann hier ein Grund für Aneuploidie sein (Kops et al., 2005; Weaver und Cleveland, 2007; Weaver et al., 2007). Der *anaphase promoting complex*, ein E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, ubiquitiniert Cyclin B nach erfolgreicher Anordnung der Schwesterchromatiden. Dadurch wird auch CDK1 inhibiert und die Mitosephase kann beendet werden (Holland und Taylor, 2008; Abbildung 1.2).

Eine Regulation der drei Interphasen-Kinasen CDK4, CDK6 und CDK2 sowie CDK1 erfolgt jedoch nicht nur durch die Akkumulation und den proteolytischen Abbau der Cyclin-Untereinheiten. Die Komplexe werden selbst durch Kinasen aktiviert und deaktiviert (Malumbres und Barbacid, 2001; Malumbres und Barbacid, 2005). Die Phosphorylierungen von Threonin- und Tyrosinresten durch die Kinasen MYT1 und WEE1 führen zur Inaktivierung der CDKs. CDK1 wird durch die dualspezifischen Kinasen an Threonin 14 und Tyrosin 15 phosphoryliert, während CDK2 und CDK4 durch die Phosphorylierung an den Tyrosinen 15 und 17 inhibiert werden. Zur erneuten Aktivierung der Kinasen erfolgt die Dephosphorylierung dann durch eine der CDC25-Phosphatasen (CDC25A, CDC25B und CDC25C). Gleichzeitig müssen die Kinasen jedoch in einer Peptidsequenz, dem *t-loop*, phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von Threonin 172 von CDK4 und Threonin 160 von CDK2 im *t-loop* erfolgt durch CDK7. Der Kinase-Komplex, bestehend aus CDK7, Cyclin H und der Untereinheit MAT1, wird auch als CAK (*CDK activating kinase*)-Komplex bezeichnet. Interessanterweise interagiert der Komplex auch mit dem Transkriptionsfaktor TFIIH der Polymerase II und phosphoryliert deren C-terminale-Domäne (CTD). Die Phosphorylierung ist entscheidend für den Beginn der Transkription aus dem Prä-Initiationskomplex heraus.

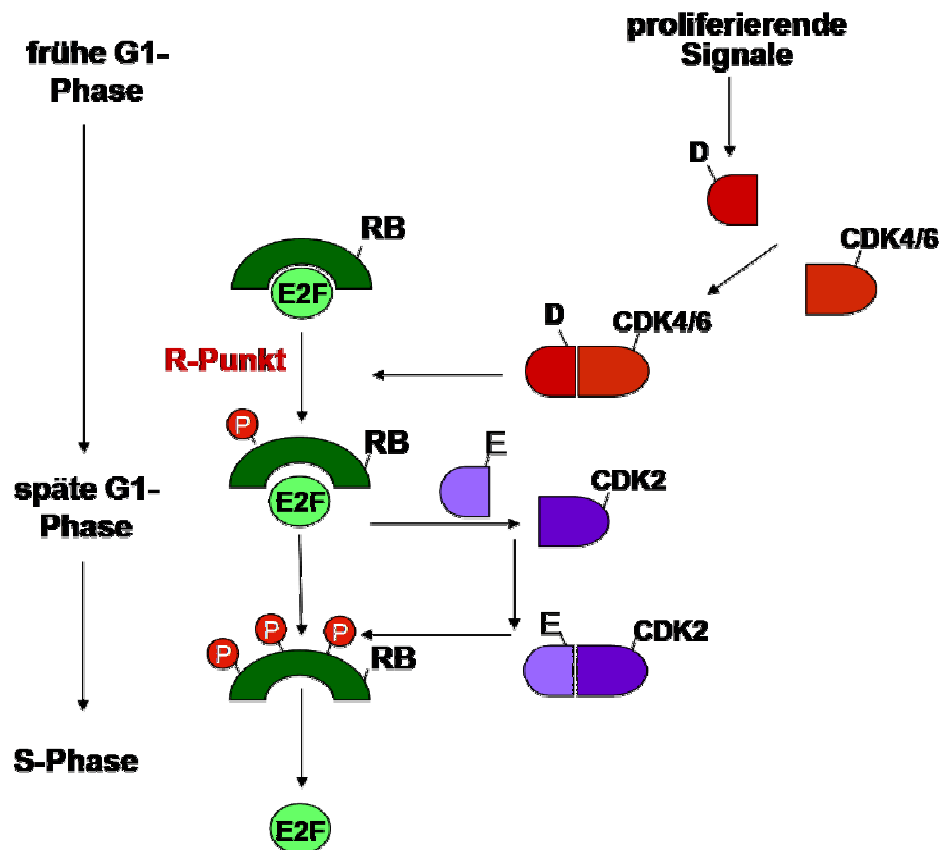


Abbildung 1.3: Der Restriktionspunkt und der Verlauf der G1-Phase

Dargestellt sind das Retinoblastoma-Protein (RB) und der Transkriptionsfaktor E2F. Der Kinasekomplex CDK4/6 mit der Cyclin D-Untereinheit phosphoryliert in der frühen G1-Phase das RB-Protein. Es kommt zur schrittweisen Aufhebung der Reprimierung von E2F und der Restriktionspunkt (R-Punkt) wird überschritten. Nach Transkription durch E2F aktiviert Cyclin E die CDK2-Kinase, es kommt in der späten G1-Phase zur Hyperphosphorylierung von RB. Dadurch wird die Reprimierung von E2F vollständig aufgehoben und die S-Phase wird eingeleitet (Abbildung modifiziert nach (Weinberg, The Biology of Cancer, Garland Science-Verlag 2007)).

2.4 Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren

Neben der Regulierung der Kinase-Aktivität durch den periodischen Abbau der Cycline, durch aktivierende und deaktivierende Phosphorylierung sowie den Export aus dem Kern, werden die CDKs auch noch selbst durch eine Gruppe von Tumorsuppressor-Proteinen reguliert. Die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) werden in zwei Familien eingeordnet. Die INK4 (Inhibitors of CDK4)-Familie und die CIP/KIP (*CDK interacting protein/kinase inhibitor protein*)-Familie. Die INK4-Familie ist an der Regulierung des Zellzyklus in der frühen G1-Phase beteiligt, wobei deren Mitglieder die Kinase-Aktivität von CDK4 und CDK6 regulieren. Die Mitglieder der CIP/KIP-Familie besitzen dagegen ein breiteres inhibitorisches Spektrum und wirken in allen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 1.4).

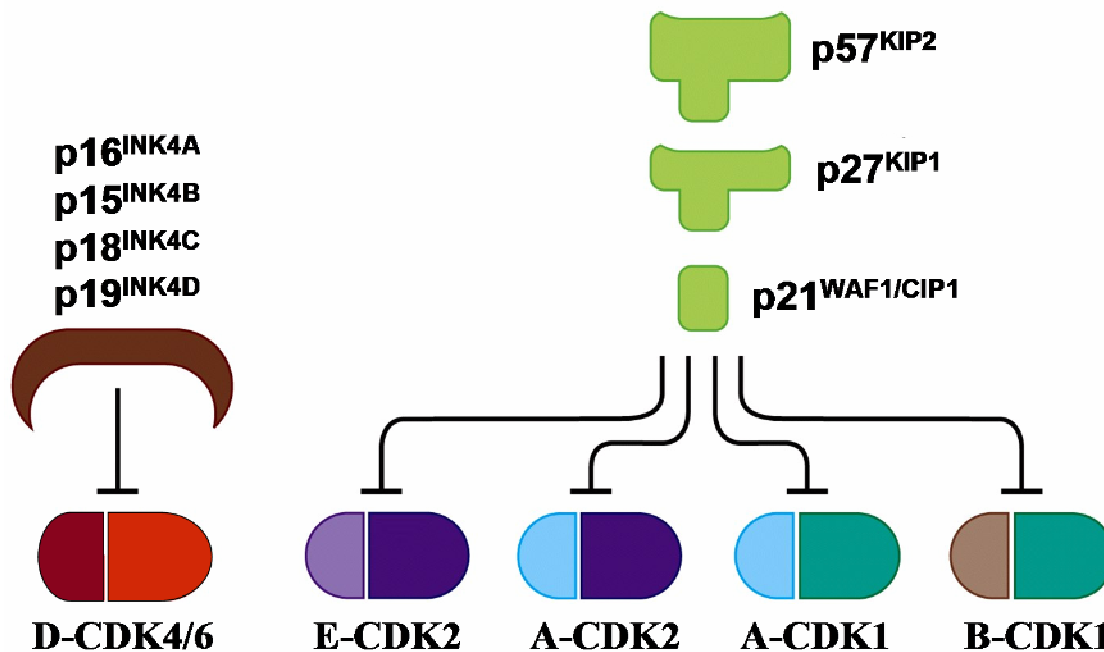


Abbildung 1.4: Die Inhibition von CDK-Komplexen durch CKIs

(Abbildung modifiziert nach (Weinberg, The Biology of Cancer, Garland Science-Verlag 2007)).

2.4.1 Die INK4-Familie der CKIs

Zu der INK4-Familie gehören vier Mitglieder: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}. Die Proteine haben zueinander eine 40%ige Homologie auf Aminosäureebene und eine Molekulargröße von 15 bis 19 kDa (Roussel, 1999). Die Mitglieder binden und inhibieren CDK4 und CDK6 (Abbildung 1.4). Durch die Herabregulierung der Kinase-Aktivität wird eine initiale Phosphorylierung der RB-Proteinfamilie verhindert und die G1-Phase kommt vor dem Restriktionspunkt zum Erliegen.

Die Inhibition der Kinase-Aktivität von CDK4 und CDK6 durch INK4-Mitglieder erfolgt auf zwei Arten. Zum einen wird eine Interaktion von CDK4 und CDK6 mit den D-Typ-Cyclinen verhindert, zum anderen kann aber auch die Kinase-Aktivität von bereits gebildeten CDK/Cyclin D-Komplexen inhibiert werden (Canepa et al., 2007).

Die CKIs binden an den N- und C-Terminus der monomeren Kinasen. Dabei wird eine konkave Struktur ausgebildet, wobei die Inhibitoren auf der Rückseite gegenüber der katalytischen ATP-Bindungsstasche der Kinase liegen. Der N- und C-Terminus von CDK4 und CDK6 werden gegeneinander verdreht, wodurch die Interaktion mit den D-Typ-Cyclinen verhindert wird. Die INK4-Mitglieder können jedoch auch an den heterodimeren Komplex aus Kinase und D-Typ-Cyclin binden. Dies führt zu einer Konformationsänderung in der katalytischen Spalte, wodurch die Aktivität der Kinase inhibiert wird (Canepa et al., 2007).

Die Akkumulation der INK4-Familie in der frühen G1-Phase wird durch eine Vielzahl von antiproliferativen Signalen reguliert. p16^{INK4A} wird eine wichtige Rolle bei der Einleitung der replikativen Seneszenz von humanen dermalen Fibroblasten zugeschrieben (Alcorta et al., 1996). p18^{INK4C} und p19^{INK4D} sind an der terminalen Differenzierung von B-Zellen (Morse et al., 1997), Muskelzellen (Frankling und Xion, 1996) sowie Neuronen (Ceruti et al., 2005) beteiligt. Die antiproliferativen Effekte des Zytokins TGFβ (*transforming growth factor β*) werden dagegen in einigen Zellarten

von p15^{INK4B} vermittelt (Massugue et al., 2000). Beispielsweise steigt die mRNA-Synthese von p15^{INK4B} nach Inkubation von humanen Keratinozyten mit TGF β um die 30-fache Menge an (Hannon und Beach, 1994).

Der Verlust von Mitgliedern der INK4-Familie ist mit der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren assoziiert (Hall und Peters, 1996). Die Inhibierung der CDK-Inhibitoren erfolgt dabei hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene. Dazu gehören die Deletion der einzelnen Genloci als auch die epigenetische Inaktivierung. Eine der am häufigsten gefundenen Deletionen in menschlichen Tumoren betrifft den INK4a/INK4b/ARF-Locus. Auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 liegen innerhalb von 35 kb die Gene für p16^{INK4A}, p15^{INK4B} sowie für p14^{ARF}. Das Protein p14^{ARF} inhibiert den Abbau des Tumorsuppressors p53, indem es an die Ubiquitin-Ligase von p53, MDM2 bindet. Der Verlust des ganzen Chromosomenabschnittes 9p21 hat daher weitreichende negative Folgen im Hinblick auf einen totalen Verlust der Zellzykluskontrolle (Kim und Sharpless, 2006).

2.4.2 Die CIP/KIP-Familie der CKIs

Die CIP/KIP-Familie der CKIs setzt sich aus drei Mitgliedern zusammen. Dazu gehören p21^{WAF1/CIP1} (p21, Gen *cdkn1a*), p27^{KIP1} (p27, *cdkn1b*) und p57^{KIP2} (p57, *cdkn1c*). Im N-terminalen Bereich der Proteine liegen eine konservierte Cyclin- sowie eine konservierte CDK-Bindungsdomäne. Daher kann eine Interaktion im Gegensatz zur INK4-Familie nicht nur mit der Kinase, sondern auch mit der Cyclin- Untereinheit erfolgen. Darüber hinaus ist die inhibitorische Fähigkeit nicht nur auf CDK4 und CDK6 beschränkt. Die CIP/KIP-Familie ist in der Lage, die Aktivität von Cyclin D-, E-, A-, und B-Kinase-Komplexen zu regulieren (Abbildung 1.4). Der C-terminale Bereich der CKIs weist nur eine geringe Sequenzhomologie auf. Hier finden eine Vielzahl von unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen und Protein-Protein-Wechselwirkungen statt, die die Stabilität und Lokalisation, darüber hinaus jedoch auch zellzyklusunabhängige Funktionen der CIP/KIP-Proteine regulieren (Besson et al., 2008).

CIP/KIP-Proteine gehören zu den intrinsisch ungefalteten Proteinen. Erst nach der Bindung an andere Proteine wird eine spezifische tertiäre Struktur eingenommen. Der Mechanismus, der zur Inaktivierung der Kinase-Aktivität durch die CIP/KIP-Proteine führt, konnte mittels Kristallstruktur-Analyse 1996 aufgeklärt werden (Russo et al., 1996; Abbildung 1.5). Die dreidimensionale Struktur von p27 in einem ternären Komplex mit Cyclin A und CDK2 zeigt, dass der Inhibitor nach der Bindung über die Aminosäuren 22 – 106 sowohl mit der Cyclin-Untereinheit über die Cyclin-Box als auch mit der aminoterminalen Domäne der CDK interagiert. In dieser geordneten Konformation ragt eine 3_{10} -Helix von p27 in die katalytische Bindungstasche der Kinase. Dadurch kann kein ATP gebunden werden und die Kinase ist inaktiviert. Die Bindungsstärke von p27 zum heterodimeren Komplex ist dabei stärker als die Bindung an die isolierten Untereinheiten (Blain, 2008). Obwohl bisher keine Kristallstrukturen von p21 und p57 mit CDK-Komplexen bekannt sind, sollte aufgrund der konservierten N-terminalen Domänen von einem gleichen Mechanismus wie bei p27 und dem CDK2/Cyclin A-Komplex ausgegangen werden.

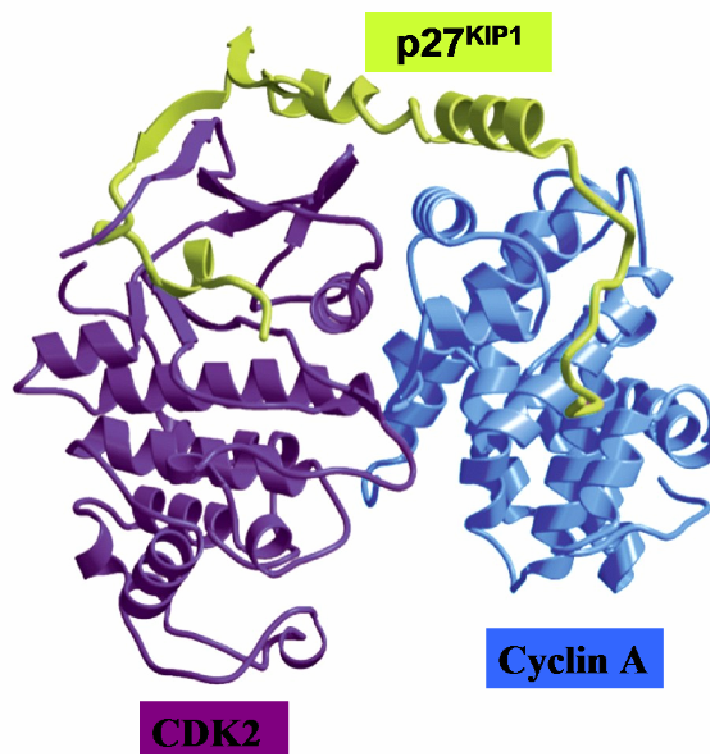


Abbildung 1.5: Kristallstruktur von p27^{KIP1} im Komplex mit CDK2 und Cyclin A

Die Abbildung zeigt ein N-terminales p27-Fragment von Aminosäure 22 – 106 (Gesamtlänge 198 Aminosäuren). Das Cyclin A-Fragment reicht von Aminosäure 175 – 342 (Gesamtlänge 423), das CDK2-Fragment reicht von Aminosäure 13 bis 298 (Gesamtlänge 298)(Russo et al., 1996).

2.4.2.1 p21 und die Regulierung des Zellzyklus

p21 wurde 1993 von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert und ist damit das am längsten bekannte Mitglied der CIP/KIP-Familie. El-Deiry et al. konnten 1993 zeigen, dass p21 als Mediator eines von p53-induzierten Zellzyklus-Arrestes fungiert (el-Deiry et al., 1993). p21 wurde von dieser Arbeitsgruppe zunächst als WAF1 (*wild-type p53 activated factor*) bezeichnet. Harper et al. identifizierten im selben Jahr p21 als potenten Inhibitor von G1-Zellzyklus-Kinasen, entsprechend der Funktion wurde p21 dann als CIP1 (*CDK-interacting protein 1*) bezeichnet (Harper et al., 1993).

Die Funktion als Mediator des p53-induzierten Zellzyklus-Arrestes trennt p21 klar von den Funktionen der beiden anderen CKIs p27 und p57 ab. Die Induktion der p21-Transkription durch den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 erfolgt als Antwort der Zelle auf verschiedene Formen von genotoxischen Stressbedingungen und mündet in einem G1- und G2-Phase Zellzyklus-Arrest. Dazu gehört die Bestrahlung mit UV- oder γ -Strahlen sowie die Exposition der Zelle mit verschiedenen alkylierenden Agenzien wie Doxorubicin. Entsprechend ist in murinen p21^{-/-}-Fibroblasten der G1-Arrest nach γ -Bestrahlung gestört (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995). Der Phänotyp liegt hier zwischen p53^{-/-}-Zellen und p53^{wt}-Zellen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass p21 nicht der alleinige Mediator für den G1-Arrest in murinen Fibroblasten ist. Dagegen konnte an der humanen Colonkarzinom Zell-Linie HCT116 gezeigt werden, dass der homozygote Verlust von p21 den G1- und G2-Arrest nach γ -Bestrahlung vollständig inhibiert (Bunz et al., 1998).

Die Abhängigkeit des Zellzyklus-Arrestes von p21 durch p53 scheint daher spezies- und zelltypabhängig zu sein.

Eine Transkription von p21 durch p53 erfolgt jedoch nicht nur nach DNA-Schädigung. Die Expression von onkogenem RAS oder RAF induziert die Expression von p21 ebenfalls p53-abhängig (Missero et al., 1996; Lloyd et al., 1997; Serrano et al., 1997). Die Folge ist ein G1-Arrest und ein Eintritt in die Seneszenz. Der Eintritt in die Seneszenz stellt einen wichtigen Mechanismus der Zelle zur Vermeidung von Hyperproliferation und additiven Mutationen dar, die eine Transformation der Zelle zur Folge haben können (Yancopoulos et al., 1985).

Die Regulation der p21-Transkription unterliegt jedoch nicht nur p53. Auch eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren wie SP1, SP3, SMADs und MYOD binden an den p21-Promotor und regulieren die Differenzierung von Zellen. MYOD induziert die p21-Transkription im Verlauf der terminalen Differenzierung von Muskelzellen (Halevy et al., 1995). Die Transkriptionsfaktoren SP1, SP3 und SMAD3/4 kooperieren bei der Transkription des p21-Promotors nach Einleitung der Differenzierung von Keratinozyten und PC12-Zellen durch TGF β (Datto et al., 1995; Billon et al., 1996; Moustakas et al., 1998). Die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 regulieren die p21-Transkription dagegen als Antwort auf eine Vielzahl antiproliferativer Wachstumssignale. Dazu zählt der Zellzyklus-Arrest in der Brustkrebszelllinie MCF7 durch Interferon- γ (Gooch et al., 2000) und der Zellzyklus-Arrest in der humanen Osteosarcom-Zell-Linie MG62 durch Interleukin-6 und Oncostatin M (Bellido et al., 1998).

Der Stopp des Zellzyklus durch p21 wird jedoch nicht nur durch die Interaktion von p21 mit CDK-Komplexen erreicht. Luo et al. zeigten, dass p21 über den N-Terminus auch an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einen Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ , binden kann (Luo et al., 1995). Die Interaktion führt zu einem Stopp der DNA-Synthese in der S-Phase. Die Inhibierung der DNA-Synthese durch p21 nach der Bindung an PCNA wird wiederum durch die potentiell onkogene Serin/Threonin-Kinase AKT verhindert. Die Kinase phosphoryliert p21 an Serin 145, wodurch p21 in der Folge nicht mehr an PCNA binden kann. Darüber hinaus interagiert p21 auch direkt mit den beiden Transkriptionsfaktoren E2F1 (Delavaine und La Thangue, 1999) und c-MYC (Kitaura et al., 2000). Beide Transkriptionsfaktoren sind essentiell an der Einleitung der S-Phase beteiligt. Auch hier wurde die Transkription von S-Phase spezifischen Genen durch die Bindung von p21 an die Transkriptionsfaktoren inhibiert.

2.4.2.2 p57 und die Regulierung des Zellzyklus

Als drittes Mitglied der CIP/KIP-Familie konnte p57 zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und charakterisiert werden (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995). Homolog zu p21 und p27 besitzt p57 eine N-terminal gelegene Cyclin- und CDK-Bindungsdomäne. Am C-terminalen Ende von p57 befindet sich zudem eine QT-Domäne, die eine geringe Sequenzhomologie zum C-terminalen Ende von p27 aufweist. Aus diesem Grund wurde p57 auch in Verwandtschaft zu p27 (auch KIP1 genannt) gestellt und daher als KIP2 bezeichnet (Matsuoka et al., 1995).

Die restliche Struktur von p57 ist im Vergleich zu p21 und p27 jedoch deutlich komplexer. Humanes p57 ist ein aus 316 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,3 kDa. Das Laufverhalten bei der

gelelektrophoretischen Auftrennung deckt sich jedoch mit der Größe eines 57 kDa globulären Proteins. Zwischen der CDK-Bindungsdomäne und der QT-Domäne liegt eine 77 Aminosäuren lange Region, die aufgrund der sich abwechselnden Wiederholungen von Prolin und Alanin auch als PAPA-Region bezeichnet wird (Matsuoka et al., 1995). Bis heute ist die Funktion dieser Region nicht bekannt. Ein Polymorphismus dieser Region wird jedoch mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs in Zusammenhang gebracht (Li et al., 1999).

Im Gegensatz zur p21 und p27 ist p57 essentiell an der Embryonalentwicklung von Mäusen beteiligt. p57^{-/-}-Mäuse weisen eine Vielzahl von schweren Entwicklungsstörungen auf und sterben nach der Geburt (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die Expression von p57 erfolgt während der Embryogenese und in adulten Mäusen gewebespezifisch und wird von verschiedenen differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktoren wie MyoD, Notch/Hes1 und Bmp-2/Bmp-6 gesteuert (Georgia et al., 2006; Vaccarello et al., 2006; Gosselet et al., 2007). Transgene Mäuse, die eine weitere Kopie des *cdkn1c*-Gens besitzen, zeigen ebenfalls schwere Entwicklungsstörungen und sterben nach der Geburt (Andrews et al., 2007). Beim Menschen geht eine gestörte Expression von p57 in einigen Fällen mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) einher. Das Syndrom ist gekennzeichnet durch übermäßiges prä- und postnatales Wachstum mit meist geringer geistiger Beeinträchtigung. Gleichzeitig liegt ein erhöhtes Risiko für einen Wilms-Tumor, einem Nierentumor bei Kindern, vor.

Ebenso wie p21 ist p57 auch an der Regulation der Transkription beteiligt. p57 kann mit PCNA, dem Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ , interagieren und somit die DNA-Replikation inhibieren (Watanabe et al., 1998). p57 interagiert bei der Differenzierung von Myoblasten-Zellen ebenfalls mit dem Transkriptionsfaktor MYOD (Reynaud et al., 1999; Reynaud et al., 2000). Die Interaktion führt zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors, es kommt zu einer verstärkten Transkription von muskelspezifischen Genen, wobei gleichzeitig die Kinase-Aktivität von CDK2 durch p57 inhibiert wird. MYOD wird dagegen in proliferierenden Myoblasten von CDK2 phosphoryliert, was zur Destabilisierung des Transkriptionsfaktors führt und die Differenzierung verhindert.

2.5 p27 und die Regulierung des Zellzyklus

p27 wurde 1994 zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt. Toyoshima und Hunter identifizierten 1994 p27 in einem *yeast two hybrid screen* als ein mit CDK4/Cyclin D interagierendes 27 kDa großes Protein (Toyoshima und Hunter, 1994). Polyak et al. konnten ebenfalls 1994 zeigen, dass p27 durch TGF β nach der Kontaktinhibierung von Epithel-Zellen heraufreguliert wird und ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase erfolgt (Polyak et al., 1994a). Gleichzeitig konnte von der gleichen Gruppe auch die cDNA kloniert werden (Polyak et al., 1994b). Nachfolgende Veröffentlichungen zeigten, dass p27 an der Regulierung des Zellzyklus von der G0-Phase bis zur S-Phase beteiligt ist (Chu et al., 2008). p27 fungiert in der G1-Phase als Mediator zwischen der Entscheidung, den Zellzyklus zu verlassen und in die G0-Phase einzutreten oder eine weitere Runde des Zellzyklus zu durchlaufen und mit der S-Phase zu beginnen. Die Aktivität und Proteinkonzentration von p27 wird in der G1-Phase von einer Vielzahl extrazellulärer und intrazellulärer, proliferativer oder antiproliferativer Signalwege gesteuert. Eine Akkumulation von p27 erfolgt neben der Kontaktinhibierung ebenfalls bei Verlust der Zelladhäsion (Fang et al., 1996; Besson et al., 2004), bei Entzug von Nährstoffen in der Zellkultur sowie bei Eintritt in die Differenzierung von Zellen (Durand et al., 1997).

Das Gegenteil ist bei Zellen der Fall, die sich konstant teilen oder von der G0-Phase in die G1-Phase eintreten. Hier fällt die p27-Konzentration auf Proteinebene stark ab.

Der CKI p27 bindet in der G1-Phase sowohl an CDK4/6/Cyclin D- sowie CDK2/Cyclin E-Komplexe. Werden in der frühen G1-Phase die CDK4/6/Cyclin D-Komplexe durch p27 inhibiert, wird die RB-Proteinfamilie nicht durch die Kinase-Komplexe initial phosphoryliert. Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind dann nicht in der Lage, Gene für die Einleitung der S-Phase zu transkribieren. Die Konsequenz ist ein Stopp des Zellzyklus vor dem Restriktionspunkt in der G1-Phase.

Die Funktion von p27 als Inhibitor von CDK4/6/Cyclin D-Komplexen in der frühen G1-Phase ist allerdings strikt abhängig von äußeren antiproliferativen Signalen. Proliferiert die Zelle, liegt der ternäre Komplex aktiv vor. Untersuchungen in den letzten Jahren konnten zeigen, dass p27 als Chaperon für den Zusammenbau von aktiven CDK4/6/Cyclin D-Komplexen fungiert (James et al., 2007; Blain, 2008; Larrea et al., 2008). *In vivo* werden CDK4/6/Cyclin D-Komplexe ausschließlich im Komplex liegend mit p27 gefunden (James et al., 2008). In p27^{-/-}-Mäusen liegt eine verringerte Anzahl von aktiven CDK4/6/Cyclin D-Komplexen vor (Cheng et al., 1999a; Cheng et al., 1999b). Der Verlust von p27 kann in diesen Zellen teilweise durch p21 kompensiert werden. Eine Re-Expression von p27 führte wieder zur Herstellung des wt-Phänotyps. Der molekulare Schalter, der p27 von einem Inhibitor des CDK-Komplexes in einen gebundenen Nicht-Inhibitor verwandelt, wird durch die Phosphorylierung von p27 gesteuert. Die Familie der SRC-Kinasen sowie die Kinase ABL werden durch eine Vielzahl von proliferativen Signalwegen aktiviert. Diese phosphorylieren p27 im CDK-Komplex liegend an den Tyrosinen 74, 88 und 89 (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007; James et al., 2007). Durch die Phosphorylierung wird die inhibitorische 3₁₀-Helix aus der katalytischen Bindungstasche von CDK4/6 verdrängt. Die Folge ist die Aktivierung der Kinasen. CDK4 und CDK6 sind dann in der Lage, die Mitglieder der RB-Familie initial zu phosphorylieren (Abbildung 1.6).

Der Mechanismus, der die inhibitorische Aktivität von p27 in der frühen G1-Phase vor dem Restriktionspunkt reguliert, kontrolliert die Aktivität von p27 auch in der mittleren G1-Phase und am G1/S-Phase-Übergang. Nach dem Überschreiten des Restriktionspunkts erfolgt die Aktivierung von CDK2 durch die Akkumulation von Cyclin E durch die Transkription von E2F-Transkriptionsfaktoren. p27 bindet an den heterodimeren Komplex und inhibiert ihn (Hitomi et al., 2006). Dadurch kann das RB-Protein nicht hyperphosphoryliert werden, und die E2F-Transkriptionsfaktoren sind nicht in der Lage, weitere Gene, deren Proteine an der Einleitung der S-Phase beteiligt sind, zu transkribieren. Wenn p27 jedoch im ternären Komplex mit CDK2/CyclinE/A tyrosinphosphoryliert vorliegt, ist CDK2 aktiv. Es kommt zur Hyperphosphorylierung des RB-Proteins und die S-Phase kann eingeleitet werden (Abbildung 1.6).

Die Funktion von p27 als Inhibitor von CDK-Komplexen in der G1-Phase wird jedoch nicht nur durch die Tyrosin-Phosphorylierungen von p27 gesteuert. So liegen nur 5-10% aller p27-Proteine in proliferierenden Zellen tyrosinphosphoryliert vor (James et al., 2007; Blain, 2008; Larrea et al., 2008). Auch die Proteinkonzentration von p27 ist maßgeblich am Fortlaufen des Zellzyklus in die S-Phase beteiligt. Die Transkription von p27 ist im Zellzyklus weitgehend konstant, so dass die Menge von p27 hauptsächlich posttranslational über proteolytische Abbauege reguliert wird (Borriello et al., 2007; Chu et al., 2008). Die höchste Konzentration von p27 liegt zu Beginn der G1-Phase vor. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn quieszente Zellen die G0-Phase verlassen und in den Zellzyklus nach Stimulierung mit mitogenen Wachstumssignalen wieder eintreten. Je weiter die G1-Phase

voranschreitet, umso stärker wird p27 abgebaut. Die Halbwertszeit von p27 ist zu Beginn der S-Phase im Vergleich zur frühen G1-Phase 5- bis 8-fach verkürzt (Nakayama et al., 2001; Nakayama und Nakayama, 2006). Bis heute sind zwei Abbauewege von p27 in der G1-Phase identifiziert worden. In der frühen G1-Phase wird p27 im Kern an Serin 10 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von p27 ermöglicht die Bindung des Exportins CRM1 an p27. Im Cytoplasma wird p27 durch die Ubiquitin-Ligase KPC1 ubiquitiniert und nachfolgend im Proteasom abgebaut (Rodier et al., 2001; Ishida et al., 2002; Connor et al., 2003). Der Export von p27 aus dem Kern in das Cytoplasma inhibiert auch die Funktion von p27 als Inhibitor der G1-Phase. Da die Kinase-Komplexe im Kern liegen, kann p27 nicht mehr an diese binden (Liang et al., 2002; Liang und Slingerland, 2003).

Der am besten charakterisierte und wahrscheinlich wirksamste Abbaueweg von p27 wird eingeleitet in der späten G1-Phase. Entscheidend ist die Phosphorylierung von p27 an Threonin 187. Die Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 schafft eine Bindungsstelle für den SCF^{SKP2} (*SCF: S-phase kinase associated protein 2 (Skp2)*) – E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und das Adaptorprotein CKS1. Die Ligase ubiquitiniert p27, so dass der Inhibitor am Ende der G1-Phase und in der S-Phase abgebaut wird (Hao et al., 2005; Nakayama und Nakayama, 2006). Entsprechend dazu führt ein Austausch von Threonin 187 durch Alanin, welches nicht mehr phosphoryliert werden kann, zu einer deutlich gesteigerten Halbwertszeit von p27 (Malek et al., 2001). Die verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 ist CDK2 selbst. Diese phosphoryliert nach der Aktivierung durch die Kinasen der SRC-Familie im Komplex liegend ihren eigenen Inhibitor und sorgt damit für den Übergang in die S-Phase (Chu et al., 2007, Grimmier et al., 2007 und Abbildung 1.6).

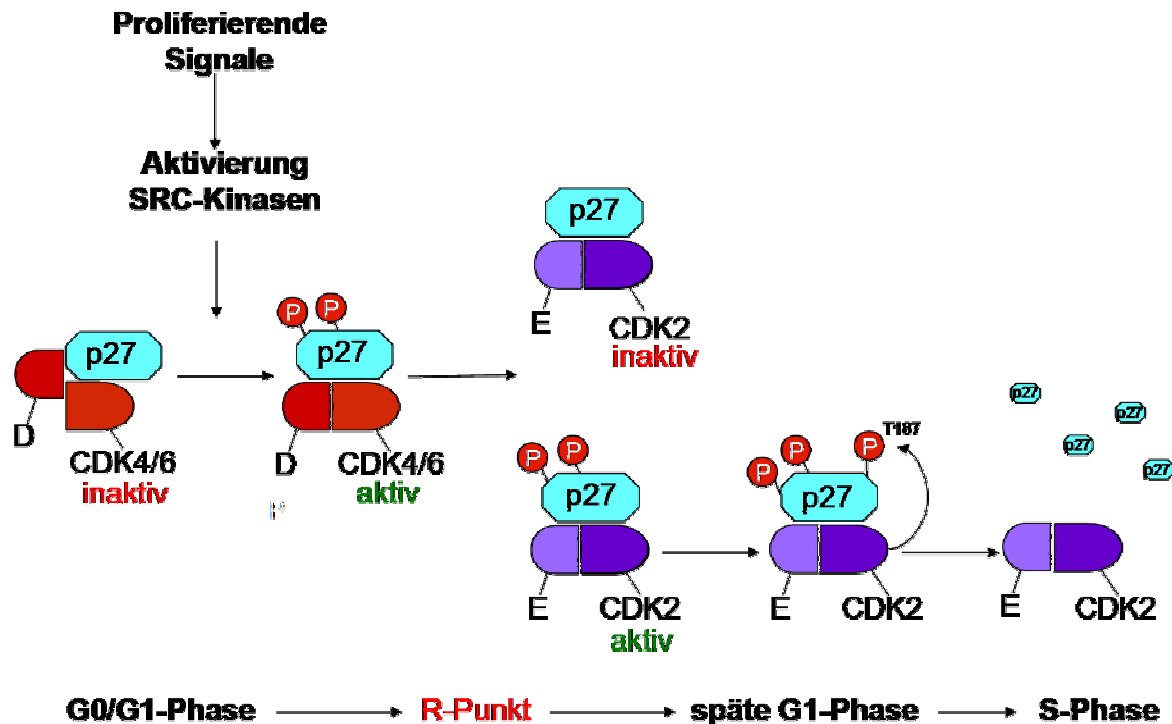


Abbildung 1.6: p27 und die Regulation der G1-Phase

Dargestellt ist der Verlauf der G1-Phase bei konstanten proliferierenden Signalen. p27 inhibiert zunächst den CDK4/CDK6-Komplex. Nach der Tyrosin-Phosphorylierung von p27 durch SRC-Kinasen liegt der CDK4/6-Komplex aktiv vor und phosphoryliert RB, wodurch der R-Punkt überschritten wird. Die Tyrosin-Phosphorylierung verhindert auch die Inhibition des CDK2-Komplexes durch p27. Es kommt zur Phosphorylierung von p27 an Threonin 187 durch CDK2, wodurch p27 in der Folge abgebaut wird. Gleichzeitig kommt es zur Hyperphosphorylierung von RB und die S-Phase wird eingeleitet. Die Chaperonfunktion von p27 für den CDK4/6/Cyclin D-Komplex zu Beginn der G1-Phase ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Die Funktion von p27 als G1-Phase-Inhibitor konnte an murinen *Knockout*-Modellen bestätigt werden. Mäuse, die eine homozygote Deletion von p27 haben, sind größer als Wildtyp-Mäuse. Hier liegen Hyperplasien von zahlreichen Organen vor. Die Mäuse erkrankten zudem häufiger an Tumoren der Hypophyse, jedoch nicht spontan an anderen Tumoren (Fero et al., 1996). Eine erhöhte Inzidenz von weiteren Tumoren wird nur nach der γ -Bestrahlung von p27^{-/-}-Mäusen oder nach der Applikation von chemischen Karzinogenen beobachtet (Fero et al., 1998). Interessanterweise tritt der gleiche Phänotyp auch bei heterozygoten p27^{+/-}-Mäusen auf, in Folge dessen wurde p27 als haploinsuffizienter Tumorsuppressor definiert. Daher scheint die Menge von p27 entscheidend für die Tumorentstehung zu sein. In der Tat liegt p27 im Kern in einer Vielzahl von humanen Tumoren auf Proteinebene stark runterreguliert vor (Slingerland und Pagano, 2000; Blain et al., 2003). Dagegen liegen nur selten Mutationen des *cdk1b*-Gens vor. Der Proteinspiegel von p27 wird bei Tumoren des Darms, Brust, Prostata sowie Ovarien als prognostischer Faktor für den Verlauf der Erkrankung genutzt. Zurzeit wird untersucht, ob sich p27 als Indikator für bestimmte Therapieoptionen eignet (Chu et al., 2008).

In den letzten Jahren wurde jedoch auch eine Reihe von onkogenen Eigenschaften von p27 abseits der Tumorsuppressor-Funktion identifiziert. Muraoka et al. und Gao et al. zeigten, dass p27^{+/-}-Mäuse eine erhöhte Inzidenz haben, an Tumoren der Brust und Prostata zu erkranken als homozygote p27^{-/-}-Mäuse (Muraoka et al., 2002; Gao et al., 2004). Eine weitere interessante Studie liegt von Besson et al. vor (Besson et al., 2007). Das Wildtyp-Allel von p27 wurde hier durch Mutagenese in der

Cyclin- und CDK-Bindungsdomäne so verändert, dass p27 nach der Expression nicht mehr an Cycline oder CDKs binden kann. Dieses p27^{CK}-Allel wurde dann wieder in p27-negative Mäuse eingeschleust. Die p27^{CK}-Mäuse entwickelten eine Vielzahl von Hyperplasien und Tumoren in Lunge, Retina, Ovarien, Milz, Nebenniere, Hypophyse sowie Lymphome. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Anzahl von Stamm- und Vorläuferzellen in der Lunge und der Retina entdeckt. Die p27^{-/-}-Mäuse entwickelten in der gleichen Studie spontan dagegen wiederum nur Tumore der Hypophyse (Besson et al., 2007; Besson et al., 2008).

Die genaue onkogene Rolle von p27 in Tumoren ist nicht aufgeklärt. Sie wird aber mit der Eigenschaft von p27 das Zytoskelett zu regulieren in Zusammenhang gebracht. Entscheidend ist hier die zytoplasmatische Lokalisation von p27. Dort bindet p27 an RHO A (*Ras homolog gene family, member A*). RHO A gehört zu der Familie der GTPasen, die im Säuger aus mindestens 20 Mitgliedern besteht. GTP-gebunden aktiviert RHO A die Kinase ROCK, die an der Ausbildung von Aktin-Stress-Fasern im Verlauf der Migration von Zellen beteiligt ist (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Fibroblasten von p27^{-/-}-Mäusen offenbaren eine verlangsamte Motilität, die auf eine erhöhte Aktivität von Rho A und eine erhöhte Anzahl von Aktin-Stress-Fasern zurückzuführen war (Besson et al., 2004). Wurde die Kinase Rock inaktiviert, konnte dagegen eine normale Motilität in den Fibroblasten wieder hergestellt werden. Wenn p27 dagegen überexprimiert wurde, lag Rho A inaktiviert vor. Dies zeigt, dass p27 an die GTPase bindet und den Austausch von aktivierendem GTP von Rho A verhindert.

Die Eigenschaft von p27, im Zytoplasma das Zytoskelett zu regulieren, scheint zumindest in einigen Zellen das Metastasierungs-Potential zu steigern. Denicourt et al. zeigten, dass schon geringfügige Mengen von p27 im Zytoplasma von Melanom-Zellen, die noch unter dem physiologischen Level von nicht-invasiven normalen Zellen lagen, zu einer erhöhten Motilität führten (Denicourt et al., 2007). Die Zellen metastasierten vermehrt in Lymphknoten, Lunge und Peritoneum. Ähnliche Daten liegen auch für Glioblastom- und Brustkrebs-Zell-Linien vor. Auch hier führte p27, welches aufgrund einer mutierten Kern-Lokalisierungssequenz ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war, zu erhöhten Motilität und Invasivität. In murinen Xenotransplantat-Modellen wurde dagegen eine verringerte Tumorigenität, Invasivität und verringertes Metastasierungs-Potential nach *Knockdown* von p27 nachgewiesen (Wu et al., 2006). Tatsächlich gilt die Lokalisation von p27 im Zytoplasma als ein negativer prognostischer Faktor bei Tumoren der Brust, Cervix, Uterus, Ösophagus sowie einigen Formen von Lymphomen und Leukämien (Chu et al., 2008).

Geringe Mengen von p27 im Zytoplasma, welche die Migration fördern, jedoch nicht mehr effektiv CDK-Komplexe im Kern inhibieren können, könnten somit einen selektiven Vorteil für Tumorzellen darstellen. Auf der anderen Seite könnte eine verstärkte Expression und/oder eine gesteigerte Halbwertszeit von p27 dem verstärkten Wachstum von Tumorzellen Einhalt gebieten. So konnte jüngst an intestinalen Tumoren der Maus gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor Argyrin, gewonnen aus dem Myxobacterium *Archangium gephyra*, p27 auf posttranslationaler Ebene stabilisiert. Die gesteigerte Halbwertszeit von p27 war verbunden mit einer erhöhten Apoptose-Rate von Tumorzellen und verhinderte auch die Neovaskularisierung des Tumors (McConkey, 2008; Nিকেleit et al., 2008). Ob die Ergebnisse auf andere Tumore übertragen werden können oder der Wirkstoff sich auch für den Menschen eignet, bleibt abzuwarten.

Die Funktion und die Regulierung von p27 waren und sind Gegenstand intensiver Forschung. Da p27 in Tumoren posttranslational runterreguliert vorliegt, könnte durch

ein besseres Verständnis der Modifikationen, die zu einer Stabilisierung oder zum Abbau von p27 auf Proteinebene führen, neue Ansatzpunkte zur Entwicklung von Medikamenten oder eine Vorhersage von p27 als prognostischem Faktor geschaffen werden. Neben der Phosphorylierung waren bislang keine weiteren posttranslationalen Modifikationen von p27 bekannt.

2.6 Die Acetylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen

Posttranslationale Modifikationen sind entscheidend für die Regulierung und Funktion von eukaryotischen Proteinen. Die Acetylierung gehört neben der Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung zu den bekanntesten und ist zudem die häufigste reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen (Yang und Seto, 2007).

Die Acetylierung von Histonen ist seit über 40 Jahren bekannt (Allfrey und Mirsky, 1964; Allfrey et al., 1994). Diese Modifikation konnte zwar in Zusammenhang mit der Regulierung der Transkription in Eukaryoten gebracht werden, ein genaues Verständnis der Funktion blieb jedoch in den nächsten 30 Jahren aus, da die Identifikation der verantwortlichen Enzyme nicht erfolgte. Erst 1996 konnte mit GCN5 die erste Histon-Acetyltransferase identifiziert werden (Brownell et al., 1996), wobei im gleichen Jahr die Entdeckung der ersten Histon-Deacetylase folgte (Taunton et al., 1996). Der Ausdruck Histon-Acetyltransferase/Deacetylase ist jedoch irreführend und hat historische Gründe. Die Acetylierung und Deacetylierung erfolgt nicht nur an Histonen. Bis heute sind über 1750 Proteine identifiziert worden, die der Acetylierung und Deacetylierung unterliegen (Choudhary et al., 2009) und das Acetylom begründen.

Generell katalysieren Histon-Acetyltransferasen (HATs) die Übertragung der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf die ϵ -Aminogruppe von Lysinen. Dadurch wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert. Die Acetylierung konkurriert mit weiteren posttranslationalen Modifikationen von Lysinen und verhindert beispielsweise die Methylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung (Yang und Seto, 2008). Die Entfernung der Acetyl-Gruppe wird dagegen durch Histon-Deacetylasen (HDACs) gesteuert (Abbildung 1.7).

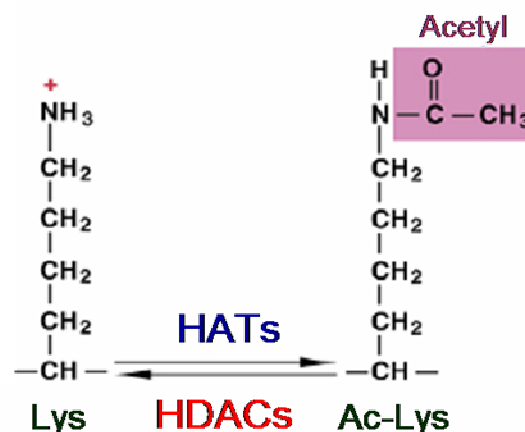


Abbildung 1.7: Die reversible Acetylierung von Lysinen
(Abbildung modifiziert nach (Yang und Seto, 2007)).

HATs werden aufgrund Ihrer Ähnlichkeit untereinander in drei Familien aufgeteilt. GCN5 ist das erste identifizierte Mitglied der GNAT (*GCN5-related N-acetyltransferases*)-Familie. Ebenfalls zur Familie gehören noch PCAF, ELP3, HAT1, HPA2 und NUT1 (Kimura et al., 2005). Alle Familienmitglieder besitzen drei konservierte Aminosäuresequenzen, die nur jeweils eine Länge von acht Aminosäuren haben. Die zweite Familie der HATs ist die MYST-Familie. Die Familie wurde nach ihren vier Gründungsmitgliedern MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 und TIP60 benannt. Zu dieser Familie gehören noch mindestens fünf weitere Mitglieder, die alle eine MYST-Domäne besitzen. Die MYST-Domäne ist homolog zu der kanonischen Acetyl-CoA-Bindungs-Domäne der GNAT-Familie. Die dritte Gruppe der HATs wird durch die beiden paralogen und homologen HATs CBP (*cyclic AMP response element-binding (CREB) protein-binding protein*) und p300 (*E1A-associated protein of 300 kDa*) gebildet. Darüber hinaus besitzt noch eine Reihe von weiteren Proteinen intrinsische HAT-Aktivität. Dazu gehören Untereinheiten von Transkriptionsfaktoren, wie TAF₂-250 des TFIID-Transkriptionsfaktors sowie eine Gruppe von HATs, die als Co-Aktivatoren von nukleären Hormonrezeptoren fungieren (Lee und Workman, 2007).

Im Menschen wurden bisher insgesamt 18 humane HDACs identifiziert. (Bolden et al., 2006; Kazantsev und Thompson, 2008; Haberland et al., 2009). Diese werden in vier Klassen, basierend auf ihrer Homologie zu Hefe-HDACs, aufgeteilt. Die Klasse I der HDACs (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) ist homolog zu dem Hefeprotein rpd3 (reduced potassium dependency-3), wobei die Mitglieder generell im Zellkern vorliegen. Mitglieder der Klasse II der HDACs (HDAC 4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10) sind überwiegend homolog zum Hefeprotein hda1 (histone deacetylase-1) und liegen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vor. Die Klassen I und II gehören zu den Zink-abhängigen Deacetylasen. Zu der Klasse IV zählt nur HDAC11, welches Homologien sowohl zur RPD3- als auch zur HDA1-Familie aufweist und daher eine separate Klasse bildet. Die Klasse III der Deacetylasen besteht aus der Familie der Sirtuine (*Sir2-like protein*). Die sieben bisher gefundenen humanen Sirtuine sind homolog zum Hefeprotein sir2 (silent information regulator-2) und besitzen zum Teil neben ihrer Deacetylase-Aktivität auch eine Mono-ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität. Das Besondere an dieser Klasse ist, dass die Aktivität der Sirtuine vom Redox-Status in den Zellen abhängig ist. So benötigen die Mitglieder NAD⁺ als Cofaktor für ihre Deacetylase-Aktivität (Lavu et al., 2008).

Die Funktion der HATs wurde lange Zeit nur mit der Auflockerung des Chromatins und der Regulierung der Transkription in Zusammenhang gebracht. HATs acetylieren die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4. Ein Octamer aus jeweils zwei der Kernhistone bildet ein Nukleosom, auf denen 147 Baseneinheiten der DNA aufgewickelt sind (Marmorstein und Roth, 2001). Die Acetylierung erfolgt hauptsächlich im unstrukturierten N-terminalen Bereich der Histone und führt zur Neutralisation der positiven Ladung, die in Wechselwirkung mit dem negativen geladenen Phosphatrückgrat der DNA steht. Dadurch lockert sich die Chromatinstruktur und Transkriptionsfaktoren erlangen Zutritt an die DNA. Die Acetylierung einzelner Lysine steht zudem in Wechselwirkung mit weiteren posttranslationalen Modifikationen wie Methylierungen und Phosphorylierungen (Kouzarides, 2007). An die Modifikationen können weitere Proteine über spezifische Erkennungsdomänen binden, die wiederum die Transkription beeinflussen. Strahl und Allis propagierten den Histon-Code, nach dem die Gesamtheit aller

posttranslationalen Modifikationen der Histone die Aktivität der Transkription zeitlich und räumlich reguliert (Strahl und Allis, 2000).

Entsprechend zum Histon-Code liegen HATs in einer Vielzahl unterschiedlicher Proteinkomplexe an der DNA vor. Die Untereinheiten in den Komplexen regulieren zum einen die Substratspezifität der HATs als auch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Alland et al., 2002; Denslow und Wade, 2007). Beispielsweise konnten bisher fünf große HAT-Komplexe charakterisiert werden, in dem GCN5 die katalytische Einheit ist. Einer von den Komplexen ist der SAGA (SPT-ADA-GCN5-acetyltransferase)-Komplex. Der Komplex besitzt 19 bekannte Untereinheiten, von denen 15 vermeintliche Chromatin-Interaktionsdomänen besitzen (Lee und Workman, 2007). Einzelne Untereinheiten wie SPT7 und CHD1 besitzen eine Bromo- bzw. Chromodomäne, mit denen sie an acetylierte oder methylierte Lysine binden können, wobei die modifizierten Lysine nicht von Histonen stammen müssen. CHD1 gehört zu den *ATP-dependent chromatin remodelling factors*, die ebenfalls an der Auflockerung der Chromatin-Struktur beteiligt sind. Im SAGA-Komplex acetyliert GCN5 Lysin 9 von Histon H3 (H3K9) sowie weniger stark H3K14. Im SLIK (SAGA-like)-Komplex dagegen, der aus 17 Untereinheiten besteht, liegt die Präferenz von GCN5 auf den Histonen H2B, H3 und H4. Beide Komplexe besitzen zum Teil redundante Funktionen, haben aber auch klar getrennte Funktionen bei Transkription und DNA-Reparaturmechanismen (Pray-Grant et al., 2002; Sterner et al., 2002; Wu und Winston, 2002; Smith und Workmann, 2009).

