

**Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation
der CDK-Inhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Cip1}**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Ulrich Göpfert

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2002

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. habil. U. Fischer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Probst

Meinen Eltern

Wie viel weißt du, o Mensch, der Schöpfung König,
Der du, was sehbar siehst, was meßbar mißt,
Wie viel weißt du! und wieder, ach, wie wenig,
Weil, was erscheint, doch nur ein Äußres ist.

Und steigst du in die Tiefe der Gedanken,
Wie findest du den Rückweg in die Welt?
Du armer König, dessen Reiche schwanken,
Der eine Krone trägt, allein kein Zepter hält.

Zu dem Gewölb aus deinen strengen Schlüssen
Stellt sich der Schlußstein nun und nimmer ein,
Und die Empfindung, Flügel an den Füßen,
entschwebt der Haft und ruft hinfliegend: Nein!

Denn etwas ist, du magst's wie weit entfernen,
das dich umspinnt mit unsichtbarem Netz,
Das wenn du liebst, du aufschaust zu den Sternen,
Dich unterwerfend dasteht: das Gesetz.

FRANZ GRILLPARZER

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis März 2002 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Selbständigen Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ludger Hengst (MPI für Biochemie) für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der für die Arbeit benötigten Mittel und für die vielen wichtigen Anregungen und Ratschläge.

Herrn Privatdozent Dr. habil. Utz Fischer (MPI für Biochemie) danke ich für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für zahlreiche kritische Anmerkungen.

Herrn Prof. Dr. Hansgeorg Probst (Universität Tübingen) danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Lottspeich (MPI für Biochemie) und den Mitgliedern seiner Abteilung danke ich für die biochemische und massenspektrometrische Identifizierung gereinigter Proteine.

Frau Dr. Anne E. Willis (University of Leicester, Leicester, UK) bin ich für die großzügige Bereitstellung der bicistronischen Plasmide pRF und phpRF dankbar.

Herrn Dr. Steven A. Reed (Scripps Research Institute, La Jolla, USA) danke ich für die großzügige Bereitstellung von Antikörpern und SF9-Zellysaten.

Ebenso danke ich Matthias Grimmer für die Expression und Reinigung von GST-Cdc14 und GST-Cdc14-C283S.

Dr. Michael Kullmann danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine fachliche Hilfestellung und zahllose Stunden anregender Diskussion.

Dr. Bernhard Lagerbauer bin ich für die freundschaftliche Begleitung der Arbeit und seine wertvollen Ratschläge dankbar.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ sowie den Arbeitsgruppen von Dr. Frauke Melchior und Dr. Utz Fischer danke ich für die angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Prinzipien des eukaryontischen Zellzyklus	3
2.2	Cyclin-abhängige Kinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation	5
2.3	Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch multiple Mechanismen	8
2.3.1	Die Regulation der Cyclinsynthese	9
2.3.2	Die Regulation des Abbaus der Cycline	10
2.3.3	Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen	11
2.3.4	Inhibitorische Untereinheiten Cyclin-abhängiger Kinasen	13
2.3.4.1	Die INK4-Familie	14
2.3.4.2	Die Cip/Kip-Familie	15
2.4	Funktion und Regulation des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p21 ^{Cip1}	17
2.5	Funktion und Regulation des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p27 ^{Kip1}	20
2.6	Translation und translationale Genregulation	25
2.6.1	Allgemeine Prinzipien	25
2.6.2	Der Cap-abhängige Scanning-Mechanismus	25
2.6.3	Cap-unabhängige Translationsinitiation	30
2.7	Aufgabenstellung	30
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Material	32
3.1.1	Geräte	32
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	34
3.1.2.1	Radiochemikalien	34
3.1.2.2	Transfermembranen	34
3.1.2.3	Röntgenfilme	34
3.1.2.4	Materialien zur Filtration und Dialyse	34
3.1.2.5	Säulenmaterialien und fertig gepackte Chromatographiesäulen	35

3.1.2.6	Molekulargewichts- und Längenstandards	35
3.1.2.7	Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets („Kits“)	35
3.1.2.8	Sonstiges Verbrauchsmaterial	37
3.1.3	Puffer und Lösungen	37
3.1.4	Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur	40
3.1.4.1	Medienbestandteile und Medienzusätze	40
3.1.4.2	Medienzusammensetzung	41
3.1.5	Bakterienkultur	41
3.1.6	Antikörper	42
3.1.7	Enzyme	42
3.1.8	DNA-Oligonukleotide	43
3.1.9	Plasmide	45
3.1.10	Bakterienstämme	45
3.1.11	Eukaryontische Zelllinien	45
3.2	Molekularbiologische Methoden	46
3.2.1	Grundlegende Standardmethoden	46
3.2.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurepräparationen	46
3.2.1.2	Fällung von Nukleinsäuren	46
3.2.1.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen	47
3.2.1.4	Präparation von Plasmid-DNA	47
3.2.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
3.2.1.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden mit CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)	48
3.2.1.7	Glätten überhängender DNA-Enden	48
3.2.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	49
3.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	49
3.2.1.11	Gerichtete In-Vitro-Mutagenese	50
3.2.1.12	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	50
3.2.1.13	Transformation von Bakterien	50
3.2.1.14	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxykettenabbruchmethode (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	51
3.2.1.15	In-Vitro-Transkription von RNA	51
3.2.1.16	Elektrophorese von RNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen	52
3.2.1.17	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen	53
3.2.1.18	Northern-Blot: Transfer von RNA auf eine Nylonmembran	53
3.2.1.19	Herstellung von ³² P-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen	54
3.2.1.20	Nachweis membrangebundener RNA mit spezifischen, ³² P-markierten cDNA-Proben	55
3.2.1.21	„RNase protection“-Analyse	55

3.2.2	Klonierung und Identifizierung von 5'- und 3'-Enden der humanen p27-mRNA	56
3.2.3	Herstellung von DNA-Fragmenten der p27-5'- und 3'UTR und deren Klonierung in Reporterplasmiden	57
3.2.4	Herstellung von Plasmiden zur In-Vitro-Transkription	58
3.2.5	Herstellung von Expressionsplasmiden für PTB und Nucleolin	59
3.3	Zellbiologische Methoden	61
3.3.1	Kultivierung humaner Zelllinien	61
3.3.2	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen	61
3.3.3	Synchronisierung von Gewebekulturzellen	62
3.3.4	Durchflußzytofluorimetrie	62
3.3.5	Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen	64
3.3.6	Bestimmung von Reporteraktivitäten	65
3.4	Biochemische Methoden	66
3.4.1	Grundlegende Standardmethoden	66
3.4.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	66
3.4.1.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.4.1.3	Coomassie-Färbung von Proteingelen	67
3.4.1.4	Silberfärbung von Proteingelen	67
3.4.1.5	Autoradiographie von Elektrophoresegelen	68
3.4.1.6	Immunoblot-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern	68
3.4.1.7	Immunpräzipitation von Proteinen	69
3.4.2	Präparation von Gesamt-Zellysaten	69
3.4.3	Präparation von translationsaktiven HeLa-Zellextrakten	70
3.4.4	In-Vitro-Translation	70
3.4.5	Messung der Gesamtproteinsynthese in Gewebekulturzellen	71
3.4.6	Analyse der Synthese und des Abbaus von p27 durch „Pulse-chase“-Markierung	72
3.4.7	Northwestern-Blot-Analyse	73
3.4.8	RNA-Protein-Quervernetzung durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Crosslink)	73
3.4.9	Präparation zytosolischer HeLa-Zellextrakte	74
3.4.10	Reinigung CCRE-RNA-bindender Proteine	75
3.4.11	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	77
3.4.12	Reinigung von bakteriell exprimiertem PTB und Nuc-p50	77
3.4.13	Reinigung von rekombinantem p21	78
3.4.14	Reinigung von rekombinantem Cyclin A/CDK2 aus Insektenzellen	79
3.4.15	In-Vitro-Phosphorylierung von p21 durch Cyclin A/CDK2	80
3.4.16	In-Vitro-Dephosphorylierung von Cyclin A/CDK2-behandeltem p21	81
3.4.17	Immobilisierung von phosphoryliertem p21 und Test seiner inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität von Cyclin A/CDK2	81

4	ERGEBNISSE	83
4.1	Untersuchungen zur translationalen Regulation von p27^{Kip1}	83
4.1.1	Identifizierung translationsregulatorischer Elemente der p27-mRNA	85
4.1.1.1	Klonierung und Charakterisierung einer p27-cDNA mit ausgedehnten untranslatierten Regionen am 5'- und 3'-Ende	85
4.1.1.2	Die Länge der p27-5'UTR unterliegt keiner zellzyklusabhängigen Variation	90
4.1.1.3	Der kleine offene Leserahmen der p27-5'UTR inhibiert die Translation von p27 <i>in vitro</i> und wird selbst translatiert	93
4.1.1.4	Die p27-5'UTR enthält ein cis-wirkendes Element zur zellzyklusabhängigen Regulation der Translation	96
4.1.1.5	Die Funktion des uORFs bei der Kontrolle der zellzyklusabhängigen Translation	98
4.1.1.6	Ein 114 Nukleotide langes Element innerhalb der p27-5'UTR, das „cell cycle responsive element“ (CCRE), ist ausreichend für die zellzyklusabhängige Regulation der Translation	100
4.1.1.7	Eine interne Ribosomenbindestelle in der p27-5'UTR	103
4.1.1.8	Die p27-IRES verhindert die Repression der Translation von p27 durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002	106
4.1.2.	Identifizierung und Charakterisierung CCRE-RNA-bindender Proteine	109
4.1.2.1	Reinigung und Identifizierung zytosolischer Proteine durch Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA	110
4.1.2.2	PTB und Nucleolin binden spezifisch an CCRE-RNA	114
4.1.2.3	Die Überexpression von PTB reprimiert spezifisch die Reportergenexpression von Transkripten mit p27-5'UTR	117
4.2	Phosphoisoformen von p21^{Cip1} als Inhibitoren von Cyclin A/CDK2	121
4.2.1	p21 wird <i>in vitro</i> von Cyclin A/CDK2 phosphoryliert	122
4.2.2	Phosphoryliertes p21 ist ein wirksamer Inhibitor der Kinaseaktivität von Cylin A/CDK2	124
5	DISKUSSION	126
5.1	Translationale Regulation von p27^{Kip1}	126
5.1.1	Eine humane p27-cDNA mit ausgedehnter 5'-untranslatierter Region	126
5.1.2	Ein cis-wirkendes Element zur zellzyklusabhängigen Translationsregulation von p27	130
5.1.3	Eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) in der p27-5'UTR	134
5.1.4	Die Rolle der p27-IRES im Kontext von Wachstumsarrest und Differenzierung	135
5.1.5	Trans-wirkende Proteinfaktoren bei der zellzyklusregulierten Translation von p27	137
5.1.6	Die Translationale Regulation von p27 im Kontext des G ₁ /S- und des G ₁ /G ₀ -Überganges	143

5.2	Phosphoisoformen von p21^{Cip1} als Inhibitoren von Cyclin A/CDK2	145
6	LITERATUR	148
7	ANHANG	162
7.1	DNA- und RNA-Sequenzen	162
7.1.1	p27-cDNA (-575 - 1941)	162
7.1.2	CCRE-RNA-Sonde	164
7.1.3	gapdh-RNA-Sonde	164
7.2	Veröffentlichungen, Posterpräsentation	165
7.3	Liste der akademischen Lehrer	166
7.4	Lebenslauf	167

Abkürzungen

A	Adenin
AES	Acetat/EDTA/SDS
Akt	Proteinkinase B; Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase
AP1	engl.: activator protein 1
APC	engl.: anaphase promoting complex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	engl.: alternative reading frame
ASK1	engl.: apoptosis-signal-regulated kinase 1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLP	Baculovirus-Lysepuffer
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CCRE	engl.: cell cycle responsive element
Cdc	engl.: cell division cycle
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	„copy“-DNA
CIAP	engl.: calf intestinal alkaline phosphatase
Cip1	engl.: CDK-interacting protein 1
CKI	CDK-Inhibitor
<i>c-mos</i>	engl.: <i>v-mos</i> Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog
<i>c-myc</i>	engl.: <i>v-myc</i> avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CoA	Coenzym A
cpm	Zählereignisse pro Minute
CRS	engl.: cytoplasmic retention signal
<i>c-sis</i>	engl.: <i>v-sis</i> simian sarcoma viral oncogene homolog
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dA	2'-Desoxyadenosin/2'-Desoxyadenylat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dC	2'-Desoxycytidin/2'-Desoxycytidylat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
ddH ₂ O	hochreines Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DICE	engl.: differentiation control element
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	engl.: Dulbecco' s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Thymidin-5'-triphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
4E-BP	eIF-4E-Bindeprotein

ECL	engl.: enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryontischer Translationsinitiations-Faktor
EMSA	engl.: electrophoretic mobility shift assay
EST	engl.: expressed sequence tag
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
Fbw7	engl.: F-Box and WD domain protein 7
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluc	Luziferase von <i>Photinus pyralis</i>
FRAP	engl.: FKBP12-rapamycin-associated protein
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung (im Kontext von Zentrifugation)
β-Gal	β-Galaktosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl.: green fluorescent protein
Gry-rbp	engl.: RRM RNA binding protein with glycine, arginine and tyrosine rich C-terminus
GSP	genspezifisches Primer-DNA-Oligonukleotid
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	engl.: human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLP	hypotonischer Lysepuffer
hnRNP	engl.: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HRV	engl.: human rhinovirus
hSWI/SNF	Multiproteinkomplex, modifiziert Chromatinstruktur
HuR	engl.: Hu antigen R
INK	engl.: inhibitor of CDK4
IP	Immunpräzipitation
IRE	engl.: iron response element
IRES	interne Ribosomenbindestelle
IRP	engl.: iron response protein
ITAF	engl.: IRES transacting factor
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kip1	engl.: kinase-inhibitory protein 1
LB	Luria-Bertani-Medium
LY294002	2-(4-Morpholino)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
MAT1	franz.: menage a trois 1
mdm2	engl.: mouse double minute 2
MEF	engl.: mouse embryonic fibroblast
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MgAc ₂	Magnesiumacetat
m ⁷ GpppG	P ¹ -5'-(7-Methylguanosin)-P ³ -5'-guanosintri-phosphat
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPF	engl.: M-phase promoting factor

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mRNP	Boten-Ribonukleoprotein
mTOR	engl.: mammalian target of rapamycin
MyoD	engl.: myogenic factor 3
MYT1	engl.: membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase
NaAc	Natriumacetat
NF-κB	engl.: nuclear factor κB
NF-Y	engl.: nuclear transcription factor Y
Nonidet P-40	nichtionisches Detergens
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
Nuc-p50	aminoterminal verkürztes Nucleolin
NWBP	Northwestern-Bindepuffer
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PABP	Poly-A-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCBP2	Poly(rC)-Bindeprotein 2
PCNA	engl.: proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	engl.: plateled-derived growth factor
PI	Propidiumjodid
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein
PSTAIR	Primärstrukturmotiv Cyclin-abhängiger Kinasen
PTB	engl.: polypyrimidine tract binding protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
5'RACE	engl.: rapid amplification of cDNA 5' ends
RB	Reaktionspuffer
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
Rluc	Luziferase von <i>Renilla reniformis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	engl.: RNA interference
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Saccharomyces
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SKP1(2)	engl.: S-phase kinase associated protein 1(2)
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
STE	Natriumchlorid/Tris/EDTA
T	Thymin
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung/Tween-20

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	engl.: transforming growth factor β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
TSS	engl.: transformation sensitizing solution
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
v/v	engl.: volume per volume
Waf1	engl.: wildtype p53-activated fragment 1
WEE1	Tyrosinkinase, homolog zur wee1-Kinase von <i>S. pombe</i>
w/v	engl.: weight per volume
U	Uracil
U	engl.: unit (im Zusammenhang mit Enzymaktivität)
unr	engl.: upstream of N-Ras
uORF	stromaufwärts gelegener offener Leserahmen
5'UTR	5'-untranslatierte Region
3'UTR	3'-untranslatierte Region
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	ultraviolettes Licht
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
XIAP	engl.: X-linked inhibitor of apoptosis

1 Zusammenfassung

Die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt oder nicht, fällt während der G₁-Phase des Zellzyklus. Die Zelle kann entweder in die S-Phase eintreten und mit der Replikation der DNA beginnen, oder sie kann aufgrund antiproliferativer Signale den Zellzyklus verlassen und in eine zeitweise oder dauerhafte Ruhephase (Quieszenz, G₀-Phase) übergehen. Die intrazelluläre Konzentration des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p27^{Kip1} spielt bei dieser Entscheidung eine kritische Rolle. p27 wird in proliferierenden Zellen selektiv während der G₁-Phase exprimiert und ist während der übrigen Zellzyklusphasen nur in geringer Menge vorhanden. Die Abnahme der p27-Menge in der späten G₁-Phase geht einher mit der Aktivierung von Cyclin E/CDK2 und ist essentiell für die Initiation der S-Phase. Im Gegensatz dazu wird die Expression von p27 noch gesteigert, wenn die Zellen aufgrund antiproliferativer Signale von der G₁- in die G₀-Phase übergehen. Die translationale Regulation der p27-Synthese ist ein wichtiger Mechanismus, der zur Kontrolle der p27-Menge am G₁/S- und am G₁/G₀-Übergang beiträgt.

Zur Analyse der translationalen Regulation von p27 wurde in dieser Arbeit eine 2516 nt lange humane p27-cDNA kloniert. Die ausgedehnten untranslatierten Regionen (UTRs) dieser cDNA wurden mittels Reporterstudien an HeLa-Zellen auf potentielle translationsregulatorische Elemente hin untersucht. Die 575 nt lange 5'UTR enthält an ihrem 5'-Ende ein Element von etwa 100 nt, das die Translation eines Reportergens in G₁-Zellen im Vergleich zu Zellen der S-Phase um den Faktor 2 bis 2,5 verstärkt. Dieses Element gewährleistet demnach eine translationale Regulation, wie sie die endogene p27-mRNA am Übergang von der G₁- zur S-Phase erfährt. Es wurde daher als „cell cycle responsive element“ (CCRE) bezeichnet. Das CCRE überlappt mit einem kleinen offenen Leserahmen mit einer Länge von 90 nt, der möglicherweise zur translationalen Kontrolle am G₁/S-Übergang beiträgt. Stromabwärts des CCRE wurde ein zweites cis-regulatorisches Element identifiziert. Es handelt sich um eine interne Ribosomenbindestelle (internal ribosomal entry site, IRES), die es Ribosomen ermöglicht, die Translation von p27 unabhängig von der 5'-Cap-Struktur zu initiieren. Dieses Element gewährleistet, daß p27 unter Bedingungen reduzierter Cap-abhängiger Translation effizient synthetisiert werden kann und trägt damit vermutlich zur Aufrechterhaltung erhöhter p27-Konzentrationen in manchen G₀-Zellen bei.

Zur Identifizierung von Proteinen, die an der translationalen Regulation durch das CCRE beteiligt sein könnten, wurde zytosolischer Extrakt aus HeLa-Zellen unter anderem einer Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA unterzogen. Mit den eluierten Proteinen wurden weitere RNA-Bindestudien (UV-Quervernetzung, Northwestern-Hybridisierung) durchgeführt. Diese zeigten, daß die abundanten RNA-Bindeproteine PTB (polypyrimidine tract binding protein) und Nucleolin *in vitro* spezifisch und unter stringenten Bedingungen an das CCRE binden. Um den Einfluß von PTB und Nucleolin auf die Translation von p27 *in vivo* zu untersuchen, wurden beide Proteine in 293T-Zellen überexprimiert. Die Überexpression von PTB reprimierte spezifisch die Reporterexpression von Transkripten mit p27-5'UTR. Dies traf auf die Überexpression von Nucleolin nicht zu. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, daß PTB *in vivo* an der translationalen Regulation von p27 beteiligt sein könnte.

Der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21^{Cip1} ist mit p27^{Kip1} nahe verwandt. p21 wird durch den Tumorsuppressor p53 als Reaktion auf DNA-Schäden induziert. Überexpression von p21 arretiert Zellen vornehmlich in der G₁-Phase. Neben der Induktion durch p53 akkumuliert der Inhibitor auch in alternden Zelllinien (Seneszenz) und während der Differenzierung verschiedener Zelltypen.

Für das Verständnis der Funktion von p21^{Cip1} ist es von großer Bedeutung, die Stöchiometrie, in der das Protein Cyclin/CDK-Komplexe bindet und inhibiert, zu kennen. Hengst *et al.* (1998) konnten zeigen, daß ein Molekül rekombinantes p21 ausreicht, den Komplex aus Cyclin A und CDK2 zu inhibieren. Aufgrund verschiedener Hinweise wurde jedoch vermutet, daß p21 durch Cyclin/CDK-Komplexe phosphoryliert und dadurch in seinen inhibitorischen Eigenschaften verändert werden könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß p21 durch Cyclin A/CDK2 *in vitro* zu drei Phosphoisoformen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit umgesetzt werden kann. Die beiden Isoformen mit der geringsten elektrophoretischen Beweglichkeit tragen vermutlich zwei bzw. drei Phosphatreste. Es konnte weiter gezeigt werden, daß diese Phosphoisoformen als Monomere Cyclin A/CDK2 inhibieren und sich darin von unmodifiziertem p21 nicht unterscheiden.

2 Einleitung

2.1 Prinzipien des eukaryontischen Zellzyklus

Die Vermehrung von Zellen setzt die Replikation wichtiger Zellkomponenten und ihre gleichmäßige und vollständige Weitergabe an die Tochterzellen voraus. Dies erfolgt in einem streng kontrollierten Prozeß, der als Zellzyklus bezeichnet wird. Die Verdoppelung der DNA als Träger der genetischen Information und ihre anschließende Aufteilung in zwei vollständige Kopien können als die zentralen Vorgänge des Zellzyklus angesehen werden. Sie sind bei höheren eukaryontischen Zellen zeitlich voneinander getrennt (Howard und Pelc, 1951). Die Replikation der DNA und damit die Verdoppelung des Chromosomensatzes erfolgt in der Synthese- oder S-Phase, die Trennung der identischen Schwesterchromatiden und ihre Verteilung auf zwei Tochterkerne in der Mitose. Dazwischen liegen zwei sogenannte „Gap“-Phasen: die präreplikative G_1 -Phase und die prämitotische G_2 -Phase. Die Mitose ist normalerweise mit der Teilung der Zelle (Zytokinese) verknüpft und wird dann als M-Phase bezeichnet.

Die Replikation des Genoms und die Mitose sind in den meisten eukaryontischen Zellen alternierende und voneinander abhängige Vorgänge, d.h. die Mitose kann erst dann erfolgen, wenn die DNA vollständig verdoppelt ist. Umgekehrt kann die DNA-Replikation erst nach erfolgter Mitose erneut initiiert werden. Die geordnete Abfolge von Zellzyklusereignissen kann durch zwei alternative Mechanismen sichergestellt werden (Hartwell und Weinert, 1989; Weinert, 1997): Zum einen kann dies durch eine Substrat-Produkt-Beziehung erfolgen, indem das Produkt eines Ereignisses das Substrat eines späteren Ereignisses darstellt. So müssen für die DNA-Replikation genügend Desoxynukleotide synthetisiert werden. Dies setzt die Aktivierung der dafür notwendigen Enzyme in der späten G_1 -Phase voraus. Zum anderen können biochemische Signalwege die Abhängigkeit zweier Prozesse sicherstellen, die anderweitig nicht miteinander in Verbindung stehen. Diese Signalwege werden als Checkpoints bezeichnet. So stellt der „DNA replication checkpoint“ sicher, daß die Mitose erst erfolgen kann, wenn die Replikation der DNA abgeschlossen ist. Der Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Mitose steht unter der Kontrolle eines weiteren Checkpoints, des Spindelcheckpoints. Dieser erlaubt die Trennung der Schwesterchromatiden erst, wenn alle Chromosomen mit beiden Polen der mitotischen

Spindel verbunden sind. Die Initiation der Replikation wie auch der Beginn der Mitose hängen von der Integrität der DNA ab. Die Signalprozesse, die diese Abhängigkeit sicherstellen, werden als „DNA damage checkpoints“ bezeichnet. Diese reagieren auf DNA-Schäden mit dem Anhalten des Zellzyklus in der G₁- oder G₂-Phase oder seiner Verlangsamung in der S-Phase. Sie ermöglichen damit die Beseitigung der Schäden, bevor diese bei der Replikation zu Mutationen führen können oder in der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben werden. Die Checkpoints tragen damit entscheidend zur Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms bei (Weinert, 1997; Puri *et al.*, 1999).

In den Ablauf des Zellzyklus greifen nicht nur endogene, sondern auch exogene Signale ein (Denhardt, 1999). Bei einzelligen eukaryontischen Organismen sind dies in erster Linie Umweltfaktoren wie z.B. das Nahrungsangebot. Bei mehrzelligen Organismen sind die Anforderungen an die Proliferationskontrolle komplexer. Hier sind die Zellen Teil eines Gewebes und dürfen sich nur dann teilen, wenn dies zur Bildung des Gewebes während der Embryogenese oder später zu seiner Regeneration angebracht ist. Manche Gewebe, wie die Epidermis oder das Darmepithel, erneuern sich fortwährend, indem sich Vorläuferzellen mit kontrollierter Geschwindigkeit teilen. Andere Zellen teilen sich nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder zur Wundheilung, wenn das Gewebe verletzt ist. Diese Zellen können den Zellzyklus verlassen und später, wenn dies erforderlich ist, wieder in den Zellzyklus eintreten.

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

Entwicklung des Organismus irreversibel verlassen und reagieren nicht mehr auf mitogene Signale.

2.2 Cyclin-abhängige Kinasen als Schlüsselenzyme der Zellzyklusregulation

Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent Kinases, CDKs) sind die zentralen Elemente des molekularen Kontrollsystems, das den geordneten und störungsfreien Ablauf des Zellzyklus sicherstellt (Ekholm und Reed, 2000; Morgan, 1997; Pines und Rieder, 2001; Planas-Silva und Weinberg, 1997; Sherr, 1996). Diese Kinasen werden im Verlauf des Zellzyklus phasenspezifisch aktiviert und inaktiviert, wodurch die Zelle jeweils in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten kann. Endogene Checkpointsignale wie auch exogene pro- und antiproliferative Signale wirken regulierend auf die CDK-Aktivität ein und werden so in die Kontrolle des Zellzyklus integriert.

CDKs sind *per se* katalytisch inaktiv und müssen mit einer regulatorischen Untereinheit aus der Proteinfamilie der Cycline assoziieren, um aktiv zu werden. Die intrazellulären Konzentrationen vieler Cycline unterliegen im Verlauf des Zellzyklus dramatischen Schwankungen, die das Ergebnis der kontrollierten Synthese und des kontrollierten Abbaus dieser Proteine sind. Dies trägt wesentlich zur phasenspezifischen Aktivierung und Deaktivierung der CDKs bei. Daneben sind eine Reihe weiterer Mechanismen an der Regulation der CDK-Aktivität beteiligt (siehe Abschnitt 2.3.).

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

Die strukturellen Ursachen für die Abhängigkeit der CDKs von ihren aktivatorischen Partnern, den Cyclinen, wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt (Morgan, 1997). In Abwesenheit der Cyclin-Untereinheit wird ATP in einer Konformation gebunden, die den elektrophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Proteinsubstrats nicht erlaubt. Außerdem blockiert ein flexibler Teil der carboxyterminalen Domäne, der „T-Loop“,

die Substratbindung am Eingang zum aktiven Zentrum. Durch die Bindung der Cyclin-Untereinheit erfährt die Kinase konformationale Veränderungen, die für die Herstellung der katalytischen Aktivität erforderlich sind.

Die Cycline bilden eine Familie von Proteinen variabler Größe (35 bis 90 kDa), deren Mitglieder auf der Ebene der Primärstruktur nur mäßig verwandt sind. Die Sequenzhomologie konzentriert sich auf einen Bereich von 100 Aminosäuren, die sogenannte Cyclin-Box, die für die Bindung und Aktivierung von CDKs notwendig ist.

In Säugerzellen wurden neun Cyclin-abhängige Kinasen (CDK1 bis 9) und zehn Cyclin-Klassen (Cyclin A, B, ... bis H, K und T) identifiziert. Eine direkte Funktion bei der Regulation des Zellzyklus ist jedoch nur für einen Teil dieser CDKs und Cycline nachgewiesen worden. Daneben üben Cyclin/CDK-Komplexe über die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne der RNA-Polymerase II eine Funktion bei der Regulation der Transkription aus (Morgan, 1997; Oelgeschlager, 2002).