Eine ähnlich komplexe Situation liegt bei HDACs vor. Da HDACs die Entfernung der Acetyl-Gruppe von Histonen katalysieren, werden diese allgemein mit der Reprimierung von Genen in Zusammenhang gebracht. Mit Ausnahme von HDAC8 agieren beispielsweise alle Mitglieder der Klasse I in großen Proteinkomplexen (Yang und Seto, 2008). Darüber hinaus ist die katalytische Aktivität einzelner HDACs strikt abhängig von Komplexpartnern. Dies macht die ausführliche Charakterisierung einzelner HDACs schwierig. Beispielsweise ist die Funktion von HDAC1 im Säuger strikt abhängig von HDAC2, wobei insgesamt drei große Komplexe identifiziert werden konnten, die in unterschiedlichem zellulären Kontext fungieren. Einer davon ist der SIN3-Komplex, der neben HDAC1 und HDAC2 mindestens 10 weitere Untereinheiten besitzt und ein Molekulargewicht von 10 MDa hat. Acht der zehn Untereinheiten werden wiederum selbst an 18 unterschiedlichen Stellen acetyliert (Choudhary et al., 2009). Der Komplex reguliert unter anderem den Zellzyklus, indem er mit dem RB-Protein interagiert und dadurch die Transkription von E2F-abhängigen Genen inhibiert (Lai et al., 1999; Lai et al., 2001). Der Komplex ist zudem in der Progression der G2-Phase involviert (Pile et al., 2002; David et al., 2003).

Neben Histonen ist eine Vielzahl von weiteren Kern-Proteinen beschrieben, die der Acetylierung/Deacetylierung unterliegen. Diese sind in allen wichtigen Kernprozessen wie DNA-Transkription, DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, *chromatin remodelling* Prozessen sowie nukleärem Transport involviert. Der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 ist dabei das am stärksten untersuchte Nicht-Histon-Substrat der HATs und HDACs. Die Acetylierung von p53 reguliert eine Vielzahl diverser Prozesse von p53. Mindestens vier HATs und vier HDACs regulieren die Bindung von p53 an die DNA, die Ubiquitinierung, die Wechselwirkung mit anderen posttranslationalen Modifikationen und die Interaktion mit weiteren Bindungspartnern (Yang und Seto, 2008).

Eine Hochdurchsatzanalyse, bei der 1750 acetylierte Proteine identifiziert werden konnten, offenbarte eine annähernd gleiche Verteilung von acetylierten Proteinen im Kern und im Zytoplasma (Choudhary et al., 2009). Dagegen sind bisher nur zwei

HATs und zwei HDACs identifiziert worden, die auch im Zytoplasma fungieren. p300 und CBP acetylieren hier den Interferon-alpha-Rezeptor (Tang et al., 2007), HDAC6 und SIRT2 deacetylieren Mikrotubuli und α -Tubulin (Westermann und Weber, 2003). Die verantwortliche HAT dagegen ist unbekannt. Die Vielzahl der acetylierten Proteine im Zytoplasma macht es jedoch wahrscheinlich, dass CBP/p300, HDAC6 und SIRT2 nicht die einzigen Proteine sind, die den Acetylierungs/Deacetylierungs-Prozess im Zytoplasma regulieren.

In den letzten zehn Jahren konnten Studien zeigen, dass eine deregulierte Acetylierung/Deacetylierung von Proteinen in einer Vielzahl von Erkrankungen vorliegt. Insbesondere HDAC-Inhibitoren könnten einen wichtigen therapeutischen Nutzen bei Behandlung von Krebs als auch von neuronalen Erkrankungen haben (Minucci und Pelicci, 2006; Kanzantsev und Thompson, 2008; Haberland et al., 2009). Dazu zählen mehrere Formen von Lymphomen und Leukämien sowie Multiple Sklerose, Chorea Huntington sowie das Rubinstein-Taybi-Syndrom (Khan und La Thangue, 2008). Die Wirkung der Inhibitoren ist dabei vielfältig. Generell wird ein Zellzyklus-Arrest induziert, der sowohl die G1-Phase als auch die G2-Phase betrifft. Der Arrest ist oft mit dem Eintritt in die Differenzierung verbunden. Dabei wird in einigen Zellarten eine Heraufregulierung von p21 und p27 beobachtet (Laggar et al., 2002; van de Mark et al., 2003; Chen und Faller, 2005). In vielen Zellen wird zudem ein Apoptoseprogramm eingeleitet. Untersuchungen gehen davon aus, dass insgesamt nur 10% des Genoms durch HDAC-Inhibitoren betroffen sind, wobei einige Gene transkriptional heraufreguliert, andere herabreguliert werden (Choudhary et al., 2009). Die genauen Mechanismen, die zur Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellzyklus-Arrest in erkrankten Zellen führen, aber gesunde Zellen dagegen aussparen, sind zum großen Teil unaufgeklärt. Dennoch laufen 80 klinische Studien zur weiteren Zulassung von HDAC-Inhibitoren. Ein erstes Medikament, SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), ein Hydroxamat-Abkömmling, wurde jüngst zur Behandlung von refraktären kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen (Mann et al., 2007).

2.7 Aufgabenstellung

Krebs ist die Folge eines deregulierten Zellzyklus. Der Tumorsuppressor p27 reguliert den Zellzyklus von der G0-Phase bis zur S-Phase und ist in vielen Krebsarten herabreguliert. Untersuchungen zeigen, dass die Funktion und Stabilität von p27 posttranslational durch Phosphorylierung gesteuert wird, andere posttranslationale Modifikationen waren bislang unbekannt. Die Entdeckung von weiteren Modifikationen, die die Funktion und die Stabilität von p27 beeinflussen, ist wünschenswert. Diese könnten möglicherweise zum besseren Verständnis der Krebsentstehung sowie neuen therapeutischen Ansätzen in der Therapie sowie weiteren Aufschluss über die Eignung von p27 als Tumormarker geben.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Acetylierung eine bisher unbekannte neue posttranslationale Modifikation von p27 darstellt. Zunächst wurden HATs identifiziert, die p27 acetylieren. Die Acetylierung wurde dann in *in vivo* und *in vitro* Experimenten verifiziert. Ein weiteres Ziel war die Identifikation der acetylierten Lysine von p27. Anschließend erfolgte die Analyse der Regulation und Funktion der p27-Acetylierung.

3 Ergebnisse

3.1 Die Verifizierung der Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27

3.1.1 *In vivo* Acetylierung von p27 durch die HATs CBP/p300

Erste Hinweise, dass die Acetylierung eine neue posttranslationale Modifikation von p27 darstellen könnte, ergaben sich aus zwei Veröffentlichungen: Chen und Faller beschrieben in Ihrer Veröffentlichung 2004 den posttranslationalen Anstieg des p27-Proteinspiegels nach Behandlung von NIH3T3-Zellen mit den HDAC-Inhibitoren Natrium-Butyrat und Trichostatin A (Chen und Faller, 2005). Eine weitere Veröffentlichung im selben Jahr offenbarte einen Zusammenhang zwischen der HAT CBP und p27. Ein konditionaler *Knockout* von CBP im murinen hämatopoetischen Gewebe führte zu einer Verringerung des p27-Proteinspiegels und zur spontanen Entwicklung von Lymphomen gegenüber der Wildtyp-Maus (Kang-Decker et al., 2004). Aus diesen Daten konnte gefolgert werden, dass die p27-Proteinmenge in Zellen der Maus positiv durch Acetyltransferasen reguliert wird und p27 möglicherweise selbst ein Ziel für die Acetylierung ist.

Um eine direkte Acetylierung von p27 durch HATs zu zeigen, wurde in einem ersten Experiment von Dr. Jörg Vervoorts-Weber aus dieser Arbeitsgruppe Flag-getaggttes humanes p27 mit einer Reihe von HATs in HEK293T-Zellen überexprimiert (Abbildung 3.1). Dazu zählen die beiden paralog und homolog verwandten humanen Acetyltransferasen CBP (Bannister und Kouzarides, 1996) und p300 (Ogryzko et al., 1996) sowie humanes PCAF (*p300/CBP-associated factor*). Die Überexpression von einer dominant negativen CBP Δ HAT-Mutante, welche durch die Deletion von einzelnen Aminosäuren keine Acetyltransferase-Aktivität mehr besitzt, diente als Negativ-Kontrolle. Nach der Immunpräzipitation (IP) von Flag-getaggttem p27 erfolgten eine SDS-PAGE und ein Western-Blot. Der Nachweis der Acetylierung von p27 erfolgte mit einem für acetylierte Lysine (AcK-) spezifischen Antikörper (Abbildung 3.1).

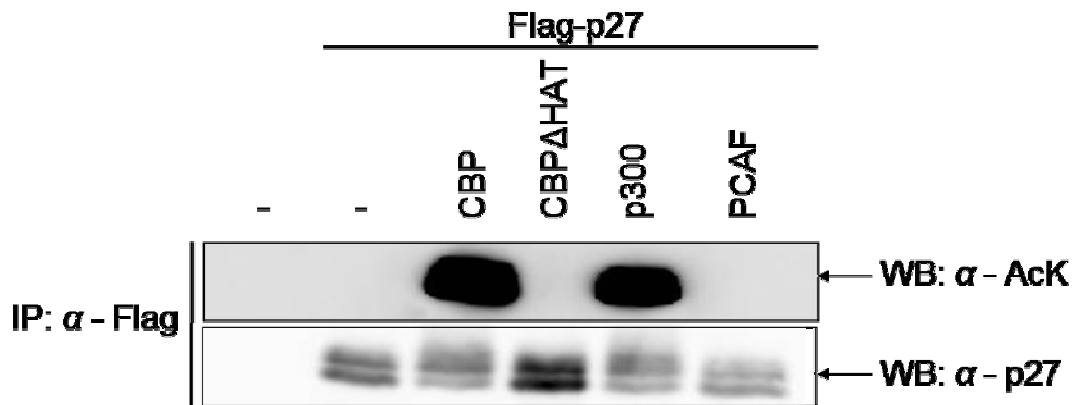


Abbildung 3.1: *In vivo* Acetylierung von p27 durch CBP und p300 (Dr. J. Vervoorts-Weber)

In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293T-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g pSC2⁺Flag-p27-Plasmid-DNA und jeweils 3 μ g pVR1012Gal4-CBP-, pVR1012Gal4-CBP Δ HAT-, pVR1012Gal4-p300- und pVR1012Gal4-PCAF-Plasmid-DNA. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm wurde p27 mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Antikörper inkubiert.

Nach der Inkubation des Blots mit dem AcK-spezifischen Antikörper konnten klare Signale auf der Höhe des Molekulargewichts von Flag-getaggetem p27 in den Ansätzen festgestellt werden, in denen p27 mit den beiden verwandten HATs CBP und p300 überexprimiert worden war. Keine Signale konnten dagegen in dem Ansatz detektiert werden, in denen p27 zusammen mit der dominant negativen CBP Δ HAT-Mutante transfiziert worden war. Auch konnte keine Acetylierung von p27 durch die Acetyltransferase PCAF festgestellt werden.

Nach dem Strippen des Blots und der Inkubation mit einem p27-spezifischen Antikörper zeigte sich eine relativ gleichmäßige Expression von p27 in den Ansätzen mit den überexprimierten Acetyltransferasen CBP, p300 und PCAF. Ein etwas stärkeres Signal für p27 wurde in dem Ansatz detektiert, in dem p27 alleine überexprimiert worden war. Eine deutlich größere Menge an p27 konnte hingegen aus dem Lysat präzipitiert werden, in dem p27 mit der dominant negativen CBP Δ HAT-Mutante überexprimiert worden war. Dieses Ergebnis könnte auf eine negative Regulierung von p27 durch die Acetyltransferasen CBP und p300 in HEK293T-Zellen hindeuten.

Auffallend ist zudem, dass p27 als Doppelbande im Gel erscheint. Ishida et al. konnten 2004 zeigen, dass dieses Laufverhalten durch die Phosphorylierung von p27 entsteht (Ishida et al., 2004). Die Phosphorylierung an Serin 10 von p27 führt zu einer Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE. Die obere Bande stellt daher vermutlich die an Serin 10 phosphorylierte Form von p27 dar.

3.1.2 Co-Immunpräzipitation (Co-IP) von CBP mit p27

Um die Interaktion von p27 mit CBP weiter zu verifizieren, wurden Co-IP-Experimente durchgeführt. Dabei wird mittels spezifischem Antikörper zunächst ein Ziel- oder Primärprotein unter nicht stringenten Bedingungen aus einem Zell-Lysat immunpräzipitiert. Potenzielle Komplex- oder Bindungspartner sollen dabei mit dem

Zielprotein aus dem Zell-Lysat co-immunpräzipitiert werden. Nach der SDS-PAGE können dann interagierende Proteine des Zielproteins mit spezifischen Antikörpern auf dem Western-Blot detektiert werden.

Für die Co-IP wurden HEK293-Zellen mit Flag-getaggtm p27 und CBP transfiziert. Nach der IP von p27 wurde dann die Anwesenheit von CBP mit Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 3.2).

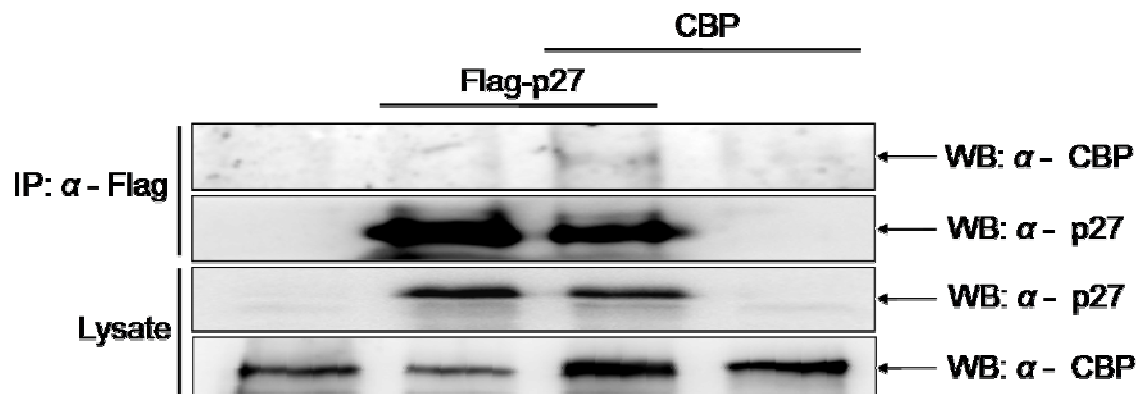


Abbildung 3.2: Co-IP von CBP mit Flag-getaggtm p27

In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen jeweils mit 1 µg pSC2⁺Flag-p27-Plasmid-DNA und mit 3 µg pVR1012Gal4-CBP-Plasmid-DNA. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit 300 µl Co-IP-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm wurde p27 mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Tank-Blot erfolgte die Inkubation des Blots mit p27- und CBP-spezifischen Antikörpern.

Die Detektion von p27 in den HEK293-Zellen lässt erkennen, dass die Zellen einen niedrigen endogenen p27-Spiegel besitzen. Signale für p27 konnten nur in den Lysaten festgestellt werden, in denen p27 überexprimiert worden war. Klar erkennbare Signale in allen vier Ansätzen konnten dagegen für CBP in den Lysaten festgestellt werden. Es wird ersichtlich, dass CBP trotz Transfektion der Zellen mit 3 µg pVR1012Gal4-CBP Plasmid-DNA nicht übermäßig stark in den Zellen im Vergleich zu untransfizierten Ansätzen und endogenem CBP überexprimiert wurde. Entweder ist dies auf eine schlechte Transfektion des mit über 20 kb großen Plasmids zurückzuführen oder aber die Transkription/Translation von CBP oder Abbauwege in der Zelle führten zu diesem Ergebnis. Auch scheint es, dass die alleinige Transfektion von p27 einen negativen Effekt auf die Expression von endogenem CBP hat.

Die starken Signale für p27 nach der Flag-IP im Vergleich zum Lysat-Blot trotz geringer Belichtungszeit am Detektionsgerät *Las 3000* machen in diesem Fall die Effizienz der Flag-IP und die starke Überexpression von p27 deutlich.

Ein schwaches Signal nach Detektion mit einem CBP-spezifischen Antikörper auf Höhe von 300 kDa lässt auf eine Interaktion von p27 und CBP in den Zellen schließen. Keine Signale für CBP wurden dagegen in der Leerkontrolle und in den zwei Ansätzen detektiert, in denen p27 und CBP jeweils einzeln überexprimiert worden waren. Eine Interaktion von Flag-getaggtm p27 mit endogenem CBP konnte daher bei diesem Experiment nicht festgestellt werden.

3.1.3 *In vitro* Acetylierung von p27 durch CBP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass p27 von CBP und p300 *in vivo* acetyliert wird, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob eine direkte Acetylierung von p27 durch CBP und p300 *in vitro*, d.h. ohne mögliche weitere Komplexpartner erfolgen kann.

Dazu wurde zunächst His-getaggttes humanes CBP rekombinant in Sf9-Insektenzellen aufgereinigt. Gleichzeitig wurde die humane p27-Sequenz aus dem pSC2⁺-Vektor ausgeschnitten und in den pGEX5x3-Vektor inkloniert. Somit lag die p27-DNA-Sequenz N-terminal fusioniert mit der Sequenz eines GST-Tags vor. Das gleiche Verfahren erfolgte mit der DNA-Sequenz der p27ΔK-Mutante. Bei dieser Mutante wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese alle 13 Lysine gegen Arginine ausgetauscht. Somit kann keine Acetylierung von Lysinen durch Acetyltransferasen erfolgen. Nach erfolgreicher Aufreinigung von GST-p27wt- und GST-p27ΔK-Protein aus *E.coli* und Abschätzung der aufgereinigten Menge durch Vergleich mit einem BSA-Standard nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (nicht gezeigt) wurde mit His-getaggttem CBP und aufgereinigtem p27 ein HAT-Assay durchgeführt (Abbildung 3.3).

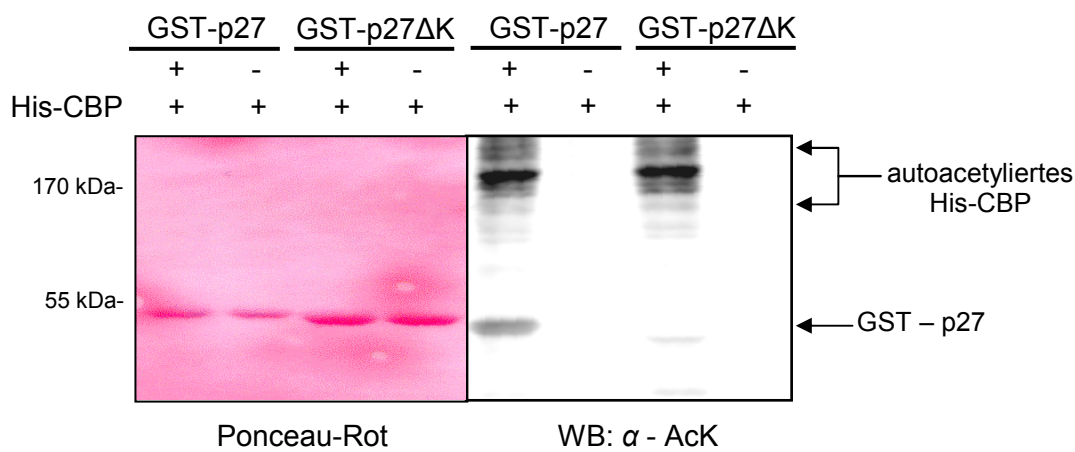


Abbildung 3.3: *In vitro* Acetylierung von p27 durch CBP

Jeweils 0,3 µg aus *E.coli* aufgereinigtes GST-p27wt und GST-p27ΔK wurden mit 3 µl baculoviral aufgereinigtem His-CBP und 6 µl 5 x HAT-Puffer bei einem Gesamtansatz von 30 µl vermischt. Nach Zugabe von 25 mM Acetyl-CoA erfolgte die Inkubation für 60 min bei 30°C. Die Reaktion wurde durch das Aufkochen mit 5 µl 5 x Proben-Puffer gestoppt. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde die Membran mit Ponceau-Rot angefärbt. Die Detektion der acetylierten Proteine erfolgte nach Inkubation mit einem AcK-spezifischen Antikörper.

Mittels Ponceau-Rot-Färbung konnten die eingesetzten GST-p27-Protein-Konzentrationen sichtbar gemacht werden. Diese liegen auf Grund des fusionierten GST-Tags (26 kDa) bei 53 kDa im Vergleich zu einem Protein-Marker. GST-p27ΔK zeigt ein leicht schnelleres Laufverhalten gegenüber GST-p27wt.

Eingesetztes His-CBP wurde durch das Ponceau-Rot nicht angefärbt. Die eingesetzte Menge an His-CBP war offenbar zu gering für diese Art der Anfärbung. Nach Inkubation mit dem AcK-Antikörper konnte eine deutliche Bande auf Höhe des GST-p27wt-Proteins im Vergleich zur Ponceau-Rot-Färbung detektiert werden. Keine acetylierten Proteine konnten dagegen in den Ansätzen festgestellt werden, in denen kein Acetyl-CoA vorhanden war. Im Gegensatz zu GST-p27wt konnte auch kein

Signal für die Acetylierung von GST-p27 Δ K detektiert werden. Die mögliche Acetylierung des GST-Tags ist damit ebenfalls ausgeschlossen.

Auffallend ist die starke Autoacetylierung des aufgereinigten His-CBP in den Ansätzen, in denen Acetyl-CoA vorhanden war. Das Erscheinen von multiplen Banden bis runter zur 100 kDa Markierung deutet auf Degradationsprodukte von His-CBP hin.

3.1.4 Acetylierung von p27 durch endogene HATs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass p27 von CBP und p300 sowohl nach Überexpression *in vivo* als auch durch baculoviral aufgereinigtes CBP *in vitro* acetyliert wird, sollten zunächst Zell-Linien und Methoden untersucht werden, bei denen die Acetylierung von p27 durch endogene Acetyltransferasen nachweisbar ist.

Eine Vermutung, dass die transformierte murine Zell-Linie NIH3T3 geeignet für den Nachweis der p27-Acetylierung sein könnte, ergab sich aus der Veröffentlichung der Daten von Chen und Faller. Dort führte der Einsatz von den HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA) und Natrium-Butyrat (Na-Butyrat) zu einem posttranslationalen Anstieg von p27 (Chen und Faller, 2004). Neben dem Bezug zu HATs war daher auch die Möglichkeit gegeben, größere Mengen von p27 auf Acetylierung zu untersuchen.

Um mögliche speziesabhängige Unterschiede in der Acetylierung auszuschließen, sollte zudem eine humane Zell-Linie untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die humane Colonkarzinom-Zell-Linie HCT116 gewählt.

Um die Acetylierung von p27 durch endogene Acetyltransferasen zu zeigen, wurden HCT116-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und mit pSC2⁺Flag-p27 Plasmid-DNA transfiziert. Um eine Verstärkung der Acetylierung von p27 und damit die Detektion zu erleichtern, wurden die Zellen sechs Stunden vor der Lyse mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Nikotinamid (NAM) behandelt (Abbildung 3.4). Das Antibiotikum TSA hemmt die Deacetylasen der Klasse I, II und IV (Minucci und Pelicci, 2006; Haberland et al., 2009). Der Wirkmechanismus erfolgt über die Chelatierung des essentiellen Ko-Faktors Zink der Deacetylasen. Die NAD⁺-abhängige Klasse III der Deactylasen, die Sirtuine, werden dagegen kompetitiv durch das Beiprodukt der Substratumsetzung, NAM inhibiert.

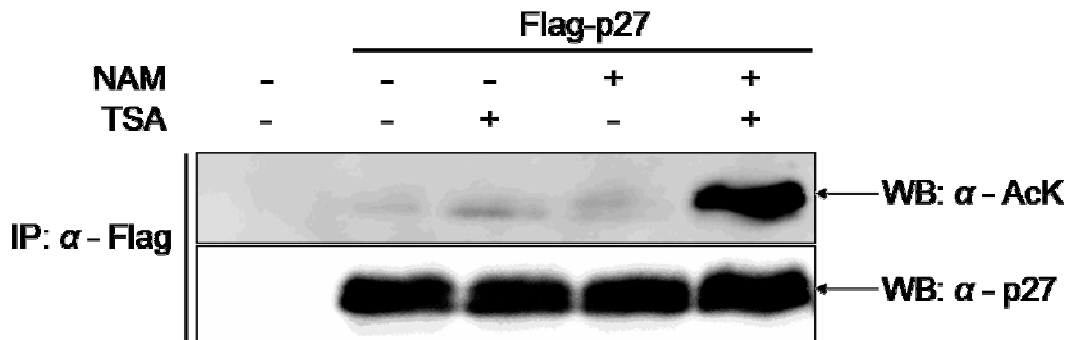


Abbildung 3.4: Acetylierung von Flag-p27 durch endogene HATs in HCT116-Zellen

2×10^5 HCT116-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 50 ng pSC2⁺Flag-p27-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 42 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit 3,5 nM TSA und 5 mM NAM für sechs Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in 300 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm wurde p27 mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von Flag-p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestriipt und p27 erneut mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

Nach Detektion mit dem AcK-spezifischem Antikörper konnten nur sehr schwache Signale für Acetylierung von p27 bei dem Ansatz festgestellt werden, in dem Flag-p27 allein überexprimiert worden war. Etwas stärkere Signale wurden durch die Behandlung der HCT116-Zellen mit TSA und NAM erreicht. TSA scheint dabei einen etwas größeren Effekt auf die Acetylierung von p27 zu erzielen. Hier wurden stärkere Signale für die Acetylierung von p27 im Vergleich zur Behandlung mit Nikotinamid erreicht. Der kombinierte Einsatz von NAM und TSA führt dagegen zu einem deutlichen Anstieg der Acetylierung von p27. Hier konnte ein starkes Signal festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten daher auf eine Regulierung der Acetylierung von p27 in HCT116-Zellen durch verschiedene Klassen von Deacetylasen hin. Die Klasse III, die NAD⁺-abhängigen Sirtuine, scheint an der Deacetylierung von p27 ebenso beteiligt zu sein, wie Mitglieder der Klassen I, II und IV, die durch TSA inhibiert werden.

Nach dem Strippen des Blots und der erneuten Inkubation mit einem p27-spezifischen Antikörper wurde festgestellt, dass Flag-p27 in gleichen Mengen aus dem Lysat immunpräzipitiert worden war. Es konnten keine Effekte auf die Expression und Stabilität von Flag-p27 durch NAM und TSA in HCT116-Zellen festgestellt werden.

Um eine Acetylierung von p27 in murinen NIH3T3-Zellen zu zeigen, wurde ein anderer Ansatz gewählt: Nach Transfektion der Zellen mit Flag-getagtem p27 und der Behandlung der Zellen mit TSA und Na-Butyrat für acht Stunden wurden die Zellen in Ripa-Puffer lysiert. Eine IP erfolgte aber in diesem Fall nicht mit den Agarose-gekoppelten Flag-spezifischen Antikörpern, sondern mit dem AcK-spezifischen Kaninchen-Antikörper von Santa-Cruz-Biotechnology und einer Protein A-Sepharose-Matrix. Nach der SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 mit einem spezifischen Antikörper (Abbildung 3.5).

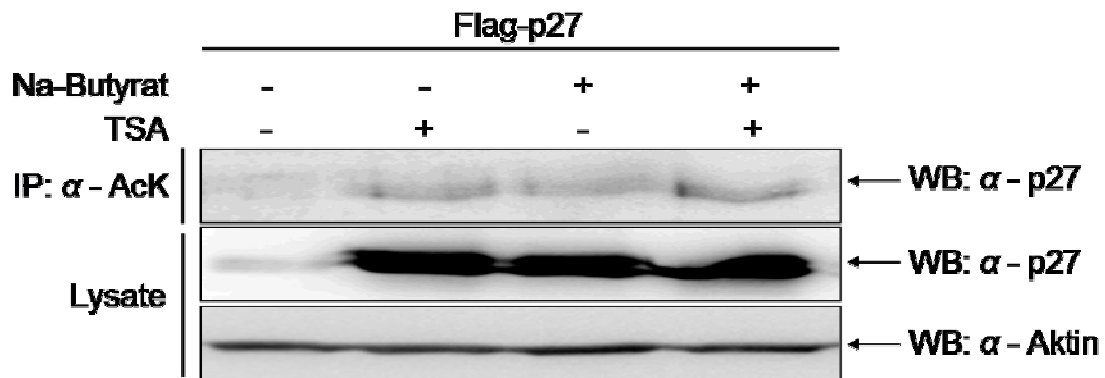


Abbildung 3.5: Detektion von Flag-p27 nach IP von acetylierten Proteinen.

In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 NIH3T3-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g pSC2⁺Flag-p27-Plasmid-DNA. Die Zellen wurden nach 36 Stunden mit 3,5 nM TSA und 5 mM Na-Butyrat inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach zwei Tagen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Die Lysate wurden mit 2 μ g AcK-spezifischem Antikörper und 20 μ l Protein A-Sepharose-Matrix für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Semidry-Blot wurden die Lysate und die Proben der IP auf vorhandenes p27 mit spezifischem Antikörper untersucht. Die Detektion von Aktin im Lysat diente der Ladekontrolle.

Die gleichmäßige Verteilung von Aktin auf dem Lysat-Blot nach Detektion mit einem spezifischen Antikörper lässt auf eine gleichmäßige Proteinkonzentration in den Lysaten schließen. Deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration konnten dagegen für p27 in den Lysaten festgestellt werden. Eine Behandlung von murinen NIH3T3-Zellen mit TSA und Na-Butyrat führt zu deutlich gesteigerten Proteinkonzentrationen von Flag-getagtem p27 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit beiden Deacetylase-Inhibitoren führt dagegen zu keiner additiven Steigerung des p27-Proteinspiegels. Damit konnten die Ergebnisse von Chen und Faller bestätigt werden (Chen und Faller, 2004). Die Behandlung von NIH3T3-Zellen mit Deacetylase-Inhibitoren führen zu einem Anstieg des p27-Proteinspiegels.

Die Detektion von p27 auf dem Western-Blot nach IP mit dem AcK-spezifischen Antikörper lässt ebenfalls auf eine Acetylierung von p27 durch endogene HATs in NIH3T3-Zellen schließen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration in den Lysaten schwache, aber deutlich vorhandene Signale für p27 detektiert.

3.1.5 Die siRNA-vermittelte Herabregulierung von endogenem CBP/p300 führt zum Verlust der p27-Acetylierung

Aus den Ergebnissen der p27-Überexpression mit verschiedenen HATs (Abbildung 3.1) konnte gefolgert werden, dass überexprimiertes p27 von den HATs CBP und p300 *in vivo* acetyliert wird. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von HDACs durch Inhibitoren zur verstärkten Acetylierung von p27 führt. (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5).

Auf Grund der Tatsache, dass bisher insgesamt drei Gruppen von humanen HATs sowie weitere Proteine mit Acetyltransferase-Aktivität beschrieben worden sind (Yang und Seto, 2007; Yang und Seto, 2008) und daher die überexprimierten Acetyltransferasen CBP/p300 und PCAF nur eine kleine Anzahl von möglichen

Acetyltransferasen für p27 abdecken, sollte in einem weiteren Experiment die Spezifität der Acetylierung von p27 durch die Herabregulierung des endogenen Proteinspiegels von CBP und p300 bewiesen werden (Abbildung 3.6). Dazu wurde ein auf der RNA-Interferenz basierender Ansatz gewählt (Brummelkamp et al., 2002; Fire, 2007)

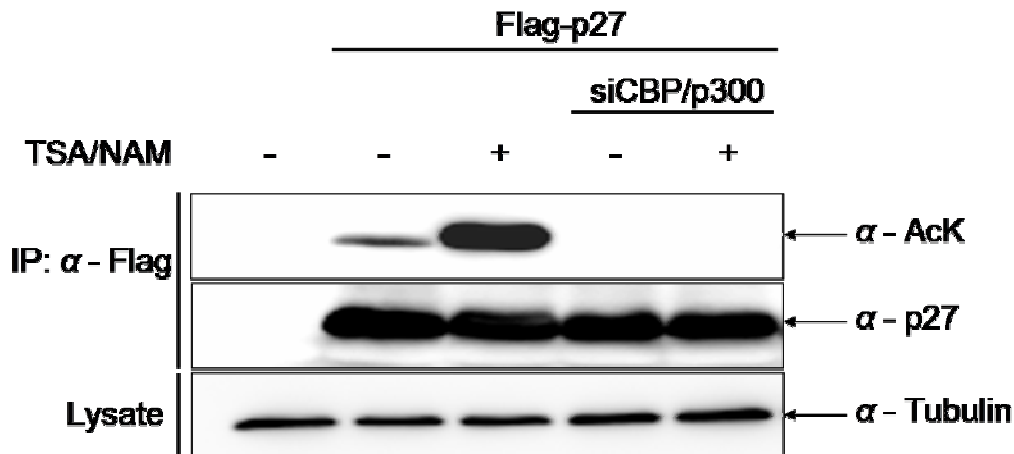


Abbildung 3.6: Verlust der p27-Acetylierung nach der siRNA-vermittelten Herabregulierung von endogenem CBP und p300

2×10^5 HCT116-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 50 ng pSC2⁺Flag-p27-Plasmid-DNA und jeweils 1 µg pSuper-Plasmid-DNA für p300 und CBP spezifisch transfiziert. Nach 42 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit 3,5 nM TSA und 5 mM NAM für 6 Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in 300 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Tubulin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Aus der gleichmäßigen Verteilung von Tubulin nach Detektion mit einem spezifischen Antikörper wird ersichtlich, dass nach der Lyse der HCT116-Zellen gleiche Proteinkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen für die IP von Flag-getaggttem p27 vorhanden waren. Eine mögliche Schwankung der Acetylierung von p27 auf Grund unterschiedlicher Proteinkonzentrationen war somit ausgeschlossen.

Nach der IP durch Flag-spezifische Antikörper konnten auf dem Blot gleiche Mengen von Flag-getaggttem p27 in den Ansätzen festgestellt werden, in denen pSC2⁺Flag-p27 Plasmid-DNA transfiziert worden war. Es zeigten sich erneut keine Schwankungen in der p27-Konzentration durch die Behandlung der Zellen mit den Deacetylase-Inhibitoren TSA und NAM.

Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TSA und NAM führt wiederum zur deutlichen Detektionssteigerung des Acetylierungs-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Inkubation des Blots mit dem AcK-spezifischem Antikörper. Dagegen konnten keine Signale für die Acetylierung von p27 festgestellt werden, wenn die Zellen mit pSuper-Plasmiden für den *Knockdown* der mRNA von CBP und p300 transfiziert worden waren. Es wurden hier auch keine Signale nach Behandlung der Zellen mit TSA und NAM detektiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Acetylierung von p27 durch die beiden homolog und paralog verwandten HATs CBP und p300 hin.

3.1.6 Die endogene Acetylierung von p27

Nachdem gezeigt werden konnte, dass p27 *in vivo* und *in vitro* von den HATs CBP und p300 acetyliert wird (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3) und die Herabregulierung der Acetyltransferasen auf endogener Ebene zu einem Verlust der Acetylierung von überexprimierten p27 führt (Abbildung 3.6), sollte die endogene Acetylierung von p27 experimentell bewiesen werden.

Das errechnete Molekulargewicht von p27 liegt auf Grund seiner 198 Aminosäuren bei 27 kDa. Endogenes immunpräzipitiertes humanes oder murines p27 läuft in der SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot jedoch auf einer Höhe von etwa 25 kDa im Vergleich zu einem Markerprotein. Nach der SDS-PAGE befinden sich jedoch die leichten Ketten des denaturierten IP-Antikörpers ebenfalls auf Höhe von 25 kDa auf dem Western-Blott. Daher muss die Detektion von acetyliertem endogenem p27 nach der IP mit einem Antikörper erfolgen, der aus einer anderen Spezies generiert wurde als der IP-Antikörper. Nur so sind unspezifische Signale zu vermeiden.

Der in dieser Arbeit verwendete AcK-spezifische Antikörper von der Firma Santa-Cruz-Biotechnology wurde durch die Immunisierung eines Kaninchens generiert. Die IP von endogenem p27 aus Zellen erfolgte daher in der Regel mit einem aus der Maus generierten Antikörper von der Firma Transductions-Laboratories (TDL abgekürzt).

Trotz der Verwendung von Antikörpern, die aus unterschiedlichen Spezies generiert wurden, wurde während dieser Arbeit immer wieder eine unspezifische Bande auf Höhe von 25 kDa mit dem AcK-spezifischen Antikörper auf der Höhe des murinen IP-Antikörpers detektiert. Um zu unterscheiden, ob es sich dabei um eine Kreuzreaktivität des sekundären α -Kaninchen Antikörpers mit dem murinen TDL IP-Antikörper oder um eine Bindung des AcK-spezifischen Antikörpers an die leichte Kette des IPs-Antikörpers handelte, wurde folgendes Experiment durchgeführt (Abbildung 3.7).



Abbildung 3.7: Detektion der leichten Ketten des IP-Antikörpers durch den AcK-spezifischen Antikörper

8×10^5 NIH3T3-Zellen wurden in einer 10 cm-Kulturschale ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation lysiert. Endogenes p27 wurde nach Zentrifugation des Lysats für 20 min bei 13000 rpm mit 2 μ g murinem TDL-Antikörper und 30 μ l Protein G-Sepharose-Matrix bei 4°C immunpräzipitiert. Nach Zentrifugation und Waschen wurde der Protein G-Sepharose Antigen-Antikörper-Komplex sowie einzeln 2 μ g TDL-Antikörper und 30 μ l Protein G-Sepharose-Matrix für 6 min mit 30 μ l 2 x Proben-Puffer aufgekocht. Es folgte eine SDS-PAGE der Proben und Western-Blot. Nach Inkubation mit einem AcK-spezifischen Kaninchen-Antikörper von Santa-Cruz-Biotechnology für 2 Stunden und anschließender Detektion wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Kaninchen-Antikörper (C19) inkubiert und detektiert. Nach Strippen des Blots folgte eine erneute Inkubation und Detektion nur mit einem sekundären α -Kaninchen-Antikörper.

Nach der Inkubation des Blots mit einem gegen den AcK-spezifischen Primär-Antikörper gerichteten sekundären α -Kaninchen-Antikörper wurden bei allen drei Proben Signale detektiert. Eine Bande befindet sich auf Höhe von 27 kDa in der linken Spur der IP-Probe sowie in der aufgekochten Protein G-Sepharose-Probe in der rechten Spur. Auf der Höhe von 25 kDa befindet sich ebenfalls eine Bande in der linken Spur der IP-Probe sowie in der mittleren Spur der TDL-Probe.

Nach dem Strippen und Inkubation des Blots mit dem p27-spezifischen C19-Antikörper konnte ein klares Signal in der IP-Probe auf Höhe von 25 kDa detektiert werden, nicht jedoch in der Probe, in der 2 μ g TDL IP-Antikörper einzeln aufgekocht worden war. Das Ergebnis in der linken Spalte deutet daher auf eine erfolgreiche IP von p27 aus den NIH3T3-Zellen hin. Dagegen ist sowohl in der linken als auch in der rechten Spur wiederum eine Bande auf Höhe von 27 kDa zu erkennen, wenn auch deutlich schwächer als vor dem Strippen des Blots.

Um eine Kreuzreaktivität des sekundären α -Kaninchen Antikörpers mit dem Maus-IP Antikörper auszuschließen, wurde der Blot erneut gestrippt und nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Es konnten jedoch keine Signale auf Höhe der 25 kDa Bande in den drei Proben detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht daher gegen eine Kreuzreaktivität. Auch sind keine Banden mehr auf Höhe von 27 kDa sichtbar.

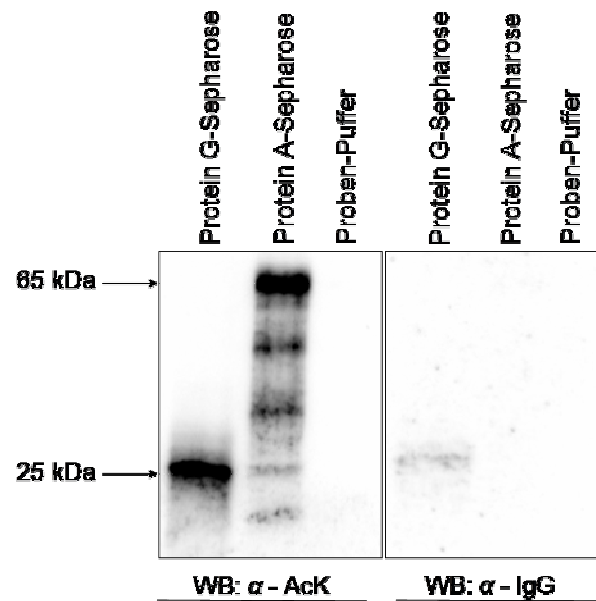
Auf Grund dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass der AcK-Antikörper der Firma Santa-Cruz-Biotechnology tatsächlich an den IP-Antikörper bindet (linke und mittlere Spur oben) und anschließend durch den sekundären Antikörper detektiert wird. Möglicherweise liegt hier eine Acetylierung der leichten Ketten des IP-Antikörpers vor.

Um ein antikörperspezifisches Problem auszuschließen, wurde der Blot erneut gestrippt und mit einem AcK-spezifischen Kaninchen-Antikörper der Firma Calbiochem inkubiert. Es konnten jedoch keine Signale auf Höhe von 25 kDa detektiert werden (nicht gezeigt). Daher ist die Vermutung, dass der AcK-spezifische Antikörper der Firma Calbiochem nicht sensitiv genug ist für eine Detektion von acetyliertem p27 oder der möglicherweise acetylierten leichten Ketten des IP-Antikörpers. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass keine Acetylierung von p27 bei diesem Experiment vorlag.

Die 27 kDa-Banden in der IP-Probe und in der Probe, in der die Protein G-Sepharose-Matrix alleine aufgekocht worden war, sind offenbar auf die Bindung des Primär-Antikörpers an Bestandteile der Sepharose-Matrix zurückzuführen. Die Anzahl und Intensität der Banden variierte je nach verwendeter Protein G- und Protein A-Sepharose-Matrix (Abbildung 3.8A). Zudem traten deutliche firmenspezifische Unterschiede auf. Bei der Protein G-Sepharose der Firma Amersham wurden deutliche Unterschiede beim Auftreten von unspezifischen Banden im Vergleich zur Protein G-Sepharose der Firma Thermo-Fisher bemerkt (Abbildung 3.8B). Laut Hersteller Thermo-Fisher wurde Protein G rekombinant ohne unspezifisch bindende Albumin- und Zelloberflächen bindene Domänen aufgereinigt, was offenbar zu einer geringeren Bindung des AcK-spezifischen Antikörpers führt.

Durch die oben beschriebenen Probleme konnte während dieser Arbeit daher nicht die Acetylierung von endogenem p27 nachgewiesen werden.

A



B

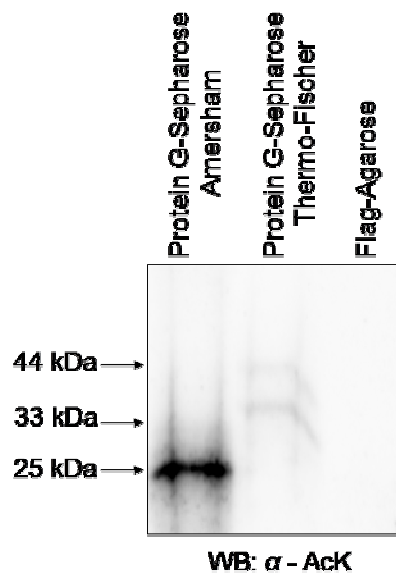


Abbildung 3.8: Bindung von Protein A- und Protein G-Sepharose durch den AcK-spezifischen Antikörper

A) Jeweils 30 µl Protein A- und Protein G-Sepharose der Firma Amersham wurden 3 x mit 500 µl Ripa-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in 30 µl 2 x Proben-Puffer für 6 min aufgekocht. Als Negativ-Kontrolle wurden 30 µl Proben-Puffer separat aufgekocht. Es folgte eine SDS-PAGE und ein Western-Blot der Proben. Der Blot wurde zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper der Firma Santa-Cruz-Biotechnology und dann mit einem α-Kaninchen-Antikörper inkubiert (links). Nach Detektion wurde der Blot gestrippt und nur mit α-Kaninchen-Antikörper inkubiert und detektiert (rechts).

B) 30 µl Protein G-Sepharose der Firma Amersham und 30 µl Protein G-Sepharose der Firma Thermo-Fischer wurden 3 x mit 500 µl Ripa-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in 30 µl 2 x Proben-Puffer für 6 min aufgekocht. Als Negativ-Kontrolle wurde 30 µl Flag-Agarose aufgekocht. Es folgte eine SDS-PAGE und ein Western-Blot der Proben. Der Blot wurde zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper der Firma Santa-Cruz-Biotechnology und dann mit einem α-Kaninchen Antikörper inkubiert.

3.2 Identifikation der acetylierten Lysine von p27

Nachdem in mehreren Experimenten deutliche Hinweise auf Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27 vorlagen (Abbildung 3.1; 3.3; 3.6), war es in weiteren Schritten notwendig, die Anzahl und Lage der Lysine von p27 zu bestimmen, die durch CBP/p300 acetyliert werden. Humanes p27 besitzt bei einer Gesamtanzahl von 198 Aminosäuren insgesamt 13 Lysine, die über das gesamte Protein verteilt sind (Abbildung 3.9). Aus der Lage der acetylierten Lysine in p27 ließen sich erste Vermutungen über die Funktion der Acetylierung von p27 ableiten. Aus der Abbildung 3.9 wird ersichtlich, dass fünf Lysine in den Bindungsdomänen von p27 zu Cyclin E und CDK2 liegen, weitere drei Lysine liegen zudem in der unmittelbaren Nähe. Eine Acetylierung dieser Lysine könnte beispielsweise Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften des Tumorsuppressors p27 auf die Kinaseaktivität von CDK2 haben.

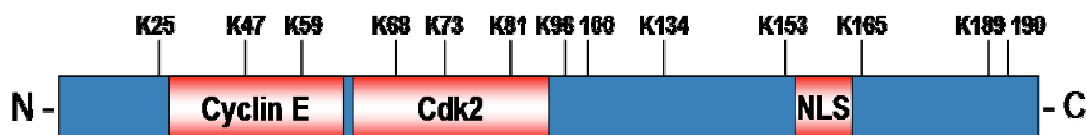


Abbildung 3.9: Anzahl und Lage der Lysine von humanem p27

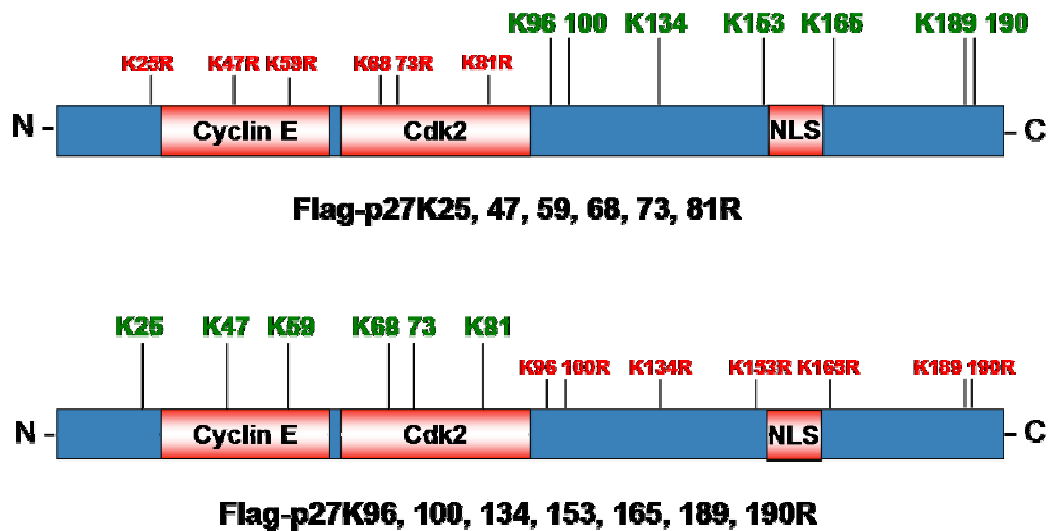
Humanes p27 besitzt bei einer Gesamtanzahl von 198 Aminosäuren 13 Lysine. Die Ziffern geben die Reihenfolge der Lysine im Gesamtprotein angefangen vom N-Terminus an. Die Bindungsdomänen für Cyclin E und CDK2 sowie die Lage des nukleären Lokalisationssignals (NLS) sind rot-weiß hervorgehoben.

Zu Beginn dieser Arbeit standen dem Institut zwei p27-kodierende Plasmide zu Verfügung: pSC2⁺Flag-p27wt und pSC2⁺Flag-p27ΔK. Im pSC2⁺Flag-p27ΔK-Plasmid wurden alle lysinkodierenden Basen-Tripletts gegen argininkodierende Tripletts ausgetauscht. Das Protein Flag-p27ΔK kann daher nicht mehr acetyliert werden (siehe Abbildung 3.3). Auch der Flag-Tag besitzt keine Lysine, die acetyliert werden können.

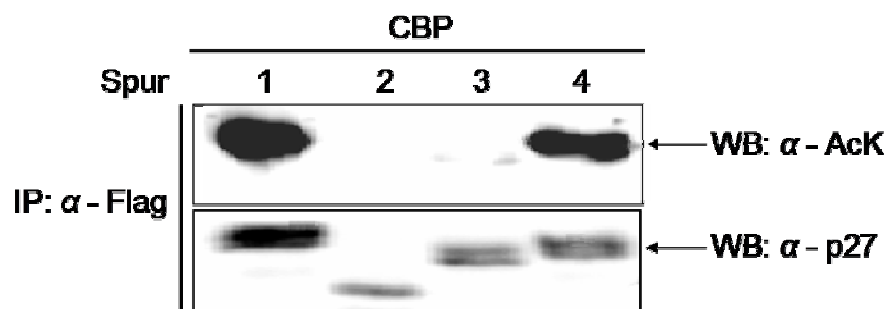
3.2.1 Acetylierbare Lysine liegen im C-terminalen Teil von p27

Um einen ersten Überblick über die Lage der acetylierten Lysine in p27 zu erlangen, wurde die C-terminale p27wt-Sequenz durch DNA-Klonierungstechniken gegen die C-terminale p27ΔK-Sequenz ausgetauscht. Somit können nur noch die ersten sechs Lysine N-terminal in der p27wt-Proteinsequenz acetyliert werden (Abbildung 3.10A unten). Umgekehrt erfolgte der Austausch der C-terminalen p27ΔK-Sequenz gegen die C-terminale p27wt-Sequenz, wobei sich im folgenden sieben Lysine im C-terminalen Bereich des Proteins befinden (Abbildung 3.10A oben). Nach Sequenzierung und Expression in HEK293-Zellen wurden die beiden Flag getaggten Proteine durch IP isoliert und nach SDS-PAGE und Western-Blot auf Acetylierung untersucht (Abbildung 3.10B).

A



B

**Spur 1: Flag-p27****Spur 2: Flag-p27ΔK****Spur 3: Flag-p27K96, 100, 134, 153, 165, 189, 190R****Spur 4: Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81R****Abbildung 3.10: Die acetylierten Lysine von p27 liegen im C-terminalen Teil des Proteins.**

A) Schematische Darstellung der zwei klonierten p27-Mutanten, die auf Acetylierung untersucht wurden. Die Ziffern geben die Lage der einzelnen Aminosäuren im Protein an. Grün markiert sind Lysine (K), rot markiert sind dagegen Lysine, die durch Mutagenese gegen Arginine (R) ausgetauscht worden sind. Die Bindungsdomänen für Cyclin E und CDK2 sowie die Lage des nukleären Lokalisationssignals (NLS) sind rot-weiß hervorgehoben.

B) In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293T-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 µg der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27ΔK, pSC2⁺Flag-p27K96, 100, 134, 153, 165, 189, 190R, pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81R und mit 3 µg Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-getaggetes p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Antikörper inkubiert.

Aus Abbildung 3.10B wird ersichtlich, dass p27wt nach Überexpression mit CBP in HEK293-Zellen stark acetyliert vorliegt. Wie erwartet, konnten dagegen keine Signale für Acetylierung bei der p27ΔK-Mutante detektiert werden. Ebenfalls wurden nur sehr

schwache Signale bei der Mutante festgestellt, bei der die Lysine 96, 100, 134, 153, 165, 189, 190 gegen nicht acetylierbare Arginine ausgetauscht wurden. Dagegen wird die Mutante, bei der die ersten sechs Lysine N-terminal gelegen gegen Arginine ausgetauscht worden waren, wiederum stark durch weiter C-terminal gelegene acetylierte Lysine detektiert. Nach dem Strippen des Blots und der Inkubation mit einem p27-spezifischen Antikörper lassen sich Expressionsschwankungen der drei p27-Mutanten im Vergleich zum p27wt-Protein feststellen. Da aber alle drei Mutanten gleich exprimiert worden waren, ergibt sich aus dem Ergebnissen dieses Blots der starke Hinweis, dass die sieben C-terminal gelegenden Lysine von p27 ein Ziel für die Acetylierung von CBP darstellen.

3.2.2 K96 und K100 sind Kandidaten für die Acetylierung durch CBP

Um einzuschränken, welche der sieben Lysine im C-terminalen Teil von p27 durch CBP acetyliert werden, wurde die Flag-p27K9R-Mutante kloniert. (Abbildung 3.11A). In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen für lysinkodierenden Triplets in der Flag-p27K9R-Mutante in argininkodierende Triplets umgewandelt. Die neu entstandenen p27-Mutanten wurden in HEK293-Zellen überexprimiert und dann durch den AcK-spezifischen Antikörper analysiert (Abbildung 3.11B).