Die D-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) sind die ersten Cycline, die nach der Stimulierung quieszenter Zellen mit Wachstumsfaktoren in Erscheinung treten. In kontinuierlich proliferierenden Zellen ist ihre Konzentration häufig nahezu konstant. Da die Synthese der D-Cycline in hohem Maße von Wachstumsfaktoren abhängig ist und die Proteine metabolisch instabil sind, fällt ihre Konzentration nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren rasch wieder ab (Sherr, 1993). Die D-Cycline binden und aktivieren CDK4 und CDK6. Die Aktivität dieser Komplexe ist in Zellen, in denen der Tumorsuppressor pRB funktionell aktiv ist (siehe Abschnitt 2.3.1), für die Progression durch die G₁-Phase notwendig (Bartek *et al.*, 1996; Sherr, 1996). Darüber hinaus führt die Überexpression von Cyclin D zu einer verkürzten G₁-Phase und zu einem frühzeitigen Eintritt in die S-Phase (Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994). Die Funktion der D-Cycline besteht also darin, mitogene und antimitogene Signale während der G₁- und G₀-Phase in die Kontrolle des Zellzyklus zu integrieren (Sherr und Roberts, 1999).

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

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

Cyclin B akkumuliert etwas später als Cyclin A in der Zelle (Pines und Hunter, 1990) und bildet zusammen mit CDK1 einen Komplex, der auch „M-phase promoting factor“ (MPF) bezeichnet wird. Die Aktivierung dieses Komplexes ist für den irreversiblen Übergang in die Mitose notwendig. Seine Inaktivierung hingegen, die durch den ubiquitinabhängigen Abbau von Cyclin B erfolgt, ist essentiell für den Eintritt in die Telophase (Pines und Rieder, 2001). Die phasenspezifische Aktivierung und Inaktivierung von Cyclin/CDK-Komplexen während des Säuger-Zellzyklus ist in Abbildung 2.1 schematisch zusammengefaßt.

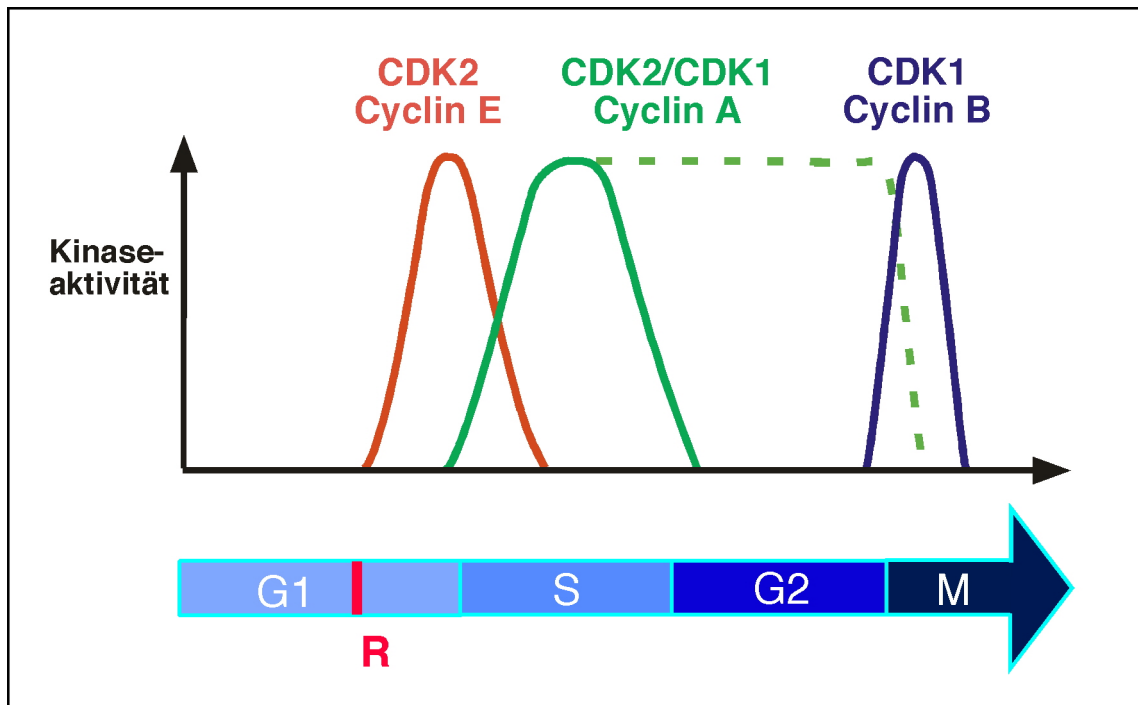


Abbildung 2.1: Cyclin-E-, Cyclin-A- und Cyclin-B-abhängige Kinasen sind zu unterschiedlichen Zeiten während des Zellzyklus aktiv
Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind als Zeitachse angegeben. Der Restriktionspunkt in der G₁-Phase ist als rotes „R“ markiert.

Ein Cyclin/CDK-Komplex, der möglicherweise indirekt zur Zellzyklusregulation beiträgt, ist Cyclin H/CDK7. Er wurde als CDK-aktivierende Kinase (CAK) isoliert, weil er Cyclin/CDK-Komplexe an einem konservierten Threoninrest der CDK-Untereinheit (z.B. T160 in humaner CDK2) phosphoryliert und damit aktiviert (Kaldis *et al.*, 1998). Ob Cyclin H/CDK7 diese Funktion auch in der Zelle hat, ist nicht geklärt.

2.3 Die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch multiple Mechanismen

An der Regulation der CDK-Aktivität sind multiple Mechanismen beteiligt. Neben der Abundanz der Cyclin-Untereinheiten tragen aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen der CDK-Untereinheit, Variation der intrazellulären Lokalisation und inhibitorische Untereinheiten (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs) zur Modulation der CDK-Aktivitäten bei (siehe Abbildung 2.2).

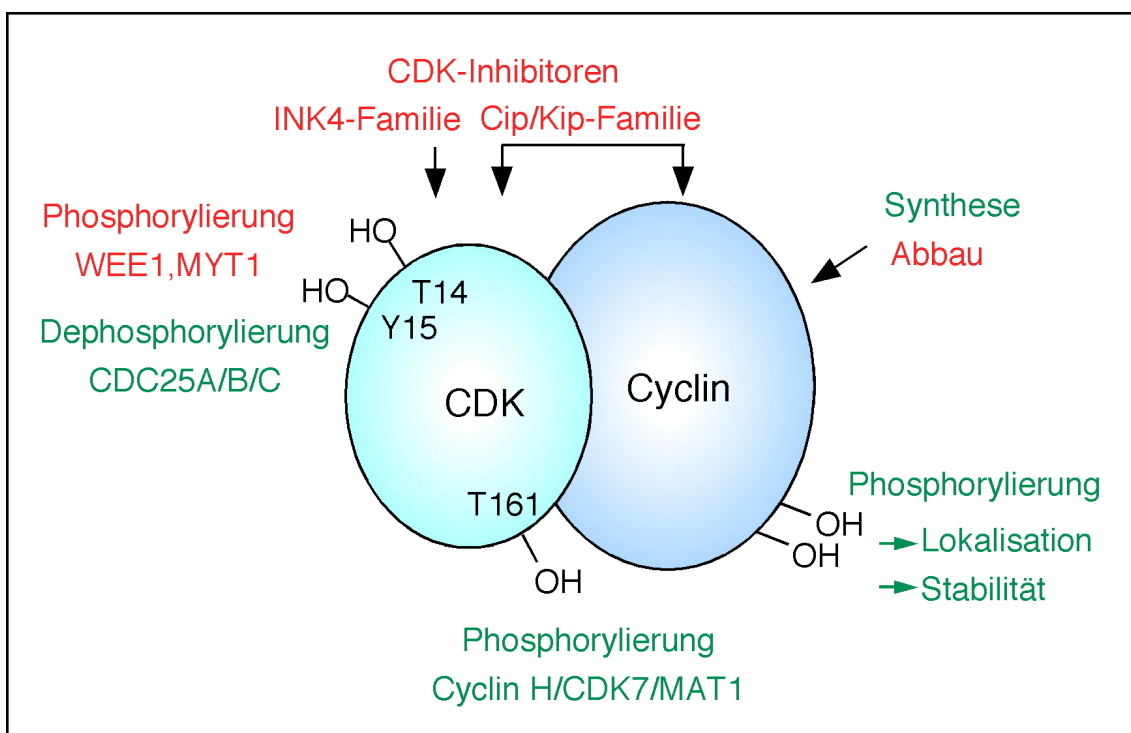


Abbildung 2.2: Die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen wird durch multiple Mechanismen reguliert

Aktivierende Einflüsse sind in Grün, inhibierende in Rot aufgeführt. Die Nummerierung der Aminosäurereste der katalytischen CDK-Untereinheit gilt für humane CDK1. Die aufgeführten Regulationsmechanismen sind nicht für alle zellzyklusregulierenden Cyclin/CDK-Komplexe in gleicher Weise und in gleichem Umfang wirksam (nähere Erläuterungen siehe Text).

2.3.1 Die Regulation der Cyclinsynthese

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

Wie bereits erwähnt, ist die Synthese der D-Cycline von der mitogenen Stimulation der Zelle abhängig. Die Gene der D-Cycline werden dabei transkriptionell aktiviert, wobei die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren c-Myc, AP1 und NF- κ B nachgewiesen wurde (Ekholm und Reed, 2000). Daneben wird eine translationale Induktion der D-Cycline über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg diskutiert (Muisel-Helmericks *et al.*, 1998; Sonenberg und Gingras, 1998; Takuwa *et al.*, 1999).

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

Die Aktivität von E2F steht unter der Kontrolle des Retinoblastoma-Tumorsuppressorproteins (pRB) und zweier verwandter Proteine, p107 und p130, die gemeinsam die Familie der Pocketproteine bilden, und deren Funktion in hohem Maße von ihrem Phosphorylierungszustand abhängt (Adams, 2001; Sanchez und Dynlacht, 1996). Die Transkription E2F-regulierter Gene wird aktiviert, wenn „freies“ E2F an den Promotor gebunden ist und reprimiert, wenn ein Komplex aus E2F und einem Pocketprotein gebunden ist. Bei manchen Genen ist zur Repression der Transkription durch E2F/pRB die Bindung von Histon-Deacetylase (HDAC) an pRB erforderlich (Luo *et al.*, 1998). HDAC verstärkt durch die Acetylierung von Histonen die Kondensation des Chromatins und erschwert damit die Transkription. Zu den Genen, die auf diese Weise reprimiert werden, gehört auch das Cyclin-E-Gen. Die Phosphorylierung des Carboxyterminus von pRB durch Cyclin D/CDK4 hebt die Interaktion von pRB und HDAC auf und induziert damit die Synthese von Cyclin E (Zhang *et al.*, 2000). Dies ist Voraussetzung für die Bildung aktiver Cyclin E/CDK2-Komplexe, die pRB an einem weiteren Serinrest phosphorylieren (Harbour *et al.*, 1999).

Dadurch wird die Bindung zwischen pRB und E2F aufgehoben und die Transkription weiterer E2F-regulierter Gene freigegeben (Adams, 2001). Es wurde vorgeschlagen, daß auch die pRB-vermittelte Repression des Cyclin-A-Genes durch aktive Cyclin E/CDK2 aufgehoben wird. Dies könnte durch Phosphorylierung von pRB selbst und/oder eines weiteren mit pRB-assoziierten Faktors, hSWI/SNF, geschehen, der für die Repression des Cyclin-A-Genes notwendig ist (Zhang *et al.*, 2000).

Die Inaktivierung von pRB durch die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen vollzieht sich also offenbar schrittweise und trägt dadurch zur zeitlichen Abfolge der Cyclin-E- und der Cyclin-A-Expression bei. Die Hyperphosphorylierung von pRB wird bis zum Ende der Mitose aufrechterhalten. Dies geschieht möglicherweise durch die Aktivität von Cyclin A/CDK2 und Cyclin B/CDK1, solange bis diese Kinasen in der Mitose abgebaut werden (Ludlow *et al.*, 1993; Ludlow *et al.*, 1990; Weinberg, 1995). Mit dem Auftreten aktiver Cyclin E/CDK2-Komplexe und damit der vollständigen Derepression von E2F in der späten G₁-Phase wird die Transkription E2F-regulierter Gene für den weiteren Verlauf des Zellzyklus mitogenunabhängig, denn E2F induziert die Synthese von Cyclinen, die wiederum ihre eigene Synthese und die Synthese von E2F unterstützen (Sherr, 1996). Diese positive Rückkopplung trägt vermutlich zum irreversiblen Überschreiten des Restriktionspunktes bei (Planas-Silva und Weinberg, 1997).

2.3.2 Die Regulation des Abbaus der Cycline

Die D-Cycline und die sie kodierenden mRNAs unterliegen einem raschen Umsatz (Sherr, 1993). So liegt die Halbwertszeit von Cyclin D1 selbst in proliferierenden Zellen bei nur 20 min (Diehl *et al.*, 1998; Matsushime *et al.*, 1992). Der Abbau von Cyclin D1 wird durch einen mitogeninduzierten Signaltransduktionsweg reguliert. Die Inhibition dieses Signalweges führt zur Phosphorylierung von Cyclin D1 durch die Glykogensynthase-Kinase-3 β . Diese Modifikation induziert den Export des Proteins aus dem Kern und seinen beschleunigten ubiquitinabhängigen Abbau durch das Proteasom (Diehl *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 1997). Die Halbwertszeit des Proteins wird dabei auf 10 min vermindert. Die Rolle der D-Cycline als Sensoren für Wachstumsfaktoren basiert demnach nicht nur auf ihrer mitogenabhängigen Synthese, sondern auch auf ihrer mitogenabhängigen Lokalisation und ihrem mitogenabhängigen Abbau (Sherr und Roberts, 1999).

Der Abbau von CDK2-gebundenem Cyclin E ist ebenfalls ubiquitinabhängig und wird durch die Phosphorylierung des Proteins durch die assoziierte CDK2-Untereinheit induziert (Clurman *et al.*, 1996; Won und Reed, 1996). Der Cyclin E/CDK2-Komplex sorgt damit durch eine negative Rückkopplung für seine eigene Inaktivierung. Die Autophosphorylierung von Cyclin E/CDK2-Komplexen markiert die Cyclin-Untereinheit für die Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Ligasen (E3-Enzyme) aus der Familie der SCF-Komplexe (Koepp *et al.*, 2001; Strohmaier *et al.*, 2001). Die Abkürzung SCF steht für die Grundbausteine der Komplexe: SKP1, Cullin-1 und ein F-Box-Protein. Die F-Box-Proteine dienen als Adaptoruntereinheiten, die spezifische Substrate für den SCF-Komplex rekrutieren, wobei die Interaktion zwischen F-Box-Protein und Substrat von dessen Phosphorylierung abhängig ist (Patton *et al.*, 1998; Tyers und Jorgensen, 2000). An der Ubiquitinierung von Cyclin E ist das F-Box-Protein Fbw7/hCdc4 beteiligt (Koepp *et al.*, 2001; Strohmaier *et al.*, 2001). Für den Abbau von freiem, nicht CDK-gebundenem Cyclin E wird ein abweichender, nicht phosphorylierungsabhängiger Mechanismus unter Beteiligung von Cullin-3, einem Verwandten der SCF-Komponente Cullin-1, diskutiert (Singer *et al.*, 1999).