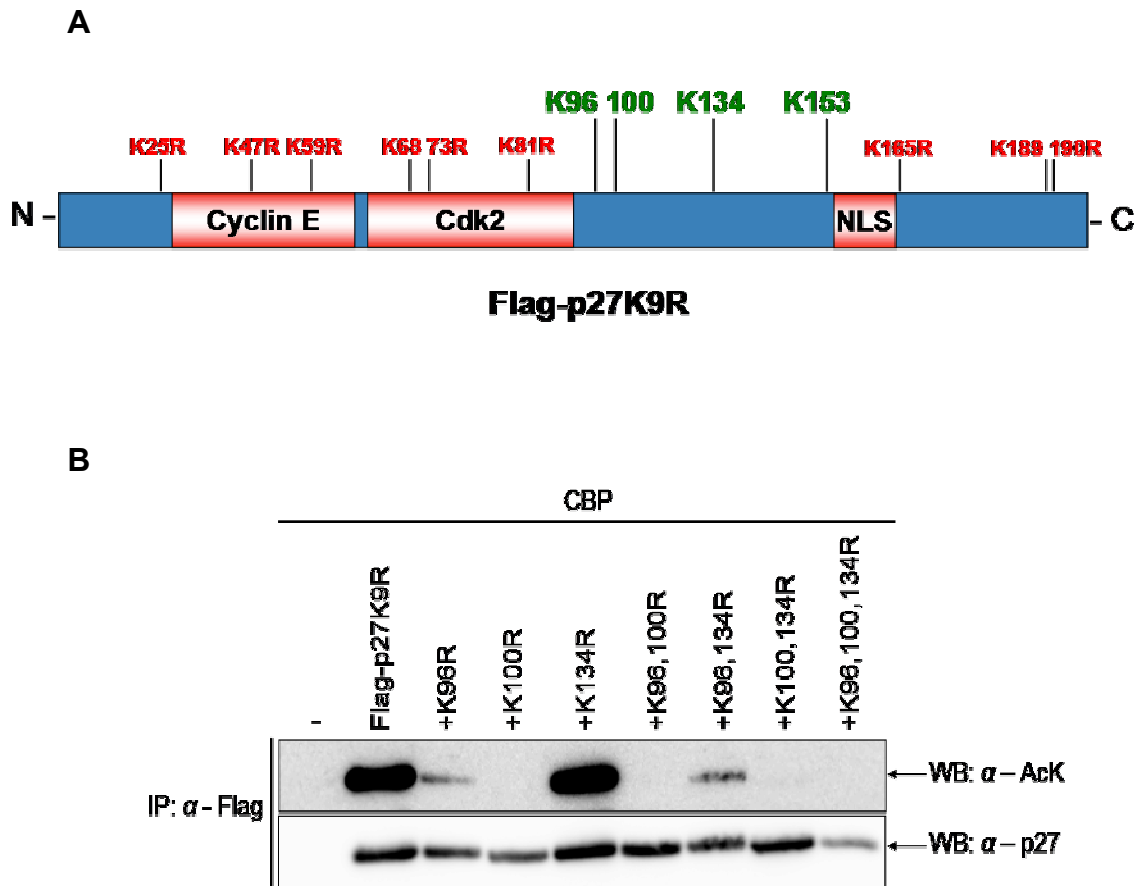


Abbildung 3.11: K96 und K100 sind Kandidaten für die Acetylierung durch CBP

A) Schematische Darstellung der klonierten Flag-p27K9R-Mutante, die auf Acetylierung untersucht wurde. Die Ziffern geben die Lage der einzelnen Aminosäuren im Protein an. Grün markiert sind Lysine (K), rot markiert sind dagegen Lysine, die durch Mutagenese gegen Arginine (R) ausgetauscht worden sind. Die Bindungsdomänen für Cyclin E und CDK2 sowie die Lage des nukleären Lokalisationssignals (NLS) sind rot-weiß hervorgehoben.

B) In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293T-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g der Plasmide pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 165, 189, 190R (Flag-p27K9R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 96, 165, 189, 190R (+96R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 100, 165, 189, 190R (+K100R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 134, 165, 189, 190R (+K134), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 96, 100, 165, 189, 190R (+K96,100R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 96, 134, 165, 189, 190R (+K96,134R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 100, 134, 165, 189, 190R (+K100,134R), pSC2⁺Flag-p27K25, 47, 59, 68, 73, 81, 96, 100, 134, 165, 189, 190R (+K96,100,134R) und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-getaggtetes p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27 spezifischen Antikörper inkubiert.

Aus Abbildung 3.11B wird ersichtlich, dass es nach dem zusätzlichen Austausch von K96 zu Arginin (+96R) in der Flag-p27K9R-Mutante zu einem starken Verlust in der Acetylierung kommt. Der Verlust der Acetylierung ist jedoch nicht vollständig. Es können noch schwache Signale für die Acetylierung von p27 detektiert werden. Ein vollständiger Verlust der Acetylierung wird jedoch nach dem Austausch von K100 (+K100R) in der Flag-p27K9R-Mutante erreicht. Kein Verlust der Acetylierung wird nach Austausch von K134 (+K134) erreicht. Der kombinatorische Austausch von K96, K100 und K134 bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse der einzelnen

Austausche der Lysine in der Flag-p27K9R-Mutante. Der Austausch von K100 führt zum totalen Verlust der Acetylierung, folglich ist K100 ein starker Kandidat für die Acetylierung durch CBP. K96 ist ebenfalls definitiv an der Acetylierung von p27 beteiligt. Hierbei sind verschiedene Modelle denkbar. Entweder wird K96 direkt durch CBP in einem schwächeren Umfang als K100 acetyliert, oder aber K96 ist indirekt an der Acetylierung von K100 beteiligt. Ebenso könnte K100 an der Substraterkennung von K96 durch CBP/p300 beteiligt sein.

3.2.3 K190 ist ein weiterer Kandidat für die Acetylierung durch CBP

Um die restlichen drei Kandidaten (siehe Abbildung 3.10 und 3.11) von p27 für die Acetylierung durch CBP zu überprüfen, wurde die Flag-p27K25,47,59,68,73,81,96,100,134,153R-Mutante kloniert. Acetylierbar waren damit nur die drei C-terminal gelegenen Lysine 165, 189, 190 nach Expression in HEK293-Zellen. Der weitere Austausch von Lysin 189 und 190 führte zu einem kompletten Verlust der Acetylierung (nicht gezeigt). Somit konnte K165 als Kandidat für die Acetylierung ausgeschlossen werden, K189 und K190 wurden dagegen als Kandidaten für die Acetylierung bestimmt. In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob die Lysine 189 und 190 beide zusammen acetyliert werden oder ob nur jeweils K189 oder K190 ein Kandidat für die Acetylierung durch CBP ist. Dabei konnte K189 ausgeschlossen werden, nur K190 wird acetyliert (nicht gezeigt). In einigen Experimenten in dieser Arbeit wird jedoch noch mit einer Flag-p27K189,190R-Doppelmutante gearbeitet.

3.2.4 Die Flag-p27K3R-Mutante wird nicht mehr acetyliert

Durch Klonierung und den gezielten Austausch von Basen-Tripletts durch ortsgerichtete Mutagenese und anschließender Überexpression der p27-Mutanten in HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass K100, K189 und K190 Kandidaten für die Acetylierung durch CBP sind. Um ein vollständiges Bild über die Acetylierung von p27 zu erhalten, wurden daher gezielt im p27wt-Plasmid die kodierenden Basen-Tripletts für K100, K189 und K190 gegen argininkodierende Basen-Tripletts ausgetauscht. Die DNA-Konstrukte wurden dann in HEK293-Zellen transfiziert und die Stärke der Acetylierung nach Expression mit der Stärke der Acetylierung im Vergleich zum p27wt-Protein verglichen (Abbildung 3.12).

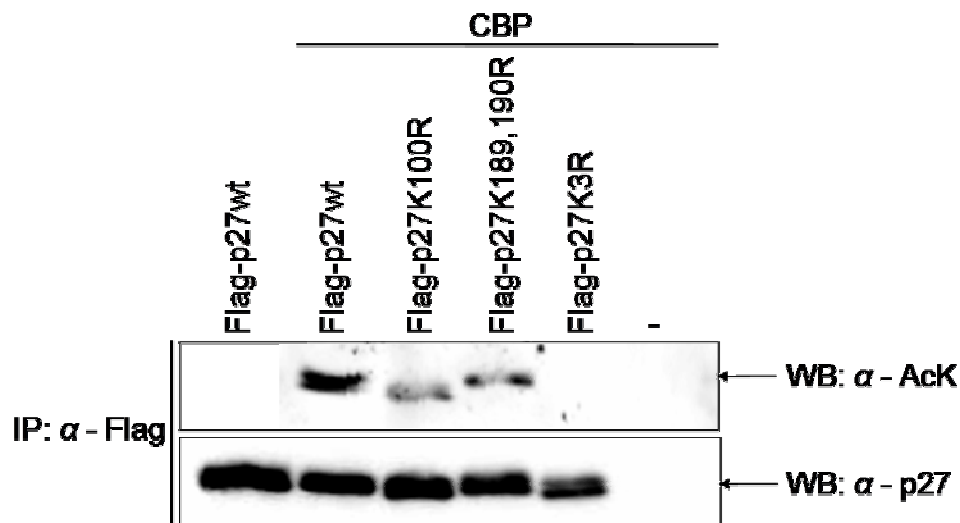


Abbildung 3.12: Verlust der Acetylierung von p27 nach Austausch von K100, K189 und K190 gegen Arginin

In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K100R, pSC2⁺Flag-p27-K189, 190R, pSC2⁺Flag-p27-K100, 189, 190R (K3R) und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Antikörper inkubiert.

Nach Überexpression von p27wt mit CBP in HEK293-Zellen konnte wie erwartet eine deutliche Acetylierung des Proteins festgestellt werden. Die p27K100R-Mutante zeigt dagegen eine deutlich geringere Acetylierung im Vergleich zum p27wt-Protein. Der Austausch von K189 und K190 gegen Arginine führt ebenfalls zu einer Abnahme in der Gesamtacetylierung im Vergleich zum p27wt-Protein, wenn gleich nicht ganz so stark wie es bei der p27K100R-Mutante der Fall ist. Der gleichzeitige Austausch von K100, K189 und K190 gegen Arginine (K3R-Mutante) hat zur Folge, dass keine Acetylierung mehr festgestellt werden konnte. Wie bereits unter Abschnitt 3.2.3 erwähnt, konnte K189 jedoch in späteren Experimenten als Kandidat für die Acetylierung ausgeschlossen werden.

Um einen weiteren Beweis für die Acetylierung der gefundenen Lysine zu erbringen, sollte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, dass die p27K3R-Mutante auch nicht mehr durch endogene HATs bei gleichzeitiger Hemmung von Deacetylasen acetyliert werden kann. Dazu wurden in HCT116-Zellen das Flag-p27wt-Plasmid und das Flag-p27K3R-Plasmid eingebracht. Sechs Stunden vor der Lyse wurden die Zellen mit den HDAC-Inhibitoren TSA und NAM inkubiert. Nach der Lyse wurde überexprimiertes p27 durch IP aus den Lysaten isoliert und dann erneut mittels AcK-spezifischem Antikörper analysiert (Abbildung 3.13).

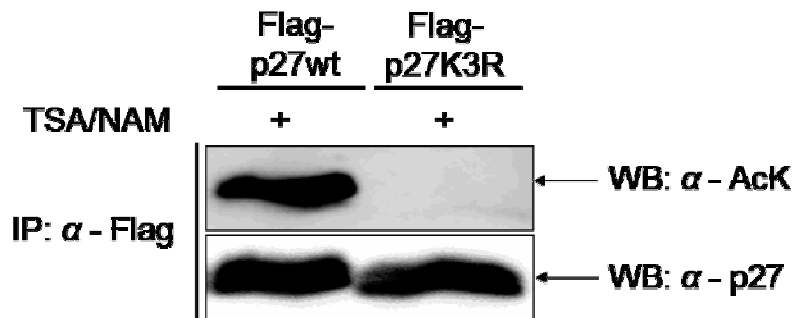


Abbildung 3.13: Verlust der Acetylierung der Flag-p27K3R-Mutante durch endogene HATs

2 x 10⁵ HCT116-Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit jeweils 50 ng der Plasmide pSC2⁺Flag-p27 und pSC2⁺Flag-p27K3R (pSC2⁺Flag-p27-K100, 189, 190R) transfiziert. Nach 42 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit 3,5 nM TSA und 5 mM NAM für 6 Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in 300 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und die Proteine erneut mit einem p27-spezifischen Antikörper detektiert.

Nach der Behandlung der HCT116-Zellen mit den Deacetylase-Inhibitoren TSA und NAM konnten klare Signale für die Acetylierung des Flag-getaggtten p27wt-Proteins detektiert werden. Ein kompletter Verlust der Acetylierung zeigt sich jedoch bei der Mutante, bei der die Lysine 100, 189 und 190 gegen Arginine ausgetauscht worden waren. Somit konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes p27 in HCT116-Zellen spezifisch an diesen Lysinen durch endogene Acetyltransferasen acetyliert wird.

3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der p27-Acetylierung

Neben der Identifikation der acetylierten Lysine von p27 durch den Austausch einzelner Lysine gegen nicht mehr acetylierbare Arginine und anschließender Untersuchung mit einem AcK-spezifischen Antikörper, wurde auch eine massenspektrometrische Analyse der acetylierten Lysine von p27 durchgeführt. Dies geschah in einer Kooperation mit David W. Litchfield von der University Ontario, London, Kanada.

Zur Acetylierung von p27 wurde zunächst ein HAT-Assay durchgeführt. Dazu wurde GST-getaggttes p27 mit baculoviral aufgereinigtem CBP und Acetyl-CoA inkubiert. Um analysierbare Peptide zu erhalten, erfolgte in Lösung der Verdau mit den Proteasen Trypsin und Glu-C. Die Peptide wurden dann in einem Massenspektrometer auf Acetylierung untersucht (Abbildung 3.14A und B).

A

Glu-C	1	MSNVRVSNNGGSPSLERMDARQAEHPK ₂₅ PSACRNLF	GPVDHEE
Trypsin	1	MSNVRVSNNGGSPSLERMDARQAEHPK ₂₅ PSACRNLF	GPVDHEE
Glu-C	41	LTRDLEK ₄₇ HCRDMEEASQRK ₅₉ WNFDFQNHK ₆₈ PLEGK ₇₃ YEWQEV	
Trypsin	41	LTRDLEK ₄₇ HCRDMEEASQRK ₅₉ WNFDFQNHK ₆₈ PLEGK ₇₃ YEWQEV	
Glu-C	80	EK ₈₁ GSLPEFYRPPRPPK ₉₆ GACK ₁₀₀ VPAQESQDVSGSRPAAPLIG	
Trypsin	80	EK ₈₁ GSLPEFYRPPRPPK ₉₆ GACK ₁₀₀ VPAQESQDVSGSRPAAPLIG	
Glu-C	121	APAASEDTHLVDPK ₁₃₄ TDPSDSQTGLAEQCAGIRK ₁₅₃ RPATDDSST	
Trypsin	121	APAASEDTHLVDPK ₁₃₄ TDPSDSQTGLAEQCAGIRK ₁₅₃ RPATDDSST	
Glu-C	163	QNK ₁₆₅ RANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPK ₁₈₉ K ₁₉₀ PGLRRRQT	
Trypsin	163	QNK ₁₆₅ RANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPK ₁₈₉ K ₁₉₀ PGLRRRQT	

B

1 MSNVRVSNNGGSPSLERMDARQAEHPK₂₅PSACRNLFGPVDHEE
 41 LTRDLEK₄₇HCRDMEEASQRK₅₉WNFDFQNHK₆₈PLEGK₇₃YEWQEV
 81 K₈₁GSLPEFYRPPRPPK₉₆GACK₁₀₀VPAQESQDVSGSRPAAPLIG
 121 APANSEDTHLVDPK₁₃₄TDPSDSQTGLAEQCAGIRK₁₅₃RPATDDS
 161 STQNK₁₆₅RANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPK₁₈₉K₁₉₀PGLRRRQT

Abbildung 3.14 Schematische Darstellung der massenspektrometrischen Analyse zur Identifikation von acetylierten Lysinen von p27 (in Kooperation mit D. W. Litchfield)

A) Gelb hervorgehoben sind erhaltene Peptide nach Verdau von GST-p27 mit den Proteasen Glu-C und Trypsin und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse im Vergleich zur humanen p27-Aminosäuresequenz. Rot dargestellt sind Lysine (K), die innerhalb der erhaltenen Peptide liegen, blau dargestellt sind Lysine, die außerhalb der gefundenen Peptide liegen.

B) Schematische Zusammenfassung der erhaltenden Peptide nach Verdau von GST-p27 mit den Proteasen Glu-C und Trypsin und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse im Vergleich zur p27-Aminosäuresequenz. Rot dargestellt sind Lysine (K), die innerhalb der erhaltenen Peptide liegen, blau dargestellt sind Lysine, die außerhalb der gefundenen Peptide liegen.

Durch den Verdau von GST-p27 mit den Proteasen Trypsin und Glu-C konnten insgesamt 7 von 13 Lysinen auf Acetylierung durch CBP mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Die Protease Glu-C spaltet an der carboxyterminalen Seite von Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D), Trypsin dagegen an der carboxyterminalen Seite von Lysinen (K) und Argininen (R). Für die hier erhaltenen Peptide mit den Lysinen 59, 68, 73, 81, 96, 134 und 189 konnte keine Acetylierung festgestellt werden. Für den Acetylierungsstatus der Lysine 25, 47, 100, 153, 165 und 190 liegen keine Daten vor, da keine Peptide mit den erwähnten Lysinen in der Massenspektrometrie detektiert werden konnten. Ein Lysin-acetyliertes Peptid von CBP, L₄₄IPNGELSLLNSGNLVPDAASK_{Ac}HK_{Ac}QLSE₇₁ welches aus dem gleichzeitigen Verdau von His-CBP und GST-p27 mit den Proteasen stammt, konnte dagegen in der Massenspektrometrie ermittelt werden. So war die Detektion von acetylierten Lysinen durch Massenspektrometrie grundsätzlich durchführbar. Das Ergebnis stützt zu einem Teil die gewonnenen Erkenntnisse aus den vorangehenden Experimenten. K189 wurde als Kandidat für die Acetylierung

durch CBP in späteren Experimenten ausgeschlossen (nicht gezeigt). Auch bei der massenspektrometrischen Analyse konnte keine Acetylierung festgestellt werden. Ebenso konnte keine Acetylierung von K96 nachgewiesen werden. Keine Daten zur Acetylierung liegen dagegen hier für die Acetylierung von K100 und K190 auf Grund nicht detektierter Peptide vor. Grundsätzlich wäre aber eine Generierung von Peptiden mit K100 und K190 durch Trypsin-Verdau möglich. Eine Acetylierung an den Lysinen hebt jedoch die positive Ladung der Aminosäure auf, was dazu führt, dass Trypsin nicht mehr an dieser Stelle das Protein schneidet (Black et al., 2008). Dies könnte ein Grund für die fehlende Detektion der Peptide sein.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden K100 und K190 von p27 als Ziele für die Acetylierung durch CBP identifiziert. K100 liegt bei einer Gesamtlänge von 198 Aminosäuren von p27 in der Mitte des Proteins, aber außerhalb der CDK2-Bindungsdomäne von p27 (siehe Abbildung 3.9). K190 liegt dagegen nur zwei Aminosäuren von der wichtigen Phosphorylierungsstelle Threonin 187 entfernt. Nach der Identifikation der acetylierten Lysine konnten nun experimentelle Ansätze zur Funktion der Acetylierung von p27 erfolgen.

3.3 Charakterisierung eines spezifischen p27AcK100-Antikörpers

3.3.1 Überprüfung von Antikörpern auf spezifische Bindung an acetyliertes K100 von p27

Wenn eine neue Modifikation wie die Acetylierung oder die Phosphorylierung eines Proteins untersucht werden soll, ist ein Antikörper, der spezifisch an die neue Modifikation bindet, ein ideales Werkzeug. Beispielsweise kann der Zeitpunkt der Modifikation des Proteins im Zellzyklus bestimmt werden, der Ort der Modifikation oder es können komplexe Interaktionen wie Acetylierung und folgende Phosphorylierung einer benachbarten Aminosäure erkundet werden.

Da die Abnahme der Acetylierung von p27 am stärksten bei dem Austausch von K100 zu R erfolgte (Abbildung 3.11B und Abbildung 3.12), wurde K100 als die dominante Stelle der Acetylierung angesehen. Deshalb sollte ein spezifischer Antikörper zunächst gegen die Acetylierung von K100 generiert werden. Zur Herstellung von Antikörpern kooperiert das Institut für Biochemie und Molekularbiologie mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer vom Institut für Immunologie des Helmholtz-Zentrum München. Die Immunisierung von Ratten mit synthetischen modifizierten Peptiden und folgender Gewinnung von gegen die Peptide spezifisch gerichteten Antikörpern mittels Hybridoma-Technologie ist eine etablierte Methode (Köhler und Milstein, 1975). So wurden zunächst Peptide mit der Aminosäuresequenz KGACK_{ac}VPAQ, die für humanes an K100 acetyliertes p27 spezifisch sind, synthetisiert. Nach der Immunisierung von Ratten mit den Peptiden wurden Antikörper bildende B-Zellen aus den Tieren isoliert und erste Bindungstest der gewonnenen Antikörper, die das acetylierte K100-Epitop im Vergleich zu einem nicht acetylierten Peptid erkennen, durchgeführt. Die genaue Charakterisierung der Antikörper erfolgte jedoch an unserem Institut.

Von Frau Dr. Elisabeth Kremmer wurden dem Institut fünf Überstände von Antikörper-produzierenden B-Zell-Klonen zugeschickt. Die in den Seren erhaltenen Ratten-Antikörper waren in ersten ELISA-Tests zunächst positiv auf Bindung von an

K100 acetylierten Peptiden getestet worden. Da die Antikörper zur Erkennung von acetyliertem K100 nach dem Western-Blot eingesetzt werden sollten, mussten die Antikörper in ihren Bindungseigenschaften weiter charakterisiert werden. In Vorarbeiten wurde überprüft, ob eine Überexpression von Flag-getaggttem p27 mit CBP in HEK293-Zellen und anschließender IP und Western-Blot zu einer Detektion von acetyliertem K100 durch die Antikörper führt. Die Serum-Überstände der B-Zell-Klone 1B2, 2H4, 7G7, 6C2 und 8A9 wurden mit den Blot-Membranen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion mit einem sekundären α -Ratten-Antikörper (Abbildung 3.15).

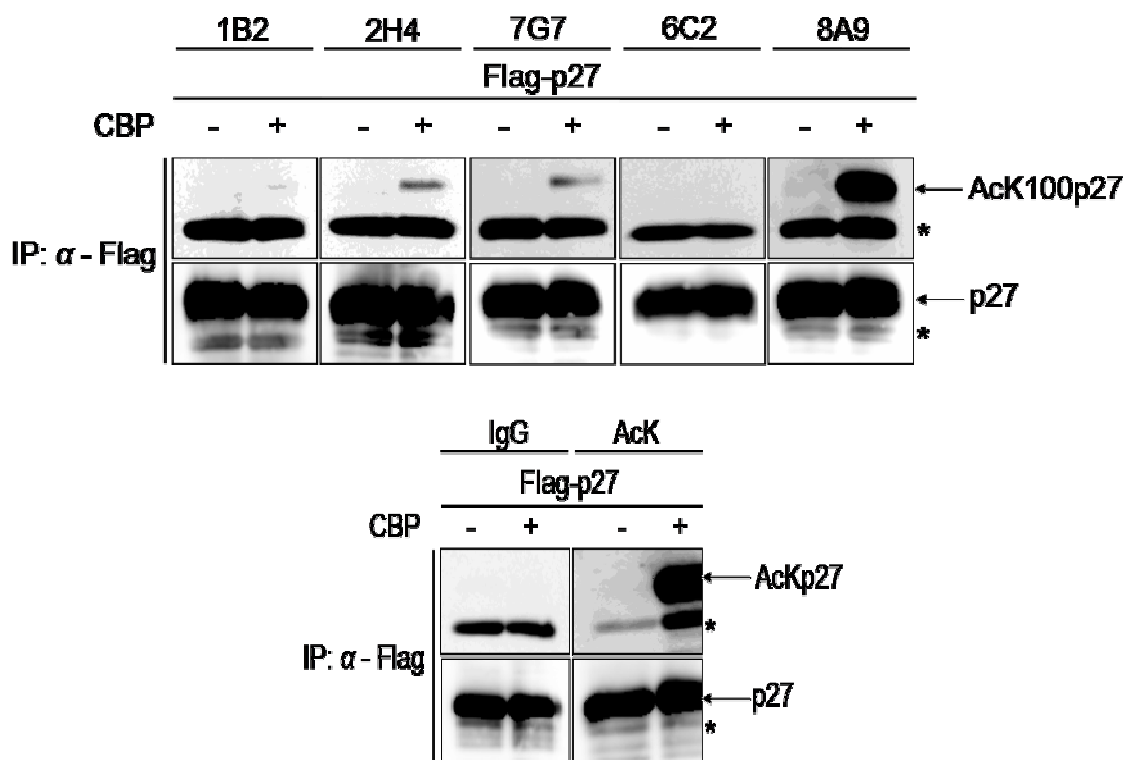


Abbildung 3.15: Detektion von *in vivo* acetyliertem p27 mittels gegen acetyliertes K100-gerichtete Antikörper (In Kooperation mit S. Voshall)

In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 mit Serum-Überständen der B-Zell Klone 1B2, 2H4, 7G7, 6C2 und 8A9, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Antikörper inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Blot nur mit dem sekundären α -Ratte-IgG-Antikörper inkubiert, als Positiv-Kontrolle erfolgte die Detektion von p27 mit einem AcK-spezifischen Antikörper. Banden, die durch einen Stern markiert sind, deuten die Kreuzreaktivität des sekundären α -Ratten-Antikörpers mit dem murinen Flag-IP-Antikörper an.

Von den fünf getesteten Serum-Überständen der B-Zell-Klone 2H4, 1B2, 6C2, 7G7 und 8A9 konnten drei positiv für die Bindung an *in vivo* acetyliertem p27 getestet werden. Bei den Klonen 1B2 und 6C2 konnten dagegen keine Signale für die Bindung an p27 festgestellt werden. Die Serum-Überstände der Klone 2H4 und 7G7 zeigen ein relatives schwaches Signal im Gegensatz zum starken Signal beim Klon 8A9. Die Kontrolle auf vorhandenes p27 zeigt bei allen getesteten Klonen

gleichmäßige Mengen. Auffallend ist die starke Kreuzreaktivität des sekundären α -Ratten-IgG-Antikörpers mit der leichten Kette des murinen Flag-IP-Antikörpers. Eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an p27 konnte jedoch nicht festgestellt werden, so dass die detektierten Signale der drei B-Zell-Klone 2H4, 7G7 und 8A9 an K100 als positiv betrachtet werden. Die Detektion mit dem AcK-spezifischen Antikörper zeigte wie erwartet eine starke *in vivo* erfolgte Acetylierung von Flag-getagtem p27 durch überexprimiertes CBP.

Bei drei der fünf vorhandenen Test-Antikörper konnte eine Bindung unter Auswertung der Abbildung 3.15 an p27 bestätigt werden. In einem weiteren Experiment sollte die Abhängigkeit der Bindung von acetyliertem K100 im Vergleich mit Mimikry-Mutanten überprüft werden. Der Austausch von K100 zu R sollte zum Verlust der Bindung führen, da allgemein ein Arginin der Mimikry eines nicht mehr acetylierbaren Lysins dient. Ein Glutamin (Q) dient dagegen der Mimikry eines acetylierten Lysins. Die Bindung eines der drei Antikörper an diese Q-Mutante wäre in soweit interessant, dass der Antikörper z.B. bei zukünftigen Immunpräzipitationen einer p27K100Q-Mutante, exprimiert durch einen endogenen p27-Promotor in einer Zell-Linie, oder generell als Kontroll-Antikörper eingesetzt werden könnte. Eine nicht vorhandene Bindung würde dagegen für die Spezifität des Antikörpers für acetyliertes K100 sprechen. In HEK293-Zellen wurde daher Flag-getaggttes p27wt, p27K100R und p27K100Q exprimiert und anschließend durch einen Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die verbliebenen drei Serum-Überstände mit den Antikörpern wurden zur Detektion der Proteine verwendet (Abbildung 3.16).

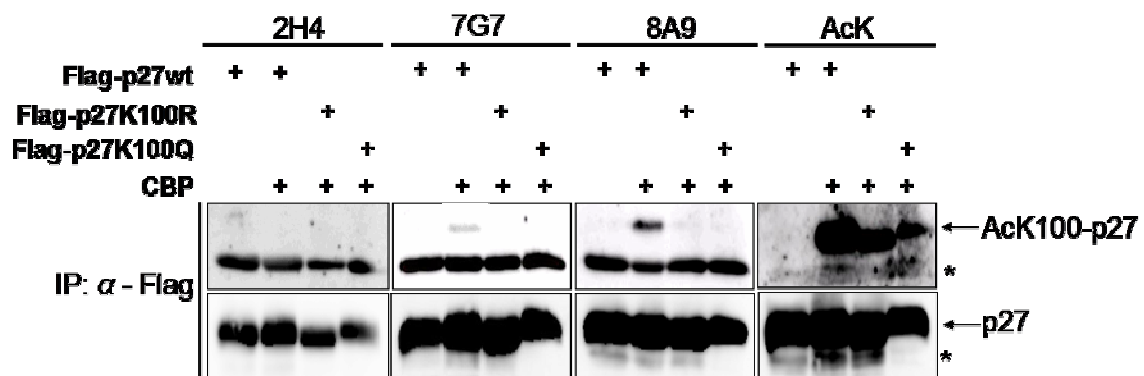


Abbildung 3.16: Detektion von Flag-p27wt, Flag-p27K100R und Flag-p27K100Q mittels gegen acetyliertes K100 gerichtete Antikörper (In Kooperation mit S.Vosshall)

In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K100R, pSC2⁺Flag-p27K100Q und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach zwei Tagen erfolgte die Lyse der Zellen in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 mit Serum-Überständen der B-Zell-Klone 2H4, 7G7 und 8A9, anschließend wurde der Blot gestrippt und mit einem p27-spezifischen Antikörper inkubiert. Als Positiv-Kontrolle erfolgte die Detektion von p27 mit dem AcK-spezifischen Antikörper. Banden, die durch einen Stern markiert sind, deuten die Kreuzreaktivität des sekundären α -Ratten-Antikörpers mit dem murinen Flag-IP-Antikörper an.

Bei der Überprüfung der Expression von p27wt, der K100R- und der K100Q-Mutante konnten gleichmäßige vorhandene Mengen von p27wt-Protein und Mutanten auf dem Blot festgestellt werden. Es konnte jedoch überraschenderweise

keine Bindung von Antikörpern des 2H4-Klons an p27wt festgestellt werden, somit war die positive Bindung der Antikörper an p27wt aus dem vorangegangenen Experiment nicht mehr reproduzierbar. Bei den Antikörpern der Klone 7G7 und 8A9 konnte erneut eine Bindung an p27wt festgestellt werden. Wiederum war das Signal für die K100-Acetylierung jedoch beim 8A9-Klon deutlich stärker als beim 7G7-Klon. Mit keinem der getesteten Antikörper konnte p27 nach Austausch von K100 zu Arginin detektiert werden. Ein Austausch von Lysin zu Glutamin zur Mimikry eines acetylierten Lysins führte ebenfalls zu keiner Detektion durch 7G7- und 8A9-Antikörper. Dies spricht für die Abhängigkeit der Bindung von acetyliertem Lysin und gegen eine Epitop-Ähnlichkeit eines eingeführten Glutamins. Die Kontrolle auf vorhandenes acetyliertes p27 mit dem AcK-spezifischen Antikörper war positiv. Wie erwartet, führt der Austausch von K100 durch Arginin oder Glutamin zu einem Verlust in der Signalstärke der Gesamtacetylierung im Vergleich zu überexprimiertem p27wt-Protein.

Die Analyse der Bindungstests lässt darauf schließen, dass der 8A9-Antikörper ein geeignetes Werkzeug für die Detektion von acetyliertem K100 im Kontext der *in vivo*-Überexpression von p27 mit CBP darstellt. Zudem konnten Signale von acetyliertem K100 in einem *in vitro* HAT-Assay mit dem 8A9-Antikörper von GST-p27wt im Vergleich zu GST-p27K100R nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Ein logischer nächster Schritt war daher die Detektion von endogenem, an K100 acetyliertem p27 mit dem 8A9-Antikörper.

3.3.2 IP von p27 durch den 8A9-Antikörper

Bisher konnte keine endogene Acetylierung von p27 mit dem AcK-spezifischen Antikörper (Santa-Cruz-Biotechnology) aufgrund der beschriebenen Probleme durch die Erkennung der IP-Antikörperketten durch den AcK-spezifischen Antikörper detektiert werden (Abschnitt 3.1.6). Der für acetyliertes K100 spezifische 8A9-Antikörper konnte ebenfalls keine endogene Acetylierung von K100 nach IP von p27 und Western-Blot detektieren (nicht gezeigt). Eine alternative Methode zur Detektion der endogenen Acetylierung stellt eine IP mit einem gegen acetylierte Lysine gerichteten Antikörper und anschließender Detektion von p27 auf dem Western-Blot mit einem gegen p27 gerichteten Antikörper dar (siehe Abbildung 3.5). Da der 8A9-Antikörper spezifisch das acetylierte K100-Epitop von p27 erkennt, wäre der Nachweis von p27 auf dem Western-Blot ausreichend für einen Beweis der endogenen Acetylierung von p27 an K100.

Um einen ersten Eindruck von der Eignung des 8A9-Antikörpers für eine IP zu erlangen, wurde in HEK293-Zellen Flag-getaggttes p27 mit CBP transfiziert. In weiteren Ansätzen wurden die Zellen mit TSA und NAM behandelt, um die Acetylierung von Flag-getaggttem p27 durch endogene HATs zu verstärken (siehe Abbildung 3.4). Anschließend erfolgte eine IP von p27 mit dem 8A9-Antikörper. Der 8A9-Antikörper wurde aus der Ratte gewonnen. Um eine Kreuzreaktivität mit den leichten Ketten des IP-Antikörpers zu vermeiden, wurde der Blot mit einem Kaninchen-Antikörper auf vorhandenes p27 untersucht (Abbildung 3.17).

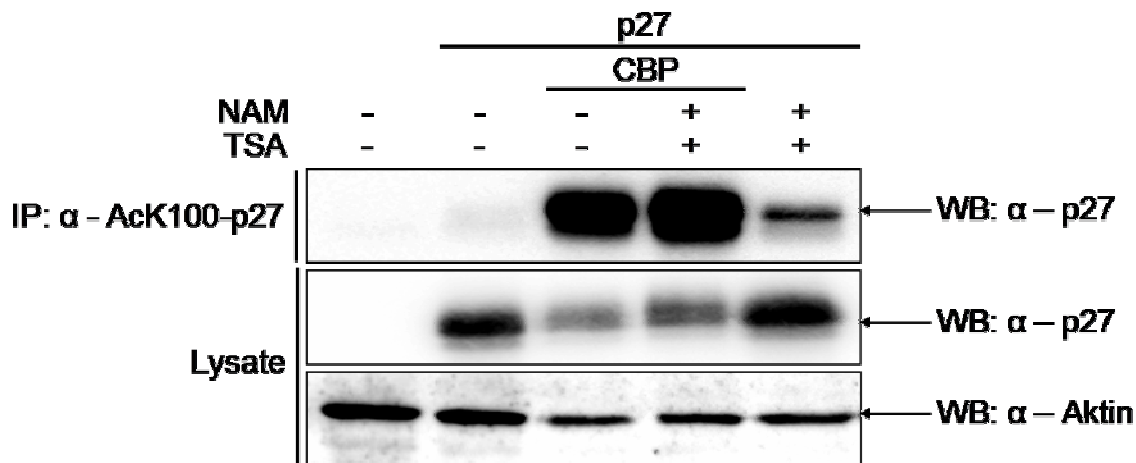


Abbildung 3.17: IP von p27 mit dem 8A9-Antikörper

In 10 cm-Kutschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen wie angegeben mit $1 \mu\text{g}$ der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt und mit $3 \mu\text{g}$ Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach 42 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit $3,5 \text{ nM}$ TSA und 5 mM NAM für 6 Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in $500 \mu\text{l}$ Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit an Protein G-Sepharose gekoppelten 8A9-Antikörpern aus den Lysaten für 2 Stunden bei 4°C immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ Lysate und die Proben der IP auf vorhandenes p27 mit einem Antikörper untersucht. Die Detektion von Aktin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Aus der Abbildung 3.17 wird ersichtlich, dass der 8A9-Antikörper ein geeignetes Werkzeug für die IP von an K100 acetyliertem p27 darstellt. Während die alleinige Transfektion von Flag-getaggttem p27 ohne CBP und Deacetylase-Inhibitoren nur zu einer sehr geringen Detektion von p27 nach der IP auf dem Blot führt, konnten starke Signale für p27 bei gleichzeitiger Überexpression mit CBP detektiert werden. Die IP konnte sogar noch ein wenig durch die Behandlung der Zellen mit den Deacetylase-Inhibitoren TSA und NAM gesteigert werden. Interessant sind die Effekte, die die Überexpression von CBP auf den Proteinspiegel von p27 hat. So wurden in beiden Proben, in denen CBP überexprimiert worden war, deutlich reduzierte Mengen von p27 in den Lysaten festgestellt. Dies spiegelt das Ergebnis aus Abbildung 3.1 wieder, dass möglicherweise der Proteinspiegel von p27 durch überexprimiertes CBP negativ reguliert wird, wobei die Effekte in Abbildung 3.1 nicht so deutlich wie hier erkennbar sind. Die weitere Behandlung der Zellen mit NAM und TSA führt dagegen wieder zu einem geringfügigen Anstieg von p27. Der Anstieg könnte wiederum durch TSA vermittelt sein (Chen und Faller, 2004).

Ebenso wie bei den HCT116-Zellen gezeigt, führt eine Behandlung der Zellen mit TSA und NAM zu einem Nachweis der Acetylierung von Flag-getaggttem p27 durch endogene HATs. Hier jedoch konnte auch der klare Nachweis für eine Acetylierung von K100 erbracht werden. Ein Nachweis von immunpräzipitiertem endogenem p27 durch den 8A9-Antikörper konnte bei diesem Versuch allerdings nicht erbracht werden. HEK293-Zellen besitzen auf Grund ihres schnell durchlaufenden Zellzyklus nur geringe endogen exprimierte p27-Mengen. Daher könnte auch die sechsstündige Behandlung der Zellen mit HDAC-Inhibitoren, die in einigen Zell-Linien zu einem reversiblen Stopp des Zellzyklus bei gleichzeitigem Anstieg des Proteinspiegels von p27 führen, zu kurz sein, um gesteigerte endogene acetylierte Mengen von p27 zu detektieren. Zudem könnte endogenes immunpräzipitiertes p27 aufgrund des starken Signals von Flag-getaggttem p27 nicht unterscheidbar sein.

Auf Grund der vorhandenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der 8A9-Antikörper ein geeignetes Werkzeug für die IP von an K100 acetyliertem p27 darstellt. Ob dieser jedoch auch geeignet ist für die IP von endogenem p27, muss in weiteren Experimenten und Zell-Linien überprüft werden.

3.4 Analyse zur Funktion der p27-Acetylierung

Die vorangegangenen Experimente lieferten deutliche Hinweise, dass die Acetylierung von p27 durch CBP Auswirkungen auf die Expression oder die Stabilität des Tumorsuppressors hat. Die Überexpression von p27 mit CBP führt zu einer deutlich verringerten Menge von p27 auf dem Western-Blot im Vergleich zu einer einzelnen Überexpression von p27 in HEK293-Zellen (Abbildung 3.1 und 3.17), wenngleich auch nicht bei jedem Experiment im gleichen Ausmaß (vergleiche Abbildung 3.1 und 3.17). Eine Behandlung von murinen NIH3T3-Zellen mit TSA und Na-Butyrat führt dagegen zu einem posttranslationalen Anstieg von p27 (Chen und Faller, 2007; Abbildung 3.5), was ebenfalls in HEK293-Zellen bestätigt werden konnte (Abbildung 3.17). Dies deutet auf eine komplexe Regulierung der Stabilität von p27 sowohl durch die HATs CBP und p300 als auch durch verschiedene HDACs hin. Da auch zwei Lysine als Ziele für die Acetylierung von p27 durch CBP identifiziert worden waren, K100 und K190, kann vermutet werden, dass möglicherweise die Funktion der Acetylierung der einzelnen Lysine voneinander verschieden sind. So wurden in nachfolgenden Experimenten mögliche Funktionen der Acetylierung der einzelnen Lysine auf die Proteinstabilität zunächst getrennt untersucht.

3.4.1 Untersuchungen zur Funktion der K190-Acetylierung

Die Regulierung der Expression von p27 in Zellen erfolgt auf mehreren Ebenen. Neben der Regulierung von p27 auf Transkriptions- und Translationsebene (Chu et al., 2008), erfolgt die Regulierung auch insbesondere durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse. Am besten charakterisiert ist dabei die Ubiquitinierung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex. Die Bindung des Ligase-Komplexes wird durch die Phosphorylierung von p27 durch CDK2 vermittelt. CDK2 phosphoryliert p27 an Threonin 187 in der späten G1/S-Phase des Zellzyklus. p27 wird dann durch den Ligase-Komplex polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Nakayama und Nakayama, 2006; Frescas und Pagano, 2008).

K190 liegt nur zwei Aminosäuren von Threonin 187 (T187) entfernt. Interessanterweise ist K190 auch ein Teil der Phosphorylierungs-Erkennungssequenz von CDK2 (S/T-P-X-K/R). So war die Frage, ob eine Acetylierung von K190 Auswirkungen auf die Phosphorylierung von T187 hat. Eine Acetylierung von K190 könnte möglicherweise die Phosphorylierung von T187 inhibieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass acetyliertes K190 bei der Bindung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex eine tragende Rolle spielt. Ist acetyliertes K190 wichtig für die Erkennung von phosphoryliertem p27 oder könnte eine Acetylierung die Ubiquitinierung von p27 durch den Komplex verhindern? Um einen ersten Überblick über die Auswirkungen von acetyliertem K190 auf die Stabilität und die Funktion von p27 im Zellzyklus zu erhalten, wurde ein *colony formation* Assay durchgeführt.

3.4.1.1 Ein *Colony formation* Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung

Ob ein Protein Auswirkungen auf das Zellwachstum hat, kann mit einem *colony formation* Assay überprüft werden. Dazu wird ein Plasmid mit der Sequenz des zu untersuchenden Proteins und ein Antibiotika-Resistenz verleihendes Plasmid mittels Co-Transfektion in Zellen eingebracht. Danach wird mit einem Antibiotikum auf den Erhalt des Plasmides durch die Zellen selektiert. Die Zellen, die ein Antibiotika-Resistenz verleihendes Plasmid erhalten haben, können hochwachsen und Kolonien bilden; die es nicht erhalten haben, sterben ab. Ob das exprimierte Protein einen Einfluss auf das Zellwachstum besitzt, lässt sich an der Zahl der Kolonien ausmachen. Wenn sich weniger Kolonien im Vergleich zu einer Leerkontrolle auf der Platte befinden, lässt das auf eine wachstumsinhibitorische Eigenschaft des zu untersuchenden Proteins schließen. Ein Beispiel für ein stark wachstumsinhibierendes Protein ist p27 aufgrund seiner Eigenschaft als Inhibitor des Zellzyklus. So wird es beispielsweise in diesem Institut als Vergleichskontrolle mit zu untersuchenden Proteinen beim *colony formation* Assay eingesetzt.

Zur Analyse der Funktion der Acetylierung wurde K190 wiederum gegen R und Q ausgetauscht. Die Plasmide wurden zunächst in HCT116-Zellen transfiziert, anschließend wurde mit Puromycin selektiert. Nach 10 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien von R- und Q-Mutanten mit der Anzahl der Kolonien der p27wt-Transfektion verglichen (Abbildung 3.18).

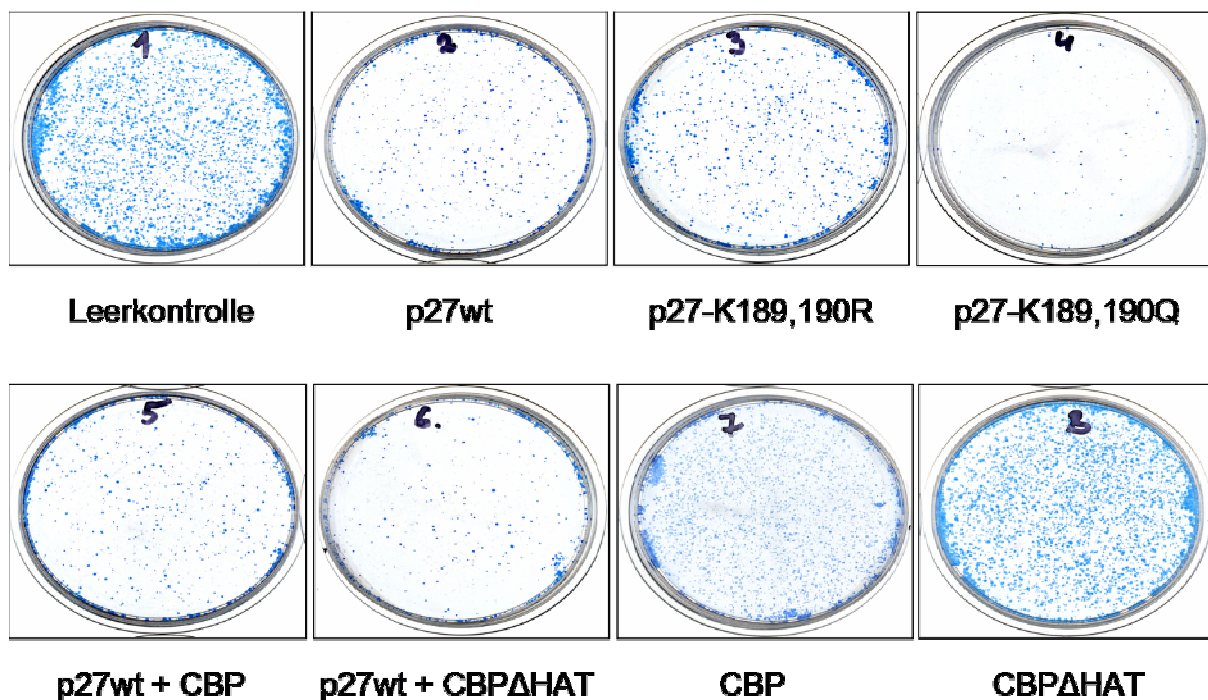


Abbildung 3.18: Analyse der Funktion der Acetylierung von K190 mittels *colony formation* Assay

3×10^5 HCT116-Zellen wurden in 6 cm Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit $2 \mu\text{g}$ der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K189,190R, pSC2⁺Flag-p27K189,190Q, pVR1012Gal4-CBP, pVR1012Gal4-CBPΔHAT und $0,4 \mu\text{g}$ des Plasmides pBabePuro. Acht Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 Stunden mit $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin selektiert. Nach zehn Tagen erfolgte die Auswertung durch Färben der Zellen mit Methylen-Blau.

Die Leerkontrolle oben links in der Abbildung 3.18, in der nur auf eine erhaltende Antibiotika-Resistenz selektioniert wurde, zeigt eine große Anzahl von Kolonien nach der Selektion mit Puromycin. Eine deutlich verringerte Anzahl von Kolonien liegt nach der Transfektion des Plasmides vor, welches für p27wt-Protein kodiert. Damit konnte die stark wachstumsinhibierende Eigenschaft von p27 nach Überexpression in HCT116-Zellen bestätigt werden. Entscheidend sind jedoch die Unterschiede beim Vergleich der Anzahl der Kolonien bei der R- und Q-Doppelmutante zur p27wt-Transfektion. Nach der Transfektion von der p27K189,190R-Doppelmutante sind deutlich mehr Kolonien auf der Platte vorhanden im Vergleich zur p27wt-Transfektion. Umgekehrt verhält es sich bei der K189,190Q-Mutante. Die wachstumsinhibierende Eigenschaft von p27 konnte noch einmal durch den Austausch von K zu Q gesteigert werden. Auf der Platte sind nur noch vereinzelt Kolonien zu erkennen.

Ebenso interessant ist der Vergleich der Anzahl der Kolonien nach der Transfektion von CBP mit der Anzahl der Kolonien nach Transfektion von CBP Δ HAT. Für CBP werden Tumorsuppressor-Eigenschaften vermutet (Chan et al., 2001; Iyer et al., 2004; Kishimoto et al., 2005; Ward et al., 2008). So zeigt sich, dass die alleinige Transfektion von CBP in HCT116-Zellen zu einer Abnahme in der Anzahl der Kolonien führt, wenngleich der Effekt nicht stark im Vergleich zu p27wt-Expression ist. Die wachstumsinhibierende Eigenschaft ist zudem von der Acetyltransferase-Aktivität abhängig. Die Transfektion der CBP Δ HAT-Mutante führt zu einer ähnlich großen Anzahl von Kolonien wie die Transfektion mit einem leeren Plasmid. Wird p27wt zusammen mit CBP transfiziert, kommt es dagegen zu einer vergleichbaren Anzahl von Kolonien wie bei der Transfektion von p27wt allein. Die wachstumsinhibitorische Eigenschaft von p27 konnte in diesem Fall nicht gesteigert werden. Wird die Δ HAT-Mutante von CBP mit p27wt transfiziert, wurde eine leicht verringerte Anzahl von Kolonien im Vergleich zu p27wt festgestellt.

Die Eigenschaft der p27K189,190Q-Mutante, eine gesteigerte inhibitorische Funktion im Vergleich zum p27wt-Protein auf den Zellzyklus zu besitzen, konnte in weiteren *colony formation* Assays bestätigt werden (nicht gezeigt). Dagegen wurde bei der p27K189,190R-Mutante jedes Mal eine größere Anzahl von Kolonien im Vergleich zu p27wt-Transfektion festgestellt. Daher könnte die Acetylierung von K190 Auswirkungen auf den Ubiquitin-vermittelten Abbau von p27 haben. Ob es zu einer Inhibierung der Phosphorylierung von T187 oder einer Inhibierung der Bindung des SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex kommt, musste in nachfolgenden Experimenten überprüft werden.

3.4.1.2 Inhibierung der Acetylierung von p27 nach Überexpression von CDK2/Cyclin E

Die Interaktion von p27 mit dem CDK2/Cyclin E-Komplex ist in einigen Zellarten von zentraler Bedeutung für das Fortschreiten des Zellzyklus in der späten G1/S-Phase zur Mitose-Phase hin (Polyak et al., 1994a; Polyak et al., 1994b). Einer Inhibierung von Kinase-Komplexen in der frühen G1-Phase durch p27 folgt unter Einfluss von mitogenen extrazellulären Signalen eine Aktivierung der Komplexe (Chu et al., 2007; Gimmler et al., 2007). p27 wird dann durch CDK2 an T187 phosphoryliert und Ubiquitin vermittelt über das Proteasom abgebaut. (Nakayama und Nakayama, 2006). Die Mimikry von acetyliertem K190 von p27 führt zu einer Verstärkung der inhibitorischen Eigenschaft von p27 in einem *colony formation* Assay mit HCT116-Zellen (Abbildung 3.18). So liegt die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von T187 durch Acetylierung an K190 verhindert wird oder aber die Acetylierung die

Erkennung durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex von p27 inhibiert. Wird p27 mit CDK2/Cyclin E überexprimiert, führt dies zu einer Erniedrigung von p27 auf Proteinebene im Vergleich zu alleinigen Überexpression (Montagnoli et al., 1999). Eine gleichzeitige Überexpression von CBP und CDK2/Cyclin E könnte dagegen möglicherweise eine stabilisierende Wirkung durch Acetylierung unter gleichzeitiger Inhibierung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus von p27 haben. Zudem beschreibt eine Veröffentlichung eine gesteigerte Acetyltransferase-Aktivität von CBP nach Phosphorylierung durch CDK2 (Ait-Si-Ali et al., 1998). Daher ergab sich die Frage, wie sich eine gesteigerte Acetyltransferase-Aktivität von CBP auf die Acetylierung von p27 auswirken würde. Um diese Fragen zu beantworten, wurden HEK293-Zellen jeweils mit p27, CBP und CDK2/Cyclin E transfiziert. Anschließend wurde mittels Western-Blot Auswirkungen auf die Acetylierung und den Abbau von p27 überprüft (Abbildung 3.19).

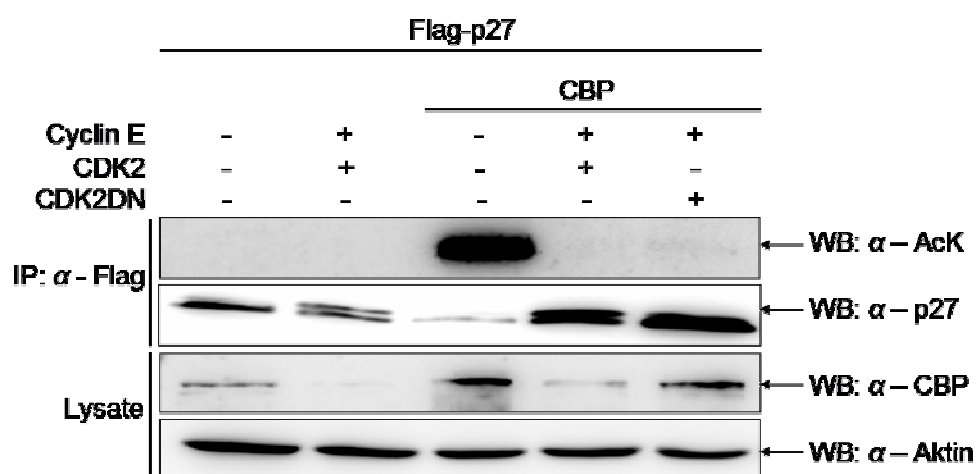


Abbildung 3.19: Inhibierung der Acetylierung von p27 nach Überexpression von CDK2/Cyclin E
In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 µg Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt und mit 3 µg Plasmid pVR1012Gal4-CBP, pCMV-CDK2, pCMV-CDK2DN und pCMV-Cyclin E. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit dem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Aktin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Da die Aktin-Ladekontrolle eine gleichmäßige Proteinkonzentration in den Lysaten anzeigt, kann von einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse ausgegangen werden. Die Überexpression von p27 mit CDK2/Cyclin E führt zu einer Erniedrigung der Proteinspiegel von p27 im Vergleich zur alleinigen Überexpression. p27 liegt dabei als Doppelbande vor, wahrscheinlich hervorgerufen durch die Phosphorylierung von p27 durch CDK2 und einem daraus resultierenden veränderten Laufverhalten im Gel. Deutlich verringerte Mengen von p27 im Vergleich zur Überexpression von CDK2/Cyclin E wurden dagegen bei Überexpression von p27 mit CBP festgestellt. Verringerte Mengen von p27 nach Überexpression von p27 mit CBP waren schon in früheren Experimenten (vergleiche Abbildung 3.1 und Abbildung 3.17) festgestellt worden. Somit scheint die alleinige Überexpression von CBP eine destabilisierende Wirkung auf p27 zu haben, vermutlich hervorgerufen durch eine gleichzeitige Acetylierung von K100 und K190 durch CBP. Klar detektiert werden konnte dagegen wiederum die Acetylierung von p27 durch CBP nach der Inkubation des Blots mit dem AcK-spezifischen Antikörper. Auffallend ist dagegen der vollständige Verlust der Acetylierung von p27 bei Co-Transfektion von CBP und CDK2/Cyclin E. Der Verlust

der Acetylierung war dabei wahrscheinlich nicht von der Kinase-Aktivität von CDK2 abhängig. Die Überexpression einer dominant negativen Kinase-Mutante von CDK2 führt zu einem ähnlich starken Verlust der Acetylierung von p27, nur mit deutlich verlängerten Belichtungszeiten konnte eine Acetylierung von p27 im Vergleich zum aktiven CDK2/Cyclin E-Komplex festgestellt werden. Bei beiden Proben wurden erhöhte Mengen von p27 auf dem Blot festgestellt. So führt eine gleichzeitige Überexpression von CDK2/Cyclin E mit CBP offensichtlich zur der Aufhebung der negativen Regulierung von p27 durch den Kinase-Komplex und der HAT.

Deutliche Unterschiede in der CBP-Menge zeigten sich dagegen in Abhängigkeit von überexprimierten CDK2/Cyclin E-Komplex. Eine Überexpression von CDK2/Cyclin E führte grundsätzlich zu deutlich erniedrigten CBP-Konzentrationen in den einzelnen Lysaten. Die erniedrigte CBP-Konzentration scheint im Zusammenhang mit der Kinase-Aktivität von CDK2 zu stehen. Nach Überexpression von der dominant negativen CDK2- Mutante konnten keine Unterschiede in der Proteinmenge von CBP im Vergleich zur alleinigen Überexpression von CBP festgestellt werden.

In einem nächsten Experiment war die Frage zu klären, warum die Überexpression von CBP und CDK2/Cyclin E zu einem Verlust der p27-Acetylierung führt. Wie erwähnt, beschreibt eine Veröffentlichung die Erhöhung der Acetyltransferase-Aktivität von CBP nach Phosphorylierung durch CDK2/Cyclin E (Ait Si Ali., 1998). Somit war der Verlust der Acetylierung von p27 überraschend. Sowohl überexprimiertes Cyclin E als auch CDK2 könnten mit p27 oder CBP interagieren und verhindern, dass p27 durch CBP acetyliert wird. In HEK293-Zellen wurden daher Cyclin E und CDK2 mit CBP einzeln überexprimiert, anschließend wurde erneut die Acetylierung von p27 untersucht. (Abbildung 3.20).

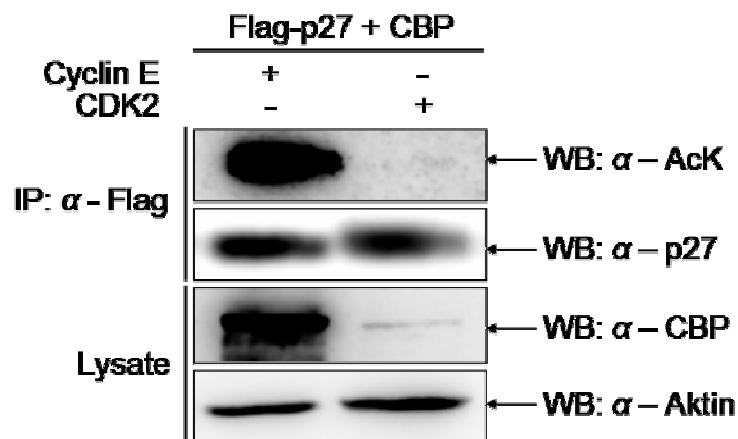


Abbildung 3.20: Verlust der p27-Acetylierung nach Überexpression von CDK2

In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 µg Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt und mit 3 µg Plasmid pVR1012Gal4-CBP und pCMV-CDK2 oder pCMV-Cyclin E. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit dem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Aktin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Aus Abbildung 3.20 wird deutlich, dass eine Überexpression von CDK2 ausreicht, um eine Acetylierung von p27 durch CBP zu inhibieren. Hier konnte erneut kein Signal für die Acetylierung von p27 festgestellt werden. Kein Verlust in der Acetylierung konnte dagegen bei Überexpression von Cyclin E festgestellt werden. Deutlich

runterreguliert ist erneut die CBP-Menge nach Überexpression mit CDK2. Dies ist in soweit überraschend, da die Kinaseaktivität von CDK2 durch die Bindung zu Cyclin E und Cyclin A reguliert wird (Bloom und Cross, 2007). Wenn die Kinase-Aktivität von CDK2 für die Herabregulierung von CBP auf Proteinebene, wie in Abbildung 3.19 gezeigt, verantwortlich ist, so scheint eine Interaktion von überexprimiertem CDK2 mit endogenem Cyclin E und Cyclin A ausreichend für die Aktivität der Kinase zu sein.

Da die Acetylierung von p27 verhindert wird, erlaubt eine gleichzeitige Überexpression von p27, CBP und CDK2/Cyclin E keine Rückschlüsse auf die Funktion der Acetylierung von K190. Eine Überexpression der p27K190Q-Mutante, die eine Mimikry von acetyliertem K190 darstellt, zusammen mit CDK2/Cyclin E, und anschließender Detektion von phosphoryliertem T187 kann ebenfalls nicht erfolgen. Der polyklonale spezifisch gegen phosphoryliertes T187 gerichtete Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit phosphorylierten Peptiden generiert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch den Austausch von K190 zu Q das Epitop des Antikörpers so verändert wird, das dieses nicht mehr erkannt wird. Somit würde auch dieses Experiment keine klaren Aussagen über den Effekt der K190-Acetylierung liefern.

Um zu überprüfen, ob eine Acetylierung von K190 von p27 Auswirkung auf die Phosphorylierung von T187 hat, wurde deshalb ein *in vitro* Kinase-Assay gewählt.

3.4.1.3 *In vitro* Kinase-Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung

p27 wird durch CDK2 und Cyclin E *in vitro* spezifisch an T187 phosphoryliert (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007). Ein Vergleich der Stärke der Phosphorylierung von aufgereinigtem p27wt-, p27K190R- und p27K190Q-Protein könnte somit Hinweise auf den Effekt der K190-Acetylierung geben. Für den Kinase-Assay wurden die GST-getaggten Proteine p27wt, p27K190R und p27K190Q in aufsteigenden Konzentrationen (150 – 1200 ng Substrat) mit baculoviral aufgereinigtem His-CDK2/Cyclin E-Komplex (R. Lilischkis) und mit radioaktiven [³²P] ATP inkubiert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel gegen einen Röntgenfilm exponiert. Dabei korreliert die Schwärzung des Films mit der Menge der übertragenden Phosphate auf T187 der GST-p27 Proteine (Abbildung 3.21).

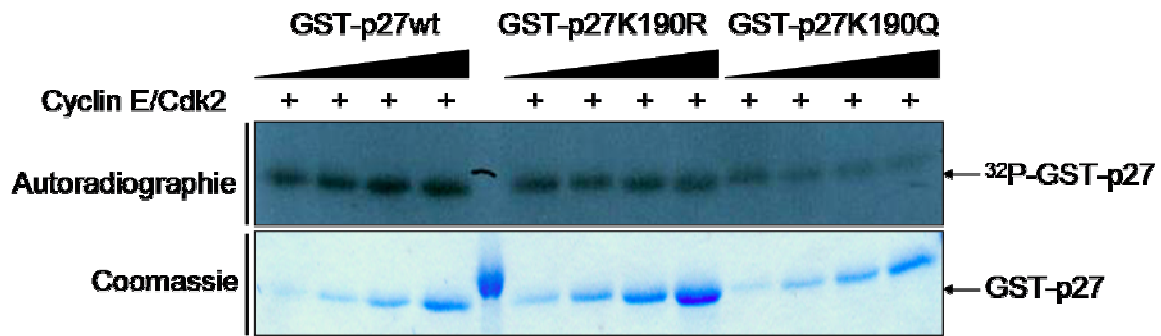


Abbildung 3.21: *In vitro* Kinase-Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung

Der Gesamtansatz pro Reaktion betrug 30 μ l. Auf Eis wurden 10 μ l 3 x Kinase-Puffer, 150, 300, 600 und 1200 ng Substrat GST-27wt, GSTp27K190R und GST190Q und 2 μ l aufgereinigter CDK2/Cyclin E-Komplex mit H₂O gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 μ l Hot Mix (2 μ Ci) gestartet und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufkochen für 6 min mit 5 x Probenpuffer beendet. Es folgte eine SDS-PAGE, das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, zur Reduzierung des Hintergrundes wurde über Nacht entfärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel zur Verstärkung des Signals für 30 min in Verstärker-Lösung *NAM P100* (GE Healthcare) inkubiert und dann im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für 24 Stunden bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Die Coomassie-Blau-Färbung des Gels zeigt gleichmäßig ansteigende Proteinkonzentrationen von GST-p27wt und GST-p27K190Q, etwas größere Proteinkonzentrationen sind dagegen bei GST-p27K190R vorhanden. Nach Exposition eines Röntgenfilms gegen das getrocknete Gel kann ein Anstieg der Schwärzung in Abhängigkeit der ansteigenden GST-p27wt-Proteinkonzentration festgestellt werden. Somit konnte die Phosphorylierung von p27 durch den CDK2/Cyclin E-Komplex *in vitro* bestätigt werden. Fast gleichmäßig stark ist die Schwärzung des Films bei allen Proben von GST-p27K190R. Dagegen ist die Schwärzung des Films bei allen GST-p27K190Q-Konzentrationen im Vergleich zu GST-p27wt und GST-p27K190R stark reduziert. Dies spricht für eine Inhibierung der Phosphorylierung von T187 durch den Austausch von K zu Q, welche eine Mimikry von acetyliertem K190 darstellt. Die Acetylierung an K190 könnte daher ein wichtiger regulierender Faktor für die Stabilität von p27 *in vivo* sein. Weitere ausgewählte Experimente sollten diese ersten Erkenntnisse zur Funktion der Acetylierung von K190 abstützen.

3.4.2 Untersuchungen zur Funktion der K100-Acetylierung

p27 besitzt eine Länge von 198 Aminosäuren. Damit liegt K100 zentral in der Mitte des Proteins (Abbildung 3.9), aber außerhalb der Bindungsdomänen von Cyclin E und CDK2. Die Überexpression von p27 mit CBP führte zu geringeren Konzentrationen von p27 im Lysat (siehe Abbildung 3.1 und 3.17). Ein *colony formation* Assay sowie ein *in vitro* Kinase-Assay zur Funktion der Acetylierung von K190 lassen jedoch auf einen stabilisierenden Effekt im Zusammenhang mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex vermittelten proteolytischen Abbau von p27 schließen. Somit ist die Acetylierung an K100 möglicherweise an der Herabregulierung von p27 auf Proteinebene nach Überexpression von CBP verantwortlich.

Eine wichtige Frage war zunächst jedoch, ob der niedrige Proteinspiegel von p27 nach der Überexpression von CBP abhängig von der Aktivität der Acetyltransferase

ist. Sowohl CBP/p300 als auch PCAF besitzen E3-Ubiquitin-Ligase- als auch E4-Polyubiquitin-Ligase-Aktivität, die unabhängig von der Acetyltransferase-Aktivität sind (Grossman et al., 2003; Shi et al., 2009). Zudem bilden p300 und CBP multimere Protein-Komplexe, in denen sowohl Deacetylasen als auch Ubiquitin-Ligasen vorhanden sind (Turnell et al., 2005; Tang et al., 2006; Han et al., 2009). Die Komplexpartner könnten wiederum zur Deacetylierung und folgender Ubiquitinierung von p27, unabhängig von der Acetyltransferase-Aktivität von CBP/p300, führen.

3.4.2.1 Der p27-Abbau ist abhängig von der HAT-Aktivität von CBP

In HEK293-Zellen wurde p27 mit CBP oder mit CBP Δ HAT überexprimiert. Nach Lyse der Zellen, SDS-PAGE und Western-Blot wurde die Menge von p27 in den einzelnen Lysaten mit einem p27-spezifischen Antikörper untersucht. (Abbildung 3.22).

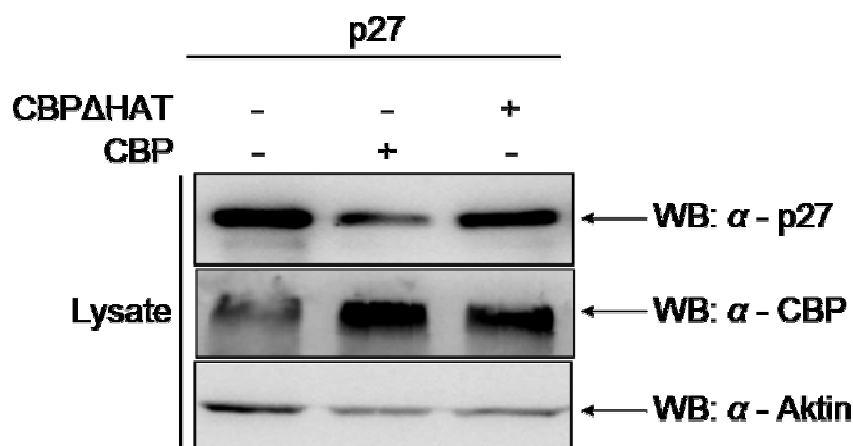


Abbildung 3.22: Abhängigkeit des p27-Abbaus von der HAT-Aktivität von CBP

In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g Plasmid pSC2⁺-p27wt und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP und pVR1012Gal4-CBP Δ HAT. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 und CBP mit spezifischen Antikörpern. Die Detektion von Aktin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Die Kontrolle auf die Expression von CBP und CBP Δ HAT zeigt deutlich erhöhte Mengen der Acetyltransferasen nach Transfektion im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Die Menge von exprimiertem p27 ist bei Co-Expression von CBP im Lysat im Vergleich zur einzelnen Überexpression von p27 deutlich reduziert. Dagegen ist die Menge von p27 bei Überexpression der Acetyltransferase-negativen CBP Δ HAT-Mutante vergleichbar mit der einzelnen Überexpression von p27. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verringerte Proteinkonzentration von p27 mit der Acetyltransferase-Aktivität von CBP zusammenhängt.

3.4.2.2 Colony formation Assay zur Analyse der Funktion der K100-Acetylierung

Um erste Erkenntnisse über die Auswirkungen der K100-Acetylierung von p27 auf den Zellzyklus zu erlangen, wurde auch hier zunächst ein *colony formation* Assay durchgeführt (Abbildung 3.23).

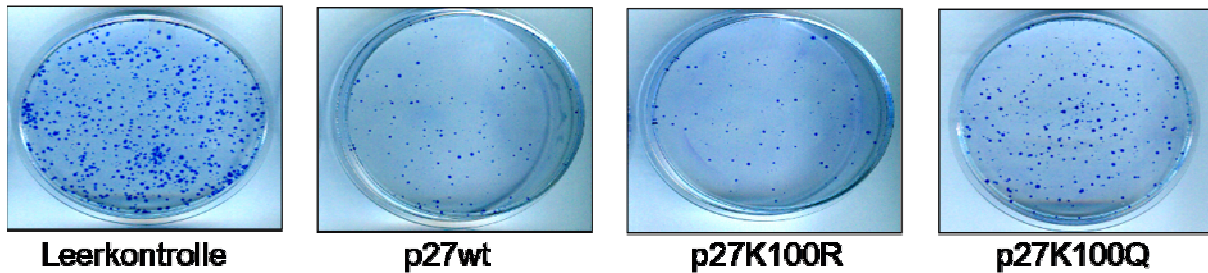


Abbildung 3.23: Colony-formation-Assay zur Analyse der Funktion der K100-Acetylierung

3 x 10⁵ HCT116-Zellen wurden in 6 cm-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 2 µg der Plasmide pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K1100R, pSC2⁺Flag-p27K100Q und 0,4 µg des Plasmides pBabePuro. Acht Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 Stunden mit 2 µg/ml Puromycin selektioniert. Nach zehn Tagen erfolgte die Auswertung durch Färben der Zellen mit Methylen-Blau.

Die Transfektion von p27wt führte wie erwartet zu einer deutlichen Reduzierung der Kolonienanzahl im Vergleich zur Leerkontrolle. Der Austausch von K100 zu R führte zu einer leicht reduzierten Anzahl von Kolonien im Vergleich zu p27wt-Transfektion. Somit scheint die inhibitorische Eigenschaft auf den Zellzyklus durch die nicht mehr an K100 acetylierbare Mutante verstärkt zu werden. Deutlich mehr Kolonien auf der Platte im Gegensatz zur Transfektion von p27wt und p27K100R sind dagegen nach Transfektion der K100Q-Mutante vorhanden. Eine Acetylierung an K100 von p27 führt somit zu einer reduzierten inhibitorischen Eigenschaft des Zellzyklus-Inhibitors. Da die Überexpression von CBP negative Einflüsse auf den Proteinspiegel von p27 hat (Abbildung 3.1 und 3.17), scheint die Erhöhung der Kolonienanzahl auf verstärkten Abbau von p27 zurückzuführen sein. Deshalb wurden in weiteren Experimenten mögliche Einflüsse der Acetylierung auf bekannte Abbauewege von p27 untersucht.

3.4.2.3 Der Austausch von K100 zu Q führt zur verstärkten Phosphorylierung von T187

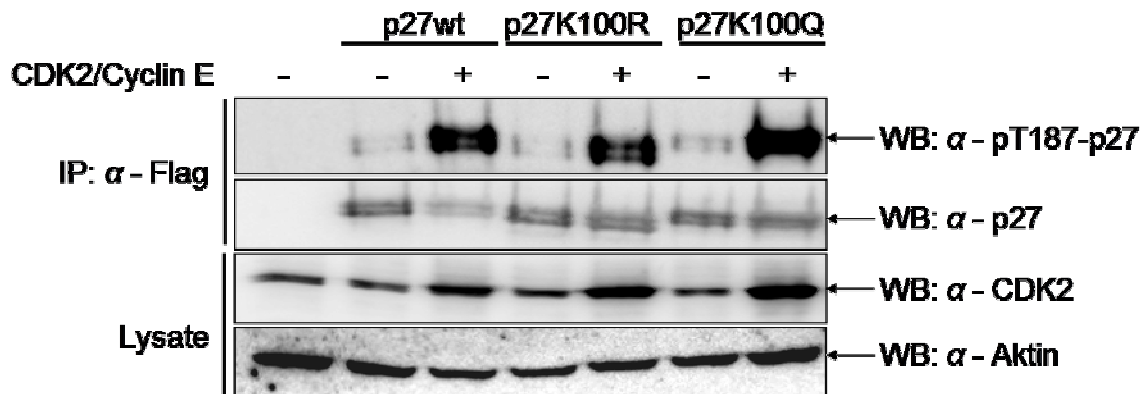
Ein zentraler Abbaueweg stellt die erwähnte Phosphorylierung von p27 an T187 durch CDK2 und die anschließende Erkennung durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex dar (Nakayama und Nakayama, 2006). Die Folge ist die Polyubiquitinierung von p27 und ein proteosomaler Abbau in der späten G1- und S-Phase des Zellzyklus. Entscheidend für die Phosphorylierung von T187 sind jedoch zunächst einhergehende Tyrosin-Phosphorylierungen von p27 in der frühen G1-Phase. In dieser Phase liegt p27 in einem ternären Komplex mit Cyclin E und CDK2 vor. Die Kinase-Aktivität von CDK2 wird inhibiert durch die Einlagerung einer 3₁₀-Helix von p27 in die katalytische Bindungstasche von CDK2. Einer Aktivierung von Kinasen der SRC-Familie durch mitogene Zelloberflächensignale folgt eine Phosphorylierung von p27 an den Tyrosinen 74, 88 und 89. Durch die Phosphorylierung der Tyrosine rutscht die inhibitorische Helix von p27 aus der ATP-Bindungstasche. CDK2 ist dann

in der Lage, ATP zu spalten und Phosphate auf Serin/Threonin-Reste mit entsprechenden Konsensussequenzen zu übertragen. Dabei wird auch T187 phosphoryliert (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007).

Die Bindung der Kinasen SRC und LYN an p27 und nachfolgende Phosphorylierung wird durch eine prolinreiche Sequenz von p27 geregelt. Diese liegt C-terminal neben der inhibitorischen 3_{10} -Helix von p27 und erstreckt sich von R90 zu K96. Die Sequenz P₉₁PRPPK₉₆ ist entscheidend für die Bindung der Kinasen über ihre SH3-Bindungsdomäne an p27. Durch die Nähe von K100 zur prolinreichen Sequenz könnte die Acetylierung von K100 an der Regulierung der Bindung der Kinasen an p27 beteiligt sein und so unmittelbar auch Einfluss auf die Phosphorylierung von T187 haben.

Um einen Einfluss der K100-Acetylierung auf die Phosphorylierung von T187 zu überprüfen, wurde Flag-getaggtetes p27wt, die p27K100R-Mutante und die p27K100Q-Mutante zusammen mit CDK2 und Cyclin E in HEK293-Zellen überexprimiert. Nach IP, SDS-PAGE und Western-Blot wurde dann die Stärke der Phosphorylierung von T187 mit einem spezifischen Antikörper überprüft. (Abbildung 3.24A)

A



B

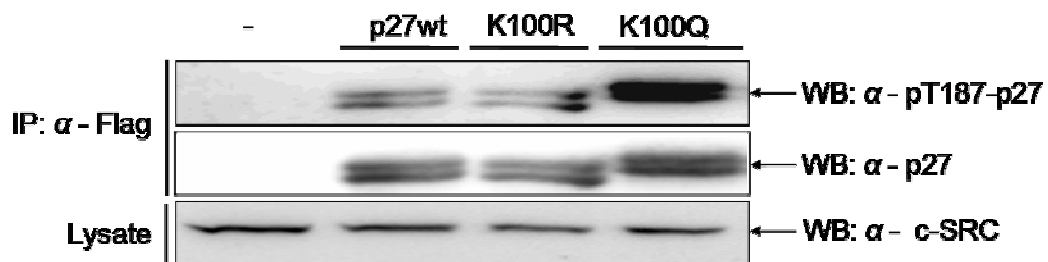


Abbildung 3.24: Verstärkte Phosphorylierung von T187 nach Austausch von K100 zu R und Q

A) In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 µg Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K100R, pSC2⁺Flag-p27K100Q und pCMV-CDK2 und pCMV-Cyclin E. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem pT187-p27-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und die Proteine erneut mit einem p27-spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Aktin in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

B) In 10 cm-Kuturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 µg Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt, pSC2⁺Flag-p27K100R, pSC2⁺Flag-p27K100Q. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem pT187-p27-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und die Proteine erneut mit einem p27-spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von c-SRC in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Durch die Überexpression von CDK2 und Cyclin E konnte die Phosphorylierung von p27 an T187 deutlich im Vergleich zur alleinigen Transfektion von p27 gesteigert werden. p27wt und p27K100R sind nach Überexpression von CDK2 und Cyclin E in Abhängigkeit der vorhandenen Proteinkonzentrationen annähernd gleich stark phosphoryliert. Bei der p27K100Q-Mutante wurden dagegen deutlich stärkere Signale für die Phosphorylierung von T187 detektiert. Somit ergibt sich der Hinweis, dass eine Acetylierung von K100 zur verstärkten Phosphorylierung von T187 führen könnte.

Da auch die Phosphorylierung von T187 durch endogenes CDK2/Cyclin E detektiert werden konnte, wurde in einem nächsten Experiment überprüft, ob die einfache

Überexpression von p27K100Q ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung durch endogenes CDK2 im Vergleich zu p27wt führt (Abbildung 3.24B).

Auch hier zeigte sich bei der p27K100Q-Mutante eine verstärkte Phosphorylierung an T187 durch endogenes CDK2 nach Detektion mit einem spezifischen Antikörper im Vergleich zu p27wt und p27K100R-Mutante. Nach dem Strippen des Blots und der Inkubation mit einem p27-spezifischen Antikörper sind annähernd gleiche Proteinmengen von p27 vorhanden. Deutlich bei diesem Blot wird auch, dass der Austausch von K100 zu Q zu einem veränderten Laufverhalten des Proteins führt. Die p27K100Q-Mutante läuft etwa 1 kDa höher als p27wt oder die p27K100R-Mutante. Ob dies auf den Austausch von K zu Q oder aber posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise die verstärkte Phosphorylierung an T187 zurückzuführen ist, lässt sich anhand dieses Experimentes nicht sagen.

3.4.2.4 Analyse der K100-Acetylierung in Abhängigkeit von HDAC-Inhibitoren

Eine entscheidende Frage ist die Regulierung der Acetylierung von K100 in Abhängigkeit des Zellzyklus. Grundsätzlich sollte von einem geschlossenen Regulationskreis zwischen Acetylierung eines Lysins durch HATs und Deacetylierung durch HDACs ausgegangen werden. Die bisherige Arbeit zeigte eine Acetylierung von p27 an K100 und K190. Da der 8A9-Antikörper ein geeignetes Werkzeug zur Detektion von acetyliertem K100 bei Überexpression von p27 ist (Abbildung 3.17), sollte festgestellt werden, ob Unterschiede in der Acetylierung von p27 an K100 bei Inhibierung von verschiedenen Klassen von Deacetylasen vorliegen. Wie bereits unter Abschnitt 3.1.3 erwähnt, hemmt TSA die Deacetylasen der Klassen I, II und IV (Minucci und Pelicci, 2006). Die NAD⁺-abhängige Klasse III, die Sirtuine, werden dagegen kompetitiv durch ein Beiprodukt der Substratumsetzung, NAM inhibiert. Ein Unterschied in der K100-Acetylierung nach Inkubation von Zellen mit den einzelnen Inhibitoren könnte somit erste Hinweise auf die Regulation der Deacetylierung von p27 geben. Dazu wurde Flag-getaggtetes p27 zusammen mit CBP in HEK293-Zellen überexprimiert. Sechs Stunden vor der Lyse der Zellen erfolgte die Inkubation mit TSA und NAM. Anschliessend wurde mit dem 8A9-Antikörper auf unterschiedliche Stärken der K100-Acetylierung überprüft (Abbildung 3.25).

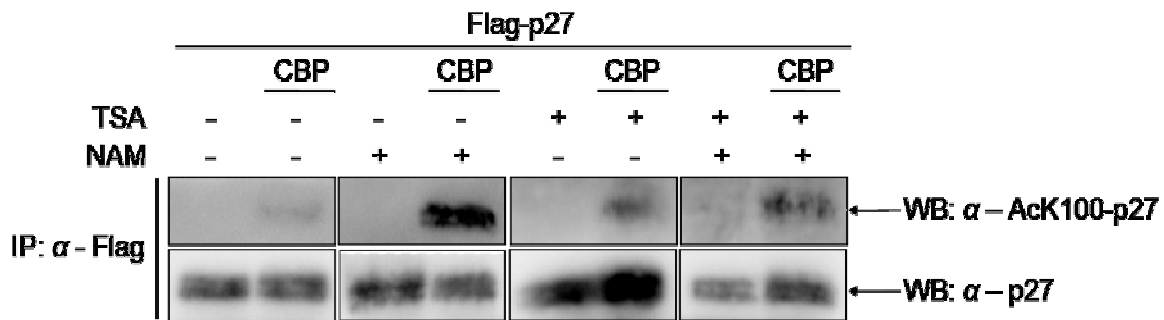


Abbildung 3.25: Auswirkung auf die Acetylierung von K100 in Abhängigkeit von HDAC-Inhibitoren (S. Vossahl)

In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt und mit 3 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP. Nach 42 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit 3,5 nM TSA und 5 mM NAM für 6 Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit dem für acetyliertes K100-spezifischen Antikörper 8A9, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 mit einem spezifischen Antikörper inkubiert.

Die Behandlung von humanen HEK293-Zellen mit TSA führt erneut zu einem deutlich gesteigerten Proteinspiegel von Flag-getagtem p27 im Vergleich zu unbehandelten HEK293-Zellen (Abbildung 3.17 und 3.25). Die gleichzeitige Überexpression von p27 mit CBP führt mit TSA zu einer weiteren Erhöhung des Proteinspiegels von p27. Dagegen ist die Acetylierung von K100 nur schwach mit dem 8A9-Antikörper detektierbar. Umgekehrt verhält es sich bei den Zellen, die mit NAM behandelt worden waren. Acetyliertes K100 liegt im Vergleich zu den mit TSA behandelten Zellen überproportional deutlich bei den mit NAM behandelten Zellen vor. Werden die Zellen sowohl mit TSA und NAM nach Überexpression von CBP behandelt, so führt dies zu einem intermediären Anstieg des Proteinspiegels von p27 im Vergleich zur alleinigen Behandlung von HEK293-Zellen mit TSA. Auch wurde ein deutlich abgeschwächtes Signal für acetyliertes K100 im Vergleich zur Behandlung der Zellen nur mit NAM detektiert. Zusammenfassend ergeben sich hier Hinweise für die Deacetylierung von K100 durch die NAD⁺-abhängige Familie der Sirtuine.

3.4.2.5 Die Inhibierung der Sirtuine führt zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von p27

Wie bereits unter Abschnitt 3.4.2.3 erwähnt, liegt K100 vier Aminosäuren C-terminal von der prolinreichen Sequenz von p27, die für die Interaktion von Mitgliedern der SRC-Kinasen mit p27 essentiell ist. Eine anhaltende Acetylierung von K100 nach Inhibierung der Sirtuine könnte die Bindung der SRC-Kinasen an p27 im Bereich der prolinreichen Sequenz verstärken und somit zum beobachteten verstärkten Abbau von p27 durch die Phosphorylierung an T187 führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde p27 und c-SRC in HCT116-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden dann in getrennten Ansätzen mit NAM und TSA behandelt. Anschließend wurde mittels Western-Blot die Tyrosin-Phosphorylierung von p27 überprüft (Abbildung 3.26).

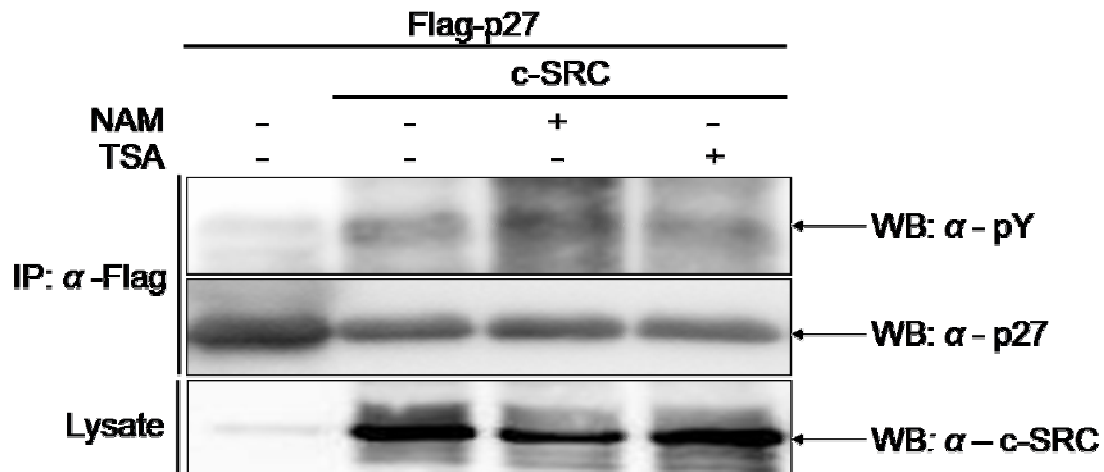


Abbildung 3.26: Tyrosin-Phosphorylierung von p27 durch c-SRC nach Inkubation von HCT116-Zellen mit NAM und TSA

2×10^5 HCT116-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 50 ng pSC2⁺Flag-p27wt- und pCMV5-c-SRC-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 42 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen mit 3,5 nM TSA und 5 mM NAM für 6 Stunden. Die Lyse der Zellen erfolgte in 300 µl Ripa-Puffer durch Sonifikation. p27 wurde mit 30 µl Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 mit einem gegen phosphoryliertes Tyrosin (α -pY) - gerichteten Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 erneut mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von c-SRC in den Lysaten diente der Ladekontrolle.

Aus der Abbildung 3.26 wird eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von p27 durch c-SRC nach Behandlung von HCT116-Zellen mit NAM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ersichtlich. Dagegen führt die Behandlung der Zellen mit TSA nicht zu einer verstärkten Phosphorylierung von p27. Zusammenfassend scheint die K100-Acetylierung zur verstärkten Interaktion von p27 mit c-SRC zu führen, wobei der einhergehenden Tyrosin-Phosphorylierung von p27 durch c-SRC eine verstärkte T187-Phosphorylierung durch CDK2 folgt, welche letztlich zum Proteasom vermittelten Abbau von p27 führt. Eine Rolle scheint dabei die Familie der NAD⁺-abhängigen Deacetylasen, die Sirtuine, zu spielen. Die Inhibierung der Sirtuine durch NAM führt zu einer verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung von p27 durch c-SRC. Die Acetylierung von K100 könnte daher ein wichtiger Faktor für die Interaktion von p27 mit der Familie der SRC-Kinasen sein.

3.5 Die Regulierung der Acetylierung durch Kinasen

Neben der Regulierung der Acetylierung/Deacetylierung und dem damit verbundenen Einfluss auf die Stabilität von p27 stellt sich auch die Frage nach einer Zellzyklus-abhängigen Regulierung der HAT-Aktivität von CBP und p300. Neben der bereits erwähnten Phosphorylierung von CBP durch CDK2 am G1/S-Phase-Übergang sind CBP und p300 als Substrate von einer Reihe weiterer Kinasen beschrieben worden. So führt beispielsweise die Phosphorylierung von CBP an Serin 89 durch die Serin/Threonin-Proteinkinase C δ (PKC δ) zu einer Inhibierung der HAT-Aktivität (Yuan et al., 2002). Gleichzeitig führt eine Überexpression von PKC δ in Ratten-Endothel-Zellen zu einer S-Phase-Arretierung durch die Erhöhung des p27-Proteinspiegels (Ashton et al., 1999).

Einen weiteren möglichen Zusammenhang zwischen der Regulierung von Acetyltransferasen durch eine Kinase und Auswirkungen auf die Expression von p27 und auf den Zellzyklus konnte aus Daten von Wang et al. gezogen werden. Eine Inhibierung der Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) hob die G0-Arretierung und Differenzierung von der Colonkarzinom-Zell-Linie HT29, hervorgerufen durch Behandlung der Zellen mit Na-Butyrat und folgender Erhöhung des p27-Proteinspiegels, wieder auf. GSK-3 β scheint damit eine Rolle in der antiproliferativen Signalkette des Deacetylase-Inhibitors Na-Butyrat auf p27 zuzukommen (Wang et al., 2008).

Inwieweit die Kinasen jedoch Auswirkungen auf die Acetylierung und Stabilität von p27 tatsächlich haben, sollte in einem Experiment überprüft werden. Dazu wurden in HEK293-Zellen PKC δ wt und eine verkürzte konstitutive aktive Mutante PKC δ -CAT sowie GSK-3 β zusammen mit p27 und CBP überexprimiert. Anschließend wurden in einem Western-Blot Auswirkungen auf die Acetylierung und die Stabilität von p27 überprüft. (Abbildung 3.27).

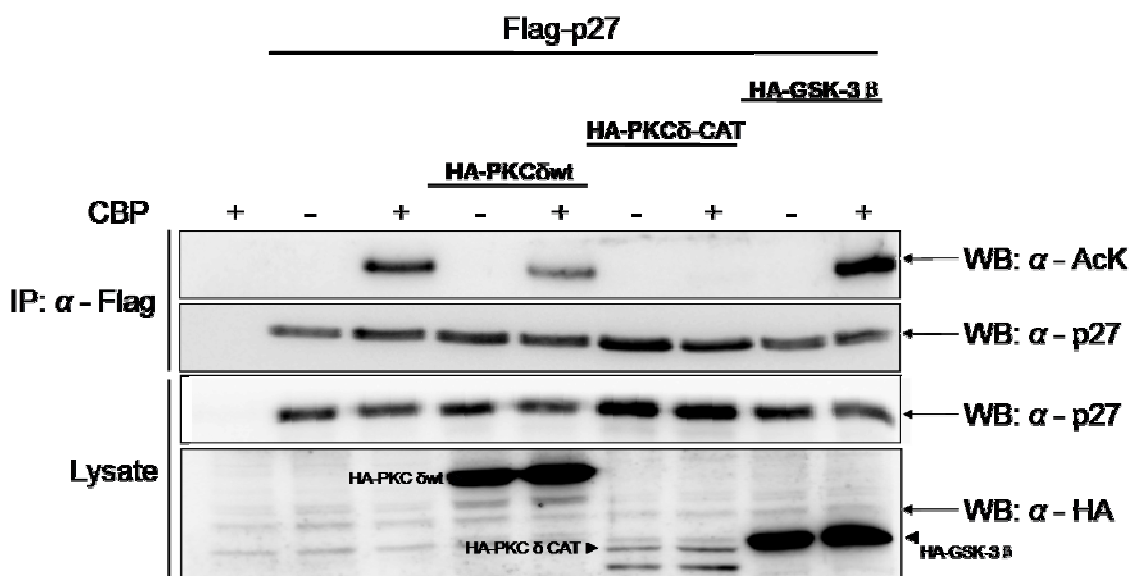


Abbildung 3.27: Acetylierung und Stabilität von p27 nach Überexpression von CBP mit den Serin/Threonin-Kinasen PKC δ und GSK-3 β

In 10 cm-Kulturschalen wurden jeweils 8×10^5 HEK293-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 1 μ g Plasmid pSC2⁺Flag-p27wt, 2 μ g Plasmid pVR1012Gal4-CBP und 3 μ g pHACE-PKC δ wt, pHACE-PKC δ -CAT und GSK-3 β . Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 μ l Ripa-Puffer durch Sonifikation. Flag-p27 wurde mit 30 μ l Flag-Agarose bei 4°C für 2 Stunden aus den Lysaten immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot erfolgte die Detektion von p27 zunächst mit einem AcK-spezifischen Antikörper, anschließend wurde der Blot gestrippt und p27 wurde erneut mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion der Kinasen erfolgte in den Lysaten mit einem gegen den HA-Tag gerichteten Antikörper.

Mittels Detektion durch einen für den HA-Tag spezifischen Antikörper konnte die Expression der HA-getaggten Serin/Threonin-Kinasen überprüft werden. Durch die Entfernung der N-terminal gelegenen Regulationsdomäne aus PKC δ wt besitzt die konstitutiv aktive PKC δ -CAT-Mutante nur noch eine Größe von rund 48 kDa im Vergleich zur wt-Kinase, welche bei rund 87 kDa liegt (Soh et al., 2003). Ebenfalls konnte eine starke Expression von GSK-3 β nachgewiesen werden, wobei das Molekulargewicht hier bei 52 kDa liegt.

Die Expression der Kinasen hat deutliche Auswirkungen auf die Acetylierung und Stabilität von p27. Die Überexpression von PKC δ wt führt zu einem leichten Verlust

der Acetylierung von p27, dagegen kommt es zu einem vollständigen Verlust der Acetylierung, wenn PKC δ -CAT überexprimiert wird. Der Verlust der Acetylierung von p27 steht im Einklang mit den Daten von Yuan et al., dass die Phosphorylierung von CBP durch PKC δ wt zu einer Inhibierung der Acetyltransferase-Aktivität führt (Yuan et al., 2002). Die Inhibierung der Acetylierung von p27 hat wiederum deutliche Auswirkungen auf die Stabilität von p27. Eine Überexpression von p27 mit CBP führt zunächst erneut zu einem deutlich verminderten p27-Proteinspiegel. Dagegen können deutlich erhöhte Mengen von p27 in Abhängigkeit der Kinase-Aktivität von PKC δ und Inhibierung der Acetyltransferase-Aktivität von CBP detektiert werden.

Ein gegenteiliger Effekt auf die Acetylierung von p27 erfolgt bei der Überexpression von GSK-3 β und CBP. Die Acetylierung von p27 wird durch die gleichzeitige Überexpression von CBP und GSK-3 β verstärkt, dagegen ist der Proteinspiegel von p27 im Lysat im Vergleich zur Co-Transfektion von p27 mit GSK-3 β leicht vermindert. Interessanterweise scheint jedoch die Co-Expression von p27 mit GSK-3 β jedoch zunächst zu einem erhöhten Proteinspiegel im Vergleich zur alleinigen Expression von p27 zu führen.

Neben dem Einfluss der Kinasen auf die Acetylierung und Stabilität von p27 konnte nach Strippen des IP-Blots zudem eine bisher nicht beschriebene Interaktion von p27 mit PKC δ und GSK-3 β mit dem HA-spezifischen Antikörper detektiert werden (nicht gezeigt). Aus diesen Daten ergeben sich daher eine Reihe von neuen experimentellen Ansätzen, um die Regulierung der Acetylierung und Deacetylierung von p27 noch detaillierter zu verstehen.

4 Diskussion

4.1 Die Verifizierung der Acetylierung als neue posttranslationale Modifikation von p27

4.1.1 Die *in vivo* und *in vitro* Acetylierung von p27 durch CBP/p300

Der CDK-Inhibitor p27 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Die Deregulierung des Tumorsuppressors ist verbunden mit der Entstehung von aggressiven Tumoren, die zudem oft eine schlechte Prognose für den Ausgang der Erkrankung haben (Chu et al., 2008). Da die Deregulierung von p27 hauptsächlich posttranslational erfolgt, ist es entscheidend, Interaktionspartner und Modifikationen von p27 zu identifizieren, welche Auswirkungen auf die Stabilität des CDK-Inhibitors haben. Dies könnte wiederum zur Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen führen. Neben der Phosphorylierung von p27 durch Kinasen an Tyrosinen sowie Serinen und Threoninen (Kotake et al., 2005; Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007) waren bisher keine weiteren posttranslationalen Modifikationen bekannt.

Erste Hinweise, dass die Acetylierung eine neue posttranslationale Modifikation von p27 darstellen könnte, ergaben sich aus zwei Veröffentlichungen im Jahr 2004: Untersuchungen an murinen CBP^{-/-}-Lymphom-Zellen zeigten mit 100%-iger Penetranz eine Reduktion von p27 auf Proteinebene (Kang-Decker et al., 2004). Chen und Faller zeigten, dass die über die HDAC-Inhibitoren Na-Butyrat und TSA vermittelte G0/G1-Arretierung von NIH3T3-Zellen abhängig von p27 ist (Chen und Faller, 2004). Die Behandlung von p27^{-/-}-Zellen führte zu keiner G0/G1-Arretierung durch die Deacetylase-Inhibitoren. Obwohl die Mechanismen der p27-Regulierung bei beiden Veröffentlichungen zu großen Teilen im Dunkeln blieben und keine direkte Acetylierung von p27 gezeigt werden konnte, ergaben sich hier Hinweise, dass die Regulierung der Stabilität von p27 im Zusammenhang mit HATs stehen könnte.

Um zu zeigen, dass p27 ein Substrat für die Acetylierung durch HATs ist, wurde p27 *in vivo* zunächst mit einzelnen Acetyltransferasen in HEK293-Zellen überexprimiert (Abbildung 3.1). CBP und p300 sind homolog und paralog verwandte HATs, besitzen jedoch auch nicht-redundante Funktionen (Yao et al., 1998; Oike et al., 1999; Jeong et al., 1999). Die dritte überexprimierte HAT war PCAF. Eine Veröffentlichung beschrieb die Heraufregulierung von p27 auf Proteinebene nach Überexpression von PCAF (Zhu et al., 2009). So bestand auch hier die Möglichkeit, dass p27 ein Ziel für die Acetylierung durch PCAF ist und die Stabilität des CDK-Inhibitors durch die Acetylierung reguliert wird.

Die Überexpression der drei Acetyltransferasen zeigte jedoch, dass p27 nur von CBP und p300 acetyliert wird (Abbildung 3.1). Es konnte damit hier auch kein Unterschied in der Substrat-Spezifität von CBP und p300 festgestellt werden. Auch in weiteren Experimenten wie z.B. bei der Identifikation der acetylierten Lysine von p27 konnten keine Unterschiede zwischen p300 und CBP festgestellt werden.

Eine Interaktion von p27 mit CBP konnte auch *in vivo* durch Co-IP von Flag-getagtem p27 mit CBP gezeigt werden (Abbildung 3.2).

Neben der *in vivo*-Acetylierung von p27 war damit *in vitro* die Frage zu klären, ob eine Acetylierung von p27 durch CBP/p300 direkt, also ohne weitere mögliche Bindungspartner von p27 und CBP/p300 erfolgen kann. p27 liegt in rasch proliferierenden Zellen gebunden in einem ternären Komplex mit CDK2 und Cyclin E/A vor (Sherr und Roberts, 1999). CBP/p300 werden dagegen als Transkriptions-Co-Aktivatoren angesehen. Durch die Histon-Acetylierung wird der Zutritt von Transkriptionsfaktoren an die DNA reguliert (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996). Gleichzeitig fungieren CBP und p300 auch als Adaptoren und Integratoren zwischen Transkriptionsfaktoren und Teilen der basalen Transkriptionsmaschinerie der Polymerase II, wobei große multimere Proteinkomplexe entstehen (Goodman und Smolik, 2000; Lee und Workman, 2007). Daher war es für den *in vitro* HAT-Assay wichtig, geeignete Expressionssysteme zu wählen, die die Aufreinigung von p27 und CBP/p300 ohne weitere potentielle Bindungspartner ermöglichen.

Für den HAT-Assay wurde p27 mit einem GST-Tag versehen in *E.coli* exprimiert. Die Expression von CBP erfolgte aus zwei Gründen dagegen in eukaryotischen Sf9-Insektenzellen mittels baculoviralem-Expressionssystem. Der erste Grund ist, dass CBP in bakteriellen Expressionssystemen sowohl in der HAT-Domäne als auch in anderen Lysin-reichen Domänen stark autoacetyliert wird (Thompson et al., 2004; Stiehl et al., 2007; Black et al., 2008). Die starke Autoacetylierung führt offenbar in Bakterien zu cytotoxischen Effekten, die Expression der HAT ist gering und zudem liegt das Protein in *inclusion bodies* vor, wobei weitere denaturierende und renaturierende Reinigungsschritte erforderlich werden würden (Bordole et al., 2001).

Der zweite Grund für die Aufreinigung von Proteinen wie CBP/p300 in Insektenzellen ist, dass posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Methylierungen im Gegensatz zur Aufreinigung in Bakterien auf das zu aufreinigende Protein übertragen werden können. CBP und p300 unterliegen zahlreichen posttranslationalen Modifikationen wie Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Phosphorylierung (Legube und Trouche, 2003; Yang und Seto, 2008).

Nach der Inkubation von GST-p27 mit baculoviral aufgereinigtem CBP im HAT-Assay konnte durch einen AcK-spezifischen Antikörper klar eine Acetylierung von p27 detektiert werden (Abbildung 3.3). Keine Acetylierung konnte dagegen bei der p27ΔK-Mutante festgestellt werden, bei der alle Lysine gegen nicht mehr acetylierbare Arginine ausgetauscht worden waren. Somit ist auch die Möglichkeit einer Acetylierung des GST-Tags in weiteren Experimenten ausgeschlossen.

Ebenfalls detektiert durch den AcK-Antikörper wurde die Autoacetylierung von CBP. (Chan et al., 2001; Tu und Luo, 2007). Die multiplen Signale bis hinunter zur 100 kDa-Markierung lassen auf Degradationsprodukte von CBP schließen. Auch besteht die Möglichkeit, dass CBP mit seiner Bromodomäne andere acetylierte Proteine in den Insektenzellen gebunden hat, die wiederum durch den AcK-spezifischen Antikörper erkannt werden. Abhilfe könnte hier ein radioaktiver HAT-Assay schaffen, wobei radiomarkiertes Acetyl-CoA eingesetzt wird. Die radioaktive Acetylgruppe von [¹⁴C] markiertem Acetyl-CoA würde durch CBP auf GST-p27 übertragen werden. Mit aufgereinigte Proteine würden dabei nicht detektiert werden, es sei denn, diese sind selbst Substrate von CBP und liegen in so großen Mengen gebunden an CBP vor, dass diese eine Schwärzung des Films verursachen würden.

Der Hauptnachteil bei radioaktiven HAT-Assays mit [¹⁴C] markiertem Acetyl-CoA mit nachfolgender Autoradiografie liegt jedoch in der langen Expositionszeit (Kim et al., 2006). Bei p27 waren während dieser Arbeit Expositionszeiten von bis zu drei

Wochen für 2 µg eingesetztes GST-p27 nötig, um eine deutliche Schwärzung des Films durch [¹⁴C] markiertes Acetyl-CoA nach dem HAT-Assay zu erreichen. Vergleicht man die Inkubationszeit mit anderen Veröffentlichungen, bei denen ebenfalls [¹⁴C] markiertes Acetyl-CoA und Autoradiographie zu Schwärzung eines Röntgenfilms verwendet wurde, ist die Inkubationszeit für p27 recht lang. So war eine Inkubationszeit von 96 Stunden bei einem HAT-Assay mit dem RB-Protein ausreichend, um deutliche Signale für die Acetylierung von zwei Lysinen, was der Menge an acetylierten Lysinen von p27 entspricht, bei gleich eingesetzten Proteinmengen zu erlangen (Chan et al., 2001). Dies könnte ein Hinweis sein, dass p27 unter den gewählten Bedingungen ein schlechtes Substrat für die Acetylierung durch CBP darstellt und/oder weitere Interaktionspartner oder posttranslationale Modifikationen vorhanden sein müssen. Ein Beispiel für die Abhängigkeit einer effizienten Acetylierung von Komplexpartnern ist die Acetylierung von p53 durch p300. Die Interaktion mit dem Interferon-regulatorischen-Faktor-1 (IRF-1) führt zur zehnfachen Steigerung der Acetylierung von p53 durch p300 (Dornan et al., 2004). Möglicherweise ist die Acetylierung von p27 durch CBP auch stark abhängig von posttranslationalen Modifikationen von p27. Aufgrund weitgehend fehlender Acetylierungs-Konsensussequenzen ist die Substratspezifität von HATs stark abhängig von weiteren Modifikationen, mit denen die Acetyltransferasen interagieren können (Poux und Marmorstein, 2003).