Cyclin A und Cyclin B werden während der Mitose ubiquitinabhängig abgebaut. Die Ubiquitinierung erfolgt durch einen großen Ubiquitinligase-Komplex, den „Anaphase-promoting Komplex“ (APC), dessen Aktivierung weitgehend auf seiner Assoziation mit zwei Hilfsfaktoren, CDC20 und CDH1, beruht (Pines und Rieder, 2001; Tyers und Jorgensen, 2000; Zachariae und Nasmyth, 1999). Der APC bleibt aktiv bis CDH1 durch Phosphorylierung am Übergang von der G₁ zur S-Phase inaktiviert wird. Die geschieht vermutlich durch Cyclin A/CDK2 und erlaubt die erneute Akkumulation von Cyclin B während der S- und G₂-Phase (Lukas *et al.*, 1999).

2.3.3 Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen

Die Assoziation mit einer Cyclin-Untereinheit reicht bei den meisten CDKs nicht aus, um diese vollständig zu aktivieren. Sie müssen darüber hinaus an einem konservierten Threoninrest (T160 in humaner CDK2, T161 in humaner CDK1) phosphoryliert werden (Morgan, 1997). Die Röntgenstruktur eines Komplexes aus einer verkürzten Form von Cyclin A und CDK2 zeigt, daß die Phosphorylierung von T160 die Wechselwirkung zwischen CDK2 und Cyclin A stabilisiert und durch eine Veränderung der

Substratbindestelle vermutlich die Substratbindung verbessert (Russo *et al.*, 1996b). Der Hauptkandidat für die CDK-aktivierende Kinase (CAK) in Vertebraten ist der trimere Komplex aus Cyclin H, CDK7 und MAT1. Die CDK7-Aktivität scheint jedoch bei Vertebraten weder limitierend, noch im Zellzyklus reguliert zu sein (Kaldis, 1999; Morgan, 1997). Ihr kommt damit vermutlich keine regulatorische Funktion zu.

Im Gegensatz dazu spielen inhibitorische Phosphorylierungen im aminoterminalen Bereich der katalytischen Untereinheit eine zentrale Rolle bei der Regulation von CDKs. Diese wurden am intensivsten an CDK1 im Kontext des G₂/M-Übergangs untersucht (Takizawa und Morgan, 2000). Vor der Mitose werden Cyclin B/CDK1-Komplexe durch inhibitorische Phosphorylierungen an Y15 und T14 in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Kinase WEE1, die im Kern lokalisiert ist, katalysiert die Phosphorylierung an Y15, während die transmembrane Kinase MYT1, die mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, CDK1 bevorzugt an T14 phosphoryliert. Die Dephosphorylierung beider Aminosäurereste von CDK1 wird durch die dualspezifische Proteinphosphatase CDC25C, einem von drei Mitgliedern der CDC25-Familie in Säugern, katalysiert. Die Aktivierung von CDK1 am Beginn der Mitose resultiert aus der Inhibition von WEE1 und MYT1 und der gleichzeitigen Aktivierung von CDC25C.

CDK2 und CDK4 werden ebenfalls an Y15 bzw. Y17 phosphoryliert und die Behandlung von CDK2 mit Phosphatase führt zur Hyperaktivierung des Enzyms *in vitro* (Ekholm und Reed, 2000). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression im Zellzyklus wird von den drei CDC25-Kinasen CDC25A für die Aktivierung von CDK2 verantwortlich gemacht (Vigo *et al.*, 1999). Die Aktivierung von CDC25A in der späten G₁-Phase fällt mit der von Cyclin E/CDK2 zeitlich zusammen, und die Überexpression von CDC25A führt zu einem frühzeitigen Übergang in die S-Phase (Blomberg und Hoffmann, 1999). Die inhibitorische Phosphorylierung von CDK2 trägt somit zum „Timing“ des G₁/S-Übergangs bei und bietet einen Ansatzpunkt für Checkpoint-Signale (Mailand *et al.*, 2000).

Die Phosphorylierung der Cyclin-Untereinheit von Cyclin/CDK-Komplexen kann deren intrazelluläre Lokalisation und dadurch ihre Aktivität und Stabilität beeinflussen. Wie bereits erwähnt ist die Phosphorylierung von Cyclin D1 durch die Glykogensynthase-Kinase-3 β mit der Verlagerung des Proteins vom Kern ins Zytoplasma und mit der Verminderung seiner Stabilität verbunden (Diehl *et al.*, 1998). Die intrazelluläre

Lokalisation von Cyclin B1/CDK1 wird ebenfalls durch die Phosphorylierung der Cyclin-Untereinheit kontrolliert (Takizawa und Morgan, 2000). Während der G₂-Phase werden Cyclin B1/CDK1-Komplexe ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. In der späten Prophase wird ein Großteil von ihnen rasch in den Kern verlagert, ein Vorgang der zusammen mit der Dephosphorylierung von CDK1 als essentiell für die Einleitung der wesentlichen Abläufe der Mitose angesehen wird. Diese Verlagerung ist von der Phosphorylierung einer Region von Cyclin B1 abhängig, die als „cytoplasmic retention signal“ (CRS) bezeichnet wird (Hagting *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des CRS führt zu einem beschleunigten Kernimport und einem verlangsamten Export.

2.3.4 Inhibitorische Untereinheiten Cyclin-abhängiger

Kinasen

Die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen steht unter der Kontrolle inhibitorischer Untereinheiten, die als CDK-Inhibitoren (CKIs) bezeichnet werden. Die CKIs von Säugern werden nach ihrer Struktur, ihrem Wirkmechanismus und den CDKs, die sie inhibieren, in zwei Familien unterteilt: die Cip/Kip- und die INK4-Familie (Carnero und Hannon, 1998; Hengst und Reed, 1998). Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht über die beiden Familien der Säuger-CKIs.

	INK4-Familie	Cip/Kip-Familie
Mitglieder	p16 ^{INK4a} , p15 ^{INK4b} , p18 ^{INK4c} , p19 ^{INK4d}	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}
Inhibition von	CDK4, 6	CDK1, 2, 3, 4, 5, 6
Inhibitionsmechanismus	Bindung an die CDK- Untereinheit	Bindung an den Cyclin/CDK-Komplex
inhibitorische Struktureinheit	Ankyrin-Repeats	CDK-Inhibitor-Domäne

Tabelle 2.1: Die beiden Familien von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen in Säugern unterscheiden sich durch ihre Spezifität und ihren Wirkmechanismus.

2.3.4.1 Die INK4-Familie

Die INK4-Familie umfaßt vier Mitglieder: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Sie binden und inhibieren spezifisch CDK4 und CDK6, indem sie allein an die katalytische CDK-Untereinheit binden. Sie bestehen aus vier (p15 und p16) oder fünf (p18 und p19) Struktureinheiten, die als „Ankyrin-Repeats“ bezeichnet werden. Die mechanistische Grundlage für die Inhibition von CDK6 durch p16 und p19 wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt (Brotherton *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998). Die „Ankyrin-Repeats“ bilden eine konkave Struktur, die an die nichtkatalytische „Rückseite“ der Kinase bindet. Dies hat zur Folge, daß die aminoternale und carboxyterminale Domäne der Kinase gegeneinander verdreht werden und damit eine Konformation einnehmen, die die Katalyse nicht mehr unterstützt.

Die zellulären Funktionen der INK4-Proteine sind komplex (Ekholm und Reed, 2000; Roussel, 1999; Sherr und Roberts, 1999). Genetische Veränderungen des p16-Genlocus (Deletionen, Translokationen) sind in vielen humanen Tumoren, insbesondere familiären und spontanen Melanomen, zu finden (Chellappan *et al.*, 1998; Sherr, 1993). p16 wurde daher als Tumorsuppressor qualifiziert. Allerdings betreffen die Mutationen auch den überlappenden Genlocus von p19^{ARF}, eines Proteins, das den Abbau des Tumorsuppressors p53 inhibiert. Studien an Mäusen, bei denen *ARF* allein (Kamijo *et al.*, 1997) bzw. *ARF* und *INK4a* (Serrano *et al.*, 1996) deletiert wurden, lassen darauf schließen, daß die Tumorsuppressorfunktion des gemeinsamen Genlocus vor allem auf *ARF* zurückzuführen ist. Beide Mäuse zeigen eine ähnliche generelle Prädisposition für Tumoren. Ob p16 tatsächlich ein Tumorsuppressor ist, kann erst nach der Analyse einer selektiv INK4a-negativen Maus abschließend beurteilt werden. Allerdings gibt es Beobachtungen, die p16 mit der Checkpointkontrolle nach UV-Schädigung in Verbindung bringen und die eine Tumorsuppressorfunktion von p16 bei der Entstehung von Melanomen nahelegen (Isoherranen *et al.*, 1998; Passegue und Wagner, 2000; Pavey *et al.*, 1999; Sotillo *et al.*, 2001). p16 akkumuliert außerdem während der Zellalterung (Seneszenz) und ist an ihrer Induktion beteiligt, wobei der Beitrag, den p16 dabei leistet, offenbar vom Zelltypus und der Spezies abhängt (Lundberg *et al.*, 2000). p15 wird in epithelialen Zellen durch das Zytokin TGF- β transkriptionell induziert, und die Akkumulation des Inhibitors trägt dazu bei, daß die Zellen in der G₁-Phase arretieren (Seoane *et al.*, 2001). Die tumorassoziierten Deletionen des p16-Genlocus

betreffen zwar häufig auch den benachbarten p15-Genlocus, Veränderungen, die sich allein auf das p15-Gen beschränken, werden jedoch selten gefunden. Letzteres gilt auch für das p18- und das p19-Gen. Beide Proteine werden in der Maus während der Embryogenese und auch im erwachsenen Tier gewebespezifisch exprimiert und spielen daher wahrscheinlich bei der terminalen Differenzierung mancher Zelltypen eine Rolle. Diese Hypothese wurde durch Studien an p18- bzw. p19-negativen Mäusen bestätigt, wobei die gleichzeitige Deletion beider Gene auf eine teilweise redundante Funktion der beiden CKIs schließen ließ (Roussel, 1999).

2.3.4.2 Die Cip/Kip-Familie

Die Mitglieder der Cip/Kip-Familie, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} binden und inhibieren ein breites Spektrum von Cyclin/CDK-Komplexen. Ihnen gemeinsam ist eine konservierte aminoternale Domäne, die für die Inhibition von Cyclin/CDK-Komplexen notwendig und ausreichend ist. Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes der Inhibitor-domäne von p27 mit CDK2 und der carboxyterminalen Hälfte von Cyclin A wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt (Russo *et al.*, 1996a) und läßt Rückschlüsse auf den Inhibitionsmechanismus zu: Der aminoternale Bereich der Inhibitor-domäne von p27 bindet die konservierte Cyclin-Box von Cyclin A, ohne die Cyclin-A-Struktur wesentlich zu beeinträchtigen. Der carboxyterminale Bereich der Inhibitor-domäne interagiert mit der aminoternalen Domäne von CDK2 und verändert deren Konformation. Zusätzlich ragt der Inhibitor in das aktive Zentrum hinein, wo er die ATP-Bindestelle blockiert. Obwohl die Struktur von p21 und p57 im Komplex mit einem Cyclin/CDK-Heterodimer noch nicht bestimmt wurde, läßt die Sequenzhomologie ihrer Inhibitor-domänen einen analogen Inhibitionsmechanismus vermuten (Ekholm und Reed, 2000).

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

Paradoxerweise können Cip/Kip-Proteine Cyclin-abhängige Kinasen auch aktivieren. p27 inhibiert Cyclin D/CDK4-Komplexe *in vitro* weniger effizient als Cyclin/CDK2-Komplexe (Blain *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). Außerdem fördern Cip/Kip-Proteine *in vitro* die Bildung katalytisch

aktiver Cyclin D/CDK4-Komplexe (LaBaer *et al.*, 1997). Dies führte zu der Vermutung, daß Cip/Kip-Proteine auch *in vivo* als sog. „Assembly“-Faktoren die Bildung aktiver Cyclin D/CDK4(und CDK6)-Komplexe fördern könnten. Für diese Hypothese spricht, daß Fibroblasten von „Knock out“-Mäusen, die weder p21 noch p27 exprimieren, keine detektierbaren Mengen an Cyclin D/CDK-Komplexen aufweisen (Cheng *et al.*, 1999). Worin besteht der physiologische Zweck von p21- bzw. p27-gebundenen aktiven Cyclin D/CDK-Komplexen? Eine Erklärung ist, daß Cyclin D/CDK-Komplexe als Reservoir für p21 und p27 dienen können: Bei einer Induktion von INK4-Proteinen werden p21 bzw. p27 aus den Cyclin D/CDK-Komplexen verdrängt. Sie binden nun an Cyclin E/CDK2-Komplexe, die dadurch inhibiert werden. Umgekehrt führt die Induktion von Cyclin D dazu, daß die beiden Inhibitoren verstärkt von Cyclin D/CDK-Komplexen gebunden und dadurch aus Cyclin E/CDK2-Komplexen entfernt werden können. Dieser Mechanismus wird als „CKI-Exchange“ bezeichnet und trägt in verschiedenen Szenarien zur Regulation von Cyclin E/CDK2 und damit zur Kontrolle des G₁/S-Überganges bei (Ekholm und Reed, 2000; Sherr und Roberts, 1999).

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

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

2.4 Funktion und Regulation des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p21^{Cip1}

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

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

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

Komplexen, ein zusätzlicher Mechanismus sein, durch den p21 als Antwort auf DNA-Schäden die Replikation verlangsamt und der Zelle Gelegenheit zur DNA-Reparatur gibt (Hengst und Reed, 1998; Vidal und Koff, 2000).