Eine schnellere Alternative zur Schwärzung eines Röntgenfilms könnten sogenannte Filter-Bindungs-Assays sein (Black et al., 2008). Nach dem radioaktiven Einbau von [¹⁴C] markiertem Acetyl-CoA oder [³H] markiertem Acetyl-CoA wird p27 auf eine Filter-Membran gespottet. Für 24 - 48 Stunden wird die Strahlung mit einem Szintillationszähler gezählt und mit entsprechenden Kontrollen grafisch dargestellt. Ebenso könnte p27, ohne zuvor acetyliert worden zu sein, direkt auf die Membran gespottet werden. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der aufgereinigten GST-HAT-Domäne und radiomarkiertem Acetyl-CoA. Die Detektion erfolgt dann auch hier wiederum durch Szintillation (Mateo et al., 2009).

4.1.2 Die Acetylierung von p27 durch endogene HATs

Nach Überexprimierung von Flag-getaggttem p27 in humanen HEK293- und HCT116-Zellen sowie murinen NIH3T3-Zellen konnte keine Acetylierung von p27 durch endogene HATs festgestellt werden. Somit scheint eine basale Acetylierung von p27 bei proliferierenden Zellen nur schwach zu sein oder der verwendete AcK-Antikörper ist nicht sensitiv genug, um die Acetylierung zu detektieren (Kim et al., 2006). Abhilfe schaffte die Verwendung von HDAC-Inhibitoren.

Bei dieser Arbeit kamen HDAC-Inhibitoren mit einem breiten Wirkspektrum zum Einsatz. TSA ist ein Antibiotikum und inhibiert die Klassen I, II und IV der Deacetylasen, während Na-Butyrat, ein bakterielles Fermentationsprodukt, die Klasse I und die HDACs 4, 5, 7 und 9 der Klasse II inhibiert (Bolden et al., 2006). Kristallstrukturen konnten den Wirkmechanismus von TSA aufklären. Dabei chelatiert TSA das für die Klassen I, II und IV essentielle Zink-Ion (Schuetz et al., 2008; Smith et al., 2010). Die Klasse der Sirtuine wird dagegen durch NAM inhibiert. NAM ist ein Beiprodukt der Deacetylase-Reaktion und hemmt bei Überschuss kompetitiv das Enzym.

Aus Abbildung 3.4 wird deutlich, dass die Behandlung von HCT116-Zellen, einer humanen Colonkarzinom-Zell-Linie, mit TSA oder NAM für 6 Stunden nur zu einem

schwachen Acetylierungssignal für überexprimiertes p27 führt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. TSA scheint dabei die Acetylierung ein wenig stärker zu erhöhen als NAM. Ein starkes Signal für acetyliertes p27 konnte dagegen nur bei kooperativem Einsatz von TSA und NAM erreicht werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Regulierung der Acetylierung von p27 durch mindestens zwei Klassen von Histon-Deacetylasen erfolgt, wobei die Familie der Sirtuine eine Klasse davon ist.

Da auch ein posttranslationaler Anstieg von p27 nach der Behandlung von murinen NIH3T3-Zellen mit TSA und Na-Butyrat beschrieben worden war (Chen und Faller, 2004), und damit die Möglichkeit einer Acetylierung von p27 durch Acetyltransferasen in diesen Zellen bestand, wurde auch bei dieser Zell-Linie überprüft, ob eine Acetylierung von überexprimierten p27 mit Deacetylase-Inhibitoren nachweisbar ist. Bei diesem Experiment wurde jedoch ein anderer Versuchsansatz als bei dem Nachweis der Acetylierung von p27 in HCT116-Zellen gewählt. Dabei wurde zunächst eine IP von acetylierten Proteinen aus dem Zell-Lysat durchgeführt und anschließend wurde p27 mit einem spezifischen Antikörper auf dem Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 3.5). Dieser Nachweis der Acetylierung von p27 muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. In proliferierenden Zellen liegt p27 in der Regel in einem ternären Komplex mit Cyclin E oder Cyclin A und CDK2 vor (Sheaff und Roberts, 1999). Sowohl für Cyclin A als auch für CDK2 wurde in jüngster Vergangenheit eine Acetylierung durch die Acetyltransferase PCAF gezeigt (Mateo et al., 2009a; Mateo et al., 2009b). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass p27 durch acetyliertes Cyclin A und/oder CDK2 bzw. durch weitere acetylierte Bindungspartner wie Hitzeschockproteine, die ebenfalls acetyliert werden und mit p27 interagieren, aus den Lysaten co-immunpräzipitiert wurde (Kovacs et al., 2005).

In den Lysaten konnte nach der Behandlung der Zellen mit TSA und Na-Butyrat eine starke Erhöhung des Proteinspiegels von p27 festgestellt werden (vgl. Chen und Faller, 2006). Die letztendlich molekulare Ursache für die Erhöhung des p27-Proteinspiegels bleibt bei diesem Experiment wie auch bei Chen und Faller im Dunkeln und wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert. Auffallend ist jedoch, dass generell keine Auswirkungen auf den Proteinspiegel von p27 in humanen HCT116-Zellen nach Behandlung mit TSA und NAM zu beobachten sind. Die Ursache könnten hier zellspezifische Effekte sein, wobei der Signalweg, der zu einer Erhöhung des p27-Proteinspiegels in NIH3T3-Zellen nach Behandlung mit Deacetylasen führt, in HCT116-Zellen dagegen nicht vorhanden oder dereguliert ist. Tatsächlich sind für Deacetylase-Inhibitoren Zelltyp-abhängige Effekte beschrieben worden. (Bolden et al., 2006; Haberland et al., 2009). Wahrscheinlich ist es jedoch, dass die Überexpression von p27 in den HCT116-Zellen das proteolytische System inhibiert. So kann freies, nicht im Komplex mit Cyclin E/A und CDK2 liegendes p27 nicht effizient durch das Proteasom abgebaut werden (Morishita et al., 2008), wodurch keine Unterschiede in der Proteinkonzentration sichtbar werden würden. Dagegen scheint p27 in den NIH3T3-Zellen nicht so stark überexprimiert worden zu sein. Ein Grund könnten die unterschiedlichen Transfektionsmethoden sein.

Eine wichtige Frage war, ob p27 tatsächlich nur Substrat der verwandten HATs CBP und p300 ist. Wie bereits erwähnt, sind bisher drei Hauptfamilien von HATs beschrieben worden: Die GNAT-, die p300/CBP- und die MYST-Familie. Zwei weitere Gruppen besitzen ebenfalls HAT-Aktivität: Eine Gruppe wird gebildet durch Untereinheiten von großen Transkriptionskomplexen, wie TAF₂₅₀ des TFIID-Transkriptionskomplex. Die zweite Gruppe, die ebenfalls HAT-Aktivität besitzt, wird

durch Proteine gebildet, die an der Signalübertragung von nukleären Hormon-Komplexen beteiligt sind, wie SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*) und ACTR (*activator or thyroid and retinoid receptors*) (Carrozza et al., 2003).

Ein interessantes Beispiel für die Acetylierung eines Proteins durch unterschiedliche HATs ist der Transkriptionsfaktor p53. Der Tumorsuppressor wird durch die Acetyltransferasen CBP/p300, PCAF, TIP60 (*HIV Tat-interacting protein of 60 kDa*) und MOF (*males absent on the first*), wobei die beiden letzten Acetyltransferasen zur MYST-Familie gehören, an verschiedenen Lysinen acetyliert und reguliert (Gu und Roeder, 1997; Sakuchi et al., 1998; Liu et al., 1999; Sykes et al., 2006; Tang et al., 2006).

Um zu zeigen, dass die Herabregulierung von CBP und p300 ausreichend ist, um die Acetylierung von p27 zu verhindern, wurde ein auf siRNA-basierender *Knockdown* gewählt (Meister und Tuschl, 2004). Für dieses Experiment wurden wiederum HCT116-Zellen gewählt. Die Zell-Linie besitzt auf DNA-Ebene Mutationen in beiden p300-Allelen, wobei nur noch ein Allel exprimiert wird (Iyer et al., 2004). Somit war nur noch die Hälfte der RNA-Menge von p300 durch den *RNAi-Knockdown* herabzuregulieren. Dabei zeigte sich, dass die Herabregulierung von CBP und p300 in HCT116-Zellen tatsächlich zum vollständigen Verlust der Acetylierung von p27 führt (Abbildung 3.6). Selbst der Einsatz von HDAC-Inhibitoren führte zu keiner Detektion der p27-Acetylierung mehr. Auffallend nach dem *Knockdown* von CBP und p300 ist wiederum der fehlende Effekt auf die Proteinkonzentration von p27. Somit scheint die Acetylierung unter diesen Bedingungen in HCT116-Zellen unmittelbar keinen Effekt auf die Proteinkonzentration oder Stabilität von p27 zu haben. Effekte auf die Proteinkonzentration bei einer länger andauernden Herabregulierung von p300/CBP und ohne die Überexpression von p27 müssen in weiteren Experimenten überprüft werden.

4.1.3 Der fehlende Nachweis der endogenen Acetylierung von p27

Wie unter Abschnitt 3.1.6 ausführlich beschrieben, konnte endogen acetyliertes p27 auf Grund von technischen Problemen während dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit verwendete AcK-Antikörper von Santa-Cruz-Biotechnology bindet an die leichten Ketten des IPs-Antikörpers. Dies ist wahrscheinlich auf eine Acetylierung der leichten Ketten zurückzuführen, die bei der Sortierung im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat zahlreichen posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen und auch Acetylierungen unterliegen (Costantini et al., 2007). Dadurch entstehen unspezifische Signale auf dem Western-Blot, die keine klaren Aussagen über den Acetylierungsstatus von immunpräzipitiertem endogenem p27 erlauben, da p27 und die leichte Kette des Antikörpers in der SDS-PAGE annähernd co-migrieren. Ein anderer AcK-spezifischer Antikörper von Calbiochem detektierte zwar nicht mehr den IP-Antikörper, aber auch kein endogenes acetyliertes p27. Dies könnte ein Hinweis sein, dass der Antikörper nicht sensitiv genug ist, um den IP-Antikörper zu detektieren. Daher sollte der Antikörper auch kein endogenes acetyliertes p27 detektieren, welches in deutlich geringeren Konzentrationen als der IP-Antikörper auf dem Western-Blot nach IP vorliegt. Das Problem der Co-Migration der leichten oder auch schweren Antikörper-Kette mit Proteinen, die auf Acetylierung hin untersucht werden, scheint auch bei anderen Arbeiten der Fall zu sein. So konnte bei der Arbeit von Mateo et al. auch kein endogen acetyliertes CDK2 identifiziert werden, welches ebenfalls ein Molekulargewicht von 27 kDa besitzt (Mateo et al., 2009b). Die

Acetylierung konnte aber *in vitro* als auch *in vivo* mit überexprimierten CDK2 gezeigt werden. Dass CDK2 endogen acetyliert wird, konnte bei einer anderen Veröffentlichung gezeigt werden, bei der die Acetylierung massenspektrometrisch nach IP gegen acetylierte Proteine nachgewiesen werden konnte (Choudhary et al., 2009).

Von entscheidender Bedeutung ist es daher, nach alternativen Möglichkeiten zu suchen, um endogenes acetyliertes p27 zu detektieren. Die einfachste Methode wäre, weitere IP-Antikörper zu testen, deren leichten Ketten nicht von dem Santa-Cruz-Biotechnology AcK-Antikörper gebunden werden und keine Kreuzreaktivität zum sekundären α -Kaninchen Antikörper besitzen. Wenn aber tatsächlich der AcK-Antikörper acetylierte Ketten des IP-Antikörpers detektiert, ist es fraglich, ob bei anderen IP-Antikörpern dieses Problem nicht vorliegt. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Co-Migration der leichten Ketten des IP-Antikörpers mit endogenem p27 aufzuheben. So könnten Variationen in der Lauflänge als auch in der Laufzeit der Gele, sowie unterschiedliche Pufferbedingungen (Glycin oder Tricin) und verschiedene Acrylamid-Konzentrationen für eine bessere Auftrennung der Proteine sorgen (Schagger, 2006). Beispielsweise konnte mit einem 4%-igen Tricin-Gel unphosphoryliertes p300 von phosphoryliertem p300 aufgetrennt werden (Poizat et al., 2005). Auch ist nicht ausgeschlossen, dass der Einsatz von nativen Gelen gegenüber den hier verwendeten denaturierenden SDS-Gelen auf Grund von posttranslationalen Modifikationen von p27, wie Phosphorylierungen, für eine bessere Auftrennung sorgt. Eine andere Idee wäre die kovalente Kopplung des IP-Antikörpers an eine Matrix, was dazu führen würde, dass der IP-Antikörper nicht mehr in die SDS-PAGE gelangen würde. Ein negativer Punkt ist jedoch, dass eine hohe Ausgangskonzentration des Antikörpers bis 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vorliegen muss, um eine ausreichende Kopplung an die Matrix zu erreichen. Auch die Immunisierung eines Lamas, dessen Antikörper keine leichten Ketten besitzen, kommt aus Kostengründen nicht in Frage. Die Abtrennung des IP-Antikörpers von p27 könnte jedoch noch über eine weitere Möglichkeit erfolgen. p27 gehört zu den intrinsisch ungefalteten hitzestabilen Proteinen. Durch das Aufkochen von Zell-Lysaten oder Immunpräzipitationen wird eine Denaturierung von mit p27-interagierenden Proteinen erreicht. Während p27 dabei auf Grund seiner hitzestabilen Eigenschaften in Lösung bleibt, werden andere denaturierte ausgefallene Proteine in einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt entfernt (Grimmler, Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}, Diss., 2002, LMU München). So könnte die leichte Kette des Antikörpers sowie CDK2 als auch CYCLIN E/A, die ebenfalls acetyliert werden (Mateo et al., 2009a; Mateo et al., 2009b), aus den Bindungsdomänen von p27 entfernt werden.

Eine Möglichkeit zur Detektion der Acetylierung, ohne Verwendung eines AcK-spezifischen Antikörpers, wäre das Markieren von p27 mittels radioaktiven Isotopen. Dabei werden Zellen entweder mit [³H] Acetat oder [¹⁴C] Acetyl-CoA inkubiert, wobei die radioaktive Acetyl-Gruppe auf Lysine von p27 durch HATs übertragen wird. Anschließend erfolgt eine IP von endogenem p27 und SDS-PAGE, das getrocknete Gel wird dann wiederum gegen einen Film exponiert oder die ausgesendete Strahlung wird mittels Szintillationszähler detektiert. Das Verfahren ist für acetylierte Histone mit [³H] Acetat erfolgreich angewendet worden (Gunjan et al., 2001). Ob dieses Verfahren auch für endogen acetyliertes p27 angewendet werden kann, ist unklar. Die Anzahl der acetylierten Lysine von Histonen ist deutlich höher als bei p27. Zudem ist bisher der Zeitpunkt der Acetylierung von p27 nicht bekannt. Dieser müsste zunächst initial bestimmt werden, um wiederum eine Verstärkung des Signals zu erreichen. Dies könnte beispielsweise durch Überexpression von p27 in HEK293-

Zellen geschehen, gefolgt von einer Arretierung der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen wie der G0-Phase, frühe und späte G1-Phase sowie S- und M-Phase mittels Cytostatika und HDAC-Inhibitoren (Mateo et al., 2009b). Zur Erhöhung der p27-Proteinkonzentration in proliferierenden Zellen könnten zudem Proteasom-Inhibitoren wie MG132 verwendet werden. Anschließend würde erneut eine IP von p27 erfolgen und der Acetylierungsstatus überprüft werden.

Auch könnte eine Bestimmung von endogen acetyliertem p27 mittels Massenspektrometrie erfolgen (siehe Abschnitt 4.2).

4.2 Die Identifizierung der acetylierten Lysine von p27

Von entscheidender Bedeutung bei der Untersuchung von neuen posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung auf Proteine ist die Identifikation der Lage der modifizierten Aminosäure. Erst dann können gezielt weitere Experimente durchgeführt werden, die sowohl die Funktion als auch die Regulierung der posttranslationalen Modifikation beschreiben können.

Im Gegensatz zu Kinasen sind keine spezifischen Konsensussequenzen für HATs bekannt, aus denen abgeleitet werden kann, welches Lysin auf Grund der umgebenen Aminosäuresequenz ein Ziel für die Acetylierung darstellt. Obwohl seit über 40 Jahren die Acetylierung von Histonen bekannt ist (Alfrey et al., 1964), rückt die Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen erst seit etwa zehn Jahren in den Fokus der Wissenschaft. So wurde eine erste umfassende Analyse des Acetyloms erst Ende 2009 veröffentlicht (Choudhary et al., 2009). Dabei wurde mittels Massenspektrometrie die Lage von 3600 acetylierten Lysinen von 1750 Proteinen bestimmt; p27 war jedoch nicht unter den gefundenen Proteinen. Die Auswertung zeigte, dass Acetylierungen hauptsächlich in geordneten sekundären Strukturen erfolgen, im Gegensatz zu Phosphorylierungen, die in unstrukturierten Regionen, wie Scharnier- und Schlaufenregionen erfolgen (Macek et al., 2007; Malik et al., 2008). Bei der Auswertung wurden auch die umliegenden Aminosäuren von Position ± 6 von den acetylierten Lysinen bestimmt, wobei schließlich bevorzugte umliegende Sequenzen für Acetylierungen von Histonen sowie von nukleären, zytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinen ermittelt werden konnten. Sowohl für nukleäre (KKKFFG**K**YIKKKK) als auch für zytoplasmatische (KKKNFE**K**YIKKKK) Proteine konnte gezeigt werden, dass neben Tyrosinen (Y) und Phenylalaninen (F) in der -2 und +1 Position weitere positiv geladene Aminosäuren wie Lysine (K), Arginine (R) und Histidine (H) an der +4 und -4 Position und darüber hinaus bevorzugt rund um acetylierte Lysine vorkommen. Thompson et al. zeigte zudem, dass die Acetyltransferase p300 ebenfalls positiv geladene Aminosäuren an der +4 und -3 Position bevorzugt (Thompson et al., 2001). Interessanterweise treffen diese Angaben sowohl auf K100 und K190 zu. Von K100 liegt N-terminal gelegen an der -4 Position K96. Bei K190 liegt an der +4 Position ebenfalls die positiv geladene Aminosäure Arginin. Somit stimmen die umliegenden Aminosäuren mit den gefundenen acetylierten Lysinen in Teilen mit den bevorzugten Sequenzen der Acetylierung überein.

Ein mögliches weiteres Ziel für die Acetylierung stellt jedoch auch noch K96 dar. Es konnte eine klare Reduzierung der Acetylierung festgestellt werden, wenn K96 zu R vorher mutiert worden war (Abbildung 3.11). K96 besitzt an der +4 Position wiederum eine positiv geladene Aminosäure, nämlich K100, und würde daher wie K100 und K190 annähernd in die ermittelte bevorzugte Acetylierungssequenz passen. Zudem beschreibt eine andere Veröffentlichung für Nicht-Histon-Proteine ein Glycin für die

+1 Position als bevorzugte acetylierte Sequenz (Basu et al., 2009), was ebenfalls für K96 zutrifft. Zwar zeigte sich, dass der Austausch von K100, K189 und K190 zu R zu einem vollständigen Verlust der Acetylierung von überexprimiertem Flag-getaggttem p27 führt (Abbildung 3.12), es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Austausch von K100 zu Arginin die Acetylierung von K96 beeinflusst. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Austausch einer Aminosäure die Substraterkennung durch p300 oder CBP komplett verhindert (Thompson et al., 2001; Poux und Marmorstein, 2003). Möglich wäre aber auch eine initiale Acetylierung von K100 und nachfolgende Bindung von p300 und CBP an das acetylierte Lysin über die Bromodomäne (Yang, 2004). Im zweiten Schritt erfolgt dann die Acetylierung von K96. Die Interaktion ist wiederum abhängig von weiteren Kontakten der Domäne mit benachbarten Aminosäuren (Yang, 2004). Beispielsweise wurde für den Transkriptionsfaktor p53 gezeigt, dass nach der Acetylierung von K382 durch p300 nach UV-induzierter DNA-Schädigung die Bindung von CBP über die Bromodomäne erfolgt, was wiederum zur weiteren Acetylierung von p53 durch CBP führt (Mujtaba et al., 2004). Umgekehrt könnte jedoch auch der Austausch von K96 zu R eine effiziente Acetylierung von K100 verhindern. Es ist bekannt, dass p300 an den Transkriptionsfaktor p53 über die prolinreiche Sequenz PXXP bindet (Dornan et al., 2003a; Dornan et al., 2004). Dieses Motiv liegt in direkter Nachbarschaft von K96. Ein Austausch von K96 zu R könnte daher aufgrund von Konformationsänderungen die Interaktion von p27 mit p300/CBP abschwächen.

Um auszuschließen, dass der Austausch von K96 oder K100 Auswirkungen auf die Bindung der Acetyltransferasen an p27 hat und dadurch die mögliche Acetylierung von K96 oder K100 inhibiert, könnten Co-IP- oder *pulldown*-Experimente durchgeführt werden. Dabei könnte die Stärke der Bindung der Acetyltransferasen an das p27wt-Protein mit der Stärke der Bindung an eine p27K→R-Mutante oder p27K→Q-Mutante verglichen werden. Werden dabei keine Veränderungen festgestellt, so spricht dies gegen eine Konformationsänderung von p27 durch den Austausch von K96 oder K100 gegen R oder Verlust der Interaktion über die Bromodomäne der Acetyltransferasen.

Eine Acetylierung von K96 könnte verschiedene molekulare Effekte haben. K96 ist eine Aminosäure der prolinreichen Sequenz von p27, die aus den Aminosäuren P₉₁PRPPK₉₆ besteht. Über die prolinreiche Sequenz bindet das Adapterprotein GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) mittels seiner SH3-Domäne, wobei K96 entscheidend an der Bindung beteiligt ist (Grimmler, Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}, Diss., 2002, LMU München). Die Interaktion von p27 und GRB2 an der inneren Zellmembran führt zur einer Herabregulierung der RAS- vermittelten Signaltransduktion (Moeller et al., 2003). So könnte eine Acetylierung von K96 eine Interaktion mit GRB2 verhindern oder auch verstärken, was unmittelbar Einfluss auf den Zellzyklus haben würde. S. Voss hall überprüfte potentielle Wechselwirkungen der K100-Acetylierung mit der Interaktion von p27 mit GRB2. Erste Untersuchungen zeigen, dass die Acetylierung von K100 die GRB2-Interaktion mit p27 inhibieren kann. Diese Daten müssen jedoch noch in weiteren Experimenten validiert werden.

Eine Acetylierung von K96 könnte ebenfalls Effekte auf die Tyrosin-Phosphorylierung von p27 haben. Eine Phosphorylierung von p27 an den Tyrosinen 74, 88 und 89 durch Kinasen der SRC-Familie führt zum Verlust der inhibitorischen Eigenschaft von p27 auf gebundenes CDK4/6 und CDK2 (Chu et al., 2007; Grimmler et al., 2007; Blain, 2008; James et al., 2008). p27 wird dann durch aktiviertes CDK2 in der späten G1-Phase an T187 phosphoryliert, was wiederum zur Erkennung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex führt und letztlich die Degradation von p27

durch das Proteasom bewirkt (Nakayama et al., 2004). Die Interaktion der Kinasen mit p27 erfolgt, genauso wie die Interaktion von p27 mit GRB2, über die prolinreiche Region von p27 und auch hier ist K96 wieder an der Bindung der SRC-Kinasen beteiligt.

Eine Methode, die eine direkte Identifikation der acetylierten Lysine *in vivo* ohne den Austausch von Aminosäuren verspricht, ist die Massenspektrometrie (Abbildung 3.14). Hierbei wurde zunächst GST-p27 *in vitro* mit baculoviral exprimiertem CBP in einem HAT-Assay inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit den Proteasen GluC und Trypsin inkubiert und mittels Massenspektrometrie untersucht. Von 13 Lysinen konnten insgesamt 7 Lysine auf Acetylierung untersucht werden, darunter auch K96. Bei keinem der gefundenen Lysine 59, 68, 73, 81, 96, 134 und 189 konnte jedoch eine Acetylierung festgestellt werden. Eine Acetylierung wurde nur bei zwei Lysinen in einem erhaltenen CBP-Peptid festgestellt. Die acetylierten Lysine 65 und 67 gehören nicht zu den bisher gefundenen acetylierten Lysinen in den Lysin-reichen Regionen KR1 – KR6 (Stiehl et al., 2007) und zu der stark autoacetylierten HAT-Domäne von CBP (Black et al., 2008), und wurden bisher nicht als Ziel einer Acetylierung beschrieben. Zwar spricht das Ergebnis gegen eine mögliche Acetylierung von K96, dennoch muss überlegt werden, inwieweit der HAT-Assay zur Acetylierung von p27 überhaupt erfolgreich gewesen ist. Die gefundenen acetylierten Lysine von CBP lassen keine Rückschlüsse auf die Effizienz des HAT-Assay zu. Die Acetylierung stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Autoacetylierung von CBP. Diese sagt aber nichts darüber aus, inwieweit p27 bei der Massenspektrometrie acetyliert vorlag.

Tatsächlich könnte aber auch die Acetylierung von GST-p27 mit hoher Effizienz erfolgt sein. Es ist bekannt, dass eine Acetylierung an Lysinen das Schneiden von Proteinen durch die Protease Trypsin inhibiert (Black et al., 2008). Dies könnte ein Grund für das Fehlen der Peptide mit den Lysinen 100 und 190 sein. In Absprache mit David W. Litchfield von der University Ontario, London, Kanada sollte daher überlegt werden, inwieweit das Spalten des p27-Proteins mit unterschiedlichen Proteasen zu einer Detektion aller Lysine führen kann. Eine erfolgreiche Massenspektrometrie wäre die Lösung in Bezug auf die offene Frage einer möglichen Acetylierung von K96 und könnte auch den Beweis der endogenen p27-Acetylierung erbringen. p27 könnte zunächst mit einem Antikörper aus Zellen immunpräzipitiert werden und dann auf Acetylierung mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Zur Verstärkung der p27-Acetylierung könnten die Zellen vorher mit den Deacetylase-Inhibitoren TSA und Na-Butyrat inkubiert werden. Das Verfahren wurde auch schon bei anderen Proteinen, die auf Acetylierung untersucht wurden, erfolgreich angewendet. (Tang et al., 2006; Jeong et al., 2009).

4.3 Charakterisierung eines für die Acetylierung von K100-spezifischen Antikörpers

Der Austausch von K100 zu R führte zu einem deutlicheren Abfall in der Gesamtacetylierung von p27 als der Austausch von K190 (Abbildung 3.12). Somit muss davon ausgegangen werden, dass K100 unter diesen experimentellen Bedingungen das zentrale Substrat von CBP ist. In zukünftigen Experimenten muss nun die Frage geklärt werden, wann im Zellzyklus die Acetylierung und die

Deacetylierung von K100 erfolgt. Da ein spezifischer und hoch affiner Antikörper ein ideales Werkzeug für die Beantwortung dieser Frage wäre, wurde in Kooperation mit Frau Dr. Elizabeth Kremmer vom Institut für Immunologie des Helmholtz-Zentrum München ein gegen acetyliertes K100 gerichteter Antikörper generiert. Der Antikörper wurde *in vivo* und *in vitro* auf Bindung und Spezifität getestet (Abbildung 3.15 und 4.16). Für den 8A9-Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieser gegenüber den anderen vier getesteten Antikörpern, am stärksten *in vivo* und *in vitro* acetyliertes p27 detektierte. Der Austausch von K zu Q führte dagegen zu keiner Detektion von p27 durch den 8A9-Antikörper. Somit konnte nicht gezeigt werden, ob ein Glutamin tatsächlich ein acetyliertes Lysin in weiteren Experimenten ersetzen kann. Einen Antikörper zu besitzen, der an ein Mimikry-Epitop bindet, wäre ein ideales Werkzeug, um die physiologische Relevanz der K100-Acetylierung in murinen *Knockin*-Modellen unter dem p27-Promotor zu ermitteln.

Nachdem ermittelt werden konnte, dass der 8A9-Antikörper spezifisch und affin an acetyliertes K100 bindet, wurde überprüft, ob sich der Antikörper auch zur IP von an K100 acetyliertem überexprimierten p27 eignet (Abbildung 3.17). Der Antikörper könnte dann eventuell auch zur IP von endogenem p27 eingesetzt werden, was wiederum ein starker Beweis für eine tatsächliche Acetylierung von endogenem p27 darstellen würde. Wie unter Abschnitt 4.1.3 beschrieben, steht ein Beweis der Acetylierung von endogenem p27 noch aus. Dabei wäre es von Vorteil, wenn im Gegensatz zu humanen HEK293-Zellen eine Zell-Linie mit hohem endogenen p27-Proteinspiegel, wie beispielsweise die murine NIH3T3-Zell-Linie, verwendet werden würde. Gleichzeitig muss auch hier zunächst überprüft werden, ob eine Kreuzreaktivität des Ratten-8A9-Antikörpers zum sekundären Western-Blot-Antikörper besteht. So wurde gezeigt, dass der sekundäre α -Maus-Antikörper den Ratten-IP-8A9-Antikörper detektiert. Aus diesem Grund kann kein primärer Maus-Antikörper, wie der hoch sensitive TDL-Antikörper, zur Detektion von p27 auf dem Western-Blot eingesetzt werden. Ob dies auch für einen primären Kaninchen-Antikörper, wie den in dieser Arbeit oft verwendeten C19-Antikörper gilt, muss in zukünftigen Experimenten abgeklärt werden.

Ein weiterer interessanter Versuchsansatz wäre auch die Überexpression von p27 und folgende IP mit dem 8A9-Antikörper. Anschließend wird mittels Massenspektrometrie überprüft, ob die K100-Acetylierung einhergeht mit benachbarten Acetylierungen, beispielsweise mit einer K96-Acetylierung oder K190-Acetylierung, oder ob die Acetylierungen zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus erfolgen. Ebenfalls könnte p27 auf Phosphorylierung und andere Modifikationen untersucht werden. So wurde insbesondere für Histone (Latham und Dent, 2007), aber auch für Nicht-Histon-Proteine, wie p53 gezeigt, dass eine Acetylierung mit zahlreichen anderen posttranslationalen Modifikationen einhergehen kann (Kurash et al., 2008). Dies ähnelt dem Modell des Histon-Codes, bei dem posttranslationale Modifikationen von Histonen im Wechselspiel mit weiteren unterschiedlichen Modifikationen stehen (Strahl und Allis, 2000).

4.4 Analyse zur Funktion der p27-Acetylierung

Die Experimente zur Identifikation der acetylierten Lysine von p27 zeigten, dass p27 an mindestens zwei unterschiedlichen Stellen durch die HATs CBP/p300 acetyliert wird. So liegt das gefundene K190 am C-terminalen Ende des Proteins, während K100 zentral in der Mitte liegt. Die Experimente zur Funktion der Acetylierung von

K100 und K190 sollen zunächst einzeln diskutiert werden, wobei die gefundenen Ergebnisse dann in Kontext zueinander gestellt und verschiedene Modelle zur Regulierung und Funktion der Acetylierung von p27 entwickelt werden.

4.4.1 Untersuchungen zur Funktion der Acetylierung von K190

Die Entdeckung, dass K190 ein Ziel für die Acetylierung durch CBP ist, ließ vermuten, dass die Modifikation des Lysins eine Rolle bei der Phosphorylierung von p27 an T187 durch den CDK2/Cyclin E- und CDK2/Cyclin A-Kinase-Komplex spielen könnte. Die Phosphorylierung von T187 führt zunächst zur Erkennung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 (*CDK subunit 1*). Anschließend wird p27 polyubiquitiniert und es kommt zum Proteasom-vermittelten Abbau von p27 in der späten G1- und S-Phase (Nakayama und Nakayama, 2006; Frescas und Pagano, 2008).

Interessanterweise ist K190 ein Teil der Phosphorylierungs-Konsensussequenz der Serin/Threonin-Kinase CDK2 (S/T-P-X-K/R). Daher könnte die Acetylierung an K190 generell Konsequenzen für die Erkennung der Kinase von T187 haben. So sind sowohl inhibierende als auch fördernde Eigenschaften von Acetylierungen auf benachbarte Phosphorylierungen bekannt. Beispielsweise ist die Acetylierung von K105 von CDC6 durch die HAT GCN5 Voraussetzung für die Phosphorylierung von S106 durch den CDK2/Cyclin A-Komplex (Paolinelli et al., 2009). Dagegen inhibiert die Acetylierung von K11 von Histon H2B die Phosphorylierung von S10 in der Hefe (Ahn et al., 2006).

Mittels Kristallisierung und ermittelter 3D-Struktur von p27 mit dem gebundenen SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 konnten zudem die Aminosäuren von p27 identifiziert werden, die entscheidend an der Bindung beteiligt sind (Hao et al., 2005). p27 interagiert mit dem Ligase-Komplex über die Aminosäuren 181 bis 190, wobei sowohl eine Bindung an SKP2 (181-184) als auch an das Adaptorprotein CKS1 (186-190) erfolgt. Glutaminsäure 185 (E185) interagiert sowohl mit SKP2 als auch mit CKS1. Der stärkste Kontakt wird durch die Interaktion von E185 und phosphoryliertes T187 vermittelt. K190 ist die letzte Aminosäure in der Sequenz, die zur Bindung von CKS1 beiträgt. Die 3D-Struktur zeigt, dass K190 keine signifikanten Kontakte zur Oberflächenstruktur von CKS1 ausbildet. Da die Entfernung zu K190 zu CKS1 innerhalb von 4 Å liegt, könnte eine Acetylierung von K190 dennoch Auswirkungen auf die Stärke der Bindung von CKS1 haben. Darüberhinaus könnte die Neutralisation der negativen Ladung von K190 nach der Acetylierung zu Konformationsänderungen führen, die wiederum Einfluss auf die Bindung von p27 mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und das Adaptorprotein CKS1 haben. Beispielsweise bindet die *cis-trans* Peptidyl-Prolyl-Isomerase PIN1 an phosphoryliertes T187. Die Isomerisierung von T187 und des benachbarten Prolins von der *cis* in die *trans* Form führte zur einer Reduzierung der Bindung von CKS1 und dem SCF^{SKP2} E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex mit p27 (Zhou et al., 2009).

Zu beachten ist, dass Lysine neben der Acetylierung einer Vielzahl von weiteren kovalenten Modifikationen wie Methylierung, Sumoylierung, Neddylierung und Ubiquitinierung unterliegen können, wobei eine Modifikation wiederum die andere ausschließt (Kouzarides, 2007; Ruthenburg et al., 2007). Die Acetylierung von Lysinen und die damit verbundene Inhibierung der Ubiquitinierung ist für eine Reihe von Proteinen als ein wichtiger Mechanismus der Proteinstabilität beschrieben

worden. (Hernandez-Hernandez et al., 2006; Vervoorts und Lüscher, 2006). So verhindert die Acetylierung von K370, K372, K373, K381 und K382 die Ubiquitinierung des Tumorsuppressors p53 und damit die proteasomale Degradierung (Yang und Seto, 2008). Die Inhibierung der Ubiquitinierung von p27 durch die Acetylierung an K190 scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein. Der Austausch von K143, K153 und K165 zu R führte zu einem deutlichen Verlust der p27-Ubiquitinierung am Übergang der G1/S-Phase (Shirane et al., 1999). Dennoch zeigen wiederum Untersuchungen an p53, dass der Austausch von Lysinen zu Glutaminen zu einer deutlich verringerten Ubiquitinierung führt als der Austausch von Lysinen zu Argininen (Brooks et al., 2007). Die Autoren vermuten, dass in diesem Fall die Mimikry der acetylierten Lysine zu verstärkten Konformationsänderung gegenüber dem Austausch der Lysine gegen Arginine geführt hat und daher die Mimikry von acetylierten Lysinen den physiologischen Effekt der Acetylierung besser nachahmen könnte. In zukünftigen Experimenten sollte neben der Frage auf veränderte Phosphorylierung oder Interaktion von p27 mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex auch die Möglichkeit einer verringerten Ubiquitinierung von p27 durch die Acetylierung von K190 bedacht werden.

4.4.1.1 Der *Colony formation* Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung

Um einen ersten generellen Eindruck über die Auswirkung von acetyliertem K190 auf die inhibitorischen Eigenschaften von p27 auf den Zellzyklus zu erlangen, wurde zunächst ein *colony formation* Assay in HCT116-Zellen durchgeführt. Die Anzahl der Kolonien der p27K189,190R-Mutante und der p27K189,190Q-Mutante wurde mit der Anzahl der Kolonien des p27wt-Proteins verglichen (Abbildung 3.18). Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, ob K189 ebenfalls acetyliert wird, wurde zunächst mit der Doppelmutante gearbeitet. In weiteren Experimenten konnte die Acetylierung von K189 jedoch ausgeschlossen werden.

Bei der p27K189,190R-Mutante, die nicht mehr acetylierbare Lysine von p27 nachahmen soll, befanden sich deutlich mehr Kolonien auf der Platte im Vergleich zur p27wt-Transfektion (Abbildung 3.18). Dies spricht für einen Verlust der inhibitorischen Eigenschaften von p27 auf den Zellzyklus. Aufgrund der Nähe zu T187 ist wahrscheinlich, dass ein Zusammenhang zur Phosphorylierung oder der Ubiquitinierung von p27 durch den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex besteht. In diesem Fall könnte das Fehlen der Acetylierung von p27 sowohl zu einer gesteigerten Phosphorylierung an T187 durch endogenes CDK2 oder aber zu einer verstärkten Bindung des SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 geführt haben. Die Transfektion der p27K189,190Q-Mutante, welches acetyliertes K189 und K190 nachahmen soll, führt dagegen zu einer verstärkten Inhibierung des Zellzyklus. Hier liegen weniger Kolonien vor im Vergleich zur p27wt-Transfektion. Dieses Ergebnis ist insoweit aussagekräftig, da bereits die Transfektion von 2 µg p27wt-Plasmids die Kolonienanzahl bei diesem Experiment im Schnitt um 92,3% reduziert. In weiteren *colony formation* Assays konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Austausch von K190 zu Q in der Folge annähernd gleiche inhibitorischen Eigenschaften von p27 auf den Zellzyklus besitzt wie der Austausch von T187 zur Alanin, einer nicht mehr phosphorylierbaren Mutante von p27, die unsensitiv für den SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex vermittelten proteosomalen Abbau ist. Daher scheint die Acetylierung von p27 an K190 inhibitorische

Eigenschaften auf die Phosphorylierung von T187 und nachfolgende Ubiquitinierung zu haben.

Neben den einzelnen Transfektionen von p27 und Mutanten wurden als Kontrollen CBP und CBP Δ HAT in HCT116-Zellen transfiziert, um mögliche Effekte einer Acetylierung von endogenem p27 auf den Zellzyklus zu zeigen. Die Transfektion von CBP führte zu einer deutlich verringerten Zahl von Kolonien gegenüber der Leerkontrolle und der Transfektion von CBP Δ HAT, dennoch war die Reduzierung nicht so stark, wie das bei der Überexpression von p27^{wt}-Protein der Fall war. Ein Grund hierfür könnte sein, dass endogenes p27 in HCT116-Zellen für die Acetylierung durch exogenes CBP nicht zugänglich ist und deswegen kein signifikanter Effekt auf den Zellzyklus nachweisbar ist. HCT116-Zellen sind Colonkarzinom-Zellen. Im Laufe der Tumorentstehung muss eine Herabregulierung von einzelnen Tumorsuppressorproteinen stattgefunden haben, wobei p27 auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene herabreguliert oder inaktiviert worden sein kann (Chu et al., 2008). In diesem Fall könnte p27 auch an K100 durch überexprimiertes CBP acetyliert worden sein, was einen destabilisierenden Effekt auf p27 mit sich bringt (siehe Abschnitt 4.4.2 bis 4.4.2.3).

Die Transfektion von CBP/p300 in HCT116-Zellen ist im Hinblick auf eine Deregulierung von regulatorischen Mechanismen auf transkriptionaler und posttranslationaler Ebene des Zellzyklus zudem noch kritischer als die Transfektion eines Proteins wie p27. Neben der Acetylierung von Histonen und der damit verbundenen Regulierung der Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren an die DNA sind p300 und CBP essentielle Co-Faktoren für den Aufbau von multimeren Protein-Komplexen, welche an der Transkription beteiligt sind. CBP/p300 fungieren dabei als Gerüst- oder Brückenproteine, die Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verbinden. Bis heute sind über 300 Transkriptionsfaktoren beschrieben, mit denen CBP interagieren kann (Wang et al., 2010). Als Beispiele seien hier die Transkriptionsfaktoren CREB (Kwok et al., 1994), E2F (Dyson, 1998), c-JUN (Bannister et al., 1995), c-FOS (Bannister und Kouzarides, 1995), c-MYC (Failla et al., 2005) sowie NF- κ B (Perkins et al., 1997) genannt.

Eine Regulierung der Transkription erfolgt auch über die begrenzte Verfügbarkeit von p300/CBP für Transkriptionsfaktoren. Die Verfügbarkeit ist wiederum abhängig vom dominierenden Signalweg in der Zelle (Avantaggiati et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Yao et al., 1998). Daher führt die Überexprimierung von p300/CBP allein schon zu einer verstärkten Transkription von Genen außerhalb des physiologischen Kontextes. Neben der Funktion als Brücken- und Gerüst-Proteine fungieren p300/CBP zudem als direkte Regulatoren von Transkriptionsfaktoren. So reguliert die Acetylierung des Transkriptionsfaktors p53 zum einen die Bindung an die DNA (Prives und Manley, 2001; Brooks und Gu, 2003), die Ubiquitinierung und die Stabilität (Hirano und Ronai, 2006) sowie weitere posttranslationale Modifikationen wie benachbarte Phosphorylierungen (Latham und Dent, 2007).

Neben der aktivierenden Funktion auf die Transkription sind für CBP/p300 jedoch auch Co-Repressor-Eigenschaften beschrieben worden. So interagiert p300 unter anderem mit HDAC1, HDAC3 und HDAC6 in verschiedenen Komplexen (Girdwood et al., 2003; Simone et al., 2004; Sankar et al., 2008). Auch führte die Überexpression von p300 unabhängig von der Acetyltransferase-Aktivität zu einer Reprimierung von c-MYC auf transkriptionaler Ebene (Sankar et al., 2008). Da c-MYC als ein zentraler Transkriptionsinitiator für den Fortgang des Zellzyklus beschrieben worden ist, zeigt dieses Beispiel, dass auch die Transfektion einer

dominant-negativen Mutante von CBP/p300 den Zellzyklus deregulieren kann. Ein weiteres Beispiel ist die Reprimierung des Cyclin E-Promotors durch überexprimiertes p300 Δ HAT in humanen Melanozyten (Bandyopadhyay et al., 2002), was wiederum zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase führte.

Neben der Deregulierung der Transkriptionsebene durch Transfektion von CBP/p300 sind auch direkte Einflüsse auf Proteine, die nicht direkt mit der DNA interagieren, auf posttranskriptionaler Ebene wahrscheinlich. Die Acetylierung der Kinase c-ABL an Lysin 730 führt beispielsweise zu einer zytoplasmatischen Akkumulation. (di Bari et al., 2006). Interessanterweise phosphoryliert c-ABL auch p27 an Y87 und Y88. (Chu et al., 2007), was wiederum zu einer Aktivierung der Kinase-Aktivität von CDK2 und final zum Abbau von p27 im Proteasom führt. Geht man in diesem Fall davon aus, dass durch die Acetylierung von c-ABL die Phosphorylierung von p27 im Kern verhindert wird, so müsste in diesem Fall die Transfektion von CBP einen inhibierenden Einfluss auf den Zellzyklus haben.

Die hier genannten Beispiele machen deutlich, dass eine Überexpression von p300/CBP im *colony formation* Assay keine generelle Aussage über den Einfluss der Acetylierung von endogenem p27 auf den Zellzyklus erlaubt. Ob eine Transfektion von p27wt und CBP oder CBP Δ Hat, wie in der Abbildung 3.18 gezeigt, tatsächlich zu einer Verstärkung (p27wt +CBP) oder zu einer Abschwächung (p27wt + CBP Δ HAT) der inhibitorischen Eigenschaften von p27 führen kann, scheint daher fraglich. Tatsächlich konnten bei diesen Ansätzen keine klaren Tendenzen, im Gegensatz zur p27wt- und Doppelmutanten-Transfektion, ausgemacht werden.

4.4.1.2 Die Überexpression von CDK2/Cyclin E inhibiert die Acetylierung von p27 durch CBP

Um einen tieferen Einblick in die molekulare Ursache der beobachteten verstärkten inhibitorischen Eigenschaft von p27 im *colony formation* Assay nach Austausch von K189 und K190 zu Q auf den Zellzyklus zu erlangen, sollte in einem Western-Blot Auswirkungen der Acetylierung von p27 durch CBP auf die Interaktion des CDK-Inhibitors mit dem CDK2/Cyclin E-Komplex überprüft werden.

Wie bereits erwähnt, ist die Interaktion von p27 mit dem Heterodimer CDK2/Cyclin E zentral für die Regulierung des Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase. Eine fortlaufende Aktivierung von CDK2 führt zu einem immer stärkeren und schnelleren Abbau von p27 und einem immer schnelleren Übertritt in die S-Phase. Umgekehrt, wenn CDK2 nicht ausreichend aktiviert wird, kommt es zu einem Stopp des Zellzyklus in der späten G1-Phase.

Die wechselseitige Regulierung von p27 und CDK2 hat jedoch auch direkte Konsequenzen für CBP/p300 und deren Regulierung der Transkription. Beispielsweise wurde eine Steigerung der HAT-Aktivität von CBP nach Phosphorylierung durch CDK2 in der C-terminalen Region ausserhalb der HAT-Domäne beschrieben (Ait-si-Ali et al., 1999). Die Phosphorylierung, so wurde argumentiert, führe zu einer Konformationsänderung in der HAT-Domäne. Die gesteigerte HAT-Aktivität wiederum führe zu einer gesteigerten Transkription von S-Phase spezifischen Genen, die in der frühen G1-Phase noch reprimiert vorliegen. Diese Daten kollidieren jedoch mit den Daten von anderen Arbeitsgruppen (Perkins et al., 1997; Snowden et al., 2000). Hier konnten die Autoren zeigen, dass p21, ein Familienmitglied der CIP/KIP-Familie, die Transaktivierung von CBP/p300 auf REL A

(p65), einer NF- κ B Untereinheit steigert. Die Transaktivierung war wiederum abhängig von der Inhibierung von CDK2 durch p21. Anhand dieser wenigen Beispiele wird deutlich, dass eine komplexe Regulierung der Transaktivierung von Genen durch CBP und p300 in Abhängigkeit des Zellzyklus erfolgt, wobei gerade die Wechselwirkung von p27 mit CDK2 eine zentrale Rolle spielen könnte (Campaner et al., 2010; Hydbring et al., 2010).

Die Überexpression von p27, CBP und CDK2/Cyclin E führte überraschend zum totalen Verlust der Acetylierung von p27 (Abbildung 3.19). Der Verlust der Acetylierung war mit großer Wahrscheinlichkeit nicht abhängig von der Kinase-Aktivität von CDK2. Auch die Überexpression einer CDK2-Mutante, die keine Kinase-Aktivität mehr besitzt, führte nur zu einer schwachen Detektion der Acetylierung. Nur mit einer sehr langen Belichtungszeit konnte die Acetylierung von p27 detektiert werden. In beiden Fällen wurde deutlich mehr p27 auf dem Blot detektiert gegenüber der alleinigen Überexpression von p27 mit CBP oder mit CDK2/Cyclin E, so dass davon ausgegangen werden muss, dass CDK2/Cyclin E und CBP in einer Weise miteinander interagieren, die zur Stabilisierung von p27 führt und die Acetylierung verhindert. Möglicherweise konkurriert überexprimiertes CDK2 (3 μ g transfiziert) daher mit p27 (1 μ g transfiziert) um die Bindung an CBP. Dafür spricht auch das Ergebnis eines weiterführenden Experiment, bei dem gezeigt wurde, dass auch die p27^{ck⁻}-Mutante, die aufgrund von Aminosäure-Austauschen kein CDK2 und Cyclin E mehr bindet, ebenfalls nicht mehr acetyliert werden kann (nicht gezeigt).

In der Tat ist die direkte Interaktion von p300 mit CDK2/Cyclin E beschrieben (Felzien et al., 1999). Diese erfolgt mit einer C-terminal gelegenen Domäne von p300, die von der Aminosäure 1532 bis 1902 reicht. *In vitro* Versuche zeigten jedoch, dass CDK2 und Cyclin E nicht an GST-p300 binden können. Eine Interaktion konnte nur *in vivo* detektiert werden, wobei hier ein ternärer Komplex aus p300, CDK2 und Cyclin E nachgewiesen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass posttranslationale Modifikationen für die Bindung von CDK2/Cyclin E an p300 Voraussetzung sind, oder aber, dass p300 und CDK2/Cyclin E nicht direkt, sondern über weitere Bindungspartner miteinander *in vivo* interagieren. Aufgrund der Tatsache, dass die p27^{ck⁻}-Mutante ebenfalls nicht acetyliert wird, scheint die *in vivo* Interaktion von CDK2/Cyclin E mit p300 nicht direkt über p27 zu erfolgen. Dennoch könnte durchaus ein Komplex aus p27, p300 und CDK2/Cyclin E *in vivo* bestehen. Solch ein Komplex könnte in Abhängigkeit von weiteren Bindungspartnern und posttranslationalen Modifikationen beispielsweise an der Regulierung der Hyperphosphorylierung des RB-Proteins beteiligt sein. In Co-IP-Experimenten wurde gezeigt, dass p300 sowohl in der frühen G1- als auch in der späten G1-Phase verstärkt mit dem RB-Protein interagiert (Iyer et al., 2001). p300 könnte daher eine Rolle bei der frühen Phosphorylierung des RB-Proteins durch die Komplexe CDK4/Cyclin D und CDK6/Cyclin D, sowie bei der späten Phosphorylierung durch CDK2/Cyclin E am G1/S-Phase Übergang zukommen, indem es die Kinase-Komplexe in räumliche Nähe zum RB-Protein bringt. Da von uns in weiterführenden Experimenten gezeigt wurde, dass auch überexprimiertes CDK4 die Acetylierung von p27 inhibiert, interagiert p300 wahrscheinlich auch mit dem Dimer CDK4/Cyclin D über die gleiche Bindungsstelle wie CDK2. Die Kinase-Aktivität in einem solchen Komplex wäre wiederum abhängig von p27. In weiteren Experimenten könnte daher überprüft werden, ob p27, p300/CBP, RB und CDK4/6/Cyclin D und CDK2/Cyclin E in großen Komplexen in der G1-Phase an der DNA vorliegen.

Interessanterweise beschreibt eine aktuelle Veröffentlichung die Reprimierung der Seneszenz durch den Transkriptionsfaktor c-MYC bei Co-Transfektion mit dem Onkogen H-Ras. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Regulierung von c-MYC

durch die Phosphorylierung von Serin 62 durch CDK2 erfolgt. Umgekehrt konnte p27 negativ CDK2 regulieren und die Seneszenz einleiten (Campaner et al., 2010; Hydbring et al., 2010). Eine Frage wäre auch hier, ob CBP/p300 an der Komplexbildung beteiligt ist.

Auffallend bei der Überexpression von p27 und CBP wiederum ist die starke Runterregulierung von p27 auf Proteinebene in Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20, wobei gleichzeitig eine starke Acetylierung von p27 beobachtet werden kann. Ob der niedrige Proteinspiegel von p27 tatsächlich mit der Acetylierung verknüpft ist, kann hier jedoch nicht beurteilt werden. So könnte die Überexpression von CBP zur transkriptionalen Reprimierung von p27 geführt haben (siehe Abschnitt 4.4.1.1). Dies muss in weiteren Experimenten überprüft werden. Eine Möglichkeit wäre, die RNA-Menge von p27 über quantitative *real time PCR* zu messen. Auch könnte der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren wie MG132 Abhilfe schaffen. Durch Proteasom-Inhibitoren wird der Abbau von p27 gestoppt. Wenn jedoch der Proteinspiegel von p27 im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle unverändert niedrig bleibt, spricht dies für eine transkriptionale Repression von p27 durch CBP.