Neben seiner Funktion als Effektor der p53-vermittelten Antwort auf genotoxischen Stress spielt p21 eine Rolle bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen. So wird während der Embryonalentwicklung eine gewebespezifische Expression von p21 beobachtet, die unabhängig von p53 ist und offenbar erfolgt, wenn die Zellen vor ihrer Differenzierung den Zellzyklus verlassen (Macleod *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1995). Anhand eines Zellkulturmodells für die Entwicklung der Skelettmuskulatur wurde gezeigt, daß p21 induziert wird, wenn Myozyten aufhören zu proliferieren und zu Myotuben fusionieren (Guo *et al.*, 1995; Halevy *et al.*, 1995). Die damit einhergehende Inaktivierung von CDKs spricht für eine funktionelle Rolle von p21 bei diesem Prozeß. Ähnliche Beobachtungen wurden in anderen Modellsystemen der Zelldifferenzierung gemacht. Humane U937-Zellen differenzieren zu Monozyten/Makrophagen, wenn sie mit Vitamin D3 behandelt werden, wobei p21 in den Zellen rasch akkumuliert. Die Überexpression von p21 wie auch von p27 reicht in diesen Zellen aus, um die Expression von Monozyten/Makrophagen-spezifischen Zellmarkern zu induzieren (Liu *et al.*, 1996). Bei der Differenzierung von epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraktes und der Epidermis ist die Funktion von p21 offenbar komplexer. Die Expression von p21 wird induziert, wenn die Zellen den Zellzyklus verlassen und sinkt während der Differenzierung wieder ab (el-Deiry *et al.*, 1995; Gartel *et al.*, 1996; Ponten *et al.*, 1995). Letzteres scheint für die Differenzierung essentiell zu sein, da die Überexpression von p21 die Differenzierung epidermaler Zellen in Kultur inhibiert (Di Cunto *et al.*, 1998). Überraschenderweise wurden bei p21-negativen Mäusen keine offenkundigen Entwicklungs- oder Gewebedefekte beobachtet (Deng *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, daß die Rolle von p21 während der Individualentwicklung redundant besetzt ist, d.h. daß andere Proteine dieselbe Funktion wie p21 ausüben oder ausüben können. Übereinstimmend mit dieser Hypothese können Mausdoppelmutanten, die weder p21 noch p57 exprimieren, keine Myotuben bilden (Zhang *et al.*, 1999). p21 akkumuliert außerdem in Zelllinien, die sich der Seneszenz nähern (Noda *et al.*, 1994). Die funktionelle Bedeutung dieser Akkumulation ist jedoch unklar. Die Deletion des p21-Gens verhindert die Seneszenz humaner Fibroblasten, nicht jedoch die Seneszenz von Mausfibroblasten (Brown *et al.*, 1997; Pantoja und Serrano, 1999).

Die Expression von p21 wird in den meisten Szenarien vornehmlich transkriptionell reguliert (Gartel und Tyner, 1999). Der p21-Genpromotor wurde intensiv charakterisiert und enthält z.B. Elemente, die durch p53, den Vitamin-D3-Rezeptor oder den myogenen Transkriptionsfaktor MyoD aktiviert werden. Daneben kann die Stabilität der p21-mRNA unter bestimmten Bedingungen variieren (Gorospe *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000).

Überraschenderweise wird die Expression von p21 in einigen Zellkultursystemen auch induziert, wenn ruhende Zellen zur Proliferation stimuliert werden und in den Zellzyklus zurückkehren (Li *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde berichtet, daß in proliferierenden humanen Fibroblasten die Mehrheit der CDK4- und CDK2-Komplexe mit p21 assoziiert ist (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite ist p21 ein Protein, das die Progression von Zellen im Zellzyklus inhibieren kann. Um dieses offenbare Paradoxon zu erklären, wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem Cyclin/CDK-Komplexe, die nur mit einem p21-Molekül assoziiert sind, aktiv bleiben und erst durch die Bindung von mehr als einem p21-Molekül inhibiert werden (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Dieses Modell wurde durch Studien unterstützt, die zeigten, daß CDK-Komplexe, die mit anti-p21 Antikörpern aus Zellysaten präzipitiert worden waren, anscheinend katalytisch aktiv waren und erst inhibiert wurden, wenn p21 im Überschuß zugegeben wurde (Harper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Es wurde daher zur Diskussion gestellt, daß p21 bei niedriger Stöchiometrie als „Assembly“-Faktor die Bildung aktiver Cyclin/CDK-Komplexe fördern könnte (LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Die dreidimensionale Struktur eines Komplexes aus Cyclin A, CDK2 und der Inhibitor-domäne des verwandten CKIs p27 zeigte jedoch, daß ein Molekül dieses Inhibitors ausreichen sollte, diese Kinase zu inhibieren (Russo *et al.*, 1996a). Die hohe Homologie der Inhibitor-domänen von p21 und p27 ließ vermuten, daß dies auch für p21 gelten sollte. Der scheinbare mechanistische Unterschied der CDK-Inhibition durch p21 und p27 wurde mit biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht (Hengst *et al.*, 1998). Durch analytische Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, daß ternäre Komplexe aus Cyclin A, CDK2 und p21, die *in vitro* aus rekombinanten Proteinen gebildet worden waren, einheitlich in einer Stöchiometrie von 1:1:1 vorlagen. Die Kinaseaktivität dieser Komplexe war gegenüber dem heterodimeren Cyclin A/CDK2-

Komplex dramatisch reduziert. Der Umfang der Inhibition nahm stark ab, wenn die ternären Komplexe unter eine kritische Konzentration verdünnt wurden. Dies wurde als Hinweis gewertet, daß die beschriebene Kinaseaktivität von anti-p21 Immunpräzipitaten durch die Dissoziation der ternären Cyclin A/CDK2-Inhibitorkomplexe im Reaktionsansatz hervorgerufen wurde. Weiterhin zeigten die Autoren, daß rekombinantes p21 in Lösung als Monomer vorliegt, und daß dieses, nachdem es auf einer Gelmatrix vereinzelt wurde, Cyclin A/CDK2 bindet und inhibiert. Zusammengenommen demonstrierten die Experimente, daß ein einzelnes p21-Molekül ausreicht, Cyclin A/CDK2 zu inhibieren und daß p21-gesättigte Cyclin A/CDK2/p21-Komplexe nur ein Molekül p21 enthalten.

Die Regulation von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen durch postranslationale Modifikationen rückt mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses. So wird p27 z.B. von Cyclin E/CDK2 am Threoninrest 187 phosphoryliert. Diese Modifikation hat in der Zelle den Ubiquitin-abhängigen Abbau des Proteins zur Folge (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). Weiterhin wurden in zellulären Cyclin-A-Komplexen zwei p21-Isoformen mit abweichender elektrophoretischer Beweglichkeit detektiert, bei denen es sich um Phosphoisoformen des Inhibitors handeln könnte (Dulic *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund wurde die Frage gestellt, ob p21 durch Cyclin A/CDK2 phosphoryliert wird, und ob diese Modifikation möglicherweise Einfluß auf die Fähigkeit des Inhibitors haben könnte, Cyclin/CDK-Komplexe zu binden und zu inhibieren. Diese Frage war Gegenstand des zweiten Teils der vorliegenden Doktorarbeit.

2.5 Funktion und Regulation des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen p27^{Kip1}

p27^{Kip1} wurde nahezu zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen als CDK-inhibierende Aktivität in G₁-arretierten Zellkulturen entdeckt (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994). Daneben wurde p27 auf genetischem Wege als Protein identifiziert, das an Cyclin D1 bindet (Toyoshima und Hunter, 1994). p27 wird in proliferierenden Zellen periodisch exprimiert. Die p27-Konzentration ist maximal während der G₁-Phase, fällt stark ab, wenn die Zellen in die S-Phase eintreten und bleibt niedrig, bis die Zellen die nächste G₁-Phase erreichen (Hengst *et al.*, 1994;

Hengst und Reed, 1996; Millard *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird p27 durch eine breite Palette antiproliferativer Signale in vielen verschiedenen Zelltypen induziert (Hengst und Reed, 1998). So akkumuliert p27 z.B. in Zellen, die nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Kontaktinhibition oder nach dem Entzug der Substratverankerung den Zellzyklus verlassen und quieszent werden.

Eine Fülle experimenteller Daten weist darauf hin, daß die intrazelluläre p27-Menge eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Restriktionspunktes spielt. (a) Der Großteil der Cyclin E/CDK2- und der Cyclin A/CDK2-Komplexe in quieszenten Mausfibroblasten ist mit p27 assoziiert, so daß deren Inhibition unter diesen Bedingungen auf p27 zurückzuführen ist (Coats *et al.*, 1996). (b) Die Überexpression von p27 in Zellen hat ihre Arretierung in der G₁-Phase zur Folge (Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). (c) Die Reduktion der intrazellulären p27-Menge mit Hilfe der Antisense-RNA-Technik verhindert, daß Fibroblasten von Nagern nach dem Entzug von Serum quieszent werden. Darüber hinaus zeigen diese Fibroblasten eine verkürzte G₁-Phase (Coats *et al.*, 1996; Rivard *et al.*, 1996). Dieser Phänotyp wird ansonsten bei Überexpression von G₁-Cyclinen beobachtet, und ist daher konsistent mit der CDK-Inhibitorfunktion von p27 (Ohtsubo *et al.*, 1995; Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994; Resnitzky *et al.*, 1995; Resnitzky und Reed, 1995).

Die Abundanz von p27 während der G₁-Phase spielt eine kritische Rolle bei der Entscheidung zwischen Proliferation oder Quieszenz. Dies wurde durch die Analyse von p27-negativen Mäusen bestätigt. In zwei Studien wurde das p27-Gen vollständig deletiert und in einer weiteren durch eine verkürzte p27-Mutante ohne CDK-Inhibitor-domäne ersetzt (Fero *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Alle drei Mausstämme zeigen den gleichen Phänotyp. Er ist vor allem gekennzeichnet durch eine Gendosis-abhängige Zunahme der Körpergröße, die generelle Unfruchtbarkeit der weiblichen Mäuse und Taubheit. Letztere wird durch die fortgesetzte Proliferation der Haarzellen des Corti-Organs in adulten Mäusen verursacht (Chen und Segil, 1999; Lowenheim *et al.*, 1999). Offenbar ist durch das Fehlen von p27 die Fähigkeit einer Reihe von Zelltypen beeinträchtigt, während der Individualentwicklung aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase überzutreten (Vidal und Koff, 2000). Überraschenderweise werden jedoch MEFs aus p27-negativen Mäusen durch den Entzug von Serum arretiert (Nakayama *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich darin von Mausfibroblasten, in denen die p27-Expression transient unterdrückt wurde. Es wurde daher vermutet, daß MEFs das Fehlen von p27 durch einen alternativen

Mechanismus der CDK-Regulation kompensieren können. In der Tat wurde beschrieben, daß das Pocketprotein p130 in MEFs, die weder p21 noch p27 exprimieren, als CKI wirkt und Cyclin E/CDK2-Komplexe inhibiert (Coats *et al.*, 1999). Die Redundanz der CDK-Regulation durch p27 und p130 ist jedoch offenbar zelltypspezifisch, denn p130 kann das Fehlen von p27 in T-Zellen nicht kompensieren, möglicherweise weil die Menge an p130 in diesen Zellen geringer ist als in MEFs (Coats *et al.*, 1999).

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

Die intrazelluläre Menge an p27 kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Dies spiegelt die Fähigkeit des Inhibitors wieder, diverse mitogene und antiproliferative Signale in die Zellzykluskontrolle zu integrieren. Eine transkriptionelle Induktion von p27 wurde z.B. beobachtet, wenn U937-Zellen infolge der Behandlung mit Vitamin D3 zu Monozyten/Makrophagen differenzieren (Inoue *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1996). In Fibroblasten, die als Antwort auf einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) in der G₁-Phase arretieren, wird p27 ebenfalls transkriptionell induziert (Gardner *et al.*, 2000). In glatten Gefäßmuskelzellen wird die p27-mRNA-Synthese vermindert, wenn die Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert werden (Servant *et al.*, 2000). In

der Mehrzahl der untersuchten Szenarien gehen Veränderungen der p27-Menge jedoch nicht mit einer Veränderung der p27-mRNA-Menge einher (Hengst und Reed, 1998). Die regulierte Translation der p27-mRNA und der regulierte Abbau des p27-Proteins wurden als Mechanismen identifiziert, die der Oszillation von p27 während des Zellzyklus und seiner Akkumulation in quieszenten Fibroblasten und quieszenten promyelozytischen HL60-Zellen zugrunde liegen (Hengst und Reed 1996, Millard 1997, Pagano 1995, Agrawal 1996).

p27 wird *in vivo* und in Zellextrakten ubiquitinabhängig durch das 26S-Proteasom abgebaut (Pagano 1995). Eine Reihe experimenteller Daten weist darauf hin, daß die Ubiquitinierung von p27 durch einen SCF-Komplex mit dem F-Box-Protein SKP2 als Adaptorprotein erfolgt (Carrano *et al.*, 1999; Morimoto *et al.*, 2000; O'Hagan *et al.*, 2000; Spruck *et al.*, 2001; Sutterluty *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999). p27 wird in Extrakten aus proliferierenden Zellen und Zellen der S-Phase rascher ubiquitiniert und abgebaut als in Extrakten aus quieszenten Zellen und Zellen der G₁-Phase (Brandeis und Hunt, 1996; Montagnoli *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995). Während der späten G₁- der S- und der G₂-Phase muß p27 durch CDK2 am Threoninrest 187 phosphoryliert werden, um effizient ubiquitiniert und abgebaut zu werden (Malek *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999; Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). Während der G₁-Phase wird p27 durch einen zweiten, ebenfalls SKP2-abhängigen Abbauweg degradiert, der von der Phosphorylierung an Threonin 187 unabhängig ist (Malek *et al.*, 2001). In einer jüngst erschienen Veröffentlichung wurde ein SKP2-unabhängiger proteasomaler Abbauweg für p27 am G₀/G₁-Übergang von Lymphozyten beschrieben, der jedoch ebenfalls ubiquitinabhängig ist (Hara *et al.*, 2001).

Über die translationale Regulation von p27 ist sehr viel weniger bekannt. Es wurde beobachtet daß sich die Effizienz, mit der die p27-mRNA translatiert wird, verändert, wenn Zellen aus dem proliferativen Zustand in die Quieszenz übergehen oder umgekehrt aus der Quieszenz wieder in den Zellzyklus zurückkehren. So wird die Translation von p27 in ruhenden BALB/c-3T3-Fibroblasten nach einer Stimulierung mit PDGF beim Eintritt in den Zellzyklus reprimiert (Agrawal *et al.*, 1996). Umgekehrt steigt die Translationseffizienz der p27-mRNA, wenn normale diploide Fibroblasten (HS68) durch Kontaktinhibition den Zellzyklus verlassen (Hengst und Reed, 1996). Die Behandlung der promyelozytischen Leukämiezelllinie HL60 mit dem Phorbolster TPA

führt gleichsam zu einem Anstieg der Translation von p27, der mit dem Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus und der Differenzierung zu Monozyten einhergeht (Millard *et al.*, 1997). Die Translationseffizienz der p27-mRNA unterliegt aber auch im Verlauf des Zellzyklus einer periodischen Schwankung. Sie ist in HeLa-Zellen, die mit Lovastatin, einem Inhibitor der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase, in der G₁-Phase arretiert wurden, im Vergleich zu Zellen der S-Phase um ein Mehrfaches erhöht (Hengst und Reed, 1996). An HL60-Zellen, die nicht arretiert, sondern durch Elutriation nach ihrer Position im Zellzyklus fraktioniert wurden, sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden (Millard *et al.*, 1997).