Ob tatsächlich die Acetylierung von K190 zu einer Inhibierung der T187-Phosphorylierung oder aber die Interaktion von p27 mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 verhindert wird, konnte aus diesem Experiment nicht beurteilt werden. Die Überexpression von CDK2 führte zu einem totalen Verlust der Acetylierung von p27. Somit war auch die Detektion von phosphoryliertem T187 mit einem spezifischen Antikörper in diesem Fall hinfällig. Die Verwendung eines spezifischen pT187-Antikörpers nach Acetylierung von K190 muss zudem kritisch betrachtet werden. Der polyklonale Antikörper von Santa-Cruz-Biotechnology wurde durch Immunisierung von einem Kaninchen mit phosphorylierten Peptiden generiert. Zu den Aminosäuren des Peptides gehörte auch K190. Die Acetylierung könnte somit zu einer Epitop-Änderung führen, die zwar die Bindung des Antikörpers an phosphoryliertes T187 inhibiert, aber keine Aussage über die Inhibierung der Phosphorylierung von T187 durch CDK2 erlaubt. Das gleiche Problem liegt auch für die p27K190Q- und K190R-Mutante vor. Eine alternative Methode wären *in vivo pulse chase* Experimente. Dabei werden Zellen mit [³²P]-Ortho-Phosphat inkubiert (*pulse*). p27 wird durch die Übertragung von radioaktivem Phosphat an T187 durch CDK2/Cyclin E markiert. Die Reaktion wird dann durch Inkubation der Zellen mit einem Überschuss an [³²P]-Ortho-Phosphat-freiem Medium gestoppt (*chase*). Anschließend würde eine IP von p27 und die Detektion von eingebautem Phosphat an T187 durch Autoradiografie erfolgen. Die Stärke der Autoradiografie wäre dann ein Maß für die Verknüpfung des Phosphates an T187 durch den CDK2/Cyclin E-Komplex von p27, der p27K190R- und der p27K190R- Mutante.

Aus den Abbildungen 3.19 und 3.20 wird auch ersichtlich, dass die Überexpression von CDK2 in Abhängigkeit der Kinase-Aktivität zur Herabregulierung von CBP auf Proteinebene führt. Dies ist insoweit überraschend, da CBP und p300 essentielle Co-Aktivatoren zur Regulierung der Genaktivität und für den geordneten Übergang von der G0- in die G1-Phase und G1- in die S-Phase essentiell sind (Kolli et al., 2001; Kalkhoven, 2004; Iyer et al., 2007). Eine Degradation von CBP/p300 wurde ebenfalls nach Überexpression von H-Ras oder N-Ras sowie nach kontinuierlicher Aktivierung von RAS-Signalwegen durch PGDF (*platelet-derived growth factor*) in NIH3T3-Zellen beschrieben (Sanchez-Molina et al., 2006). Die genauen molekularen Ursachen der CBP/p300-Degradation blieben dabei im Dunkeln. Eine kontinuierliche Aktivierung von RAS führt jedoch vermutlich über den RAS→RAF→MEK→ERK- oder über den

RAS→PI3K→AKT/PKB-Signalweg zu gesteigerter CDK2/Cyclin E-Aktivierung und dadurch ebenfalls zur Degradierung von CBP/p300. Da CBP/p300 Tumorsuppressor-Eigenschaften zugeschrieben werden und RAS und CDK2 in Tumoren oft überaktiviert vorliegen, könnte die Herabregulierung von CBP/p300 eine wichtige Voraussetzung für die Transformation sein (Petrij et al., 1995; Gayther et al., 2000; Kung et al., 2000). In der Tat wurden CBP/p300 als limitierende Faktoren des onkogenen Potentials von RAS beschrieben. So wurde in *Caenorhabditis elegans* gezeigt, dass eine Punktmutation des CBP-Homologs *cbp-1* zu einer gesteigerten HAT-Aktivität führt und dabei aktiviertes Ras antagonisiert (Eastburn und Han, 2005). Die Inhibierung der HAT-Aktivität ist auch Voraussetzung bei der Transformation von embryonalen Ratten-Fibroblasten durch RAS und E1A. Das adenovirale Onkoprotein E1A bindet an p300 und inhibiert die HAT-Aktivität (Chakravarti et al., 1999; Li et al., 1999). Die Expression von RAS alleine reicht dagegen nicht zu Transformation aus, da sonst Seneszenz in der Zelle eingeleitet werden würde (Deng et al., 2005).

4.4.1.3 Der Kinase-Assay zur Analyse der Funktion der K190-Acetylierung

Um eine Aussage über den Einfluss der K190-Acetylierung auf die Phosphorylierung von T187 zu erhalten, wurde die Stärke des Einbaus von [³²P] nach Inkubation von p27wt, der p27K190R- und der p27K190Q-Mutante *in vitro* in einem Kinase-Assay überprüft (Abbildung 3.21). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Austausch von K190 zu Q tatsächlich den Einbau von [³²P] in p27 begrenzt. Annähernd gleich stark phosphoryliert sind dagegen die p27K190R-Mutante und das p27wt-Protein. Dieses Ergebnis ist insoweit nicht überraschend, da die Konsensussequenz von CDK2, S/T-P-X-K/R sowohl ein K als auch ein R an Position 190 erlaubt. Inwieweit dieser erste *in vitro* Kinase-Assay jedoch verlässliche Aussagen über die Inhibierung der Phosphorylierung erlaubt, sollte kritisch bedacht werden. Die Mimikry eines acetylierten Lysins durch ein Q ist zwar in zahlreichen Veröffentlichungen ein fester Bestandteil der Funktionsuntersuchung von acetylierten Proteinen (Cohen et al., 2004; Tang et al., 2008), dennoch könnte der Verlust der Phosphorylierung eher auf die Veränderung der Konsensussequenz von K zu Q als auf der tatsächlichen Mimikry eines acetylierten Lysins zurückzuführen sein. In zukünftigen *in vitro* Kinase-Experimenten könnte mit synthetisierten acetylierten Peptiden gearbeitet werden, die den Austausch von K zu Q nicht nötig machen und eine klare Aussage *in vitro* über die Inhibierung der Phosphorylierung durch die Acetylierung erlauben könnte. Auch könnte p27 zunächst *in vitro* durch einen HAT-Assay oder *in vivo* durch Co-Transfektion mit CBP acetyliert werden. Nach der *in vivo* Acetylierung könnte p27 aus den Zellen immunpräzipitiert werden, und dann in einen *in-vitro* Kinase-Assay eingesetzt werden. Hier wäre der Vorteil, im Gegensatz zum *in vitro* HAT-Assay, dass p27 eventuell weitere posttranslationale Modifikationen erfährt, die die Acetylierung und Phosphorylierung beeinflussen. Zu bedenken bei diesen Versuchen ist die offene Funktion der K100-Acetylierung und inwieweit diese die Acetylierung und Funktion von K190 beeinflusst. Hier müsste wiederum mit einer acetylierungsfreien R- und einer Q-Mutante von K100 gearbeitet werden.

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen zur Funktion der K190-Acetylierung darauf schliessen, dass acetyliertes K190 die Phosphorylierung von T187 durch den CDK2/Cyclin E-Komplex beeinträchtigt und dadurch einen Signalweg, der zur proteolytischen Degradation von p27 führt, inhibieren könnte. Bei einem *colony formation* Assay (Abbildung 3.18) wurde eine gesteigerte inhibitorische Eigenschaft

von p27 auf den Zellzyklus nach Austausch von K190 zu Q beobachtet. Die gesteigerte inhibitorische Eigenschaft hängt vermutlich mit einer verringerten Phosphorylierung von p27 zusammen, wie in dem Kinase-Assay gezeigt werden konnte. Zukünftige Experimente müssen diese Vermutung untermauern. Die gesteigerte inhibitorische Eigenschaft auf den Zellzyklus nach Acetylierung von p27 könnte in weiteren Experimenten mittels FACS (*fluorescence activated cell sorter*)- oder BrdU-Assay weiter überprüft werden. Die verringerte Phosphorylierung kann, wie bereits erwähnt, *in vitro* mit synthetischen Peptiden als auch *in vivo* mit *pulse chase* Experimenten weiter überprüft werden. *Pulse chase* Experimente sollten mit der p27K190Q- als auch mit der p27K190R-Mutante erfolgen. In weiteren Experimenten sollten dann Effekte der Acetylierung von K190 auf die Stabilität von p27 untersucht werden. So sollte die verringerte Phosphorylierung an T187 zu einer gesteigerten Halbwertszeit von p27 führen. Im Institut wurde dazu bereits mit Cyclohexamid-Experimenten begonnen. Cyclohexamid inhibiert die Protein-Translation, so dass nach Zugabe der Substanz der proteolytische Abbau von p27 über einen bestimmten Zeitraum gemessen werden kann. Auch hier könnte ein Vergleich des wt-Proteins mit der p27K190R- als auch mit der p27K190Q-Mutante erfolgen. Eine gleichzeitige Transfektion von p27 mit CBP bei einem Cyclohexamid-Experiment könnte wiederum kritisch sein. So erfolgt die Acetylierung ebenfalls an K100, was wiederum Auswirkungen auf die Acetylierung von K190 und die Phosphorylierung an T187 haben könnte (siehe Abbildung 3.24). Hier könnte mit einer Mutante von p27 gearbeitet werden, bei der K100 gegen R ausgetauscht wurde. Soll die Halbwertszeit von endogenem p27 beispielsweise in NIH3T3-Zellen bestimmt werden, müssen wieder transkriptionale Effekte nach Transfektion von CBP im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle bedacht werden. In weiteren Experimenten sollte auch die Interaktion von p27 mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 überprüft werden. Zwar liegen erste Daten vor, dass die Acetylierung von K190 die Phosphorylierung von T187 inhibiert, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Acetylierung durch Konformationsänderungen des C-Terminus von p27 auch die Interaktion mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex abschwächt. Auch hierzu liegen im Institut erste Daten vor. Nach Co-Transfektion mit CBP wird p27 *in vivo* weniger ubiquitiniert. Zwar könnte die verringerte Ubiquitinierung auf eine verringerte Phosphorylierung von T187 zurückzuführen sein, aber interessanterweise zeigen unveröffentlichte Daten, dass die Bindung des SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex an p27, abhängig vom Zelltyp, auch unabhängig von der Phosphorylierung an T187 erfolgen kann (Gao et al., 2009; Wang et al., 2009). Dem Institut liegen baculovirale Konstrukte zur Aufreinigung des SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex und dem Adaptorprotein CKS1 vor. Daher könnten neben *in vivo* Ubiquitinierungs-Assays beispielsweise auch *in vitro pulldown*-Experimente mit GST-p27wt, der GST-p27K190R- und der GST-p27K190Q-Mutante mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex erfolgen.

Ein wichtiger Schritt für zukünftige Experimente ist die Generierung eines für acetyliertes K190-spezifischen Antikörpers. Der Antikörper wäre entscheidend für die Detektion der Acetylierung im Verlauf des Zellzyklus. Bisher wurden Acetylierungen von p27 an zwei Lysinen gefunden, an K100 und K190. Die Acetylierung an den Lysinen könnte zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus oder unter verschiedenen zellulären Stress-Bedingungen erfolgen, was jedoch mit einem allgemein AcK-spezifischen Antikörper nicht unterschieden werden kann. Die Acetylierung an K190 scheint eine eher stabilisierende Funktion auf p27 zu haben, wohingegen die Acetylierung von K100 eher zum verstärkten proteolytischen Abbau

von p27 beiträgt (Abbildung 3.24). Ein spezifischer AcK190-Antikörper wäre ebenso wie ein spezifischer AcK100-Antikörper zudem entscheidend, um mögliche Wechselwirkungen mit anderen posttranslationalen Modifikationen zu entschlüsseln. p27 wird im C-Terminus noch an zwei weiteren Threoninen phosphoryliert. Die Phosphorylierung von T175 durch AKT verhindert den Kern-Import von p27 (Liang et al., 2002) und ist zudem an der Interaktion von p27 mit dem CDK4/6/Cyclin D-Komplex beteiligt (Larrea et al., 2008). Die Phosphorylierung der C-terminal endständigen Aminosäure T198 spielt sowohl bei der Stabilität von p27 (Kossatz et al., 2006) als auch bei der Interaktion von p27 mit CDK4/6/Cyclin D eine Rolle (Larrea et al., 2008). Neben den Phosphorylierungen sind in naher Zukunft weitere Entdeckungen von Modifikationen im C-terminalen Teil von p27 zu erwarten. Beispielsweise liegt an Position 178 ein Serin flankiert von einem Prolin vor. Dies ist die minimale Konsensussequenz von MAP-Kinasen (Malik et al., 2008). Desweiteren könnten weitere Lysine in der Nachbarschaft von K190 methyliert, ubiquitiniert, sumoyliert oder neddyliert werden (Yang und Seto, 2008).

4.4.2 Untersuchungen zur Funktion der K100-Acetylierung

K100 trennt den N-terminalen Teil, in dem die Bindungsdomänen für die Cycline und die CDKs liegen, vom C-terminalen unstrukturierten Teil von p27 ab (Galea et al., 2008). Interessanterweise liegt K100 nur vier Aminosäuren entfernt von der prolinreichen Sequenz R₉₀PPRPPK₉₆. Die Region ist essentiell an der Regulierung der Funktion von p27 als Inhibitor von CDK2/CDK4/CDK6-Komplexen sowie an der Regulierung der Stabilität und des Abbaus von p27 am G1/S-Phase-Übergang beteiligt (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007; Blain, 2008; James et al., 2008). Zudem spielt die Region eine Rolle bei der Inhibierung von RAS-Signalwegen, welche hervorgerufen wird durch die Interaktion von p27 mit GRB2 (Moeller et al., 2003). Nachdem gezeigt werden konnte, dass K100 acetyliert wird (Abbildung 3.11), standen daher zwei Untersuchungen zur Funktion der Acetylierung von K100 im Mittelpunkt: 1. Beeinflusst die Acetylierung die Stabilität und den Abbau von p27 und 2. Beeinflusst die Acetylierung die Interaktion von p27 mit GRB2?

GRB2 ist ein Adaptorprotein der RAS-vermittelten Signaltransduktion. Es bindet über seine SH2 (*SRC homology 2*)-Domäne auf zytoplasmatischer Seite an phosphorylierte Tyrosine von aktivierten Wachstumsrezeptoren. Die Signalweiterleitung wird über die Interaktion des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors SOS (*son of sevenless*) mit GRB2 vermittelt. Dabei bindet die SH3 (*SRC homology 3*)-Domäne von GRB2 an eine prolinreiche Sequenz von SOS. An SOS bindet wiederum RAS, welches GTP gebunden, eine Vielzahl von proliferierenden und anti-apoptotischen Signalwegen einleiten kann. p27 bindet ebenfalls über seine prolinreiche Sequenz an die SH3-Domäne von GRB2 und inhibiert so die Bindung zu SOS. Dies führt wiederum zur Inhibierung der RAS-Aktivierung (Moeller et al., 2003). Wie erwähnt, überprüfte S. Voshall potentielle Wechselwirkungen der K100-Acetylierung mit der Interaktion von p27 mit GRB2. Erste Untersuchungen zeigten, dass die Acetylierung von K100 die GRB2-Interaktion mit p27 inhibieren kann. Diese Daten müssen jedoch noch in weiteren Experimenten validiert werden.

Im Zusammenhang mit der K100-Acetylierung lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit daher auf der Regulierung der Stabilität von p27 nach Acetylierung. Wie bereits bei der Untersuchung der K190-Acetylierung erwähnt, ist für die Ubiquitin vermittelte Proteolyse von p27 am G1/S-Übergang die Phosphorylierung von T187 ausschlaggebend. Die Phosphorylierung von T187 durch CDK2/Cyclin E und später

durch CDK2/Cyclin A wird durch die Phosphorylierung an Y74, Y88 und Y89 eingeleitet (Chu et al., 2007; Grimmmler et al., 2007). p27 ist ein Substrat der Kinasen der SRC-Familie LYN, FYN, SRC sowie ABL. Für die Bindung der Kinasen ist wiederum die prolinreiche Region von p27 verantwortlich. So konnte für die Kinase LYN gezeigt werden, dass diese, genau wie GRB2, über die SH3-Domäne mit der prolinreichen Region von p27 interagiert. Essentiell für die Wechselwirkung sind die Aminosäuren P94, P95 und K96. Der Austausch dieser Aminosäuren in der R₉₀PPRPPK₉₆-Sequenz gegen Alanin führte zum Verlust der GRB2-Bindung (Grimmmler, Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}, Diss., 2002, LMU München).

Im Gegensatz zur Acetylierung von K190 könnte die Acetylierung von K100 ein abbauender Faktor sein. Während dieser Arbeit wurde regelmäßig eine Runterregulierung von p27 auf Proteinebene nach Co-Transfektion mit CBP festgestellt (Abbildung 3.1 und 3.17).

Interessanterweise wurde auch für den Transkriptionsfaktor c-MYC die Acetylierung als ein abbauender Faktor beschrieben, während die direkte Interaktion mit p300 als Co-Aktivatoren der Transkription unabhängig von der HAT-Domäne zu einer Stabilisierung von c-MYC führte (Faiola et al., 2005). Initial wurde daher zunächst überprüft, ob die Runterregulierung von p27 auf Proteinebene ebenfalls abhängig von der HAT-Aktivität von CBP ist (Abbildung 3.22). Bei der Co-Transfektion von CBPΔHAT wurde jedoch kein Einfluss auf die Proteinstabilität von p27 festgestellt, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die beobachtete Runterregulierung von p27 auf Proteinebene mit der HAT-Aktivität von CBP zusammenhängt.

Wie unter Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben, ist jedoch die einfache Überexpression von CBP und CBPΔHAT kritisch. CBP und p300 liegen in der Zelle in multimeren Proteinkomplexen vor, die je nach Art der Bindungspartner transkriptional aktivierend oder reprimierend sind (Girdwood et al., 2003). Um transkriptionale Ursachen für die beobachtete Runterregulierung von p27 auszuschließen, wurde daher erneut ein *colony formation* Assay durchgeführt (Abbildung 3.23). Der Austausch von K100 zu Q führte in diesem Fall zu deutlich mehr Kolonien auf der Platte, verglichen mit der Transfektion von p27wt und der p27K100R-Mutante. Somit scheint die Acetylierung von K100 die inhibitorische Eigenschaft von p27 auf den Zellzyklus abzuschwächen. Die p27K100R-Mutante, die nicht mehr acetyliert werden kann, verstärkt dagegen die inhibitorische Eigenschaft von p27.

Da diese ersten Daten auf eine Degradation von p27 nach Acetylierung von K100 hindeuten, wurde die Möglichkeit einer verstärkten T187-Phosphorylierung in Betracht gezogen. Im Gegensatz zu den Experimenten zur Funktion der Acetylierung von K190, bei denen die Möglichkeit besteht, dass der Austausch von K zu R und Q zu Epitop-Veränderungen führt und somit die Bindung des Antikörpers inhibiert wird, konnte hier mit einem pT187-spezifischen Antikörper gearbeitet werden. Nach der Überexpression der p27K100Q-Mutante wurde eine verstärkte Phosphorylierung von T187 sowohl durch überexprimiertes CDK2 (Abbildung 24A) als auch durch endogenes CDK2 (Abbildung 24B) im Vergleich zum p27wt-Protein als auch zur p27K100R-Mutante festgestellt. Interessanterweise wurde auch ein verändertes Laufverhalten der K100Q-Mutante nachgewiesen. Diese migrierte in der SDS-PAGE ein wenig höher als das p27wt-Protein und die K100R-Mutante, was wiederum auf die verstärkte Phosphorylierung von T187 zurückzuführen sein könnte.

Die bereits erwähnte Nähe von K100 zur prolinreichen Sequenz, die essentiell an der Bindung der Kinasen und der folgenden Tyrosin-Phosphorylierung von p27 beteiligt ist, lässt vermuten, dass die Acetylierung von K100 diese Vorgänge verstärkt. So

könnte die Acetylierung von K100 auf Grund von Konformationsänderungen zu einer verstärkten Bindung der SRC-Kinasen an die prolinreiche Sequenz führen. Zukünftige Co-IP- oder *pulldown* Experimente zwischen den SRC-Kinasen und p27wt, der p27K100R- und der p27K100Q-Mutante würden Klarheit über eine verstärkte Interaktion nach Acetylierung bringen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Konformationsänderung Y88 und Y89 räumlich näher an die Kinasen heranführt, so dass eine verstärkte Phosphorylierung erfolgen kann. Mittels *in vitro* und *in vivo* Kinase-Experimente könnte diese These überprüft werden.

Die Acetylierung von K100 könnte jedoch nicht nur in direkter Nachbarschaft zur Konformationsänderung führen und Auswirkungen auf die Tyrosin-Phosphorylierung haben, sondern auch Auswirkung auf die gesamte p27-Proteinkonformation haben. Die N-terminale Region von p27 liegt nach Bindung des heterodimeren CDK2/Cyclin A-Komplexes in einer geordneten Struktur vor. Die 100 Aminosäuren umfassende C-terminale Region von p27 nimmt an der Bindung des CDK2/Cyclin A-Komplexes nicht teil und liegt ausgestreckt und intrinsisch unstrukturiert in Lösung vor. Eine wichtige Frage war daher, wie nach Aktivierung von CDK2 eine Phosphorylierung von T187 in der C-terminalen Region aufgrund der räumlichen Entfernung zu CDK2 stattfinden kann. Durch NMR-Spektroskopie und computerunterstütztem dynamischen-Modelling konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Y88 eine Konformationsänderung zu Folge hat, die die C-terminale Region von p27 nach vorne zum gebundenen CDK2/Cyclin A-Komplex klappen lässt und so eine effiziente Phosphorylierung von T187 durch gebundenes CDK2 erlaubt (Galea et al., 2007). Die flexible Scharnierregion von p27, die das Umklappen der C-terminalen Region ermöglicht, liegt im Bereich von Aminosäure 96 bis 140. Die Acetylierung von K100 könnte aufgrund der Neutralisation der positiven Ladung eine wichtige Rolle bei diesem Prozess spielen. Ähnlich der Acetylierung von Histonen, die die elektrostatische Anziehung der positiv geladenen Lysine mit der negativ geladenen DNA aufhebt, wäre sowohl die Aufhebung von intramolekularen als auch von intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen denkbar, die die Scharnierregion flexibler werden lassen. Die Acetylierung von K100 wäre daher ein Mediator von posttranslationalen Modifikationen zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Region. Ein Beispiel für die Auswirkung einer Acetylierung auf weit entfernte liegende Domänen ist wiederum p53. Der C-Terminus von p53 liegt, ähnlich der C-terminalen Region von p27, ungebunden intrinsisch unstrukturiert in Lösung vor, hat eine Länge von 21 Aminosäuren (367 - 388) und ist das Ziel zahlreicher posttranslationaler Modifikationen (Lavin und Gueven, 2006; Toledo und Wahl, 2006). Die Acetylierung von Lysinen in dieser kurzen Sequenz hat konformationelle Auswirkungen auf die DNA-Bindungsdomäne von p53, die von den Aminosäuren 94 bis 292 reicht. Die Folge ist, dass die Bindung von p53 an die DNA verstärkt wird.

Um mögliche Konformationsänderungen nach Acetylierung von K100 und eine damit einhergehende stärkere Phosphorylierung an T187 durch CDK2 zu überprüfen, könnten auch hier *in vitro* Kinase-Assays durchgeführt werden. Ähnlich den Experimenten für die Funktion der K190-Acetylierung würde hier mit einer Acetyl-Mimikry-Mutante oder mit *in vitro* acetyliertem p27 gearbeitet werden. Ein interessantes Experiment wäre auch die *in vivo* Phosphorylierung von p27 durch CDK2 bei Austausch von K100 zu Q und einer mutierten prolinreichen Sequenz, die keine Bindung der SRC-Kinasen mehr erlaubt. Alternativ könnte auch eine IP des mutierten p27-Proteins mit dem CDK2/Cyclin E-Komplex mit spezifischen

Antikörpern erfolgen, wobei dann *in vitro* die Kinase-Aktivität von CDK2 auf Histone überprüft wird.

Ähnlich wie bei der Acetylierung von K190 müssen weitere Experimente auch die Frage klären, inwieweit tatsächlich die Stabilität von p27 durch die Acetylierung an K100 betroffen ist. Die Experimente in der Abbildung 3.24 lassen zwar auf eine stärkere Phosphorylierung von T187 in der K100Q-Mutante schliessen, dennoch wurde kein signifikanter Unterschied in der Proteinkonzentration im Vergleich zum p27wt-Protein oder zur K100R-Mutante deutlich. Die Überexpression von p27 könnte die proteosomale Degradation in den Zellen inhibiert haben. Dies muss auch bei anstehenden Cyclohexamid- oder *pulse chase* Experimenten berücksichtigt werden, die einen direkten Vergleich der Halbwertszeit nach Acetylierung von K100 zum unmodifizierten p27wt-Protein erlauben würden. Technisch elegant wäre es auch, die DNA-Sequenzen der Austausch-Mutanten stabil in murine embryonale p27^{-/-}-Fibroblasten unter dem endogenen p27-Promotor einzubringen. Dies würde einen deutlichen physiologischeren Einblick in die tatsächliche Relevanz der p27-Acetylierung als die Überexpression der Proteine erlauben. Der Einfluss der Acetylierung auf den Zellzyklus könnte dann wiederum in einem FACS-Assay oder durch BrdU-Einbau bestimmt werden.

4.4.2.1 Analyse der K100-Acetylierung in Abhängigkeit von HDAC-Inhibitoren

Erste interessante Schlussfolgerungen auf die Regulierung der p27-Acetylierung brachte die Detektion von acetyliertem K100 mit dem 8A9-Antikörper unter Einfluss von verschiedenen Deacetylase-Inhibitoren. Aus Abbildung 3.25 wird ersichtlich, dass die Inkubation von HEK293-Zellen mit den Deacetylase-Inhibitoren TSA und NAM zu unterschiedlichen Stärken der K100-Acetylierung von überexprimierten p27 führt. Eine starke Acetylierung von K100 wurde nach Inkubation mit NAM detektiert. Im Verhältnis dazu wurde nur eine schwache Acetylierung nach Inkubation der Zellen mit TSA detektiert, obwohl gleichzeitig wiederum ein deutlich erhöhter Proteinspiegel von p27 in den Zellen vorlag. Deshalb könnte die K100-Deacetylierung durch Mitglieder der NAD⁺-abhängigen Deacetylasen erfolgen, während die Deacetylierung von K190 durch Mitglieder der Zink-abhängigen HDACs erfolgt.

Die Vermutung, dass p27 ein Substrat von mehreren HDAC-Klassen sein könnte, ergab sich aus einem vorangegangenen Experiment. In Abbildung 3.4 wird deutlich, dass der Einsatz von TSA und NAM zu kooperativen Verstärkung in der Gesamtacetylierung führt.

Eine Regulierung der Acetylierung durch unterschiedliche HDAC-Klassen wurde auch schon bei anderen Proteinen gezeigt. So wird die Acetylierung von p53 durch mindestens vier Deacetylasen (HDAC1, HDAC3, SIRT1 und SIRT7) unter verschiedenen zellulären Bedingungen reguliert. (Brooks und Gu, 2003; Zeng et al., 2006; Vakhrusheva et al., 2008). Ein weiteres Beispiel ist KU70, ein Protein, welches bei der nicht-homologen Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie bei der Neuordnung von Antikörper- und T-Zell-Rezeptoren bei der V(D)J-Rekombination eine entscheidende Rolle spielt (Featherstone und Jackson, 1999). Auch hier führte der gleichzeitige Einsatz von TSA und NAM zu deutlich verstärkter Detektion der Acetylierung, wobei die verantwortlichen Deacetylasen nicht identifiziert werden konnten (Cohen et al., 2004).

Dennoch stellt sich die Frage, ob p27 tatsächlich ein direktes Substrat von unterschiedlichen Deacetylasen ist oder ob indirekte Effekte zu einer kooperativen Verstärkung des Acetylierungssignals geführt haben. Für p300 wurde eine Interaktion mit HDAC1 und HDAC6 nachgewiesen (Simone et al., 2004). Die Überexpression von HDAC1 führt zur Reprimierung der Acetyltransferase-Aktivität von p300 (Stiehl et al., 2007). Die Autoacetylierung von p300 ist jedoch entscheidend für die HAT-Aktivität (Thompson et al., 2004). Wird HDAC1 durch TSA inhibiert, würde das zu einer Hyperaktivierung von p300 führen, aber keinen Aufschluss über eine mögliche Acetylierung von p27 durch HDAC1 geben. Eine weitere HDAC von p300 ist zudem SIRT1 (Black et al., 2008). So könnte NAM die Deacetylase-Aktivität von SIRT1 inhibiert und zu einer gesteigerten Acetyltransferase-Aktivität von p300 geführt haben, wobei eine direkte Deacetylierung von p27 durch SIRT1 *in vivo* nicht vorliegt. Desweiteren könnte auch *in vivo* die Bindung von CBP/p300 an p27 abhängig von weiteren acetylierten Komplexpartnern sein, an die CBP/p300 über ihre Bromodomänen binden müssen, um p27 effektiv acetylieren zu können. Die bisherigen *in vitro*-Ergebnisse zeigen zwar, dass p27 direkt von CBP/p300 acetyliert werden kann, dennoch bleibt die Frage nach anderen Partnern *in vivo* offen. Für den Transkriptionsfaktor p53 wurde gezeigt, dass die Acetylierung von K382 einhergeht mit der Verstärkung der Bindung von CBP über die Bromodomäne (Mujtaba et al., 2004). Auch könnte eine initiale Acetylierung von p27 zu einer verstärkten Bindung von CBP/p300 führen, wobei dann in der Folge weitere Lysine acetyliert werden.

Durch *in vitro*-Experimente könnte überprüft werden, ob K100 ein tatsächliches Substrat der Sirtuin-Familie ist: In einem *in vitro* HAT-Assay wird GST-p27 zunächst durch CBP acetyliert. Anschließend wird p27 mit den sieben rekombinant exprimierten Mitgliedern der Sirtuin-Familie einzeln in einem Deacetylase-Assay inkubiert und mittels AcK-spezifischem Antikörper oder mit dem 8A9-Antikörper detektiert. Um auszuschließen, ob Unterschiede in der Deacetylierung von p27 nicht durch Interaktionen der Sirtuine mit CBP verursacht werden, könnte acetyliertes p27 zunächst aus dem HAT-Assay entfernt und erst dann in den Deacetylase-Assay eingesetzt werden. Es könnte jedoch auch direkt im Anschluss an den HAT-Assay die Deacetylase-Reaktion erfolgen, wobei jedoch einige Kontrollen durchzuführen wären. Eine Kontrolle wäre, die Reaktion mit und ohne NAD^+ durchzuführen. Wie bereits beschrieben, ist die Aktivität der Sirtuine abhängig vom Co-Faktor NAD^+ . Daher würden Schwankungen in der Deacetylase-Reaktion in Abwesenheit von NAD^+ eine unterschiedliche Effizienz in der vorangegangenen Acetylase-Reaktion zeigen. Desweiteren könnte die Reaktion in Anwesenheit von TSA und NAM erfolgen. TSA sollte keinen Einfluss auf die Deacetylase-Reaktion haben, während der Überschuss des kompetitiven Inhibitors NAM die Deacetylase-Reaktion inhibieren sollte.

Ein Kandidat aus der Familie der Sirtuine für die p27-Deacetylierung wäre SIRT1. Die Inkubation mit Resveratrol, einem Aktivator der SIRT1-Deacetylase, führte zu einem posttranslationalen Anstieg von p27 in der Prostatakrebs-Zell-Linie LNCaP. Der Anstieg von p27 war verbunden mit einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase (Benitez et al., 2007). Die Deacetylierung von K100 könnte also hier den verstärkten Abbau von p27 inhibiert haben. Die Effekte von Resveratrol auf p27 scheinen aber Zelltyp-spezifisch zu sein. Die Inkubation der Colonkarzinom-Zell-Linie Caco-2 mit Resveratrol und Na-Butyrat führte zwar zu einer verstärkten Differenzierung, war aber verbunden mit einer Runterregulierung von p27 auf Proteinebene (Wolter und Stein, 2002). Ein weiterer interessanter Kandidat für die Deacetylierung von K100 aus der Familie der Sirtuine wäre SIRT2. In diesem Labor konnte gezeigt werden,

dass die Phosphorylierung von SIRT2 an S331 einhergeht mit der Inhibierung der katalytischen Aktivität (Pandithage et al., 2008). Eine gesteigerte Kinase-Aktivität von CDK2 am G1/S-Phase Übergang könnte daher die Deacetylierung von K100 verhindern und so zum raschen Abbau von p27 beitragen.

Die Identifikation von HDACs der Klassen I, II und IV mittels *in vitro* Experimenten gestaltet sich auf Grund der Komplexbildung und der damit verbundenen Regulierung der Aktivität als schwierig. So liegen HDAC1, HDAC2 und HDAC3 hauptsächlich in multimeren Proteinkomplexen in direkter Nachbarschaft mit weiteren HDACs und HATs vor (Nicolas et al., 2007). Beispielsweise wurde für HDAC2 gezeigt, dass die enzymatische Funktion abhängig vom Komplex mit HDAC3 ist (Fischle et al., 2002). Bisher konnten nur HDAC1 und HDAC3 *in vitro* einhergehend charakterisiert werden (Li et al., 2004), nicht jedoch HDAC2 (Fischle et al., 2002). Eine Idee wäre die spezifische Runterregulierung von einzelnen HDACs *in vivo* mit *siRNA*, um dann in einem folgenden Schritt wieder mit Antikörpern den Acetylierungsstatus von p27 zu überprüfen. Die Gefahr bei diesem Experiment ist aber, dass die Runterregulierung von einzelnen HDACs auf Proteinebene, die zwar an der Regulierung der Aktivität von anderen HDACs im Komplex beteiligt sind, aber mit p27 nicht interagieren, zu falsch positiven Signalen führt. Eine Alternative wäre die gezielte Inhibierung von einzelnen HDACs mit spezifischen Inhibitoren, wobei ausgeschlossen sein sollte, dass ein Verlust der Deacetylierung durch das Fehlen von Komplexpartnern auf Proteinebene hervorgerufen wird. So könnte die Klasse I, zu der HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8 gehören, gezielt durch den Benzamid-Abkömmling MS-275 inhibiert werden (Hu et al., 2003). Wenn dort Veränderungen in der Acetylierung von p27 festgestellt werden, könnte mit weiteren Inhibitoren, wie dem Hydroxymat-Abkömmling SK-7041, der HDAC1 und HDAC2 inhibiert, gearbeitet werden (Park et al., 2004). Auch für die Familie der Sirtuine sind spezifische Inhibitoren bekannt und können zum Teil käuflich erworben werden (Lavu et al., 2008). Interessanterweise beschreibt jedoch eine aktuelle Veröffentlichung Effekte auf die Zusammensetzung von HDAC-Komplexen durch HDAC-Inhibitoren (Smith et al., 2010). So führte die Behandlung mit SAHA (*suberolanilide-hydroxamic-acid*) zu einer Dissoziation der ING2-Untereinheit vom SIN3-Deacetylase-Komplex in HEK293-Zellen, wodurch der Komplex nicht mehr an den p21-Promotor binden konnte.

Eine weitere Idee zur Identifikation der verantwortlichen HDACs ergibt sich aus der unterschiedlichen Lokalisation der einzelnen HDACs in verschiedenen Zellkompartimenten. SIRT1 und die HDACs der Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8) liegen ausnahmslos im Kern vor. Dagegen gehören SIRT2 sowie HDAC6 und HDAC10 zu den zytoplasmatischen HDACs. SIRT2 und HDAC6 sind hier an der Deacetylierung von Tubulin beteiligt. Die Inkubation von *in vitro* acetyliertem p27 mit einer nukleären und einer zytoplasmatischen Zellfraktion könnte daher Aufschluss über nukleäre und zytoplasmatische HDACs von p27 geben. Auch können schon im Vorfeld einzelne HDACs generell ausgeschlossen werden. SIRT3 gehört beispielsweise zu den mitochondrialen Proteinen. Zudem ist die Expression einzelner HDACs gewebespezifisch reguliert. HDAC8 wird beispielsweise nur im Muskel exprimiert.

Hinweise auf mögliche verantwortliche HDACs von K190 ergeben sich aus HDAC-*Knockout*-Studien. Der *Knockout* von HDAC1 und HDAC2 führte zu einer Erhöhung von p27 auf posttranslationaler Ebene (Lagger et al., 2002). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass HDAC1 und HDAC2 in Karzinomen von Brust, Colon, Magen und Prostata überexprimiert vorliegen. (Bolden et al., 2006). Die Überexpression der beiden HDACs könnte daher zu einer Deacetylierung von K190

und zur einer Destabilisierung von p27 auf Proteinebene geführt haben. Die Folge wäre eine deregulierte G1-Phase.

4.5 Regulation und Funktion der p27-Acetylierung: Modelle und Ausblick auf zukünftige Experimente

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass p27 durch CBP/p300 an mindestens zwei Lysinen acetyliert wird. Wie beschrieben, scheint die Acetylierung von K190 möglicherweise den proteasomalen Abbau von p27 am G1/S-Phase Übergang zu inhibieren, während die Acetylierung von K100 offensichtlich den Tumorsuppressor zu destabilisieren scheint. Da die Funktionen der Acetylierungen zueinander konträr sind, ergibt sich automatisch die Frage, welche Signale unter welchen Bedingungen die Acetylierungen regulieren und welche Deacetylasen an der Regulation beteiligt sind. Die Regulation der Acetylierung durch Deacetylasen scheint ähnlich komplex zu sein wie die unterschiedlichen Funktionen der Acetylierungen. p27 wird vermutlich durch mindestens eine der 11 Zink-abhängigen HDACs der Klassen I, II und IV sowie durch mindestens ein Mitglied der sieben Mitglieder zählenden NAD⁺-abhängigen Sirtuin-Familie deacetyliert (siehe Abschnitt 4.4.2.1).

Aufgrund der vorliegenden Daten und Veröffentlichungen werden zusammenfassend verschiedene Modelle erstellt, unter welchen Bedingungen die Acetylierung von p27 erfolgt und wie diese reguliert wird. Gleichzeitig soll ein Ausblick auf Experimente erfolgen, die diese Thesen untermauern könnten.

p27 fungiert von der G0- bis zur S-Phase als Mediator in der Entscheidung zwischen der Proliferation oder dem Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus in die vorübergehende G0-Phase oder dem finalen Eintritt in die Differenzierung. Neben der bekannten Regulierung von p27 durch Phosphorylierung könnte nun der Acetylierung ebenfalls eine wichtige Rolle zukommen.

Der Austritt von Zellen aus dem Zellzyklus in die Differenzierung erfolgt sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene. Auf posttranslationaler Ebene sorgt die rasche Akkumulation von CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 für die Unterbrechung der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Kern und für die Einleitung des genetischen Differenzierungsprogrammes. Die Akkumulation von p27 ist in einigen Zellarten entscheidend für den Stopp des Zellzyklus und geht einher mit einer gesteigerten Halbwertszeit von p27 (Dimberg et al., 2002; Casaccia-Bonnelil und Liu, 2003). Der genaue Mechanismus, der zu der Akkumulation und einer gesteigerten Halbwertszeit von p27 führt, ist bisher weitgehend im Dunkeln geblieben. Die Acetylierung von K190 könnte hierbei eine Rolle spielen, indem sie den Abbau von p27 durch CDK2 unterbindet. In der Tat lassen einige Veröffentlichungen auf einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von p27 mit einer gesteigerten HAT-Aktivität von Acetyltransferasen schließen. CBP und p300 sind als essentielle Faktoren für die Differenzierung von corticalen, hämatopoetischen, intestinalen, muskulären und cardären Vorläuferzellen beschrieben worden (Goodmann und Smolik 2000; McKinsey et al., 2001; Dimberg et al., 2002; Wang et al., 2010). Gleichzeitig geht die Differenzierung in den Vorläuferzellen oft mit einem posttranslationalen Anstieg von p27 einher (Poolman et al., 1999; Nguyen et al., 2006; Yeh et al., 2007). Ein weiterer Zusammenhang ergibt sich auch aus dem beobachteten posttranslationalen Anstieg von p27 nach Behandlung der humanen undifferenzierten Colonkarzinom-Zell-Linien Caco-2 und HT29 mit dem HDAC-

Inhibitor Na-Butyrat. Auch hier war der Anstieg von p27 mit einer Differenzierung der Zellen verbunden (Litvak et al., 1998; Yamamoto et al., 1999).

In zukünftigen Experimenten wäre es daher sinnvoll, den Acetylierungsstatus von p27 nach Generierung von spezifischen Antikörpern in geeigneten Differenzierungsmodellen zu untersuchen. Ein geeignetes Modell wäre neben den erwähnten Colonkarzinom-Zell-Linien beispielsweise die humane Monoblasten-Zell-Linie U937. Diese differenziert nach Zugabe von Retinsäure und ist in diesem Labor als Differenzierungsmodell etabliert. Ein interessantes Untersuchungsmodell könnten auch neuronale und muskuläre Vorläuferzellen sein (Vernon et al., 2003; Vernon und Philpott, 2003). So wird p27 nicht nur während der Neurogenese posttranslational heraufreguliert, sondern interagiert direkt mit dem Transkriptionsfaktor Neurogenin 2, was zu einer gesteigerten Stabilität des Transkriptionsfaktors führt (Vernon et al., 2003; Nguyen et al., 2006). Interessanterweise interagiert Neurogenin 2 auch direkt mit CBP (Sun et al., 2001). Die Acetylierung könnte daher nicht nur bei der Stabilisierung von p27 eine Rolle spielen, sondern auch bei der Bildung von Proteinkomplexen, die zur Transkription von spezifischen Differenzierungsprogrammen benötigt werden (Campaner et al., 2010; Hydbring et al., 2010).

Der Acetylierungsstatus von p27 sollte jedoch auch bei zellulärer Quieszenz überprüft werden. Zwei geeignete Zell-Linien wären die murine NIH3T3- und die humane Glioblastom-T98G-Zell-Linie, die durch Serumentzug reversibel in die G0-Phase eintreten. Erste Experimente zum Acetylierungsstatus von p27 nach Serumentzug sowie nach Behandlung von NIH3T3-Zellen mit HDAC-Inhibitoren (Abbildung 3.5) wurden während dieser Arbeit durchgeführt. Eine Acetylierung von p27 in NIH3T3-Zellen konnte jedoch nicht klar nachgewiesen werden, was insbesondere auf die Detektion der leichten Antikörper-Ketten nach der IP zurückzuführen war.

Inwieweit die Acetylierung von K190 auch bei der Aufrechterhaltung der G0-Phase eine Rolle spielt, muss in weiteren Experimenten abgeklärt werden. p27 bleibt nach dem Eintritt in die G0-Phase posttranslational heraufreguliert. Die Stabilität des Tumorsuppressors scheint aber hier durch Kinasen reguliert zu sein. p27 wird in der G0-Phase an S10 von den Kinasen MINK (*minibrain related kinase*) und DYRK1B (*dual tyrosine phosphorylation related kinase-1*) sowie an T198 durch die Kinase AMPK (*AMP activated protein kinase*) phosphoryliert. Dies führt in der Folge zur Akkumulation von p27 auf Proteinebene (Deng et al., 2004; Besson et al., 2006; Kossatz et al., 2006; Liang et al., 2007). Daher scheint die Acetylierung im Hinblick auf die gesteigerte Stabilität von p27 eine untergeordnete Rolle zu spielen, insbesondere auch, weil CDK2 aufgrund der fehlenden Cyclin-Untereinheiten inaktiv vorliegt. Doch auch hier liegen Zelltyp-abhängige Ausnahmen vor. Eine Veröffentlichung beschreibt die Phosphorylierung an T187 und S10 durch CDK5 (Kawauchi et al., 2006). CDK5 wird im Komplex liegend mit der Nicht-Cyclin-Untereinheit p35 in postmitotischen Neuronen aktiviert. Die Phosphorylierung an T187 trägt auch hier wieder zum Abbau von p27 bei.

Die Acetylierung von p27 könnte jedoch auch an der Regulierung der Phosphorylierung von S10 und T198 beteiligt sein, wobei insbesondere bei der S10-Phosphorylierung interessante Zusammenhänge bestehen könnten. CBP/p300 binden an phosphorylierte Serine, die von einem Prolin (P) flankiert sind (Tang et al., 2007). Diese Voraussetzung gilt für S10 und für P11 von p27. Flag-getaggtetes p27 läuft in der SDS-PAGE auf Grund der Phosphorylierung an S10 als Doppelbande, wobei phosphoryliertes p27 etwas höher migriert (Abbildung 1.1; Ishida et al., 2001; Ishida et al., 2002). Im Laufe dieser Arbeit konnte eine Acetylierung von p27 nach Überexpression von CBP oft nur bei phosphoryliertem p27 festgestellt werden (nicht

gezeigt). Die Phosphorylierung von S10 könnte daher auch die Voraussetzung für die Bindung von CBP/p300 an p27 sein und damit die Acetylierung regulieren. Zukünftige experimentelle Ansätze wären eine Co-IP zwischen einer Phospho-Mimikry p27S100D- und einer nicht mehr phosphorylierbaren p27S10A-Mutante und CBP durchzuführen, sowie den generellen Acetylierungsstatus bei den Mutanten, verglichen mit dem p27wt-Protein, zu überprüfen.

Werden bei diesen Experimenten Unterschiede detektiert, könnte die Acetylierung auch an der Regulierung der Lokalisation von p27 beteiligt sein. Die Phosphorylierung an S10 ist Voraussetzung für den nukleären Export von p27 und wird in der frühen G1-Phase von der Kinase KIS (*kinase interacting stathmin*) gesteuert. Nach Phosphorylierung bindet das Exportin CRM1 in der CDK-Bindungsdomäne und exportiert p27 ins Zytoplasma (Rodier et al., 2001; Ishida et al., 2002; Connor et al., 2003). Dabei interagiert p27 über R90 mit Proteinen des Kernkomplexes (Muller et al., 2000). Hier wäre die Vermutung, dass eine Acetylierung von K100 an der Interaktion mit dem Kernkomplex und am Export beteiligt ist. Die Inkubation von NIH3T3-Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Na-Butyrat führte zu einer Akkumulation von p27 im Kern (Chen und Faller, 2005). Dies spricht für eine Inhibierung des Exportes von p27 nach der Acetylierung. Lokalisationsstudien nach Behandlung von NIH3T3-Zellen mit Na-Butyrat sowie Co-IPs zwischen CRM1 und p27-Acetylierungsmutanten könnten über mögliche Interaktionen Aufschluss geben.

Von genereller Bedeutung wäre es auch zu überprüfen, wo die Interaktion von p27 mit CBP und die Acetylierung erfolgt. In den letzten Jahren beschreiben einige Veröffentlichungen die Lokalisation von HATs wie CBP/p300 im Zytoplasma. Eine Arbeitsgruppe beschrieb die zytoplasmatische Bindung von CBP an ein phosphoryliertes Serin des aktivierten Interferon-alpha-Rezeptors-2 nach Behandlung von Hela-Zellen mit Interferon-alpha (Tang et al., 2007). Anschließend erfolgte die Acetylierung von K399, was wiederum eine Bindungsstelle für den Interferon-regulatorischen-Faktor-9 (IRF9) an den Rezeptor generierte. Der regulatorische Faktor dient dann als Plattform für die Acetylierung und Aktivierung eines Transkriptionskomplexes, der nach dem Kernimport spezifisch für die Transkription von antiviralen Genen sorgt. Wie genau die zytoplasmatische Lokalisation von CBP geregelt ist, konnte aber in der Veröffentlichung nicht gezeigt werden.

Ein weiteres Beispiel für die Lokalisation von CBP im Zytoplasma steht im Zusammenhang mit der Fähigkeit der HAT, auch als E3- und E4-Ubiquitin-Ligase zu fungieren (Grossman et al., 2003). CBP polyubiquitiniert p53 in U2OS- und MCF10A-Zellen im Zytoplasma, aber nicht im Kern (Shi et al., 2009). Sowohl wie der Kernexport als auch die spezifische Substraterkennung geregelt ist, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

In einer anderen Veröffentlichung erfolgte die Lokalisation von CBP in das Zytoplasma nach Behandlung von HEK293-Zellen mit UV-Licht. CBP acetyliert dort KU70, was zur Folge hat, dass das pro-apoptotische BAX nicht mehr an KU70 binden kann. BAX bindet daraufhin an die mitochondriale Membran und depolarisiert sie, wodurch die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (Cohen et al., 2004).

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschreibt auch eine gesteigerte HAT-Aktivität von CBP und p300 nach DNA-Schädigung durch UV, ionisierende Strahlung und dem alkylierenden Agens Doxorubicin. Die Acetylierung von Transkriptionsfaktoren wie p53 (Gu und Roeder., 1997; Tang et al., 2008), p73 (Costanzo et al., 2002) und pro-apoptotischen Proteinen wie BAX (Cohen et al., 2004) sorgt für den Stopp des Zellzyklus und, wenn die Schädigung der DNA zu groß ist, für den Eintritt in die

Apoptose. Als verantwortlich gesehen für den Arrest des Zellzyklus nach DNA-Schädigung wird das CIP/KIP-Familienmitglied p21, welches durch den Transkriptionsfaktor p53 heraufreguliert wird (Vogelstein et al., 2000). Eine direkte Rolle für p27 in der Einleitung des Arrests nach DNA-Schädigung war bisher nicht bekannt. Interessanterweise beschreibt nun eine Veröffentlichung die Rolle von p27 in der Aufrechterhaltung des Arrests nach DNA-Schädigung durch Doxorubicin in der humanen Lungenkarzinom-Zell-Linie A594 (Cuadrado et al., 2009). Der Arrest geht einher mit der initialen Heraufregulierung von p21 durch p53. Nach 24 Stunden erfolgt auch eine posttranslationale Akkumulation und Stabilisierung von p27, welche entscheidend für die Aufrechterhaltung des Arrests ist. Wie die genaue posttranslationale Stabilisierung von p27 erfolgt, ist nicht bekannt, aber offenbar spielt die Doxorubicin-aktivierte Kinase p38 bei der Signaltransduktion eine Rolle. CBP und p300 sind ebenfalls ein Ziel der Kinase beim Zellzyklus-Arrest und der Regulierung der Apoptose nach Inkubation von cardiären Zellen mit Doxorubicin (Poizat et al., 2005). Daher besteht möglicherweise ein Signalweg über die Regulierung der HAT-Aktivität durch die Kinase hin zur folgenden Acetylierung und dem posttranslationalen Anstieg von p27 als Antwort auf die DNA-Schädigung.

4.5.1 Modell zur Regulierung und Funktion der Acetylierung von der G0- bis zu S-Phase

Der Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus aus der G0-Phase heraus geht einher mit der stetigen Runterregulierung von p27 auf posttranslationaler Ebene und einer 5 – 8 fachen verkürzten Halbwertszeit (Nakayama und Nakayama, 2006). Der Abbau von p27 in der frühen G1-Phase erfolgt zum einen durch den zytoplasmatischen Ubiquitin-Ligase-Komplex KPC1 (Kamura et al., 2004) und zum anderen durch einen bisher unbekannten Abbaumechanismus, der aber unabhängig vom SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex ist (Malek et al., 2001). Die bisherigen experimentellen Daten lassen bisher auf keinen Zusammenhang zwischen den beiden genannten Abbauprozessen und der Acetylierung von p27 schließen, sowohl die K100-Acetylierung als auch die K190-Acetylierung scheinen primär im Zusammenhang mit dem SCF^{SKP2}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex vermittelten Abbau von p27 am G1/S-Phase-Übergang zu stehen. Da die K190-Acetylierung möglicherweise die Phosphorylierung von p27 an T187 inhibiert und die K100-Acetylierung die Phosphorylierung durch den CDK2/Cyclin E-Komplex verstärkt, ergibt sich die Frage, durch welche Prozesse die Acetylierung gesteuert und wann der stabilisierende und wann der abbauende Signalweg in der G1-Phase überwiegt.

Ein Modell könnte so aussehen: p27 liegt zu Beginn der G1-Phase an K190 acetyliert vor. Überwiegen mitogene proliferierende Signale wird p27 zunächst an K100 acetyliert. Die Acetylierung ermöglicht die Bindung der aktivierten SRC-Kinasen an p27. Durch die Tyrosin-Phosphorylierung wird der gebundene CDK4/CDK6-Inhibitor zu einem gebundenen Nicht-Inhibitor. Durch die Phosphorylierung von RB durch CDK4/CDK6 wird der Restriktionspunkt überschritten. Die K190-Acetylierung wirkt zunächst inhibierend auf die T187-Phosphorylierung von p27 durch CDK2. Es kommt in der Folge zur schrittweisen Entfernung der K190-Acetylierung durch eine aktivierte HDAC. CDK2 phosphoryliert T187 und die S-Phase kann durch den Abbau von p27 und die folgende Hyperphosphorylierung von RB eingeleitet werden (Abbildung 4.1).