Zusammengenommen zeigen die bisherigen Untersuchungen, daß die Abnahme der p27-Menge in der späten G₁-Phase eine wichtige Voraussetzung für das Überschreiten des Restriktionpunktes ist. Der kontrollierte Abbau von p27 und die translationale Regulation seiner Synthese spielen daher eine kritische Rolle bei der Entscheidung zwischen Proliferation und Wachstumsarrest.

2.6 Translation und translationale Genregulation

2.6.1 Allgemeine Prinzipien

Der Prozeß der Translation, also der Übersetzung der Kodon-Sequenz einer Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) in die Aminosäuresequenz eines Proteins, kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Bei der Initiation wird die mRNA-Matrize mit einer speziellen Initiator-Aminoacyl-tRNA und den beiden Ribosomenuntereinheiten am Startkodon zu einem Komplex vereinigt. Bei der anschließenden Elongation wird entsprechend der Kodon-Sequenz der mRNA eine Aminosäure nach der anderen an den Carboxyterminus der wachsende Polypeptidkette angefügt. Schließlich wird bei Erreichen des Stopkodons das vollständige Protein aus dem Komplex entlassen (Termination). Das Ribosom dissoziiert in seine beiden Untereinheiten und steht für eine neue Translationsrunde zur Verfügung.

Translationale Genregulation bedeutet, daß sich die Anzahl der pro Zeiteinheit an einer bestimmten mRNA synthetisierten Protein-Moleküle ändert. Sowohl die Initiation als auch die Elongation und die Termination können für die Translation geschwindigkeitsbestimmend sein. Bei den meisten mRNAs ist jedoch die Initiation für die Translationsrate limitierend. Translationale Regulation findet daher meist auf der Ebene der Initiation statt (Mathews *et al.*, 2000). Die zelluläre Gesamtproteinsyntheserate wird durch die Aktivität allgemeiner Translationsinitiationsfaktoren beeinflusst. Diese hängt von extrazellulären Stimuli und der Position der Zelle im Zellzyklus ab. Die Translationseffizienz einer bestimmten mRNA wird durch cis-wirkende RNA-Elemente gesteuert, die sich meist in der 5'- oder der 3'-untranslatierten Region der mRNA befinden. Diese können entweder allein aufgrund ihrer Struktur oder im Zusammenspiel mit spezifischen trans-wirkenden Faktoren regulatorisch wirken. Bei diesen spezifischen trans-wirkenden Faktoren handelt es sich meist um Proteine, selten um RNAs (Mathews *et al.*, 2000).

2.6.2 Der Cap-abhängige Scanning-Mechanismus

Die Translationsinitiation der meisten eukaryontischen mRNAs erfolgt nach einem einheitlichen Mechanismus. Dieser wird als Cap-abhängiges Scanning bezeichnet, da er

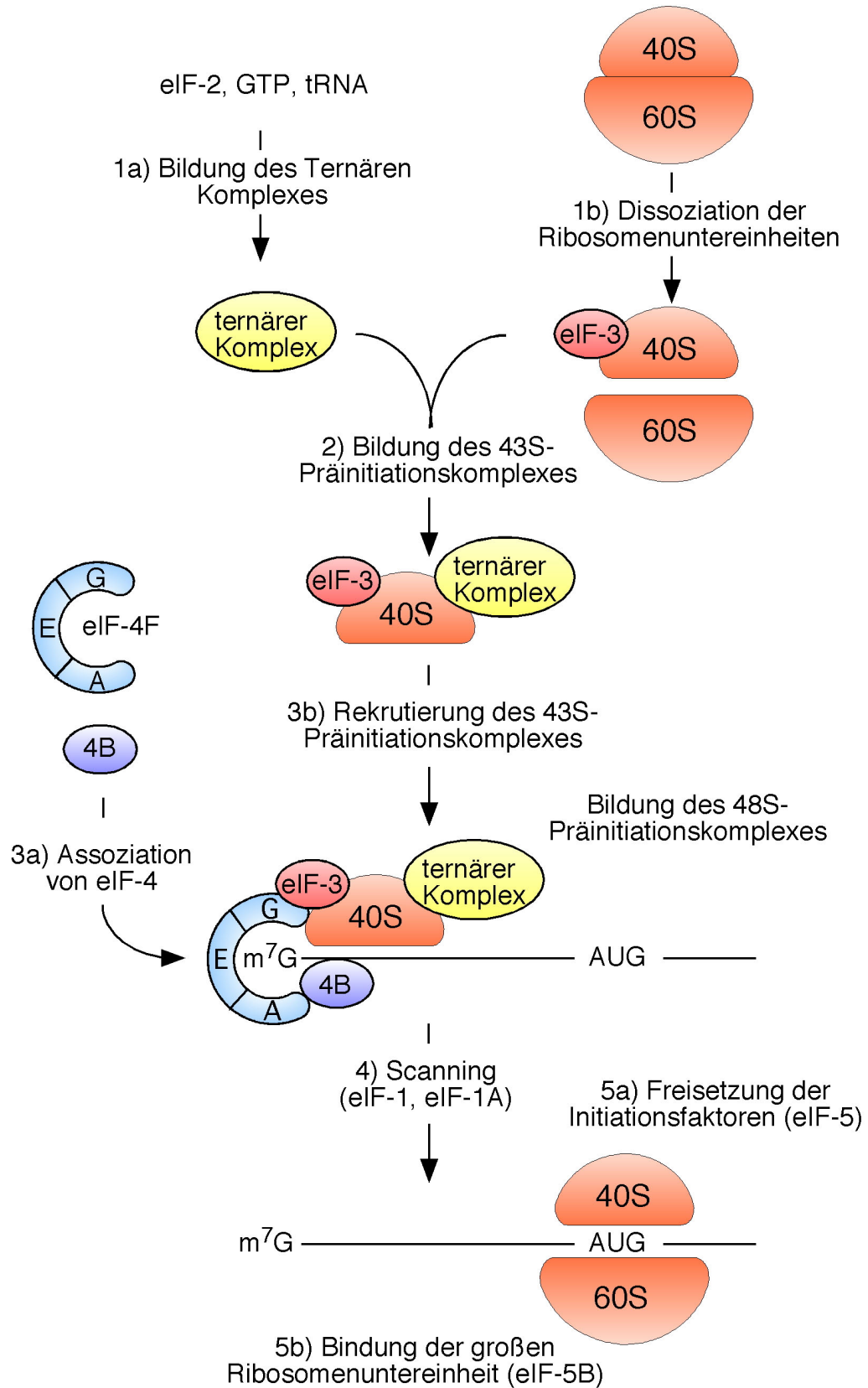


Abbildung 2.3: Translationsinitiation durch Cap-abhängiges Scanning, modifiziert nach Gray und Wickens (1998); Erläuterungen siehe Text.

auf der Erkennung der 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende der eukaryontischen mRNAs beruht (Gray und Wickens, 1998; Kozak, 1999; Hershey und Merrick, 2000; Pestova *et al.*, 2001). Eine Reihe von Initiationsfaktoren sind an diesem Mechanismus beteiligt. Abbildung 2.3 zeigt eine vereinfachte Übersicht.

Zur Initiation der Translation müssen Ribosomen generell zunächst in ihre beiden Untereinheiten dissoziieren. Dies wird durch die Bindung des Initiationsfaktors eIF-3 an die kleine (40S-)Ribosomenuntereinheit gefördert. Diese lagert sich mit dem ternären Komplex zum 43S-Präinitiationskomplex zusammen. Der ternäre Komplex besteht aus der Methionyl-Initiator-tRNA, dem Initiationsfaktor eIF-2 und GTP.

Der 43S-Präinitiationskomplex wird durch den Initiationsfaktor eIF-4F zum 5'-Ende der mRNA gelenkt. Dieser Initiationsfaktor besteht bei Säugern aus drei Untereinheiten: eIF-4E, der die 7-Methylguanosin-Kappe bindet, eIF-4A, der eine ATP-abhängige RNA-Helikase-Aktivität besitzt und eIF-4G, der neben eIF-4E und eIF-4A auch eIF-3 bindet und dadurch die Rekrutierung des 43S-Präinitiationskomplexes unterstützt. Es wird allgemein davon ausgegangen, daß die Helikase-Aktivität von eIF-4F dazu dient, Sekundärstrukturen am 5'-Ende der mRNA aufzulösen, die sonst mit der Bindung des 43S-Komplexes interferieren könnten. Die Helikaseaktivität wird stimuliert durch den Initiationsfaktor eIF-4B, der zusammen mit eIF-4F oder kurz darauf an die mRNA bindet.

Nach der Bindung des 43S-Komplexes an die mRNA wandert dieser in einem ATP-abhängigen Prozeß die 5'-untranslatierte Region (5'UTR) entlang stromabwärts, bis er ein Startkodon erkennt. Bei 90% der mRNAs handelt es sich um das am weitesten stromaufwärts gelegene AUG. Selten dienen auch die Basentriplets GUG und CUG als Startkodons. Das Absuchen der mRNA nach dem Startkodon wird als Scanning bezeichnet und wird durch die Initiationsfaktoren eIF-1 und eIF-1A stimuliert. Nach der Erkennung des Startkodons, die primär auf der RNA-RNA-Wechselwirkung des Startkodons mit dem Antikodon der Initiator-tRNA beruht, löst der Initiationsfaktor eIF-5 die Hydrolyse des GTPs des ternären Komplexes aus. Diese Reaktion galt bis vor kurzem als einzige Voraussetzung für die Dissoziation der Initiationsfaktoren und die Bindung der großen (60S-)Ribosomenuntereinheit. Neuere Untersuchungen zeigten, daß ein weiterer Initiationsfaktor, die GTPase eIF-5B, für die Bindung der großen Ribosomenuntereinheit und damit für die Bildung eines elongationskompetenten 80S-Initiationskomplexes notwendig ist.

Wie bereits erwähnt, wird im Rahmen des Cap-abhängigen Scannings meist, jedoch nicht immer das am weitesten stromaufwärts gelegene AUG-Triplett als Startkodon genutzt. Die Effizienz, mit der ein AUG-Triplett erkannt wird, hängt von der umgebenden RNA-Sequenz ab (Kozak, 1999). Startkodons, die effizient erkannt werden, besitzen Purin-Nukleotide in den Positionen -3 und +4, wobei das A des AUG-Triplets der Position +1 entspricht. AUG-Triplets, deren Sequenzkontext von diesem Konsensusmotiv abweicht, werden mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vom 43S-Komplex „überlesen“, so daß die Proteinsynthese an einem stromabwärts gelegenen AUG initiiert wird. Dieser Prozeß wird als „leaky scanning“ bezeichnet.

Eine Variation des ribosomalen Scanning-Mechanismus ist die Reinitiation (Gray und Wickens, 1998; Hershey und Merrick, 2000; Jackson, 2000). Bei diesem Mechanismus wird nach der Translation eines stromaufwärts gelegenen offenen Leserahmens (upstream open reading frame, uORF) die Translation an einem stromabwärts gelegenen Startkodon erneut initiiert. Die Art und Weise, wie Reinitiation erfolgt, ist nicht geklärt. Es wird postuliert, daß die ribosomale 60S-Untereinheit nach der Translation des uORFs von der mRNA abdissoziiert, während die 40S-Untereinheit das Scanning wieder aufnimmt. Ob sie zu diesem Zeitpunkt noch mit Translationsinitiationsfaktoren assoziiert ist, und wenn ja, mit welchen, ist nicht bekannt. Zumindest muß sie einen neuen ternären Komplex aufnehmen, um die Translation reinitiiieren zu können.

uORFs eukaryontischer mRNAs sind meist klein, und bisher ist, zumindest für Säuger, kein Beispiel für eine bicistronische mRNA bekannt, die für zwei funktionelle Polypeptide kodiert. uORFs können jedoch die Translation des Haupt-ORFs modulieren (Morris und Geballe, 2000; Geballe und Sachs, 2000). Die Mechanismen, die diese Modulation ermöglichen, sind „leaky scanning“ und Reinitiation. Faktoren, die die Effizienz beider Prozesse beeinflussen, bestimmen, wie stark die Translation des Haupt-ORFs inhibiert wird. uORFs, deren Startkodon mit geringer Effizienz erkannt wird, sind weniger inhibitorisch als solche, deren Startkodon mit hoher Effizienz erkannt wird. Die Effizienz der Reinitiation kann von der Länge des uORFs, seinem Abstand vom Haupt-ORF und dem Sequenzkontext des Stopkodons beeinflußt werden. Sowohl „leaky scanning“ als auch Reinitiation können durch die Aktivität von Translationsinitiationsfaktoren beeinflußt werden. Bei einer Anzahl von uORFs spielt auch die Sequenz des kodierten Peptids für die inhibitorische Wirkung auf die Translation des Haupt-ORFs eine Rolle.

Die Translation eines ORFs kann durch stabile Sekundärstrukturen in der 5'-untranslatierten Region inhibiert werden. Ihre inhibitorische Wirkung hängt von ihrer Stabilität und ihrer Position ab. Strukturen, die sich nahe an der 5'-Kappe befinden, verhindern die Bindung von 43S-Präinitiationskomplexen und müssen dazu nur mäßig stabil sein (Kozak, 1989). Strukturen die sich weiter stromabwärts befinden können das ribosomale Scanning inhibieren und müssen dazu stabiler sein (Kozak, 1986; Kozak, 1989). Andere RNA-Elemente inhibieren die Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes oder das ribosomale Scanning nur, wenn sie mit einem Repressorprotein assoziiert sind. Ein Beispiel dafür ist das IRE (iron response element) das im Zusammenspiel mit den IRPs (iron regulatory proteins) die Translation z.B. der Ferritin-mRNA reguliert (Muckenthaler *et al.*, 1998; Paraskeva *et al.*, 1999).

mRNAs, die für Proteine kodieren, die eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen (Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und andere Proto-Onkogene), besitzen häufig ausgedehnte 5'UTRs von mehr als 200 nt, die stabile Sekundärstrukturen bilden (Kozak, 1987; Kozak, 1991). Bei geringfügigen Änderungen der zellulären Gesamtproteinsynthese ändert sich die Translationseffizienz mancher dieser mRNAs dramatisch. Dieser Effekt wird als „translational discrimination“ bezeichnet. Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin bestehen, daß RNAs mit stabilen Sekundärstrukturen sensitiver gegenüber der (Helikase-)Aktivität des Initiationsfaktors eIF-4F (Cap-bindender Komplex) sind, die in Säugern häufig mit der Gesamtproteinsyntheserate korreliert (Gingras *et al.*, 2001). Für die Aktivität von eIF-4F ist die Aktivität des Cap-Bindeproteins eIF-4E limitierend. Diese wiederum steht unter der Kontrolle einer Familie von Inhibitoren, der eIF-4E-Bindeproteine (4E-BPs) (Gingras *et al.*, 1999; Raught *et al.*, 2000). Hypophosphorylierte Formen der 4E-BPs binden an eIF-4E und verhindern dadurch die Bildung eines funktionellen eIF-4F-Komplexes. Die Phosphorylierung der 4E-BPs wird durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone) induziert und umgekehrt durch Stressfaktoren, z.B. Nährstoffmangel, inhibiert. Die Regulation des Phosphorylierungszustandes der 4E-BPs erfolgt über Signalwege, die einerseits über die Serin/Threonin-Kinase FRAP/mTor und andererseits über die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB verlaufen (Gingras *et al.*, 2001). Beide Signalwege sind auch an der Aktivierung der S6-Kinase beteiligt, die die Translation einer besonderen Klasse von mRNAs induziert, die am 5'-

Ende eine Oligopyrimidin-Sequenz besitzen. Zu dieser Klasse gehören unter anderem mRNAs, die für ribosomale Proteine und Translationselongationsfaktoren kodieren.

2.6.3 Cap-unabhängige Translationsinitiation

Die Initiation der Translation kann in eukaryontischen Zellen durch einen zweiten Mechanismus erfolgen. Interne Ribosomenbindestellen (internal ribosomal entry sites, IRESs) ermöglichen Ribosomen, bestimmte mRNAs unabhängig von der 7-Methylguanosin-Kappe zu binden und zu translatieren (Jackson, 2000; Belsham und Jackson, 2000; Pestova *et al.*, 2001).

Solche Elemente wurden zuerst in den RNA-Genomen von Picornaviren entdeckt. Diese viralen IRES-Elemente sind etwa 400 nt lang und hochstrukturiert. Sie können aufgrund ihrer Sequenz und Sekundärstruktur verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Für ihre Funktion ist in erster Linie ihre Sekundärstruktur ausschlaggebend. Die Primärstruktur der RNA ist nur in wenigen, kurzen Bereichen wichtig.

Die Translationinitiation an Picornavirus-RNAs erfordert eine Reihe kanonischer zellulärer Translationsinitiationsfaktoren, sie kann aber in Abwesenheit von intaktem eIF-4F erfolgen. Viele Picornaviren (z.B. der Poliovirus) nutzen diesen Umstand, indem sie die weitgehend Cap-abhängige zelluläre Translation durch Proteolyse von eIF-4F (genauer der Untereinheit eIF-4G) selektiv ausschalten und dadurch den Translationsapparat auf die Synthese der viralen Proteine fokussieren (Thompson und Sarnow, 2000; Belsham und Jackson, 2000). Die Aktivität der IRES-Elemente von Picornaviren hängt von weiteren zellulären Proteinen ab, die als „IRES transacting factors“ (ITAFs) bezeichnet werden und von Virus zu Virus variieren (Pestova *et al.*, 2001).

IRES-Elemente wurden inzwischen auch bei anderen RNA-Viren und einer Reihe zellulärer mRNAs nachgewiesen. Einige dieser mRNAs kodieren für Proteine, die unter Bedingungen verminderter Cap-abhängiger Translation, beispielsweise während der Mitose oder unter Stress, exprimiert werden (Holcik *et al.*, 2000).

2.7 Aufgabenstellung

Die Expression des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} unterliegt einer translationalen Regulation, die von der Position der Zelle im Zellzyklus und den Wachstumsbedingungen abhängt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mechanismen dieser Regulation aufzuklären. Dazu

sollten zunächst potentielle cis-regulierende RNA-Elemente in der p27-mRNA identifiziert werden. Im zweiten Schritt sollten Proteine, die an diese Elemente binden, isoliert und auf ihre mögliche Rolle bei der Translationsregulation von p27 hin untersucht werden.

In einem zweiten Projekt sollte eine Fragestellung aus dem Bereich der posttranskriptionellen Regulation des CDK-Inhibitors p21^{Cip1} bearbeitet werden. Hengst *et al.* (1998) konnten zeigen, daß ein Molekül p21 ausreichend ist, Cyclin A/CDK2 zu inhibieren. Aufgrund verschiedener Hinweise wurde vermutet, daß p21 durch Cyclin/CDK-Komplexe phosphoryliert und dadurch in seinen inhibitorischen Eigenschaften verändert werden könnte. Um dieser Frage nachzugehen, sollte versucht werden, p21 durch Cyclin A/CDK2-Komplexe *in vitro* zu phosphorylieren. Das phosphorylierte p21 sollte isoliert und auf seine Fähigkeit hin untersucht werden, als Monomer Cyclin A/CDK2 zu inhibieren.

3 Material und Methoden

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

3.1 Material

3.1.1 Geräte

AG204, Analysenwaage	Mettler Toledo, Giessen
ÄKTApurifier, Chromatographie-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Centrifuge 5415 C, Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Curix 60, Röntgenfilmentwickler	Agfa, Köln
Digital pH-meter 4500	Beckman, München
Dounce-Homogenisator, Typ L	B. Braun, Melsungen
Elektrophorese-Apparaturen	Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
Elektrophoresis Power Supply EPS 300	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresis Power Supply ECPS 3000/150	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPSON GT-9500, Scanner	EPSON, Düsseldorf
FACSCalibur, Durchflußzytofluorimeter	Becton Dickinson, Heidelberg
FPLC, Chromatographie-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fujifilm BAS-2500, PhosphorImager	Fujifilm, Düsseldorf
Gel Dryer Model 583	BioRad, München
GS-15R, Kühlzentrifuge	Beckman, München
Hera cell, Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau
Herolab UVT 2020 (365 nm), UV-Leuchttisch	Herolab, Wiesloch
Hettich Rotixa/KS, Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
HFU 86, Tiefkühlschrank (-80°C)	Heraeus, Hanau
Hypercassette, Autoradiographiekassette	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ImageMaster VDS 1D, Dokumentationssystem	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Incucell 404, Brutschrank	MMM Medcenter, Planegg
Innova 4430, Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen

ISS Orbital Shaker	Integrated Separator Systems, Natick, USA
J6-HC, Kühlzentrifuge	Beckman, München
L8-70M, Ultrazentrifuge	Beckman, München
LS-4.2, Rotor	Beckman, München
Labofuge 400R, Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Labsonic U, Ultraschallhomogenisator	B. Braun, Melsungen
LaminAir HB 2448, Sterilbank	Heraeus, Hanau
LS-1801, Szintillationszähler	Beckman, München
Lumat LB 9501, Luminometer	Berthold, Wildbad
Membran Vakuumpumpe MD8C	Vakuubrand, Wertheim
Mini Hybridisation Oven	Appligene-Oncor, Illkirch, Frankreich
Mini Oven MK II	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Olympus CK 30, Mikroskop	Olympus, Hamburg
Optima TLX, Ultrazentrifuge	Beckman, München
Premium no frost, Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
PG5002-SDR, Präzisionswaage	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Primus, Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
Purelab Plus UV/UF	USF, Ransbach-Baumbach
Sorvall GS3, Rotor	Du Pont, Bad Nauheim
Sorvall GSA, Rotor	Du Pont, Bad Nauheim
Sorvall SS34, Rotor	Du Pont, Bad Nauheim
Sorvall RC 5C, Kühlzentrifuge	Du Pont, Bad Nauheim
Speed Vac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Spectrophotometer DU 640	Beckman, München
TI 50.2, Rotor	Beckman, München
TLA 100.3, Rotor	Beckman, München
TranScreen LE und HE	Kodak, Stuttgart
Überkopffrotator	Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Wasserbäder	B. Braun, Melsungen
Western-Blot-Apparatur	Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeblock	Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Feinchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in Analysequalität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), SERVA (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Es wurde ausschließlich Wasser verwendet, das über eine „Purelab Plus UV/UF“-Filteranlage der Firma USF (Ransbach-Baumbach) gereinigt worden war. Es wird im folgenden als ddH₂O bezeichnet.

3.1.2.1 Radiochemikalien

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

Adenosin-5'-[γ -³²P]triphosphat, Triethylammonium-Salz, 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

Cytidin-5'-[α -³²P]triphosphat, Triethylammonium-Salz, 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

Desoxycytidin-5'-[α -³²P]triphosphat, Triethylammonium-Salz, 3000 Ci/mmol,
10 μ Ci/ μ l

L-[U-¹⁴C]Leucin, 314 mCi/mmol, 50 nCi/ μ l

Redivue L-[³⁵S]Methionin, >1000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

L-[³⁵S]Methionin, >1000 Ci/mmol, 15 μ Ci/ μ l

Pro-mix L-[³⁵S], Gemisch aus L-[³⁵S]Methionin und L-[³⁵S]Cystein zur metabolischen
Markierung, >1000 Ci/mmol, 14,3 μ Ci/ μ l

3.1.2.2 Transfermembranen

Hybond-N+, positiv geladene Nylonmembran Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

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

Optitran BA-S 83, verstärkte Nitrozellulose Schleicher & Schüll, Dassel

3.1.2.3 Röntgenfilme

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

3.1.2.4 Materialien zur Filtration und Dialyse

Centricon 30 Amicon, Witten

Spectra/Por, Dialyseschläuche The Spectrum Companies, Gardena, USA

UH 100/1 Ultrahülsenapparatur	Schleicher & Schüll, Dassel
UH 100/10 Ultrahülsen	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman 3 MM, Filterpapier	Maidstone, UK
Whatman GF/C, Glasfaserfilter	Maidstone, UK

3.1.2.5 Säulenmaterialien und fertig gepackte

Chromatographiesäulen

CNBr-Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HighTrap Heparin 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HighTrap Q 1 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HighTrap SP 1 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Micro Bio-Spin, Minisäulchen	BioRad, München
Ni-NTA Agarose	QIAGEN, Hilden
PolyPrep, 2-ml-Tropfsäule	BioRad, München
ProBond Nickel-Chelating Resin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Protein A Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sephadex G-25	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.2.6 Molekulargewichts- und Längenstandards

BenchMark Protein Ladder	Life Technologies, Karlsruhe
GeneRuler 100bp Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1kb Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Protein Standards, prestained	BioRad, München
Precision Protein Standards, unstained	BioRad, München
Protein Molecular Weight Marker, prestained	New England Biolabs, Schwalbach
RNA Century Marker Plus Template Set	Ambion, Austin, USA
RNA Ladder, 0,24-9,5 kb	Life Technologies, Karlsruhe
SigmaMarker Wide Range	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

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

Amplify, Fluorographie-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Aqua-Roti-Phenol, pH 4,5 – 5	Roth, Karlsruhe

Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Deoxynucleotide Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dual Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
Multiple Tissue Northern (MTN) Blot	CLONTECH, Heidelberg
Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, pH 8,0	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Prime-a-Gene Labeling System	Promega, Mannheim
RNase Protection Kit	Roche, Mannheim
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
5'RACE Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Reporter Lysis Buffer	Promega, Mannheim
RiboMax Large Scale RNA Production System	Promega, Mannheim
Ribonucleoside Triphosphate Set	Roche, Mannheim
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, USA
TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TNT-SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.2.8 Sonstiges Verbrauchsmaterial

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

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

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

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

3.1.3 Puffer und Lösungen

AES	300 mM NaAc (pH 5,2), 2 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS
Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% (w/v) Amidoschwarz 10B, 10% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärber	90% (v/v) Methanol, 1% (v/v) Essigsäure
BLP, 2 x	40 mM NaH ₂ PO ₄ /NaOH (pH 8,0), 600 mM NaCl, 20% (w/v) Glycerin
β-Gal-Substratlösung, 2 x	200 mM NaH ₂ PO ₄ /NaOH (pH 7,3), 2 mM MgCl ₂ , 100 mM β-Mercaptoethanol, 0,133% (w/v) o-Nitrophenyl-β-D-galactosid
„complete“ ohne EDTA, 50 x	1 Tablette „complete without EDTA“ (Roche) in 1 ml ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)
DNA-Auftragspuffer, 6 x	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Dialysepuffer	20 mM HEPES/KOH (pH 7,9), 100 mM KCl, 20% (w/v) Glycerin, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT

Formamid-Probenpuffer	90% (v/v) Formamid, 0,025% (w/v) Xylencyanol, 0,025% (w/v) Bromphenolblau
HBS	50 mM HEPES, 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ , 280 mM NaCl, eingestellt mit NaOH auf pH 7,05
HLP	10 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT
Harnstoff-Probenpuffer	8 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,025% (w/v) Xylencyanol, 0,025% (w/v) Bromphenolblau
IP-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Nonidet P-40
Lysolecithin-Puffer	20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 100 mM KAc, 2,2 mM MgAc ₂ , 2 mM DTT, 1% (w/v) Lysolecithin
Methylenblau-Färbelösung	0,04% (w/v) Methylenblau in SSC
MOPS-Puffer	20 mM MOPS/NaOH (pH 7,0), 5 mM NaAc, 1 mM EDTA
Northwestern-Bindepuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,02% (w/v) BSA, 0,02% (w/v) Ficoll 400, 0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
Northern-Probenpuffer	50% (v/v) Formamid, 6,7% (w/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer
Northern-Auftragspuffer, 6 x	50 % (w/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau in MOPS-Puffer
P1	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	3 M KAc (pH 5,5)
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , eingestellt auf pH 7,5 mit NaOH
Phosphatasepuffer, 10 x	200 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 M NaCl, 20 mM MgCl ₂

Phosphatase-Inhibitor-Mix, 10 x	500 mM β -Glycerophosphat, 100 mM KF, 1,25 mM Na_3VO_4
PI-Färbelösung	1 $\mu\text{g/ml}$ Popidiumjodid, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,2 mg/ml RNase A in PBS
Ponceau-Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
RB, 10 x	200 mM Tris/HCl (pH 7,2), 75 mM MgCl_2
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS
RIPA+-Puffer	1 x „complete“ ohne EDTA in RIPA-Puffer
RNA-Bindepuffer	10 mM HEPES/KOH (pH 7,9), 100 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10% (w/v) Glycerin
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10 x	209 mM Tris/HCl (pH 6,8), 41% (w/v) Glycerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 17% (v/v) β -Mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer, 2 x	125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 17% (w/v) Glycerin, 4,1% SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 2% (v/v) β -Mercaptoethanol
SDS-Sammelgelpuffer, 4 x	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS
SDS-Trenngelpuffer, 4 x standard	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
für 20%ige Gele	3 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
SSC, 20 x	300 mM Trinatriumcitrat/HCl (pH 7,0), 3 M NaCl
STE	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TBS	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% Tween-20 in TBS
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Translationsmix, 1,25 x	25 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 125 mM KAc, 2,8 mM MgAc ₂ , 2,5 mM DTT, 37,5 mM Kreatinphosphat, 1,25 mM ATP, 0,25 mM GTP, 0,125 mM je proteinogener Aminosäure ohne Methionin, 6,25 U Kreatinphosphokinase/μl
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂ in LB-Medium
Vorhybridisierungslösung	1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Heringssperma-DNA
Zytosolpuffer, 10 x	300 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 1,4 M KCl, 3 mM MgCl ₂