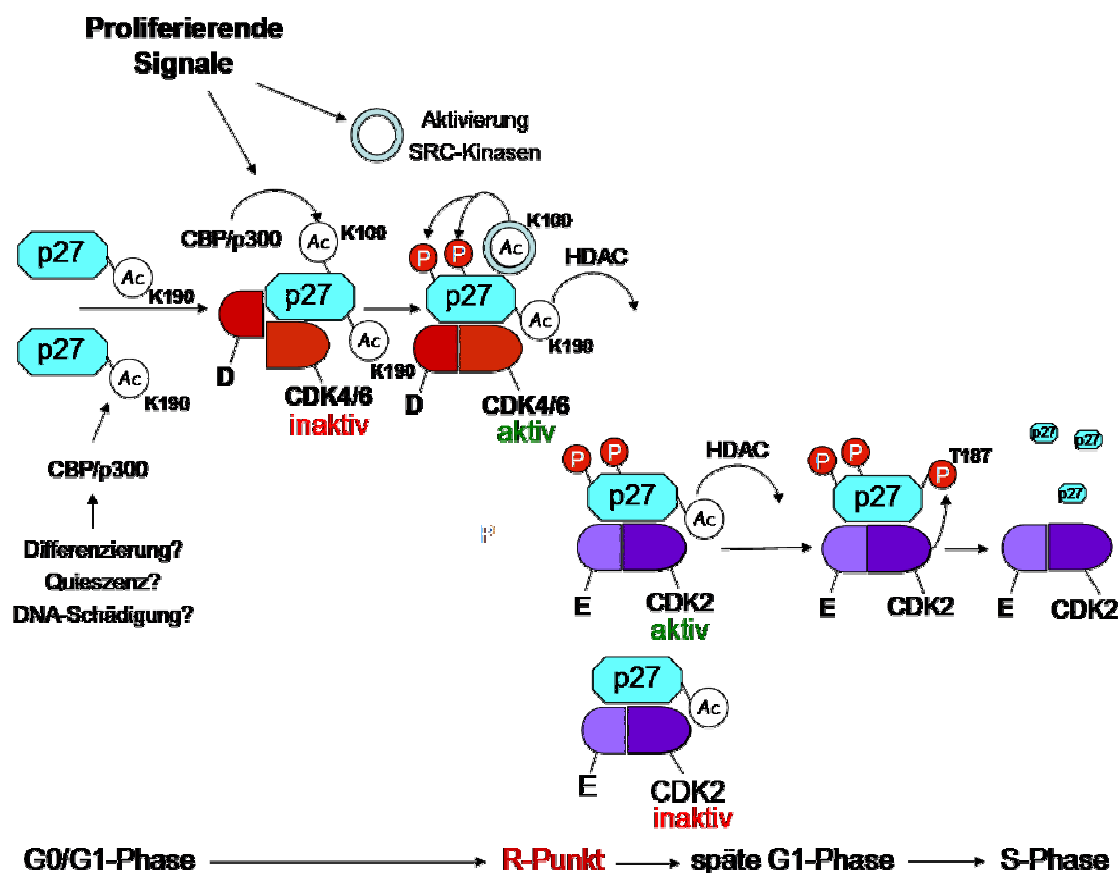


Abbildung 4.1: Modell zur Regulation und Funktion der p27-Acetylierung in der G1-Phase

Mögliche Komplexbildungen von Proteinen wie RB, CDK2, CBP/p300 und p27 an der DNA sind zur besseren Übersicht nicht aufgeführt.

Da die Ereignisse vor dem Restriktionspunkt dynamischen Regulationsprozessen unterliegen, sollte bei ausreichenden antiproliferierenden Signalen auch der umgekehrte Weg ablaufen können: p27 wird an K100 deacetyliert und wiederum an K190 acetyliert, was wiederum den Zellzyklus verstärkt in die G1-Phase arretieren würde. Interessanterweise wird ein ähnliches Acetylierungs/Deacetylierungs- und Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-Modell auch für RB propagiert. (Wong und Weber, 2007). Bei diesem Modell liegt RB unter verschiedenen Bedingungen wie Kontaktinhibierung (Wong und Weber, 2007), Eintritt in die Differenzierung (Nguyen et al., 2004) sowie als Antwort auf Schädigung der DNA (Markham et al., 2007) stark acetyliert durch p300 vor. Die Acetylierung geht dabei einher mit einer Hypophosphorylierung von RB (Chan et al., 2001; Iyer et al., 2007). Beim Fortschreiten der G1-Phase erfolgt die Deacetylierung durch SIRT1 (Wong und Weber, 2007). Gleichzeitig kommt zu einer Hyperphosphorylierung des Tumorsuppressors durch CDK2. Die Prozesse, die die Acetylierung/Deacetylierung von RB durch p300 und SIRT1 regulieren, sind wiederum Teil der Zellzyklus-Kontrolle und werden vermutlich wiederum selbst durch Kinasen/Phosphatasen gesteuert.

4.5.2 Die Regulierung der Acetylierung durch Kinasen

Neben der Regulierung der Acetylierung von p27 durch Deacetylasen in der G1/S-Phase ist es wahrscheinlich, dass auch die Substraterkennung und die Aktivität von CBP/p300 sowohl von antiproliferierenden Signalen als auch von proliferierenden Signalen gesteuert werden. Generell kommen hier Kinasen als Signalübermittler als Antwort von veränderten Zellbedingungen in Frage. Erste Daten zeigen, dass CDK2 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Substraterkennung als auch bei der Regulierung der HAT-Aktivität von CBP und p300 spielt (Abbildung 3.19 und 3.20; Ait si Ali et al., 1999; Felzien et al., 1999; Snowden et al., 2000). Darüberhinaus wurde in einem Experiment überprüft, ob weitere Kinasen an der Regulierung der HAT-Aktivität von CBP und der Acetylierung von p27 beteiligt sind (Abbildung 3.27).

Eine interessante Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen ist die PKC-Familie, die etwa 2% des humanen Kinoms ausmacht. Deren 11 Mitglieder werden aktiviert durch Diacylglycerol (DAG) und Kalzium sowie durch eine Reihe von allosterisch wirkenden Phorbolestern wie TPA (Tetradecanoyl-Phorbolacetat). Die einzelnen Mitglieder sind beteiligt an einer Vielzahl von diversen zellulären Prozessen wie der Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose, Migration und dem Glukose-Stoffwechsel. Einzelne Mitglieder können bei diesen Prozessen als Onkogene (PKC ϵ), andere wiederum als Tumorsuppressor-Proteine fungieren. Für PKC δ , eine Kinase, die in vielen Geweben exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass die Überexpression oder die Aktivierung durch den Phorbolster PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) zu einem posttranslationalen Anstieg von p27 führt, der mit einem G1-Phase-Arrest verbunden ist (Frey et al., 1997; Harrington et al., 1997; Ashton et al., 1999). Interessanterweise konnte PKC δ auch als Kinase für CBP identifiziert werden. Die Phosphorylierung von CBP an S89 führte dabei zu einem Verlust der HAT-Aktivität von CBP (Yuan und Gambée, 2000; Yuan et al., 2002). Dadurch ergab sich der Hinweis, dass PKC δ möglicherweise die Acetylierung von p27 regulieren und die Stabilität beeinflussen könnte. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven PKC δ -Mutante zu einem vollständigen Verlust der Acetylierung führt, wobei gleichzeitig erhöhte p27-Proteinmengen auf dem Blot detektiert werden konnten (Abbildung 3.27). Daher könnte PKC δ ein wichtiger Faktor bei der TPA- und IFN- γ -induzierten Seneszenz in einem U937-Differenzierungsmodell sein (Hydbring et al., 2010). Erhöhte Mengen von p27 führen in diesem Modell zu einer Inhibierung der Kinase-Aktivität von CDK2, wodurch überexprimiertes c-MYC nicht mehr an S62 phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung ist jedoch entscheidend für die Transkription von Genen wie *h-TERT*. Kommt es zu keiner Transkription wird die Seneszenz in den Zellen eingeleitet. Gleichzeitig könnte die Inhibierung der HAT-Aktivität bedeuten, dass CBP nicht mehr als Co-Aktivator für die c-MYC-abhängige Transkription fungiert, sondern als Repressor, der je nach Phosphorylierungsstatus HDACs, wie z.B. HDAC3 heranzieht und dadurch c-MYC negativ reguliert (Sankar et al., 2008). Auf der anderen Seite könnte die Phosphorylierung von CBP durch CDK2 zu einer erhöhten HAT-Aktivität führen, wobei CBP in diesem Fall als Co-Aktivator von c-Myc fungieren würde (Ait si Ali et al., 1999).

Eine weitere interessante Kinase aus der PKC-Familie ist PKC α . Diese besitzt je nach Zelltyp onkogene oder antiproliferierende Eigenschaften, die wiederum zu einer verstärkten Expression von p27 führen (Frey et al., 1997; Gao et al., 2009). Auch diese Kinase phosphoryliert CBP, jedoch nicht an S89, sondern an unbekannter Stelle, was mit einer erhöhten HAT-Aktivität verbunden ist (Yuan et al., 2002). Die Überexpression von p27 mit PKC α führte zu einer starken Runterregulierung von p27 in HEK293-Zellen, bei gleichzeitiger Überexpression mit CBP kommt es jedoch

zu einer Akkumulation von p27 auf Proteinebene, wobei p27 stark acetyliert vorlag (nicht gezeigt). Daneben konnte gezeigt werden, dass sowohl PKC α als auch PKC δ direkt mit p27 interagieren, was bisher nicht veröffentlicht wurde. Daher ergeben sich hier weitere Fragen an zukünftige Experimente: Wann und in welchen Zellen interagiert p27 mit den beiden Kinasen und wie wird die Acetylierung von p27 reguliert? Erste Experimente könnten beispielsweise in dem erwähnten U937-Differenzierungsmodell erfolgen. Von Interesse wäre hier den Phosphorylierungsstatus von CBP an S89 sowie eine mögliche Interaktion von CBP mit c-MYC an Promotoren wie dem von *hTERT* oder *cyclin-D2* zu überprüfen.

Ein weitere Kinase, die an der Acetylierung von p27 beteiligt sein könnte, ist die Glycogen-Synthase-3-Kinase (GSK-3). Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen hat GSK3 die höchste Aktivität in ruhenden Zellen, welche einhergeht mit der Regulierung der Proliferation und Differenzierungsprozessen (Marcus et al., 1998; Hoeflich et al., 2000). Ein bekanntes GSK-3-Substrat ist c-MYC, wobei die Phosphorylierung an S62 Voraussetzung für die Phosphorylierung an T58 durch GSK3 ist (Vervoorts et al., 2006). Die Phosphorylierung führt zu verstärkter Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors, wodurch die Differenzierung der Zelle eingeleitet wird. Ein interessanter Zusammenhang, dass GSK-3 an der Regulierung der Acetylierung und der Stabilität von p27 beteiligt sein könnte, ergab sich aus einer Veröffentlichung von 2008. Nach Inkubation mit dem HDAC-Inhibitor Na-Butyrat erfolgt in der Colonkarzinom-Zell-Linie HT29 ein Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase, der einher geht mit der Differenzierung der Zellen. Gleichzeitig konnte eine starke Heraufregulierung von p27 auf Proteinebene festgestellt werden, welche zu Inhibierung der Kinase-Aktivität von CDK2 führte. Eine pharmakologische Inhibierung von GSK-3 führte dagegen zu einer Aufhebung des G0/G1-Arrests und einer Reaktivierung der Kinase-Aktivität von CDK2 (Wang et al., 2008). Somit scheint GSK-3 eine wichtige Rolle bei der durch HDAC-Inhibitoren vermittelten antiproliferierenden Signaltransduktion zuzukommen. Deshalb wurde in einem Experiment überprüft, inwieweit die Überexpression von GSK-3 β , neben GSK-3 α eine Isoform von GSK-3, zu einer veränderten Acetylierung von p27 führt (Abbildung 3.27). Hier konnte eine klare Zunahme der Acetylierung von p27 nach Überexpression mit GSK3- β und CBP im Vergleich zur alleinigen Überexpression von p27 mit CBP festgestellt werden. Auch konnte eine direkte Interaktion von p27 mit GSK-3 β detektiert werden (nicht gezeigt). In zukünftigen Experimenten bleibt die Frage zu klären, wie es zu der verstärkten Acetylierung von p27 kommt. Hierbei sind mehrere Modelle denkbar. Eine mögliche Phosphorylierung von CBP durch GSK-3 β könnte zu einer verstärkten HAT-Aktivität und zur Acetylierung von K190 führen, was den Tumorsuppressor p27 stabilisieren und die Differenzierung der Zelle einleiten würde. Andererseits könnte auch p27 durch GSK-3 β an einem Serin phosphoryliert werden, was Voraussetzung für eine nachfolgende Bindung und Acetylierung durch CBP und p300 sein könnte (Tang et al., 2007).

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (München), Amicon (Billerica, USA), AppliChem (Darmstadt), BioRad Laboratories GmbH (München), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Difco (Lawrence, USA), Eurogentech (Lüttich, B), Gibco BRL (Eggenstein), Invitek (Berlin), Invitrogen (Leck, NL), Merck (Darmstadt), Metabion (Martinsried), QIAGEN (Hilden), Roche Diagnostic GmbH (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Enzyme zur Restriktion und Modifikation von DNA stammen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot). New England Biolabs GmbH (Frankfurt) und Stratagene (Berlin).

Verbrauchsmaterialien des täglichen Laborbedarfs stammen von den Anbietern Applied Biosystems (Darmstadt), BioRad Laboratories GmbH (München), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Heraeus (Osterode), Herolab (Wiesloch), Kodak (Stuttgart), Sarstedt (München), Serva (Heidelberg), Schott Glaswerke (Mainz), Whatman (Maidstone, GB).

5.2 Reaktionskits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
NucleoBond Extra Maxi Plus (Macherey und Nagel, Düren)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Kleve)

5.3 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden für die Amplifikation, Mutagenese und Sequenzierung von DNA verwendet. Generiert wurden die Primer für die Mutagenese von einem Programm der Firma Stratagene. Dieses ist im Internet unter www.stratagene.com zu finden. Die Firma MWG synthetisierte die Primer. Die Sequenzierung der DNA erfolgte ebenfalls bei MWG und bei der Firma Seqlab.

Primer für die Mutagenese und die Amplifikation von DNA

Name	Sequenz 5' > 3'
K189R-for	GAGCAGACGCCCAGGAAGCCTGGCCTC
K189R-rev	GAGGCCAGGCTTCCTGGGCGTCTGCTC
K190R-for	GGAGCAGACGCCCCAAGAGGCCTGGCCT
K190R-rev	AGGCCAGGCCTCTTGGGCGTCTGCTGCTCC
K153R-for	TGCGCAGGAATAAGGAGGAGGCCTGCAACC
K153R-rev	GGTTGCAGGCCTCCTCCTTATTCCTGCGCA
K165R-for	ACGATTCTTCTACTCAAAACAGAAGAGCCAACAGAACAGAA
K165R-rev	CTTCTGTTCTGTTGGCTCTTCTGTTTTGAGTAGAAGAATCGT
K59R-for	GAGGCTAGCCAGCGCAGGTGGAATTTTCGATTTT
K59R-rev	GAAAATCGAAATTCCACCTGCGCTGGCTAGCCT
K68R-for	TGGAATTTTCGATTTTCAGAATCACAGACCCCTAGAGGGC
K68R-rev	GCCCTCTAGGGGTCTGTGATTCTGAAAATCGAAATTCCA
K73R-for	ACCCCTAGAGGGCAGGTACGAGTGGCAAG
K73R-rev	CTTGCCACTCGTACCTGCCCTCTAGGGGT
K81R-for	GAGTGGCAAGAGGTGGAGAGGGGCAGCTTG
K81R-rev	CAAGCTGCCCCCTCTCCACCTCTTGCCACTC
K25R-for	GGCGGAGCACCCCAGGCCCTCGG
K25R-rev	CCGAGGGCCTGGGGTGCTCCGCC
K47R-for	AGTTAACCCGGGACTTGAGAGGCACTGCAGAG
K47R-rev	CTCTGCAGTGCCTCTCCAAGTCCCGGGTTAAC
K96R-for	CCGCGGCCCCCCCAGAGGTGCCTGC
K96R-rev	GCAGGCACCTCTGGGGGGCCGCGG
K100R-for	AAAGGTGCCTGCAGGGTGCCGGCG
K100R-rev	GCGCCGGCACCCCTGCAGGCACCTT
K134R-for	CATTTGGTGGACCCAAGGACTGATCCGTCGGA
K134R-rev	TCCGACGGATCAGTCCTTGGGTCCACCAAATG
K100Q-for	AAAGGTGCCTGCCAGGTGCCGGCG
K100Q-rev	GCGCCGGCACCTGGCAGGCACCTTT
K189Q-for	CTGAGGCCAGGCTGCTTGGGCGTCTGC
K189Q-rev	GAGCAGACGCCCCGAGAAGCCTGGCC
K190Q-for	GCAGACGCCCCAAGCAGCCTGGCCTCAG
K190Q-rev	CTGAGGCCAGGCTGCTTGGGCGTCTGC
p27- <i>StuI</i> -for	GCAGGAATAAGGAAGAGGCCTGCAACCGACGATTG
p27- <i>StuI</i> -rev	GAATCGTCGGTTGCAGGCCTCTTCCTTATTCCTGC
p27- <i>NheI</i> -for	CGTCGGACAGCCAGACCGGTTTAGCGGAGCAATGC
p27- <i>NheI</i> -rev	GCATTGCTCCGCTAAACCGGTCTGGCTGTCCGACG
p27- <i>XhoI</i> -for	TCCGACGGATCAGTCCTTGGGTCCACCAAATG
p27- <i>XhoI</i> -rev	CGGGCTCGAGTCTTACGTTTGACGTCTTCTGAGCC
K189,190R-for	GTGGAGCAGACGCCCAGGAGGCCTGGCCT
K189,190R-rev	AGGCCAGGCCTCCTGGGCGTCGTCTGCTCCAC
K189,190Q-for	GGAGCAGACGCCCCGAGGAGCCTGGCCTCAG
K189,190Q-rev	CTGAGGCCAGGCTCCTCGGGCGTCTGCTGCTCC
p27ΔK-R100K-for	GGGGTGCTGCAAGGTGCCGGCG
p27-ΔK-R100K-rev	CGCCGGCACCTTGCAGGCACCCC
p27-ΔK-R189K-for	GTGGAGCAGACGCCCCAAGCGACCTGGCCTCAGA
p27-ΔK-R189K-rev	TCTGAGGCCAGGTCGCTTGGGCGTCTGCTCCAC
p27-ΔK-R190K-for	GAGCAGACGCCCCGTAAACCTGGCCTCAG
p27-ΔK-R190K-rev	CTGAGGCCAGGTTTACGGGGCGTCTGCTC

p27-T187A-for	GTTCTGTGGAGCAGGCGCCCAAGAAGCCT
p27-T187A-rev	AGGCTTCTTGGGCGCCTGCTCCACAGAAC

Primer für die Sequenzierung von DNA

Name	Sequenz 5' > 3'
Sp6-MWG	CATTAGGTGACACTATAG
Sp6-Seqlab	ATTAGGTGACACTATAG
pGEX 5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Oligonukleotide für den *Knockdown* von p300 und CBP

Für den *Knockdown* von CBP und p300 wurde das pSUPER RNAi System™ verwendet (Brummelkamp et al., 2002). Die Sequenzen für den *Knockdown* wurden durch ein Programm der Firma DHARMACON generiert, welches im Internet unter www.dharmacon.de zu finden ist. Die Firma MWG synthetisierte die Oligonukleotide. Anschließend wurden die Oligonukleotide in den pSuper-Vektor einkloniert.

Name	Sequenz 5' > 3'
CBP-RNAi-for	GATCCCCGCGCAAGACTAATGGAGGATTCAAGAGATCCTCCAT TAGGAATCAGTGCACC
CBP-RNAi-rev	AGCTTTTCCAAAAAGCGCAAGACTAATGGAGGATCTCTTGAATC CTCCGTACTTCAGCC
p300-RNAi-for	GATCCCCGGACACAGAATATCAATTCAAGAGATTGATATTGCCC TTCCTAGGACTGAC
p300RNAi-rev	AGCTTTTCCAAAAAGGACACAGGGCAATATCAATCTCAAGAAAT ACATGTTGTCTGGGG

5.4 Plasmide

Eukaryotische Expressionsplasmide

pEQ176P2	Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit <i>PvuII</i> und Religation des verbliebenen Vektors wurde ein Großteil der vorhandenen β -Galactosidase-cDNA entfernt. Dieser Vektor wurde zum Auffüllen von transienten Transfektionsansätzen auf gleiche DNA-Mengen verwendet. (Firzlaff et al., 1991)
pSC2 ⁺ Flag-p27	Die humane cDNA von p27 wurde über die <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Schnittstellen in den Vektor einkloniert. Die Expression von p27 liegt unter der Kontrolle des CMV-Promotors. p27 liegt nach Expression als Flag-Fusionsprotein in der Zelle vor.

pSC2 ⁺ Flag-p27 ΔK	Der Aufbau des Vektors entspricht dem des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden alle 17 für Lysine kodierende Basen-Triplets in der p27-DNA-Sequenz gegen für Arginin kodierende Basen-Triplets ausgetauscht.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>NheI/StuI</i> wurde die mittlere DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch werden in den zuvor nicht für Lysine kodierenden pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor die Lysine 59, 68, 73, 81, 96, 100, 143, 153 in der p27-DNA-Sequenz eingeführt.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K59, 68, 73, 81, 96, 100, 134R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Schnittstellen <i>NheI/StuI</i> wurde die mittlere Sequenz von p27 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Die p27-DNA-Sequenz in diesem Vektor kodiert nun nicht mehr für die Lysine, sondern für die Arginine 59, 68, 73, 81, 96, 100, 134.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>XhoI/StuI</i> wurde die C-terminale p27-DNA-Sequenz gegen die C-terminale p27ΔK-Sequenz ausgetauscht. Dadurch kodiert die p27-DNA-Sequenz nun für die Arginine 165, 189, 190.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 73, 81, 96, 100, 134,153R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>XhoI/StuI</i> wurde die C-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektors gegen die C-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch entsteht eine p27-DNA-Sequenz, die im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor für die Lysine 165, 189, 190 kodiert.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>BamHI/NheI</i> wurde die N-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors gegen die N-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektors ausgetauscht. Die p27-DNA-Sequenz kodiert nun für die Arginine 25 und 47 im pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektor.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K59, 68, 73, 96, 100,134,153, 165, 89, 190R	Über durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>BamHI/NheI</i> wurde die N-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektors gegen die N-terminale Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Die p27-DNA-Sequenz kodiert nun für die Lysine 25 und 47 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K96, 100, 134, 153R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere Sequenz der p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektors ausgetauscht. Dadurch wurden die für Lysine 96, 100, 134 und 153 kodierende p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektor gegen eine für Arginine kodierende Sequenz ausgetauscht.

pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 81,165,189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere DNA-Sequenz von p27 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch wurde die für Arginine 96, 100, 134, 153 kodierende p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen eine für Lysine kodierende Sequenz ausgetauscht.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 81, 96, 165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere DNA-Sequenz von p27 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch wurde die für Arginine 96, 100, 134, 153 kodierende p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen eine für Lysine kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht. Anschließend wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese die für die Lysin 96 kodierende DNA-Sequenz gegen eine für eine Arginin kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 81, 96, 100, 165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere DNA-Sequenz von p27 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27 Vektors ausgetauscht. Dadurch wurde die für Arginine 96, 100, 134, 153 kodierende DNA-Sequenz gegen eine für Lysine kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht. Anschließend wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese die für die Lysine 96 und 100 kodierende p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen eine für Arginine kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 81, 96, 100, 134, 165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere DNA-Sequenz von p27 im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch wurde die für Arginine 96, 100, 134, 153 kodierende DNA-Sequenz gegen eine für Lysine kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht. Anschließend wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese die für die Lysine 96, 100, 134 kodierende p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen eine für Arginine kodierende Sequenz ausgetauscht.
pSC2 ⁺ Flag-p27 K25, 47, 59, 68, 81, 100, 134, 165, 189, 190R	Über die durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführten Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI/StuI</i> wurde die mittlere p27-DNA-Sequenz im pSC2 ⁺ Flag-p27ΔK-Vektor gegen die mittlere DNA-Sequenz des pSC2 ⁺ Flag-p27-Vektors ausgetauscht. Dadurch wurde die für Arginine 96, 100, 134, 153 kodierende DNA-Sequenz gegen eine für Lysine kodierende DNA-Sequenz ausgetauscht. Anschließend wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese die für die Lysine 100 und 134 kodierende p27-DNA-Sequenz gegen eine für Arginine kodierende Sequenz ausgetauscht.
pVR1012Gal4-CBP	Die murine cDNA von CBP wurde als <i>BamHI</i> -Fragment aus dem pRSV-HA-CBP-Vektor über die <i>BamHI</i> -Schnittstelle in den pVR1012Gal4-Vektor einkloniert. (Snowden et al., 2000).

pCMV-CDK2	Humanes CDK2 unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde von Dr. Bernards, Division of Molecular Carciogenesis and Centre for Biomedical Genetics, Netherlands Cancer Institute zur Verfügung gestellt.
pCMV-Cyclin E	Humanes Cyclin E unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde von Dr. Bernards, Division of Molecular Carciogenesis and Centre for Biomedical Genetics, Netherlands Cancer Institute zur Verfügung gestellt.
pBabe-Puro	Ein retroviraler Expressionsvektor. Dieser kodiert für die Antibiotika-Resistenz Puromycin. Die Transkription erfolgt unter Kontrolle eines SV40-Promotors (Morgenstern und Land,1990)

Prokaryotische Expressionsplasmide

pGEX5'X3'-p27	Die humane p27-Sequenz wurde über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I in den Vektor einkloniert. Die Fusion der GST-Sequenz mit der p27-Sequenz erlaubt die Aufreinigung des Proteins durch Glutathion-Sepharose.
---------------	---

5.5 Antikörper

α - Aktin	Monoklonaler muriner IgG1-Antikörper, bindet an ein Epitop, welches von humanen Skelettmuskeln bis zu Pflanzen konserviert ist (MP-Biomedicals).
α - alpha-Tubulin (B-5-1-2)	Monoklonaler muriner Antikörper, bindet an ein alpha-Tubulin-Epitop (Sigma Aldrich).
α - p27 (G173-524)	Monoklonaler muriner IgG1-Antikörper, bindet an den N-Terminus von humanem p27 (BD Transductions Laboratories).
α - p27 (C19)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an den C-Terminus von humanem p27 (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-528).
α - pT187-p27	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an phosphoryliertes Threonin 187 von hp27 (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-16324).
α - CBP (A22)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an den N-Terminus von CBP (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-369).
α - p300 (C20)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an den C-Terminus von p300 (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-585).
α - AcK	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an acetylierte Lysine (Cell Signaling,#9441).
α - CDK2 (M2)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bindet an den C-Terminus von CDK2 (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-163).
α - Cyclin E (HE12)	Monoklonaler Maus-Antikörper, bindet an Cyclin E (Santa-Cruz-Biotechnology, sc-247).
α - AcK100-p27	Polyklonaler Ratten-Antikörper, bindet an acetyliertes Lysin 100 von humanem p27 (in Kooperation mit dem Institut für Immunologie des Helmholtz-Zentrum München).
α - Kaninchen IgG + IgM	sekundärer α -Kaninchen-Antikörper aus der Ziege, kovalent gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Jackson Immuno Research, 111-035-144).

α - Maus IgG + IgM	sekundärer α -Maus-Antikörper aus der Ziege, kovalent gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Jackson Immuno Research, 112-096-068).
α - Ratte IgG + IgM	sekundärer α -Ratte-Antikörper aus der Ziege, kovalent gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Jackson Immuno Research, 112-035-068).
α - HA (3F10)	Monoklonaler Ratten IgG1-Antikörper, bindet an die Peptidsequenz YPYDVDPYA (Roche).

5.6 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

5.6.1 Verwendete Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme:

DH5 α (Invitrogen)	<i>recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) Δ(lacZVA-argF)U169 supE44 dlacZΔM15 thi-1 gyrA96 relA1 deoR</i>
XL10-Gold (Stratagene)	<i>Tet^r D(mcrA) 183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>
BL21 (Stratagene)	<i>B F- dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]</i>

5.6.2 Verwendete Anzuchts- und Selektionsmedien für Bakterien

LB-Medium

1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl
pH = 7,0

Bacto-Agar (Difco)

Ampicillin (Invitrogen)

Zur Herstellung von Festmedium wurde 1,5% (w/v) Agar ins Medium gegeben. Sollte der Stamm unter selektiven Bedingungen anwachsen, wurden 100 μ g/ml Ampicillin ins Medium gegeben.

5.6.3 Protokolle für das Arbeiten mit Bakterien

5.6.3.1 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation

TB-Puffer

15 mM CaCl₂
250 mM KCL
10 mM HEPES
55 mM MnCl₂
pH 6.7; steril filtriert

LB-Medium (250 ml) wurde mit einer gut gewachsenen Übernachtskultur (5 ml) des gewünschten Zellstammes versetzt und bei 220 rpm und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,94 inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis gestellt und dann bei 4°C und 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TB-Puffer mit 7% DMSO resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aliquots (200 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 80°C gelagert.

5.6.3.2 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von DNA durch eine Empfängerzelle. Im Labor wird DNA in der Regel in Form von Plasmiden auf Bakterien übertragen.

Zur Transformation wurden 100 µl des zuvor bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterienstammes für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50-400 ng Plasmid-DNA zum Aliquot gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Wasserbad. Für weitere drei Minuten wurde der Stamm auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 37°C warmen LB-Mediums regenerierte der Stamm für eine Stunde bei 37°C. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch das Ausstreichen der Kultur auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C haben die Bakterien, die das Plasmid erhalten haben, auf dem Medium sichtbare Kolonien gebildet.

5.7 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)

5.7.1 Verwendete Zell-Linien

5.7.1.1 Humane Zell-Linien

HEK293 (ATCC CRL-1573):

Adhärenz epitheliale Zell-Linie aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), die mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert wurde. Das Ad5-Insert befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 19q15.2. Die Zell-Linie HEK293 ist eine hypotriploide Linie mit der modalen Chromosomenzahl $n = 64$, die man in ca. 30% der Zellen vorfindet.

MCF7 (ATCC HTB-22):

Adhärenz wachsende epitheliale Brustkrebs-Zell-Linie, 1970 isoliert.

HCT116 (ATCC HJS-35):

Adhärenz wachsende epitheliale Colonkarzinom-Zell-Linie.

5.7.1.2 Murine Zell-Linien

NIH3T3 (ATCC CCL92):

Adhärenz wachsende transformierte Fibroblasten, etabliert 1962.

5.7.1.3 Insekten Zell-Linien

Sf9 (ATCC CEP-76):

Ovar-Zell-Linie aus der Puppe von *Spodoptera frugiperda*.

5.7.2 Material für die Zellkultur

5.7.2.1 Material für die Zellkultur von humanen und murinen Zell-Linien

DMEM (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
RPMI (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
FCS (Gibco)	fötales Kälberserum
Penicillin/Streptomycin (Seromed)	10.000 Einheiten/ml (10.000 µg/ml)
PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,45 mM KH ₂ PO ₄
Trypsin/EDTA (Seromed)	0.5/0.02% (w/v) in PBS
Gewebekulturschalen (Sarstedt)	Durchmesser 6 cm, 10cm

5.7.2.2 Material für die Zellkultur von Insektenzellen

Grace Insekten Medium (Gibco)	10% (v/v) FCS (Gibco) 20 µg/ml Gentamycin (Merck)
Zell-Kultur Flaschen	175 cm ² und 75 cm ² (Greiner)

5.7.3 Kulturbedingungen

5.7.3.1 Kulturbedingungen für humane und murine Zell-Linien

Alle Zell-Linien wurden unter einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ und 37°C in Kulturschalen von 6 cm und 10 cm Durchmesser kultiviert. Die Zell-Linien HEK293 und NIH3T3 wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zell-Linien MCF7 und HCT116 wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Erreichten die Zell-Linien eine 90%ige Konfluenz in der Kulturschale, wurden die Zell-Linien

HEK293 und NIH3T3 1 : 10 mit frischen Medium vermischt, MCF7 und HCT116 dagegen 1 : 5.

5.7.3.2 Kulturbedingungen für Insektenzellen

Die Sf9-Insekten-Zell-Linie wurde in Suspension von 300 ml bei 60 rpm in einem Inkubator bei 27°C kultiviert. Die Kultur wurde alle drei Tage 1 : 5 mit frischem Medium vermischt.

5.7.4 Protokolle für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

5.7.4.1 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer

20 µl einer Zellsuspension wurden vorsichtig zwischen einem Deckgläschen und einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden die Zellen innerhalb von 4 x 4 Kleinquadraten (4 Großquadrate) der Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt. Aus den vier Summen der jeweiligen Großquadrate wurde ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl/ml ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = M \times V \times K$$

M = Mittelwert

V = Verdünnungsfaktor

K = 1×10^4 = Konstante der Zählkammer

5.7.4.2 Transiente Transfektion der Zell-Linien HEK293 und NIH3T3

a) mit der Calcium-Phosphat-Methode

CaCl-Lösung	250 mM
2 x Hebs-Puffer	274 mM NaCl 42 mM HEPES 9,6 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ auf pH = 7,3 einstellen
HEPES-Puffer	142 mM NaCl 10 mM HEPES 6,7 mM KCl auf pH = 7,0 einstellen

Zur transienten Transfektion von HEK293- und NIH3T3-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Methode verwendet (Chen und Okayama, 1988). Dabei präzipitiert die Plasmid-DNA in einem Komplex mit Calcium-Phosphat und wird von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen. Die DNA wird dann extrachromosomal transkribiert.

Am Tag vor der Transfektion wurden zunächst die Zellen in einer Konzentration von 3×10^5 (6 cm-Kulturschale) oder in einer Konzentration von 8×10^5 (10 cm-Kulturschale) ausgesät. Am folgenden Tag wurden dann 17 µg Plasmid-DNA mit 500 µl CaCl_2 -Lösung für eine 10 cm-Schale vermischt, für eine 6 cm-Schale wurden dagegen 7 µg Plasmid-DNA und 200 µl CaCl_2 -Lösung vermischt. Anschließend wurden 500 µl bzw. 200 µl 2 x Hebs zur Lösung gegeben, für 10 sec mit einem Vortexer vermischt und schließlich für weitere 10 Minuten inkubiert. Die Lösungen wurden dann ins Medium der Kulturschalen vorsichtig getropft. Die Inkubation erfolgte dann für 4 – 6 Stunden im Kulturschrank. Um das verbleibende, für die Zellen auf Dauer toxische Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitat von den Zellen zu entfernen, wurde das Medium abgesaugt und die Kulturschale für 10 min mit HEPES-Puffer gefüllt. Das HEPES löst den Komplex aus Calcium-Phosphat-DNA, welches dann abgesaugt wird. Die Zellen wurden dann bis zur Lyse für weitere 48 Stunden mit frischem Medium inkubiert.

b) mit dem *FUGENE 6 Transfection Reagenz* (Roche)

Das *FUGENE 6 Transfection Reagenz* (Roche) ist ein auf Lipiden basierendes Transfektionsreagenz. Hierbei bilden DNA und Lipide einen Komplex, der dann von den Zellen aufgenommen wird. Das *FUGENE 6 Transfection Reagenz* wurde verwendet für die Transfektion von MCF7- und HCT116-Zellen, die sich mittels Calcium-Phosphat-Methode nicht ausreichend transfizieren ließen.

Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben, dabei betrug das Verhältnis Reagenz zur DNA 3 : 2. Die Lyse der Zellen erfolgte 48 Stunden später.

5.7.4.3 Colony formation Assay

Methylen-Blau Lösung	0,2% (w/v) Methylen-Blau in Methanol gelöst
----------------------	--

Puromycin	1mg/ml
-----------	--------

FUGENE 6 Transfection Reagenz (Roche)

Ob ein Protein Auswirkungen auf das Zellwachstum hat, kann mit einem *colony formation* Assay überprüft werden. Dazu wird ein Plasmid mit der Sequenz des zu untersuchenden Proteins und ein Antibiotika-Resistenz (hier Puromycin) verleihendes Plasmid mittels Co-Transfektion in Zellen eingebracht. Danach wird mit einem Antibiotikum auf den Erhalt des Plasmides durch die Zellen selektioniert. Die Zellen, die ein Antibiotika-Resistenz verleihendes Plasmid erhalten haben, können hochwachsen und Kolonien bilden; die es nicht erhalten haben, sterben ab. Ob das exprimierte Protein einen Einfluss auf das Zellwachstums besitzt, lässt sich an der Zahl der Kolonien ausmachen. Wenn sich weniger Kolonien im Vergleich zu einer Leerkontrolle auf der Platte befinden, lässt das auf eine wachstumsinhibitorische Eigenschaft des zu untersuchenden Proteins schließen.

Am Tag vor der Transfektion wurden $2,5 \times 10^5$ HCT116-Zellen in 6 cm-Kulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit dem *FUGENE 6 Transfection Reagenz* (Roche) bei einer eingesetzten Plasmid-Menge von 4 µg und einem Verhältnis von 3 : 2 Reagenz/DNA. 0,4 µg eingesetzte Plasmid-DNA kodierte dabei für die Antibiotika-

Resistenz Puromycin. Puromycin wurde nach 8 Stunden in einer Konzentration von 2 µg/ml zum Medium gegeben und die Zellen wurden für 23 h inkubiert. Anschließend erfolgte der Wechsel des Mediums. Die Zellen wurden dann für weitere zehn Tage inkubiert. Zur Auswertung wurden die Platten zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Kolonien mit einer Methylen-Blau-Lösung angefärbt. Nach dem Waschen mit H₂O wurden die Platten an der Luft getrocknet und abschließend gezählt.

5.7.4.4 Plaque-Assay zur Bestimmung des Baculovirus-Titers

PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,45 mM KH ₂ PO ₄
Neutral-Rot-Lösung	0,5% steril filtriert in PBS
Plaque-Assay-Agarose (Roche)	1% autoklaviert in Grace-Medium

Die Bestimmung des Virus-Titers einer Lösung erfolgte durch einen Plaque-Assay. Der Titer ergibt sich dabei aus der Anzahl der *plaque forming units* pro ml (pfu/ml). Zur Bestimmung des Titers wurden in 6 *well*-Platten 2×10^6 Sf9-Insektzellen ausgesät. Die Zellen mussten dabei eine Viabilität von mindestens 95% aufweisen. Die Platten wurden dann anschließend für eine Stunde stehen gelassen, was die Anheftung der Sf9-Zellen an die Oberfläche ermöglichte. Gleichzeitig wurden Verdünnungen von Viren von 10^{-3} bis 10^{-7} in *Grace* Insekten Medium (Gibco) hergestellt. Das Medium der 6 *well*-Platten wurde vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden 500 µl der Verdünnungen pro *well* pepettiert. Die Anlagerung der Viren an die Insektzellen erfolgte für zwei Stunden bei 27°C. Ein *well* diente als Negativ-Kontrolle und wurde daher nur mit Insektenmedium überschichtet. Nach zwei Stunden wurde die Viruslösung vorsichtig abgesaugt und zu den *wells* wurde jeweils 2 ml 37°C warme Plaque-Assay-Agarose (Roche) gegeben. Zur Erhärtung der Agarose wurden die *wells* dann für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend wurde zur erhärteten Agarose noch 1 ml Insektenmedium gegeben. Die Auswertung des Plaque-Assays erfolgte nach 5 Tagen Inkubationszeit bei 27°C. Zu den *wells* wurde je 1 ml Neutral-Rot-Lösung gegeben. Die Färbung erfolgte für zwei Stunden bei 27°C. Nach dieser Zeit wurde überschüssige Neutral-Rot-Lösung abgesaugt und die Platten wurden auf dem Kopf für eine Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag konnten die einzelnen angefärbten Plaques gezählt werden. Nach Auszählung der Triplikate wurde der Mittelwert mit der jeweiligen Verdünnung multipliziert.

5.7.4.5 Amplifikation des Baculovirus-Titers

Die Virus-Amplifikation erfolgte durch die Infektion der Sf9-Zellen mit anschließender Ausknospung der neu gebildeten Viren. Zur Amplifikation wurde eine MOI (multiplicity of infection = Anzahl Virus-Einheiten pro Zellen) von 0,3 benötigt, daher wurden 8×10^6 Insektzellen mit $2,56 \times 10^6$ pfu des Virenstammes vermischt. Die Inkubation

erfolgte für 3 Tage bei 27°C in 175 cm² Zellkultur-Flaschen. Die Kultur wurde anschließend bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die neu gebildeten Viren. Der Überstand wurde mit 0,22 µm Filter sterilfiltriert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die Effizienz der Amplifikation wurde dann erneut mit einem Plaque-Assay überprüft.

5.7.4.6 Infektion von Sf9-Insektzellen mit Baculoviren

In einem kleinen Maßstab

Zur Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren wurde eine MOI von 2 gewählt. In einer 10 cm-Platte wurden 5×10^6 Sf9 Insektzellen ausgesät. Die Platte wurde 30 min zum Anheften der Sf9-Insektzellen an die Oberfläche stehen gelassen. Zu der Platte wurde eine Virus-Verdünnung von 10^7 Viren/ml gegeben. Eine Inkubation erfolgte für drei Tage bei 27°C. Anschließend wurde exprimiertes His-getaggttes CBP aufgereinigt.

In einem großen Maßstab

Um eine ausreichende Infektion der verwendeten eukaryotischen Sf9-Insektzellen in einem großen Maßstab zu gewährleisten, musste eine MOI von 5 vorliegen. Zur Infektion wurden daher 2×10^8 Insektzellen mit 1×10^9 Virenpartikeln vermischt. Zur Anheftung der Viren an die Oberfläche der Insektzellen wurde die Kultur für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Kultur wurde dann auf ein Gesamtvolumen von 300 ml mit Insekten-Medium aufgefüllt und für drei Tage bei 27°C inkubiert.

5.8 Molekularbiologische Methoden

5.8.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH = 8 10 mM EDTA bei 4°C gelagert
Lösung 2	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3M Kaliumacetat, pH = 4,8 5M Eisessig 10 mM Tris-HCl, pH = 7,4 1 mM EDTA
RNase	1 µg/ml

Mini-Präparationen:

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA in einem kleinen Maßstab von ca. 200 ng wurde das *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit* (MBI Fermentas) verwendet. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit einer *E.coli*-Kolonie über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Pelletierung der Kultur erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute. Eine spätere RNA-Kontamination wurde durch Resuspendierung in der RNase-haltigen Lösung 1 ausgeschlossen. Durch kurze Inkubation mit 250 µl der alkalischen, SDS-haltigen Lösung 2 erfolgte anschließend die Lyse der Bakterien. Die Zugabe von Kaliumacetat (350 µl Lösung 3) bewirkte die Neutralisation des Lysates. Bei diesem Schritt hybridisieren die Stränge der Plasmid-DNA schneller als die Stränge der chromosomalen DNA. Die Plasmid-DNA selbst wird an eine Silikat-Matrix gebunden und 2 x mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Ablösung der DNA erfolgte von der Säule mit einem TE-Puffer niedriger Ionenstärke. Die angereicherte reine DNA wurden für Standard-Klonierungen und PCR-Anwendungen verwendet.

Maxi-Präparationen:

Plasmide aus einer 250 ml Bakterien-Kultur wurden mittels Anionenaustauscher Chromatographie-Säulen aufgereinigt. Dafür wurde das *NucleoBond Extra Maxi Plus Kit* (Macherey und Nagel) verwendet. Die hier erhaltende DNA wurden für transiente Transfektionen in der Zellkultur verwendet. Die Ausbeute betrug in der Regel 1 – 2 µg reine Plasmid-DNA.

5.8.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit

Die Bestimmung der Plasmid-Konzentration und Reinheit erfolgte spektralphotometrisch mit dem Gerät *Nanodrop 1000* der Firma Thermo-Scientific. Dabei wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Diese sollte für DNA bei 1,8 liegen.

5.8.3 Restriktion von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben des Herstellers in den spezifischen Puffern. Die Enzyme und Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs GmbH bezogen. Pro 1 µg DNA wurden 1-2 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Dabei ist 1 Unit eines Restriktionsenzym definiert als die Enzymmenge, welche in einer Stunde bei 37°C 1 µg DNA an allen Erkennungssequenzen schneidet. Bei einem Restriktionsverdau von DNA mit zwei verschiedenen Endonukleasen wurde der Puffer nach Herstellerangaben verwendet, der die höchste Aktivität der beiden Enzyme gewährleistete.

Der Restriktionsverdau fand in der Regel über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde das Restriktionsenzym nach Herstellerangaben durch Hitze inaktiviert und die entstandenen DNA-Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

5.8.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH = 8 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
10 X DNA-Ladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH = 8 50 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol
Agarose	Low EEO (Sigma) NuSieve GTG Agarose (Biozym Scientific)
Ethidiumbromid	0,1 µg/ml

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte in einem elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Gesamtladung, bedingt durch die Phosphate, wandern Nukleinsäuren in einem Agarosegel von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ist dabei abhängig von der Molekülmasse, der angelegte Spannung, der Struktur und Konformation der Nukleinsäuren und der Konzentration des Agarosegels. Agarose ist ein Galaktosepolymer, welches nach Erwärmung ein Gitternetz bildet. Der Vernetzungsgrad ist dabei abhängig von der Konzentration der Agarose. Es wurden in dieser Arbeit Gele mit 0,8 – 1,2%igen Agaroseanteil mit einer Konzentration von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid benutzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1 x TBE-Puffer.

Die DNA-Lösung wurde zunächst mit 10 x DNA-Ladepuffer vermischt. Anschließend erfolgte die Trennung im elektrischen Feld. Der Ladepuffer zeigt die ungefähre Wanderungsgeschwindigkeit und Laufweite der Nukleinsäuren im Gel an. Waren die Nukleinsäuren im elektrischen Feld für eine saubere Auftrennung weit genug gelaufen, wurde das Gel aus der Kammer genommen. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit UV bei einer Wellenlänge von 302 nm. Dazu wurde der UV-Transilluminator mit dem *Fotodokumentationssystem 2000* (Herolab) genutzt.

5.8.5 Präparative Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur weiteren Klonierung nach einer PCR-Amplifikation oder einem Restriktionsverdau wurden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel nach der Elektrophorese mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) nach Angaben des Herstellers. Die abschließende Elution der DNA erfolgte mit 20 µl H₂O.

5.8.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit einem Plasmid über kohäsive Enden wurden 100 – 200 ng des Eingangsplasmids und ein dreifacher molarer Überschuss

des DNA-Fragmentes eingesetzt. Zum Ansatz kamen 2 µl 10 x Ligase-Puffer und 2 U T4-Ligase der Firma MBI Fermentas bei einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden 7 µl des Ansatzes für die Transformation von *E.coli* verwendet.

5.8.7 DNA-Sequenzierung

Nach einer PCR-Mutagenese von DNA-Sequenzen oder eines Ligationsansatzes wurden die isolierten Plasmide mittels DNA-Sequenzierung auf die gewünschte Mutation oder Insertion des DNA-Fragmentes untersucht. Dazu wurden Proben der Plasmid-DNA in einer Konzentration von 100 - 300 ng zu den Firmen SeqLab oder MWG geschickt. Der komplementäre Primer zum Start der Sequenzierung wurde je nach Art der Eingangssequenz des verwendeten Plasmides ausgewählt.

5.8.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5.8.8.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Der Reaktionsansatz betrug 50 µl, die Amplifikation erfolgte durch einen PCR-Cycler von MWG.

Komponente	Volumen
H ₂ O bidest.	41 µl
Template 25 ng/µL	1 µl
dNTPs 10mM	1 µl
Primer-Mix je 5 µM	1 µl
10 x <i>Pfu</i> -Polymerasepuffer (Stratagene)	5 µl
<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase 2,5 U (Stratagene)	1 µl

Verwendetes PCR-Programm für die Amplifikation von DNA

Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	40
Hybridisierung	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	4 min	
finale Elongation	72°C	8 min	1
Ende	4°C	∞	1

5.8.8.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die ortsgerechte Mutagenese von Plasmid-DNA beruht auf der klassischen PCR. Dabei erfolgen im DNA-Template gezielte Sequenzänderungen, wodurch neue Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen in die humane p27-Sequenz eingeführt wurden. In die kodierende p27-DNA-Sequenz wurden in dieser Arbeit auch Basen-Triplets ausgetauscht, die für eine andere Aminosäure in der Folge codieren. Die gewünschte Sequenzveränderung wird durch die verwendeten Primer gesetzt, die durch das *Quick Change Primer Design*-Programm der Firma Stratagene generiert wurden. Dieses ist im Internet unter www.stratagene.com zu finden. Die Primer binden mit einem Basenanteil komplementär an das DNA-Template, enthalten aber in der Mitte ihrer Sequenz nicht komplementäre Basen. Nach dem zweiten PCR-Zyklus ist die Sequenzveränderung etabliert und die verwendete DNA-Sequenz wird exponentiell amplifiziert.

Reaktionsansatz für 50 µl:

Komponente	Volumen
10 x <i>Pfu</i> -Polymerasepuffer	5 µl
Template 25 ng/µL	1 µl
dNTPs 10mM	1 µl
<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase 2,5 U (Stratagene)	1 µl
Primer-Mix je 5 µM	1 µl
H ₂ O bidest.	41 µl

Verwendetes PCR-Programm für die Mutagenese von DNA

Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1
Denaturierung	94°C	30 sec	18
Hybridisierung	55°C	1 min	
Elongation	72°C	5 min	
finale Elongation	72°C	8 min	1
Ende	4°C	∞	1

Nach der PCR wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *DpnI* inkubiert. Das Enzym erkennt die eingesetzte methylierte Plasmid-DNA und zerschneidet die Stränge. Die Methylierung der DNA erfolgte durch die Amplifikation des Plasmides in *E.coli*. Die neu in der PCR synthetisierte DNA enthält dagegen keine Methylierung und bleibt von dem Enzym *DpnI* unangetastet. Nach einer Stunde wurden dann 7 µl des Reaktionsansatzes für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

5.9 Proteinchemische Methoden

5.9.1 Aufreinigung von GST-Fusions-Proteinen aus *E.coli*

TNE-Puffer	20 mM Tris-Base pH = 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH = 8 5 mM DTT 1 mM Pefa-Bloc 1% (v/v) Trasylol
GST-Waschpuffer	100 mM Tris-Base pH = 8 120 mM NaCl
Gluthation-Lösung	200 mM Gluthation 20 mM HEPES pH = 8
GST-Elutionspuffer	20 mM Gluthation 100 mM Tris-Base pH = 8 120 mM NaCl
IPTG	1 M
Lysozym (500X)	50 mg/ml in TE
Glutathion-Sepharose (Sigma)	

Unter Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins versteht man die gezielte Isolierung eines Proteins, welches mit einem Glutathion-S-Transferase (GST) -Tag fusioniert vorliegt. Das Fusionprotein bindet mit dem Glutathion-S-Transferase-Tag an immobilisiertes Glutathion. Die Ablösung des Proteins von der Chromatographie-Säule erfolgt dann mit reduziertem Glutathion im Elutions-Puffer.

Eine 20 ml Bakterien-Vorkultur von *E.coli* BL21 wurde über Nacht bei 37°C selektiv angezogen. Das Animpfen der 200 ml Hauptkultur erfolgte am nächsten Tag. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Der Bakterienstamm wuchs für weitere 5 Stunden bei 37°C, danach erfolgte die Pelletierung bei 5000 rpm für 20 min. Das Pellet wurde dann in 30 ml TNE-Puffer unter Zugabe von 60 µl 500 x Lysozym resuspendiert. Darauf erfolgte die Sonifizierung der Suspension mit einem Stabsonifizierer (Hartmann Laborgeräte, Dresden) für 3 x 1 min bei einer Stärke von 2 bei einem Puls/sec. Die Zelltrümmer wurden bei 15000 rpm für 20 Minuten pelletiert und anschließend entfernt. Die Inkubation des Überstandes erfolgte mit 250 µl Glutathion-Sepharose für zwei Stunden bei 4°C. Zur Elution der GST-Fusionsproteine wurden der Überstand erneut abgesaugt und 3 x mit 10 ml TNE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose auf eine *Poly-Prep-Chromatography-Column* (BioRad Laboratories GmbH) gegeben. Es folgte eine erneuter Waschschrift mit 10 ml TNE-Puffer. Die GST-Fusions-Proteine wurden dann 3 x mit jeweils 400 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA-Verdünnungsreihe auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

5.9.2 Aufreinigung von His-getaggttem CBP aus Sf9-Insektenzellen

Lyse-/Waschpuffer	20 mM HEPES pH = 7,5 10% Glycerol 300 mM CaCl ₂ 0,1% NP-40 5 mM Imidazol 1,4 µl/ml Aprotinin
-------------------	--

Elutionspuffer	20 mM HEPES pH = 7,5 10% Glycerol 200 mM NaCl 0,1% NP-40 10 mM EDTA 10 mM DTT 1,4 µl/ml Aprotinin
----------------	---

Talon-Agarose (Novagen)

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Nach Vireninfection und der Expression von His-getaggttem CBP wurden 300 ml Sf9-Insektenkultur bei 1000 rpm für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde in 30 ml Lyse-/Waschpuffer gut resuspendiert. Anschließend folgte ein Ultraschallaufschluss der Zellen mittels Stabsonifizierer für 3 x 1 min bei einer Stärke von 5 und einem Impuls/sec. Die Zelltrümmer wurden bei 15000 rpm für 20 min pelletiert. Zum Überstand wurde 1 ml gewaschene Talon-Agarose (Novagen) gegeben. Anschließend wurde für zwei Stunden inkubiert. Die Agarose wurde dann 3 x mit 10 ml Lysis-/Waschpuffer gewaschen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde die Talon-Agarose in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Reste des Überstandes wurden abgesaugt. Die Elution von His-getaggttem CBP erfolgte in drei Schritten mit jeweils 300 µl Elutionspuffer für 10 min. Zur Abschätzung der Protein-Konzentration wurde eine SDS-PAGE mit 20 µl Eluat vorgenommen, das Gel anschließend Coomassie-Blau gefärbt. Der Rest des Eluats wurde bei -80° verwahrt.

5.9.3 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen

Ripa-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH = 7,4 150 mM NaCl 1% (w/v) NP-40 1% (w/v) Desoxycholat 0,1% (w/v) SDS 0,5% Trasyolol 5 mM Pefablock
-------------	--

Co-IP-Puffer

20 mM HEPES, pH = 7,4
50 mM NaCl
30 mM Na₂P₂O₇
50 mM NaF
0,2% Triton X-100
10% Glycerol
5 µM ZnCl₂

Zu beiden Puffern wurde ein Proteasen- und Phosphatasen-Inhibitoren-Gemisch frisch dazugegeben.

2,5 µg/ml Pepstatin
2,5 µg/ml Leupeptin
0,15 mM Benzamidin
5 mM Pefabloc
0,025 U/ml α₂-Makroglobulin
14 µg/ml Aprotinin
10 mM β-Glycerophosphat
1 mM EGTA
50 mM NaF

Zu beiden Puffern wurde ein HDAC-Inhibitoren-Gemisch frisch dazugegeben.

5 mM Nikotinamid
5 mM Natrium-Butyrat
100 ng/ml Trichostatin A

Flag-Agarose (Sigma)

Protein G- und Protein A-Sepharose (Pierce)

Unter Immunpräzipitation (IP) von Proteinen versteht man die gezielte Isolierung eines Proteins mit Antikörpern aus einer Lösung. Die Antikörper binden in der Lösung an das Ziel-Protein. Die Antikörper mit gebundenem Protein werden durch Protein A- oder Protein G-Sepharose, die an den konstanten Fc-Teil der Antikörper bindet, durch Zentrifugation von der Lösung getrennt.

In dieser Arbeit wurde neben Antikörpern und Protein A- und Protein G-Sepharose auch Flag-Agarose eingesetzt. Hier sind Antikörper an eine Agarose-Matrix gekoppelt. Die Antikörper binden an das Flag-Epitop, welches aus acht Aminosäuren mit der Abfolge D-Y-K-D-D-D-D-K besteht.

Für eine IP wurden die Kulturschalen zunächst mit einem Gummischaber und Ripa-Puffer abgekratzt, so dass die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt werden konnten. Anschließend erfolgte die Sonifizierung der Zellen mit einem Stabsonifizierer für 30 sec bei Stärke 2 und 1 Impuls/sec. Die sonifizierten Zellen wurden dann bei 13000 rpm für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde von den Zelltrümmern getrennt und 20 µl des Überstandes wurden für den Lysat-Western-Blot aufbewahrt. Mit dem Rest des Überstandes erfolgte die IP. In der Regel wurden 1 -2 µg Antikörper und 20 µl gewaschene Flag-Agarose oder Sepharose eingesetzt.

Anschließend wurde mit Ripa-Puffer mindestens dreimal gewaschen, die Antigen-Antikörper-Matrix wurde dann für 6 min mit 2 x Ladepuffer aufgekocht. Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

Eine Co-Immunpräzipitation liegt dann vor, wenn mit dem immunpräzipitierten Primär-Protein ein sekundäres Protein, welches mit dem Primär-Protein interagiert, aus dem Lysat isoliert wird. Eine Co-Immunpräzipitation erfolgte mit CoIP-Puffer. Dieser ist weniger stringent als Ripa-Puffer, so dass die Interaktion von miteinander agierenden Proteinen erhalten bleiben sollte. Auch erfolgte keine Sonifizierung der Zellen.

5.9.4 Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli-Puffer (Laufpuffer)	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin pH = 8,3 0,1 % SDS
2 x Ladepuffer	160 mM Tris pH = 6,8 20% (v/v) Glycin 10% (w/v) SDS 0,25% (w/v) Bromphenolblau 100 mM β -Mercaptoethanol
12%iges Trenngel	7,5% (v/v) Acrylamid 0,085% (v/v) Bisacrylamid 0,4 M Tris pH = 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS
10%iges Trenngel	19,5% (v/v) Acrylamid 0,5% (v/v) Bisacrylamid 0,625 M Tris pH = 8,4 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS
7,5%iges Trenngel	32,5% (v/v) Acrylamid 0,9% (v/v) Bisacrylamid 0,38 M Tris pH = 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS
5%iges Sammelgel	13,3% (v/v) Acryl-/Bisacrylamid (30%/0,8%) 0,13 M Tris pH = 6,8 0,068% (v/v) TEMED 0,12% (v/v) SDS 0,11% (v/v) APS

Mittels denaturierender diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach Ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wird das Proteingemisch vor Beladung der SDS-PAGE zunächst mit 2 x Ladepuffer für 6 min aufgekocht. Durch das Aufkochen denaturieren die Proteine. Das SDS im Ladepuffer bindet quantitativ zum Molekulargewicht an die Proteine und erzeugt aufgrund seiner anionischen Eigenschaften eine negative Nettoladung der Proteine. Dadurch werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt und die Proteine wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Zudem unterbindet das Detergenz SDS die erneute Ausbildung nicht kovalenter Bindungen, so dass eine Renaturierung des Proteins verhindert wird. Das β -Mercaptoethanol im Ladepuffer löst zudem die Disulfidbrücken im Protein.

Das Polyacrylamidgel besteht aus dem unteren Trenngel und dem oberen Sammelgel, welche sich im pH-Wert, Ionenstärke und dem Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid unterscheiden. Das Sammelgel diente der Fokussierung der Proteine zu einer Lauffront am Übergang zum Trenngel. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngele mit 7,5 – 12%igem Acrylamid-Anteil benutzt.

5.9.5 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

Fixierlösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung	0,08% (w/v) CBB G-250 1,6% (v/v) o-Phosphorsäure 8% (w/v) Ammoniumsulfat 20% (v/v) Methanol
Entfärbelösung	25% (v/v) Methanol

Die Coomassie-Blau-Färbung wurde zum Abschätzen von Protein-Konzentrationen im Vergleich zu einem BSA-Standard verwendet, sowie zur Färbung von Proteinen nach enzymatischen Assays. Die Färbung erfolgt durch Wechselwirkung des blauen Farbstoffs mit kationischen und hydrophoben Aminosäuren.

Nach der SDS-Page wurden die Gele zunächst in Fixierlösung für 15 min eingelegt. Anschließend folgte die Färbung der Proteine für eine 1 h bei Raumtemperatur. Das Entfärben des blauen Hintergrundes erfolgte mit Entfärbelösung über Nacht unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.

5.9.6 Western-Blot

Semidry-Transfer-Puffer (für Nitrocellulose-Membranen)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Semidry-Transfer-Puffer (für PVDF-Membranen)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin

Tank-Blot-Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,01% (w/v) SDS
Waschpuffer	1 x PBS 0,05% (v/v) Tween-20
Blockpuffer	1 x PBS 0,05% (v/v) Tween-20 5% (w/v) Magermilchpulver
0,2% (w/v) Ponceau-Rot	
100% Methanol	
Whatman-Papier	

Der Western-Blot dient der elektrophoretischen Übertragung von Proteinen auf eine Membran nach der SDS-PAGE. Im Verlauf des Transfers geht das an die Proteine gebundene SDS verloren. Die Proteine liegen daher auf der Membran größtenteils wieder renaturiert vor. Dies ist wichtig für die spätere Detektion von Proteinen mit Antikörpern. Nach dem Transfer wird die Membran mit Blockpuffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und damit unspezifische Antikörperbindung zu verhindern.

Bei dieser Arbeit wurden bei einem Semidry-Blot zunächst alle Komponenten, d.h. Whatman-Papiere, PVDF- oder Nitrocellulose-Membran und das Polyacrylamidgel in den entsprechenden Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran musste zur Aktivierung zunächst für 10 sec in Methanol eingelegt werden. Der Aufbau des Blots erfolgte im *sandwich*-Verfahren. Dazu wurden das Polyacrylamidgel und die Transfer-Membran von jeweils drei Lagen Whatman-Papier umschlossen. Die Membran lag dabei in Richtung zur Anode und das Gel in Richtung Kathode. Der Transfer erfolgte für 1 h und 20 min bei 2 mA/cm².

Der Tank-Blot diente der Übertragung von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 150 kDa. Der Aufbau des Blots entsprach dabei grundsätzlich dem des Semidry-Blots, wobei Whatman-Papiere, Gel und PVDF-Membran in einer Kassette fixiert wurden. Die Kassette wurde dann vertikal in eine mit Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingespannt. Der Transfer erfolgte für 60 min bei 100 V.

Nach dem Blot wurden die Membranen zunächst mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt. Dies diente der Fixierung der Proteine auf der Membran und zur Überprüfung der Effizienz der Protein-Übertragung. Anschließend erfolgte das Blocken der Membran mit Blockpuffer bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

5.9.7 Immundetektion von Proteinen nach dem Western-Blot

PBS-T	140 mM NaCl 2,6 mM KCL 2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,45 mM KH ₂ PO ₄ 0,05% (v/v) Tween -20
-------	--

Primärer Antikörper	1:100 – 1:1000 in PBS-T
Sekundärer Antikörper	1: 5000 – 1:10000 in PBS-T
Stripping-Puffer	62 mM Tris 2% SDS 10% Methanol

ECL-Lösungen Pico oder Femto (Pierce)

β -Mercaptoethanol

Nach dem Western-Blot und dem Blocken mit Blockpuffer wurde die Membran zunächst für 30 min in PBS-T gewaschen. In der Regel erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht oder aber für mindestens 2 Stunden bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut mit PBS-T zur Entfernung von ungebundenem Primär-Antikörper gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper bindet dabei an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers. Der sekundäre Antikörper ist gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase. Nach der Inkubation wurde die Membran zur Entfernung von überschüssigem sekundärem Antikörper erneut in PBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte schließlich mit dem Kamera-assoziierten Chemi-Dokumentationssystem *Las 3000* (Fuji). Die Membran wurde dazu mit der ECL-Lösung beträufelt. Die Peroxidase oxidiert in dieser Reaktion das Luminol der ECL-Lösung, wobei eine Chemilumineszenz entsteht, die von der Kamera detektiert und computerunterstützt sichtbar gemacht wird.

War eine weitere Detektion mit Antikörpern erforderlich, so wurde der Blot nach der Detektion *gestrippt*. Dazu wurde die Membran für 30 min bei 60°C mit 50 ml Stripping-Buffer und 250 μ l β -Mercaptoethanol inkubiert. Nach dem Vorgang erfolgte das Waschen der Membran mit PBS-T für 30 min. Dies diente der vollständigen Entfernung des β -Mercaptoethanols. Anschließend wurde erneut die Membran mit Blockpuffer inkubiert, und nach weiterem Waschen erfolgte die erneute Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht oder für mindestens 2 Stunden.

5.9.8 Massenspektrometrie

Zur Acetylierung von p27 wurde zunächst ein HAT-Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 5.9.1). Zur weiteren Analyse wurden die Proben zu David W. Litchfield (University of Ontario, London, Canada) geschickt. Die Proben wurden dann in Lösung mit den Proteasen Glu-C und Trypsin verdaut. Anschließend erfolgte die Analyse der erhaltenen Peptide auf acetylierte Lysine.

5.10 Enzymatische Assays

5.10.1 Histon-Acetyltransferase (HAT)-Assay

5 x HAT-Puffer	250 mM Tris-Base pH = 8 25% Glycerol 0,5 mM EDTA 250 mM KCl 10 mM Natrium-Butyrat
----------------	---

Acetyl-Coenzyme A [acetyl-1- ¹⁴ C] (Sigma)	54 mCi/mMol (0,05 mCi/ml; 749,6 µg/ml)
--	---

Acetyl-Coenzyme A (Sigma)	25 mM
---------------------------	-------

Aufgereinigtes His-CBP

Verstärker-Lösung *NAM P100*
(GE-Healthcare)

Bei einem Histon-Acetyltransferase-Assay werden Acetyl-Gruppen von Acetyl-Coenzym A durch Histon-Acetyltransferasen auf freie Lysin-Gruppen des Substrats übertragen. Die Acetylierung der Lysine wurde mittels Antikörper gegen acetylierte Lysine oder mittels Autoradiographie der Substrate gegen einen Röntgenfilm überprüft.

Das Gesamtvolumen betrug sowohl bei einem radioaktiven als auch bei einem nicht radioaktiven Assay 30 µl. Bei einem radioaktiven Assay wurden 3 µl aufgereinigtes His-CBP-Eluat, 2 µg p27-Substrat, 6 µl 5 X HAT-Puffer und 0,2 µCi [1-¹⁴C] Acetyl-Coenzym A eingesetzt. Der nicht radioaktive Assay erfolgte mit 0,3 µg Substrat und 0,1 µl 25 mM Acetyl-Coenzym A. Beide Assays erfolgten bei 30°C für 45 min, die Proben wurden dann mit 5 µl 5 x Proben-Puffer für 6 min aufgekocht. Es folgte eine SDS-PAGE. Das radioaktive Gel wurde Coomassie-Blau gefärbt und zur Reduzierung des Hintergrundes wieder entfärbt. Zur Verstärkung der Signale wurde das Gel in Verstärker-Lösung *NAM P100* (GE-Healthcare) für 30 min inkubiert, anschließend wurde das Gel für 2 h bei 60°C unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde abschließend für zwei Wochen bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Proteine bei einem nicht radioaktiven Assay wurden nach der SDS-PAGE mittels Western-Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mittels Antikörper die Acetylierung detektiert.

5.10.2 Kinase-Assay

3 x Kinase-Puffer	150 mM HEPES pH = 7,5 30 mM MgCl ₂ 75 µM ATP 3 mM Natrium-Vanadat 3 mM NaF 30 mM β-Glycerophosphat
-------------------	--

Hot-Mix
(Hartman-Analytik)

74 kBq [γ – ^{32}P] ATP
mit 5 μl H_2O

Aufgereinigter His-CDK2/Cyclin E-Komplex
(R. Lilischkis)

Bei dieser Arbeit wurde der Kinase-Assay mit GST-p27-Fusionsproteinen und aufgereinigtem His-CDK2/Cyclin E-Komplex durchgeführt. Der Gesamtansatz pro Reaktion betrug 30 μl . Auf Eis wurden in einem 1,5 ml Schraubgefäß zunächst 10 μl 3 x Kinase-Puffer, 150 – 1200 ng Substrat, 4 μl aufgereinigter CDK2/Cyclin E-Komplex mit H_2O gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl Hot-Mix gestartet und für 30 min bei 30°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Aufkochen für 6 min mit 5 x Probenpuffer. Es folgte eine SDS-PAGE, das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, zur Reduzierung des Hintergrundes wurde das Gel über Nacht entfärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel zur Verstärkung des Signals für 30 min in Verstärker-Lösung *NAM P100* (GE Healthcare) inkubiert und dann mittels Vakuum bei 60°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für 12-48 Stunden bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

6 Referenzen

Ahn, S. H., Diaz, R. L., Grunstein, M., and Allis, C. D. (2006). Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol Cell* 24, 211-220.

Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., *et al.* (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* 396, 184-186.

Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-13747.

Aleem, E., Berthet, C., and Kaldis, P. (2004). Cdk2 as a master of S phase entry: fact or fake? *Cell Cycle* 3, 35-37.

Alland, L., David, G., Shen-Li, H., Potes, J., Muhle, R., Lee, H. C., Hou, H., Jr., Chen, K., and DePinho, R. A. (2002). Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex. *Mol Cell Biol* 22, 2743-2750.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.

Allfrey, V. G., and Mirsky, A. E. (1964). Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* 144, 559.

Andrews, S. C., Wood, M. D., Tunster, S. J., Barton, S. C., Surani, M. A., and John, R. M. (2007). Cdkn1c (p57Kip2) is the major regulator of embryonic growth within its imprinted domain on mouse distal chromosome 7. *BMC Dev Biol* 7, 53.

Ashton, A. W., Watanabe, G., Albanese, C., Harrington, E. O., Ware, J. A., and Pestell, R. G. (1999). Protein kinase Cdelta inhibition of S-phase transition in capillary endothelial cells involves the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Biol Chem* 274, 20805-20811.

Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-1184.

- Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M. S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V., and Colombatti, A. (2005). p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 7, 51-63.
- Bandyopadhyay, D., Okan, N. A., Bales, E., Nascimento, L., Cole, P. A., and Medrano, E. E. (2002). Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Res* 62, 6231-6239.
- Banerjee, A. C., Recupero, A. J., Mal, A., Piotrkowski, A. M., Wang, D. M., and Harter, M. L. (1994). The adenovirus E1A 289R and 243R proteins inhibit the phosphorylation of p300. *Oncogene* 9, 1733-1737.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *Embo J* 14, 4758-4762.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* 11, 2509-2514.
- Barberis, M., and Klipp, E. (2007a). Insights into the network controlling the G1/S transition in budding yeast. *Genome Inform* 18, 85-99.
- Barberis, M., Klipp, E., Vanoni, M., and Alberghina, L. (2007b). Cell size at S phase initiation: an emergent property of the G1/S network. *PLoS Comput Biol* 3, e64.
- Basu, A., Rose, K. L., Zhang, J., Beavis, R. C., Ueberheide, B., Garcia, B. A., Chait, B., Zhao, Y., Hunt, D. F., Segal, E., *et al.* (2009). Proteome-wide prediction of acetylation substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13785-13790.
- Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., and Manolagas, S. C. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 273, 21137-21144.
- Benitez, D. A., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P. M., and Castellon, E. A. (2007). Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J Androl* 28, 282-293.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 13, 1775-1785.

- Besson, A. (2007). [p27Kip1: tumor suppressor and oncogene?]. *Med Sci (Paris)* 23, 1089-1091.
- Besson, A., Dowdy, S. F., and Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.
- Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K. S., Kemp, C. J., and Roberts, J. M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev* 20, 47-64.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., and Roberts, J. M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 18, 862-876.
- Besson, A., Hwang, H. C., Cicero, S., Donovan, S. L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B. E., Dyer, M. A., and Roberts, J. M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev* 21, 1731-1746.
- Billon, N., van Grunsven, L. A., and Rudkin, B. B. (1996). The CDK inhibitor p21WAF1/Cip1 is induced through a p300-dependent mechanism during NGF-mediated neuronal differentiation of PC12 cells. *Oncogene* 13, 2047-2054.
- Black, J. C., Mosley, A., Kitada, T., Washburn, M., and Carey, M. (2008). The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell* 32, 449-455.
- Blain, S. W. (2008). Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* 7, 892-898.
- Blain, S. W., Scher, H. I., Cordon-Cardo, C., and Koff, A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3, 111-115.
- Bloom, J., and Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., and Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5, 769-784.
- Bordoli, L., Husser, S., Luthi, U., Netsch, M., Osmani, H., and Eckner, R. (2001). Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucleic Acids Res* 29, 4462-4471.
- Borriello, A., Cucciolla, V., Oliva, A., Zappia, V., and Della Ragione, F. (2007). p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle* 6, 1053-1061.

- Brooks, C. L., and Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 164-171.
- Brooks, C. L., Li, M., and Gu, W. (2007). Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *J Biol Chem* 282, 22804-22815.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Burkhardt, D. L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Campaner, S., Doni, M., Hydbring, P., Verrecchia, A., Bianchi, L., Sardella, D., Schleker, T., Perna, D., Tronnersjo, S., Murga, M. (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat Cell Biol* 12, 54-59; sup pp 51-14.
- Canepa, E. T., Scassa, M. E., Ceruti, J. M., Marazita, M. C., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., and Ogara, M. F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59, 419-426.
- Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19, 321-329.
- Casaccia-Bonnel, P., and Liu, A. (2003). Relationship between cell cycle molecules and onset of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci Res* 72, 1-11.
- Ceruti, J. M., Scassa, M. E., Flo, J. M., Varone, C. L., and Canepa, E. T. (2005). Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 4065-4080.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H. Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1999). A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* 96, 393-403.

- Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., and La Thangue, N. B. (2001). Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3, 667-674.
- Chan, H. M., and La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-2373.
- Chen, C. A., and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Chen, J. S., and Faller, D. V. (2005). Histone deacetylase inhibition-mediated post-translational elevation of p27KIP1 protein levels is required for G1 arrest in fibroblasts. *J Cell Physiol* 202, 87-99.
- Cheng, J. D., Werness, B. A., Babb, J. S., and Meropol, N. J. (1999a). Paradoxical correlations of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 5, 1057-1062.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., and Sherr, C. J. (1999b). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* 18, 1571-1583.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Vandel, L. (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *Embo J* 21, 5457-5466.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
- Chu, I., Sun, J., Arnaout, A., Kahn, H., Hanna, W., Narod, S., Sun, P., Tan, C. K., Hengst, L., and Slingerland, J. (2007). p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* 128, 281-294.
- Chu, I. M., Hengst, L., and Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 253-267.
- Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B. M., and Sinclair, D. A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13, 627-638.
- Coller, H. A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 667-670.

Coller, H. A., Sang, L., and Roberts, J. M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 4, e83.

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

Costantini, C., Ko, M. H., Jonas, M. C., and Puglielli, L. (2007). A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J* 407, 383-395.

Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P. A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., *et al.* (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* 9, 175-186.

Cuadrado, M., Gutierrez-Martinez, P., Swat, A., Nebreda, A. R., and Fernandez-Capetillo, O. (2009). p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer Res* 69, 8726-8732.

Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5545-5549.

David, G., Turner, G. M., Yao, Y., Protopopov, A., and DePinho, R. A. (2003). mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells. *Genes Dev* 17, 2396-2405.

Delavaine, L., and La Thangue, N. B. (1999). Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 18, 5381-5392.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

Deng, Q., Li, Y., Tedesco, D., Liao, R., Fuhrmann, G., and Sun, P. (2005). The ability of E1A to rescue ras-induced premature senescence and confer transformation relies on inactivation of both p300/CBP and Rb family proteins. *Cancer Res* 65, 8298-8307.

Deng, X., Mercer, S. E., Shah, S., Ewton, D. Z., and Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 279, 22498-22504.

- Denicourt, C., Saenz, C. C., Datnow, B., Cui, X. S., and Dowdy, S. F. (2007). Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res* 67, 9238-9243.
- Denslow, S. A., and Wade, P. A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26, 5433-5438.
- di Bari, M. G., Ciuffini, L., Mingardi, M., Testi, R., Soddu, S., and Barila, D. (2006). c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *EMBO Rep* 7, 727-733.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Dimberg, A., Bahram, F., Karlberg, I., Larsson, L. G., Nilsson, K., and Oberg, F. (2002). Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood* 99, 2199-2206.
- Dornan, D., Eckert, M., Wallace, M., Shimizu, H., Ramsay, E., Hupp, T. R., and Ball, K. L. (2004). Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* 24, 10083-10098.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A. J., and Hupp, T. R. (2003a). The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* 23, 8846-8861.
- Dornan, D., Shimizu, H., Perkins, N. D., and Hupp, T. R. (2003b). DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300. *J Biol Chem* 278, 13431-13441.
- Durand, B., Gao, F. B., and Raff, M. (1997). Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 16, 306-317.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.
- Eastburn, D. J., and Han, M. (2005). A gain-of-function allele of cbp-1, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the mammalian CBP/p300 gene, causes an increase in histone acetyltransferase activity and antagonism of activated Ras. *Mol Cell Biol* 25, 9427-9434.
- Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-684.

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

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.

Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lyman, E., Farina, A., and Martinez, E. (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* 25, 10220-10234.

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

Featherstone, C., and Jackson, S. P. (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 434, 3-15.

Felzien, L. K., Farrell, S., Betts, J. C., Mosavin, R., and Nabel, G. J. (1999). Specificity of cyclin E-Cdk2, TFIIIB, and E1A interactions with a common domain of the p300 coactivator. *Mol Cell Biol* 19, 4241-4246.

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

Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Fire, A. Z. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ* 14, 1998-2012.

Firzlaff, J. M., Luscher, B., and Eisenman, R. N. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5187-5191.

Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* 9, 45-57.

- Franklin, D. S., and Xiong, Y. (1996). Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Mol Biol Cell* 7, 1587-1599.
- Frescas, D., and Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 438-449.
- Frey, M. R., Saxon, M. L., Zhao, X., Rollins, A., Evans, S. S., and Black, J. D. (1997). Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 272, 9424-9435.
- Galea, C. A., Nourse, A., Wang, Y., Sivakolundu, S. G., Heller, W. T., and Kriwacki, R. W. (2008). Role of intrinsic flexibility in signal transduction mediated by the cell cycle regulator, p27 Kip1. *J Mol Biol* 376, 827-838.
- Gao, D., Inuzuka, H., Tseng, A., Chin, R. Y., Toker, A., and Wei, W. (2009). Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCdh1-mediated Skp2 destruction. *Nat Cell Biol* 11, 397-408.
- Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W., Borowsky, A. D., Lin, Y., Kim, M., Lee, H., Shih, W. J., Cardiff, R. D., Shen, M. M., and Abate-Shen, C. (2004). A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17204-17209.
- Gao, Q., Tan, J., Ma, P., Ge, J., Liu, Y., Sun, X., and Zhou, L. (2009). PKC alpha affects cell cycle progression and proliferation in human RPE cells through the downregulation of p27kip1. *Mol Vis* 15, 2683-2695.
- Gayther, S. A., Batley, S. J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S. F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H. M., *et al.* (2000). Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* 24, 300-303.
- Georgia, S., Soliz, R., Li, M., Zhang, P., and Bhushan, A. (2006). p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev Biol* 298, 22-31.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Gooch, J. L., Herrera, R. E., and Yee, D. (2000). The role of p21 in interferon gamma-mediated growth inhibition of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 11, 335-342.
- Goodman, R. H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-1577.

- Gosselet, F. P., Magnaldo, T., Culerrier, R. M., Sarasin, A., and Ehrhart, J. C. (2007). BMP2 and BMP6 control p57(Kip2) expression and cell growth arrest/terminal differentiation in normal primary human epidermal keratinocytes. *Cell Signal* 19, 731-739.
- Grimmler, M. (2002). Identifikation und Charakterisierung von neuen Interaktionspartnern des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}. Diss., 2002, LMU München
- Grimmler, M., Wang, Y., Mund, T., Cilensek, Z., Keidel, E. M., Waddell, M. B., Jakel, H., Kullmann, M., Kriwacki, R. W., and Hengst, L. (2007). Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128, 269-280.
- Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Gunjan, A., Sittman, D. B., and Brown, D. T. (2001). Core histone acetylation is regulated by linker histone stoichiometry in vivo. *J Biol Chem* 276, 3635-3640.
- Haberland, M., Montgomery, R. L., and Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10, 32-42.
- Halevy, O., Novitch, B. G., Spicer, D. B., Skapek, S. X., Rhee, J., Hannon, G. J., Beach, D., and Lassar, A. B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.
- Hall, M., and Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68, 67-108.
- Han, Y., Jeong, H. M., Jin, Y. H., Kim, Y. J., Jeong, H. G., Yeo, C. Y., and Lee, K. Y. (2009). Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 88-92.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Hao, B., Zheng, N., Schulman, B. A., Wu, G., Miller, J. J., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2005). Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 20, 9-19.

- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harrington, E. O., Loffler, J., Nelson, P. R., Kent, K. C., Simons, M., and Ware, J. A. (1997). Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 7390-7397.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H., and Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J* 25, 3264-3274.
- Hirano, Y., and Ronai, Z. (2006). A new function for p53 ubiquitination. *Cell* 127, 675-677.
- Hitomi, M., Yang, K., Guo, Y., Fretthold, J., Harwalkar, J., and Stacey, D. W. (2006). p27Kip1 and cyclin dependent kinase 2 regulate passage through the restriction point. *Cell Cycle* 5, 2281-2289.
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., and Woodgett, J. R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.
- Holland, A. J., and Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 478-487.
- Holland, A. J., and Taylor, S. S. (2008). Many faces of separase regulation. *SEB Exp Biol Ser* 59, 99-112.
- Hu, E., Dul, E., Sung, C. M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., *et al.* (2003). Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 720-728.
- Hunt, T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* 1, 268-274.
- Hwang, H. C., and Clurman, B. E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24, 2776-2786.
- Hydbring, P., Bahram, F., Su, Y., Tronnorsjo, S., Hogstrand, K., von der Lehr, N., Sharifi, H. R., Lilischkis, R., Hein, N., Wu, S. (2010). Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 58-63.

Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2002). Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277, 14355-14358.

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

Iyer, N. G., Ozdag, H., and Caldas, C. (2004). p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23, 4225-4231.

Iyer, N. G., Xian, J., Chin, S. F., Bannister, A. J., Daigo, Y., Aparicio, S., Kouzarides, T., and Caldas, C. (2007). p300 is required for orderly G1/S transition in human cancer cells. *Oncogene* 26, 21-29.

James, M. K., Ray, A., Leznova, D., and Blain, S. W. (2008). Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Mol Cell Biol* 28, 498-510.

Jeong, H., Then, F., Melia, T. J., Jr., Mazzulli, J. R., Cui, L., Savas, J. N., Voisine, C., Paganetti, P., Tanese, N., Hart, A. C., *et al.* (2009). Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* 137, 60-72.

Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 68, 1145-1155.

Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* 6, 1229-1235.

Kang-Decker, N., Tong, C., Boussouar, F., Baker, D. J., Xu, W., Leontovich, A. A., Taylor, W. R., Brindle, P. K., and van Deursen, J. M. (2004). Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell* 5, 177-189.

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol* 8, 17-26.

Kazantsev, A. G., and Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7, 854-868.

Khan, O., and La Thangue, N. B. (2008). Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 714-726.

- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., *et al.* (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* 23, 607-618.
- Kim, W. Y., and Sharpless, N. E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.
- Kimura, A., Matsubara, K., and Horikoshi, M. (2005). A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J Biochem* 138, 647-662.
- Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hiram, C., Kitabayashi, I., Minna, J. D., *et al.* (2005). Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 512-519.
- Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* 275, 10477-10483.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kolli, S., Buchmann, A. M., Williams, J., Weitzman, S., and Thimmapaya, B. (2001). Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4646-4651.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5, 773-785.
- Kossatz, U., Vervoorts, J., Nickeleit, I., Sundberg, H. A., Arthur, J. S., Manns, M. P., and Malek, N. P. (2006). C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kip1. *Embo J* 25, 5159-5170.
- Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., and Nakayama, K. I. (2005). Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J Biol Chem* 280, 1095-1102.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., and Yao, T. P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18, 601-607.

- Kung, A. L., Rebel, V. I., Bronson, R. T., Ch'ng, L. E., Sieff, C. A., Livingston, D. M., and Yao, T. P. (2000). Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev* 14, 272-277.
- Kurash, J. K., Lei, H., Shen, Q., Marston, W. L., Granda, B. W., Fan, H., Wall, D., Li, E., and Gaudet, F. (2008). Methylation of p53 by Set7/9 mediates p53 acetylation and activity in vivo. *Mol Cell* 29, 392-400.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., and Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., and Seiser, C. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *Embo J* 21, 2672-2681.
- Lai, A., Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Bertos, N. R., Yang, X. J., Theberge, M. C., Tsai, S. C., Seto, E., Zhang, Y., Kuzmichev, A., *et al.* (2001). RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol* 21, 2918-2932.
- Lai, A., Lee, J. M., Yang, W. M., DeCaprio, J. A., Kaelin, W. G., Jr., Seto, E., and Branton, P. E. (1999). RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol Cell Biol* 19, 6632-6641.
- Larrea, M. D., Liang, J., Da Silva, T., Hong, F., Shao, S. H., Han, K., Dumont, D., and Slingerland, J. M. (2008). Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol* 28, 6462-6472.
- Latham, J. A., and Dent, S. Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1017-1024.
- Lavin, M. F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13, 941-950.
- Lavu, S., Boss, O., Elliott, P. J., and Lambert, P. D. (2008). Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 841-853.

- Lee, K. K., and Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-649.
- Legube, G., and Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep* 4, 944-947.
- Li, J., Staver, M. J., Curtin, M. L., Holms, J. H., Frey, R. R., Edalji, R., Smith, R., Michaelides, M. R., Davidsen, S. K., and Glaser, K. B. (2004). Expression and functional characterization of recombinant human HDAC1 and HDAC3. *Life Sci* 74, 2693-2705.
- Li, Q., Imhof, A., Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. (1999). p300 stimulates transcription instigated by ligand-bound thyroid hormone receptor at a step subsequent to chromatin disruption. *Embo J* 18, 5634-5652.
- Li, Y., Millikan, R. C., Newman, B., Conway, K., Tse, C. K., and Liu, E. T. (1999). P57 (KIP2) polymorphisms and breast cancer risk. *Hum Genet* 104, 83-88.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z. X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D. J., Gutterman, J. U., Walker, C. L., *et al.* (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 218-224.
- Liang, J., and Slingerland, J. M. (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339-345.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.
- Lin, H. K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C. H., Yang, W. L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K. I., Nimer, S., *et al.* (2009). Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 11, 420-432.
- Litvak, D. A., Evers, B. M., Hwang, K. O., Hellmich, M. R., Ko, T. C., and Townsend, C. M., Jr. (1998). Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. *Surgery* 124, 161-169; discussion 169-170.

- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- Lloyd, A. C., Obermuller, F., Staddon, S., Barth, C. F., McMahon, M., and Land, H. (1997). Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev* 11, 663-677.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-161.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J. V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P. R., and Mann, M. (2007). The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 6, 697-707.
- Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T. R., and Roberts, J. M. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* 413, 323-327.
- Malik, R., Nigg, E. A., and Korner, R. (2008). Comparative conservation analysis of the human mitotic phosphoproteome. *Bioinformatics* 24, 1426-1432.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., and Pazdur, R. (2007). FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12, 1247-1252.
- Markham, D., Munro, S., Soloway, J., O'Connor, D. P., and La Thangue, N. B. (2006). DNA-damage-responsive acetylation of pRb regulates binding to E2F-1. *EMBO Rep* 7, 192-198.
- Marmorstein, R., and Roth, S. Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 155-161.

Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.

Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Busino, L., Martinez-Balbas, M. A., Pagano, M., Agell, N., and Bachs, O. (2009). Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene* 28, 2654-2666.

Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Zecchin, A., Martinez-Balbas, M., Agell, N., Giacca, M., Pujol, M. J., and Bachs, O. (2009). The transcriptional co-activator PCAF regulates cdk2 activity. *Nucleic Acids Res* 37, 7072-7084.

Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9, 650-662.

McAllister, S. S., Becker-Hapak, M., Pintucci, G., Pagano, M., and Dowdy, S. F. (2003). Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 23, 216-228.

McConkey, D. J. (2008). A novel role for a familiar protein in apoptosis induced by proteasome inhibition. *Cancer Cell* 14, 1-2.

McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11, 497-504.

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.

Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.

Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., and Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 10, 3065-3075.

Moeller, S. J., Head, E. D., and Sheaff, R. J. (2003). p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol Cell Biol* 23, 3735-3752.

Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-1189.

Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18, 1068.

- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res* 68, 5076-5085.
- Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., and Chen-Kiang, S. (1997). Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 6, 47-56.
- Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6733-6738.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Yan, S., Plotnikova, O., Sachchidanand, Sanchez, R., Zeleznik-Le, N. J., Ronai, Z., and Zhou, M. M. (2004). Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Mol Cell* 13, 251-263.
- Muller, D., Thieke, K., Burgin, A., Dickmanns, A., and Eilers, M. (2000). Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *Embo J* 19, 2168-2180.
- Muraoka, R. S., Lenferink, A. E., Law, B., Hamilton, E., Brantley, D. M., Roebuck, L. R., and Arteaga, C. L. (2002). ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Mol Cell Biol* 22, 2204-2219.
- Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.
- Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 853-860.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-381.
- Nguyen, D. X., Baglia, L. A., Huang, S. M., Baker, C. M., and McCance, D. J. (2004). Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *Embo J* 23, 1609-1618.

- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J. M., and Guillemot, F. (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev* 20, 1511-1524.
- Nickeleit, I., Zender, S., Sasse, F., Geffers, R., Brandes, G., Sorensen, I., Steinmetz, H., Kubicka, S., Carlomagno, T., Menche, D., *et al.* (2008). Argyrin a reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer Cell* 14, 23-35.
- Nicolas, E., Yamada, T., Cam, H. P., Fitzgerald, P. C., Kobayashi, R., and Grewal, S. I. (2007). Distinct roles of HDAC complexes in promoter silencing, antisense suppression and DNA damage protection. *Nat Struct Mol Biol* 14, 372-380.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Oike, Y., Takakura, N., Hata, A., Kaname, T., Akizuki, M., Yamaguchi, Y., Yasue, H., Araki, K., Yamamura, K., and Suda, T. (1999). Mice homozygous for a truncated form of CREB-binding protein exhibit defects in hematopoiesis and vasculo-angiogenesis. *Blood* 93, 2771-2779.
- Pandithage, R., Lilischkis, R., Harting, K., Wolf, A., Jedamzik, B., Luscher-Firzlaff, J., Vervoorts, J., Lasonder, E., Kremmer, E., Knoll, B., and Luscher, B. (2008). The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol* 180, 915-929.
- Paolinelli, R., Mendoza-Maldonado, R., Cereseto, A., and Giacca, M. (2009). Acetylation by GCN5 regulates CDC6 phosphorylation in the S phase of the cell cycle. *Nat Struct Mol Biol* 16, 412-420.
- Park, J. H., Jung, Y., Kim, T. Y., Kim, S. G., Jong, H. S., Lee, J. W., Kim, D. K., Lee, J. S., Kim, N. K., Kim, T. Y., and Bang, Y. J. (2004). Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potently inhibit human tumor proliferation. *Clin Cancer Res* 10, 5271-5281.
- Perkins, N. D., Felzien, L. K., Betts, J. C., Leung, K., Beach, D. H., and Nabel, G. J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275, 523-527.

Petrij, F., Giles, R. H., Dauwerse, H. G., Saris, J. J., Hennekam, R. C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G. J., Goodman, R. H., Peters, D. J., and et al. (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376, 348-351.

Pietenpol, J. A., and Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182, 475-481.

Pile, L. A., Schlag, E. M., and Wassarman, D. A. (2002). The SIN3/RPD3 deacetylase complex is essential for G(2) phase cell cycle progression and regulation of SMRTER corepressor levels. *Mol Cell Biol* 22, 4965-4976.

Poizat, C., Puri, P. L., Bai, Y., and Kedes, L. (2005). Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 25, 2673-2687.

Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994a). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.

Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., and Massague, J. (1994b). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.

Poolman, R. A., Li, J. M., Durand, B., and Brooks, G. (1999). Altered expression of cell cycle proteins and prolonged duration of cardiac myocyte hyperplasia in p27KIP1 knockout mice. *Circ Res* 85, 117-127.

Poux, A. N., and Marmorstein, R. (2003). Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry* 42, 14366-14374.

Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahon, S. J., Wood, J. M., Kennedy, E. L., Cook, R. G., Workman, J. L., Yates, J. R., 3rd, and Grant, P. A. (2002). The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol Cell Biol* 22, 8774-8786.

Prives, C., and Manley, J. L. (2001). Why is p53 acetylated? *Cell* 107, 815-818.

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

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

Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* 20, 6672-6682.

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

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* 45, 781-782.

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

Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J., and Allis, C. D. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 983-994.
Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.

Sanchez-Molina, S., Oliva, J. L., Garcia-Vargas, S., Valls, E., Rojas, J. M., and Martinez-Balbas, M. A. (2006). The histone acetyltransferases CBP/p300 are degraded in NIH 3T3 cells by activation of Ras signalling pathway. *Biochem J* 398, 215-224.

Sankar, N., Baluchamy, S., Kadeppagari, R. K., Singhal, G., Weitzman, S., and Thimmapaya, B. (2008). p300 provides a corepressor function by cooperating with YY1 and HDAC3 to repress c-Myc. *Oncogene* 27, 5717-5728.

Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811-815.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16-22.

Schuetz, A., Min, J., Allali-Hassani, A., Schapira, M., Shuen, M., Loppnau, P., Mazitschek, R., Kwiatkowski, N. P., Lewis, T. A., Maglathin, R. L., *et al.* (2008). Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity. *J Biol Chem* 283, 11355-11363.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

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

- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.
- Shi, D., Pop, M. S., Kulikov, R., Love, I. M., Kung, A. L., and Grossman, S. R. (2009). CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16275-16280.
- Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Kitagawa, M. (1999). Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 13886-13893.
- Simone, C., Stiegler, P., Forcales, S. V., Bagella, L., De Luca, A., Sartorelli, V., Giordano, A., and Puri, P. L. (2004). Deacetylase recruitment by the C/H3 domain of the acetyltransferase p300. *Oncogene* 23, 2177-2187.
- Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-17.
- Smith, K. T., Martin-Brown, S. A., Florens, L., Washburn, M. P., and Workman, J. L. (2010). Deacetylase inhibitors dissociate the histone-targeting ING2 subunit from the Sin3 complex. *Chem Biol* 17, 65-74.
- Smith, K. T., and Workman, J. L. (2009). Introducing the acetylome. *Nat Biotechnol* 27, 917-919.
- Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* 20, 2676-2686.
- Soh, J. W., Lee, Y. S., and Weinstein, I. B. (2003). Effects of regulatory domains of specific isoforms of protein kinase C on growth control and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 3, 115-126.
- Sterner, D. E., Belotserkovskaya, R., and Berger, S. L. (2002). SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11622-11627.
- Stiehl, D. P., Fath, D. M., Liang, D., Jiang, Y., and Sang, N. (2007). Histone deacetylase inhibitors synergize p300 autoacetylation that regulates its transactivation activity and complex formation. *Cancer Res* 67, 2256-2264.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376.
- Sykes, S. M., Mellert, H. S., Holbert, M. A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W. S., and McMahon, S. B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-851.
- Tanaka, Y., Naruse, I., Maekawa, T., Masuya, H., Shiroishi, T., and Ishii, S. (1997). Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10215-10220.
- Tang, X., Gao, J. S., Guan, Y. J., McLane, K. E., Yuan, Z. L., Ramratnam, B., and Chin, Y. E. (2007). Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* 131, 93-105.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133, 612-626.
- Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Thompson, P. R., Kurooka, H., Nakatani, Y., and Cole, P. A. (2001). Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* 276, 33721-33729.
- Thompson, P. R., Wang, D., Wang, L., Fulco, M., Pediconi, N., Zhang, D., An, W., Ge, Q., Roeder, R. G., Wong, J., *et al.* (2004). Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* 11, 308-315.
- Toledo, F., and Wahl, G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tu, A. W., and Luo, K. (2007). Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J Biol Chem* 282, 21187-21196.
- Turnell, A. S., Stewart, G. S., Grand, R. J., Rookes, S. M., Martin, A., Yamano, H., Elledge, S. J., and Gallimore, P. H. (2005). The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature* 438, 690-695.

- Vaccarello, G., Figliola, R., Cramerotti, S., Novelli, F., and Maione, R. (2006). p57Kip2 is induced by MyoD through a p73-dependent pathway. *J Mol Biol* 356, 578-588.
- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T., and Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* 102, 703-710.
- van de Mark, K., Chen, J. S., Steliou, K., Perrine, S. P., and Faller, D. V. (2003). Alpha-lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J Cell Physiol* 194, 325-340.
- van den Heuvel, S., and Dyson, N. J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 713-724.
- Vernon, A. E., Devine, C., and Philpott, A. (2003). The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* 130, 85-92.
- Vernon, A. E., and Philpott, A. (2003). A single cdk inhibitor, p27Xic1, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in *Xenopus*. *Development* 130, 71-83.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J., and Luscher, B. (2006). The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* 281, 34725-34729.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J. M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wang, J., Weaver, I. C., Gauthier-Fisher, A., Wang, H., He, L., Yeomans, J., Wondisford, F., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2010). CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain. *Dev Cell* 18, 114-125.
- Wang, Q., Zhou, Y., Wang, X., and Evers, B. M. (2008). p27 Kip1 nuclear localization and cyclin-dependent kinase inhibitory activity are regulated by glycogen synthase kinase-3 in human colon cancer cells. *Cell Death Differ* 15, 908-919.
- Ward, R., Johnson, M., Shridhar, V., van Deursen, J., and Couch, F. J. (2005). CBP truncating mutations in ovarian cancer. *J Med Genet* 42, 514-518.

- Watanabe, H., Pan, Z. Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., Hurwitz, J., and Xiong, Y. (1998). Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1392-1397.
- Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2007). Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 10103-10105.
- Weaver, B. A., Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P., and Cleveland, D. W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* 11, 25-36.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weinberg, R. A. (2007). *The biology of Cancer*. Garland Science Verlag, 2007.
- Weksberg, R., Shuman, C., and Smith, A. C. (2005). Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137C, 12-23.
- Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- Wolter, F., and Stein, J. (2002). Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. *J Nutr* 132, 2082-2086.
- Wong, S., and Weber, J. D. (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J* 407, 451-460.
- Wu, F. Y., Wang, S. E., Sanders, M. E., Shin, I., Rojo, F., Baselga, J., and Arteaga, C. L. (2006). Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer Res* 66, 2162-2172.
- Wu, P. Y., and Winston, F. (2002). Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol Cell Biol* 22, 5367-5379.
- Wu, T. H., Yang, R. L., Xie, L. P., Wang, H. Z., Chen, L., Zhang, S., Zhao, Y., and Zhang, R. Q. (2006). Inhibition of cell growth and induction of G1-phase cell cycle arrest in hepatoma cells by steroid extract from *Meretrix meretrix*. *Cancer Lett* 232, 199-205.
- Yamamoto, H., Soh, J. W., Shirin, H., Xing, W. Q., Lim, J. T., Yao, Y., Slosberg, E., Tomita, N., Schieren, I., and Weinstein, I. B. (1999). Comparative effects of overexpression of p27Kip1 and p21Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18, 103-115.

- Yan, Y., Frisen, J., Lee, M. H., Massague, J., and Barbacid, M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* 11, 973-983.
- Yancopoulos, G. D., Nisen, P. D., Tesfaye, A., Kohl, N. E., Goldfarb, M. P., and Alt, F. W. (1985). N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5455-5459.
- Yang, X. J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26, 1076-1087.
- Yang, X. J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310-5318.
- Yang, X. J., and Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* 31, 449-461.
- Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-372.
- Yeh, N., Miller, J. P., Gaur, T., Capellini, T. D., Nikolich-Zugich, J., de la Hoz, C., Selleri, L., Bromage, T. G., van Wijnen, A. J., Stein, G. S., *et al.* (2007). Cooperation between p27 and p107 during endochondral ossification suggests a genetic pathway controlled by p27 and p130. *Mol Cell Biol* 27, 5161-5171.
- Yuan, L. W., and Gambée, J. E. (2000). Phosphorylation of p300 at serine 89 by protein kinase C. *J Biol Chem* 275, 40946-40951.
- Yuan, L. W., Soh, J. W., and Weinstein, I. B. (2002). Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta. *Biochim Biophys Acta* 1592, 205-211.
- Zeng, L., Xiao, Q., Margariti, A., Zhang, Z., Zampetaki, A., Patel, S., Capogrossi, M. C., Hu, Y., and Xu, Q. (2006). HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *J Cell Biol* 174, 1059-1069.
- Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A., and Elledge, S. J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151-158.
- Zhou, W., Yang, Q., Low, C. B., Karthik, B. C., Wang, Y., Ryo, A., Yao, S. Q., Yang, D., and Liou, Y. C. (2009). Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. *J Biol Chem* 284, 23980-23988.

Zhu, C., Qin, Y. R., Xie, D., Chua, D. T., Fung, J. M., Chen, L., Fu, L., Hu, L., and Guan, X. Y. (2009). Characterization of tumor suppressive function of P300/CBP-associated factor at frequently deleted region 3p24 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 28, 2821-2828.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α	anti-
A	Adenin, im Zusammenhang mit DNA
A	Ampere
Å	Ångström
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin, im Zusammenhang mit DNA
cDNA	<i>copy</i> -DNA
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Deletion
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanosin, im Zusammenhang mit DNA
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	<i>hour</i> , Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	<i>hepes buffered saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
k-	Kilo-
KAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
μ -	Mikro
m-	Milli-
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
n-	Nano-
N-	Aminoterminal
NaAc	Natriumacetat
NP-40	Nonidet P-40, nichtionisches Detergens
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p-	Pico-
[³² P]	radioaktives Phosphorisotop der Massenzahl 32
pH	negativer dekadischer Log. der Protonenkonzentration
Pi	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	<i>reaction buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
[³⁵ S]	radioaktives Schwefelisotop der Massenzahl 35
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	<i>second</i> ; Sekunde(n)
T	Thymin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	X-100 p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
U	Uracil
5'UTR	5'-untranslatierte Region

3'UTR	3'-untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Einbuchstabencode für Aminosäuren

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

Abkürzungen der Gene und ihrer Produkte

ABL	<i>v-abl</i> Abelson murine leukemia viral oncogen homolog 1
AKT/PKB	<i>thymoma viral proto oncogene 1</i> /Protein Kinase B
c-	zelluläre Form
CAK	<i>CDK activating kinase</i> ; CDK-aktivierende Kinase
cdc	<i>cell division cycle</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
CIP1	<i>CDK-interacting protein 1</i>
CKI	CDK-Inhibitor
ERK	<i>extracellular signal related kinase</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRF40	<i>Grb2 family member of 40 kDa</i>
GSK3-β	Glycogen-Synthase-Kinase 3-β
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
INK	<i>inhibitor of CDK4</i>
KIP1	<i>kinase-inhibitory protein 1</i>
KIP2	<i>kinase-inhibitory protein 2</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>

MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
RAS	<i>Rats with sarcoma</i>
RAF	<i>v-raf-leukemia viral oncogene</i>
RB	Retinoblastoma-Protein
PSTAIR	Primärstrukturmotiv Cyclin-abhängiger Kinasen
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SKP1(2)	S-phase kinase associated protein 1(2)
SMAD	<i>small tail and mothers against decapentaplegic</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
SRC	<i>v-src sarcoma viral oncogen homolog (avian)</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor</i>
v-	virale Form
WAF1	<i>wildtype p53-activated fragment 1</i>
WEE1	Tyrosinkinase, homolog zur wee1-Kinase von <i>S. pombe</i>

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum:	04.12.1975
Geburtsort:	Oberhausen
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1986	Schulabschluss an der Christus König Grundschule, Kleve
1986 – 1998	Johanna Sebus Gymnasium, Kleve Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1998 - 10/1999	Studium der Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt
10/1999 - 10/2006	Studium der Biologie, RWTH Aachen, Abschluss: Diplom-Biologe, Note 1,0. Thema der Arbeit: An ethanol-inducible Promotor to reduce photorespiration in <i>Arabidopsis thaliana</i>

Berufstätigkeit:

Seit Dezember 2006	im Rahmen einer Promotion Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikum Aachen (Prof. Dr. Bernhard Lüscher)
--------------------	---

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder vergleichbare Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Aachen, 07.07.2010

Jens Schirmmacher

7.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher danke ich für die Möglichkeit zur Promotion auf diesem Themengebiet und in dieser Arbeitsgruppe sowie für sein Vertrauen und seinen grenzenlosen Optimismus in diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lothar Elling danke ich für die freundliche Übernahme des Referats.

Bei Dr. Jörg Vervoorts-Weber möchte ich mich für seine stets konstruktive Kritik sowie seinen Ehrgeiz bedanken, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit nach drei Jahren fertigzustellen.

Für die gute Atmosphäre und den wissenschaftlichen Austausch bedanke ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Lüscher.

Ein extra Dankeschön an meine Mitstreiterinnen Ulrike Linzen, Steffi Speckens und Alexandra Forst aus Lab1, die mit mir den alltäglichen Laborwahnsinn mit allen Höhen und Tiefen durchlebt haben.

Henning „dem besten Pferd im Stall“ Kleine, danke ich für die Korrektur dieser Arbeit und für viele wertvolle Tipps. Dafür, dass sie sich immer Zeit für die Beantwortung von großen und kleinen Fragen genommen hat, möchte ich Frau Dr. Juliane Lüscher-Firzlaff meinen Dank aussprechen.

Ein Dankeschön an Gabriele Lützeler und Elke Meyer. Bei Euch war immer gute Laune im Raum und Ihr habt zu jeder Lebenslage eine kompetente und hilfsbereite Antwort gehabt.

Elena „der besten TA der Welt“ Buerova, danke ich für Ihre ewige Hilfsbereitschaft und Ihr stets offenes Ohr für alle Probleme. Gut, das Du da warst!

Besonderer Dank gilt Stefan „dem Freibeuter“ Dreschers sowie Nora „dem Nörchen“ Honke. Mit Euch gab es immer etwas zum Lachen, Ärgern, Feiern.

Sven „Svente“ Voss hall danke ich für seine Freundschaft, die weit über die Grenzen des Labors hinausging. Es war eine Superzeit, die auch nicht mit der Promotion enden wird.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

Meiner Frau Silke danke ich für die Liebe, die Unterstützung und die Geduld in all den Jahren.