3.1.4 Medien und Medienzusätze für die Gewebekultur

3.1.4.1 Medienbestandteile und Medienzusätze

5-Brom-2'-desoxyuridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung	1% (w/v) in PBS
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung	25 mg/ml in PBS
DMEM mit 4500 mg/l Glucose, ohne Natrium- pyruvat	LifeTechnologies, Karlsruhe
DMEM mit 4500 mg/ml Glucose, ohne L-Glutamin, Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin	LifeTechnologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum, FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (100 x)	LifeTechnologies, Karlsruhe
Joklik's Medium	Life Technologies, Karlsruhe
Lovastatin	Merck, Darmstadt
Stammlösung	40 mM in Ethanol
LY294002	BIOMOL, Hamburg
Stammlösung	40 mM LY294002 in Ethanol
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung	25mg/ml in PBS

Natriumpyruvat (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung	5mg/ml in DMSO
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Thymidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stammlösung	200 mM in PBS

3.1.4.2 Medienzusammensetzung

Standardmedium für

adhärente HeLa, 293T	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, ohne Natriumpyruvat
HS68	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat
HeLa-Suspensionszellen	Joklik's-Medium, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Hungermedium	DMEM mit 4500 mg/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4), ohne Natriumpyruvat, L-Cystein, L-Methionin
Puls-Medium	Hungermedium mit 0,8 mCi/ml „Pro-mix L-[³⁵ S]“
Chase-Medium	Standardmedium mit 0,1 mg/ml L-Methionin, 0,12 mg/ml L-Cystein, 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)

3.1.5 Bakterienkultur

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

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

3.1.6 Antikörper

anti-BrdU (clone B44), gekoppelt an FITC	Becton Dickinson, Hamburg
anti-Cip1/Waf1 (clone 70)	Becton Dickinson, Hamburg
anti-C23 (Nucleolin) (MS-3)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-KIP1/p27 (clone 57)	Becton Dickinson, Hamburg
anti-p21 (C19), polyklonaler Kaninchenantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p27 (C19), polyklonaler Kaninchenantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PSTAIRE, monoklonaler Antikörper gegen die PSTAIRE-Region Cyclin-abhängiger Kinasen	Dulic <i>et al.</i> , 1992
anti-PTB (Ab-1) (clone SH54)	Oncogene, Cambridge, USA
anti- α -Tubulin (clone DM 1A)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Goat anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
Goat anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase-gekoppelt	Pierce, Rockford, USA
T310, Kaninchenantiserum gegen humanes Cyclin A	Hengst <i>et al.</i> , 1994

3.1.7 Enzyme

GST-Fusionsproteine der Cdc14-Phosphatase von *S. cerevisiae* und ihrer inaktiven Mutante Cdc14-C283S (Taylor *et al.*, 1997) wurden freundlicherweise von Matthias Grimmler zur Verfügung gestellt.

Weitere Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden geeignete Reaktionspuffer durch Verdünnung der vom Hersteller gelieferten, 10fach konzentrierten Reaktionspuffer hergestellt.

3.1.8 DNA-Oligonukleotide

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

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Klonierung des 5'-Endes der p27-mRNA (5'RACE)

Primer	DNA-Sequenz
P2 (GSP1)	5'-GGCCCGAACCCCTCTCCGAA-3'
P1 (GSP 2)	5'-CTGCCCTCGGAGCCAAAAGA-3'
P6 (GSP 3)	5'-TGACGAAGAAGAAAATGATT-3'
AAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
AUAP*	GGCCACGGGTCGACTAGTAC

*Universalprimer der Firma Life Technologies (Karlsruhe)

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Klonierung von p27-5'UTR- und p27-3'UTR-Fragmenten

Fragment	Primer	DNA-Sequenz
5'UTR (-575 - -3)	P3	5'- AAGCTT CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
$\Delta 1$	P3	5'- AAGCTT CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P12	5'- CCATGGT TCTCTGACGAAGAAGAAAATGATTG-3'
$\Delta 2$	P3	5'- AAGCTT CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P13	5'- CCATGGT TCTCGGGGAGAAAACACCCCGAAA-3'
$\Delta 3$	P3	5'- AAGCTT CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P19	5'- CCATGGT TCTCCTTGCCGGCGTCGGAGTCGCAG-3'
$\Delta 4$	P3	5'- AAGCTT CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P14	5'- CCATGGT TCTCCAAGCGGAGAGGGTGGCAAAG-3'
Δa	P16	5'- AAGCTT CGGCTCCCGCCGCCGCAACCA-3'
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
Δb	P26	5'- AAGCTT TCTTCTTCGTCAGCCTCCCT-3'
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
Δc	H11	5'- AAGCTT GGATCCGCGGCCTCCTTCCACC-3' *
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
Δd	P17	5'- AAGCTT CGTCTTTTCGGGGTGTTTTTC-3'
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
Δe	P18	5'- AAGCTT CCGACGCCGCAAGGTTTGGGA-3'
	P8	5'- CCATGGT TCTCCCGGGTCTGCACG-3'
3'UTR	P36	5'-AAAAAA ACTAGT ACAGCTCGAATTAAGAATATGTTTC CT-3'
	P37	5'-AAAAAA ACTAGT GAATAGCTATGGAAGTTTTCTTTATT GA-3'

Die Erkennungssequenzen der zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen sind fett gedruckt. Primer H11 enthält eine Mutation, die zur Deletion von C-457 in Fragment Δc führte.

Primer-DNA-Oligonukleotide zur gerichteten Mutagenese der p27-5'UTR

Fragment	Primer	DNA-Sequenz
ATT	P22	5'-CCGCCGCAACCAATTGATCTCCTCCTCTG-3'
	P23	5'-CAGAGGAGGAGATCAATTGGTTGCGGCGG-3'
prestop	P68	5'-GCCGCAACCAATGGATCCTCCTCCTCTGTTTA-3'
	P69	5'-TAAACAGAGGAGGAGGATCCATTGGTTGCGGC-3'
ATT/ATG	P73	5'-CTGTTTAAATAGACTCGCCATGGCAATCATTTTCTTCTTC GTC-3'
	P74	5'-GACGAAGAAGAAAATGATTGCCATGGCGAGTCTATTTAA ACAG-3'

Die eingeführten Punktmutationen sind fett gedruckt.

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Synthese radioaktiv markierter p27-cDNA-Sonden

Sonde	Primer	DNA-Sequenz
-575 - -462	P6	5'-CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
	P77	5'-CCACCTTAAGGCCGCGCT-3'
-461 - -348	P78	5'-GCCTCCCTTCCACCGCCAT-3'
	P79	5'-CGGCGTCGGAGTCGCAGA-3'
49 - 162	P75	5'-GACGCCAGGCAGGCGGAG-3'
	P76	5'-CTCTTCATGTCTCTGCAGT-3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur Amplifikation und Klonierung der offenen Leserahmen von PTB und Nucleolin

Fragment	Primer	DNA-Sequenz
Nucleolin ORF	P46	5'-AAAAAACATATGGTGAAGCTCGCGAAGGCAGGT-3'
	P47	5'-AAAAAAGGATCCTATTCAAACCTTCGTCTTCTTTCCTT GT-3'
PTB ORF	P48	5'-AAAAAAGGATCCATGGACGGCATCGTCCCAGAT-3'
	P49	5'-AAAAAGAATTCCATAGATGGTGGACTTGGAGAAGGA-3'

Die Erkennungssequenzen der zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen sind fett gedruckt.

Primer-DNA-Oligonukleotide zur gerichteten Mutagenese des offenen Leserahmens von Nucleolin.

Primer	DNA-Sequenz
P66	5'-CGTTTCCCAACAAAAAAGGTTGCAGTTGCC-3'
P67	5'-GGCAACTGCAACCTTTTTTGTGGGGAAACG-3'

Primer-DNA-Oligonukleotide zur gerichteten Mutagenese pCRII

Primer	DNA-Sequenz
P20	5'-GACACTATAGAATACTCAAGCTCATCAAGCTTGGTACCGAGC-3'
P21	5'-GCTCGGTACCAAGCTTGATGAGCTTGAGTATTCTATAGTGTC-3'

3.1.9 Plasmide

pBluescript SK(-)	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pEGFP-C2	CLONTECH, Heidelberg
pGL3 Control	Promega, Heidelberg
pSV-B-Gal	Promega, Heidelberg
pRF	Coldwell <i>et al.</i> , 2000; Stoneley <i>et al.</i> , 1998
phpRF	Coldwell <i>et al.</i> , 2000; Stoneley <i>et al.</i> , 1998

Alle übrigen verwendeten Plasmide leiten sich von diesen Plasmiden ab. Ihre ausführliche Beschreibung befindet sich im Abschnitt 3.2.

3.1.10 Bakterienstämme

BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>
INVaF'	F' <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 λ ⁻
TOP10F'	F' { <i>lacI</i> ^q Tn10 (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

3.1.11 Eukaryontische Zelllinien

HeLa, Suspensionzellen	menschliche Cervix-Karzinom-Zelllinie (Gebärmutterhalskrebs)
HeLa, adhärenente Zellen	menschliche Cervix-Karzinom-Zelllinie
HS68	menschliche diploide Fibroblasten aus Neugeborenen-Vorhaut, ATCC-Nummer CRL-1635
293T	humane, embryonale Nierenzellen, 293 (ATTC-Nummer CRL-1573), zusätzlich mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Grundlegende Standardmethoden

3.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurepräparationen

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und 1 min lang kräftig gemischt. Nach einer anschließenden Phasentrennung durch 2minütige Zentrifugation bei 13000 g wurde die obere wäßrige Phase gesammelt und mit einem weiteren Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) in gleicher Weise behandelt. Abschließend wurde die wäßrige Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durch erneutes kräftiges Mischen von Phenolresten gereinigt.

Es wurden alternativ zwei verschiedene Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösungen eingesetzt: eine mit TE-Puffer gesättigte Lösung (pH 8,0) zur Reinigung von DNA-Präparationen und eine ddH₂O-gesättigte Lösung (pH 4,5 - 5) zur Reinigung von RNA-Präparationen.

Als Alternative zur Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Präparationen eingesetzt.

3.2.1.2 Fällung von Nukleinsäuren

Eine wäßrige DNA- oder RNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) auf eine Endmolarität von 0,3 M eingestellt und mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 30 min bei -20°C oder für kürzere Zeit bei -80°C. Das Präzipitat wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 13000 g gesammelt und mitausgefallenes Salz durch Behandlung mit 70% Ethanol aus dem DNA-(RNA-)Präzipitat entfernt. Die nach erneuter Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wurde an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Puffer gelöst.

3.2.1.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

DNA- oder RNA-Konzentrationen wäßriger Lösungen wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA und 20 µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotide. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0).

3.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 2 ml Selektionsnährmedium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsröhrchen überführt und 10 s bei 13000 g zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung P2 wurde das Gemisch vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Puffer P3 zugegeben. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Das voluminöse Präzipitat wurde abzentrifugiert (15 min, 13000 g) und die Plasmid-DNA mit 350 µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 15minütige Zentrifugation bei 13000 g und 4°C sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen reiner, intakter Plasmid-DNA wurde das „Midi-“ bzw. „Maxi Plasmid Purification Kit“ der Firma QIAGEN den Empfehlungen des Herstellers gemäß eingesetzt. Diese DNA wurde auch zur Transfektion von Gewebekulturzellen eingesetzt.

3.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Optimale Bedingungen für die Restriktionsspaltung wurden mittels 10 x Puffern eingestellt, die von den Vertreibern der Restriktionsenzyme bereitgestellt wurden. Pro 1 µg DNA wurden 2 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, daß das Reaktionsvolumen mindestens das 10fache der in Glycerin gelösten Enzyme war. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug mindestens 1 h bei 37°C. Die Reaktion

wurde entweder durch Zugabe von 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer oder durch Hitzedenaturierung der Restriktionsendonuklease - den Empfehlungen des Herstellers folgend - beendet.

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

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde die Restriktionsendonuklease zunächst hitzeinaktiviert und der Reaktionsansatz mit 1/9 Volumen 10 x CIAP-Puffer (Roche) und 3 U CIAP/ μ g Plasmid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37°C und anschließend zur Inaktivierung der CIAP 15 min bei 75°C inkubiert. Das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid wurde danach durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

3.2.1.7 Glätten überhängender DNA-Enden

Wenn es die Kolonierungsstrategie erforderte, wurden überhängende 5'- oder 3'-DNA-Enden, die durch Restriktionsendonukleasen generiert worden waren, im Anschluß mit Hilfe von DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) geglättet. Da das Klenow-Fragment unter den Bedingungen der Restriktionsspaltung aktiv ist, wurde auf das Umpuffern der DNA verzichtet.

Die Restriktionsendonuklease wurde den Angaben des Herstellers entsprechend hitzeinaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und auf eine Endkonzentration von je 25 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP eingestellt. Nach Zugabe von 1 U Klenow-Fragment pro μ g eingesetzter DNA wurde der Ansatz 20 min bei 30°C und anschließend zur Inaktivierung des Klenow-Fragments 10 min bei 75°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt oder zuvor, sofern dies gewünscht war, mit einer zweiten Restriktionsendonuklease behandelt.

3.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8- bis 2%ige Agarose-Gele mit den Ausmaßen (Länge x Breite) 14 cm x 13 cm oder 9 cm x 8 cm verwendet. Zur

Präparation des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose mit TBE versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml wurde die flüssige Agarose in eine Gießkammer gegeben und ein Kamm zur Aussparung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE überschichtet. Die mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Auftragspuffer versetzten Proben wurden aufgetragen und bei 5V/cm aufgetrennt. Die DNA wurde im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (ImageMaster VDS 1D, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde in modifizierter Form nach der Methode von Tautz und Renz (Tautz und Renz, 1983) durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende DNA-Bande im UV-Durchlicht (365 nm) aus dem Gel herauspräpariert und das Gelstück in ein am Boden durchbohrtes 0,5-ml-Reaktionsgefäß, das zur Hälfte mit silanisierter Glaswolle bestückt war, gegeben. Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und die DNA-haltige Flüssigkeit durch Zentrifugation (13000 g, 10 min) aus dem Gel in das 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde dabei durch die Glaswolle im oberen Gefäß zurückgehalten. Die gesammelte DNA-TBE-Lösung wurde entweder direkt weiterverwendet (z.B. zur Ligation) oder zuvor einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Alternativ wurden DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen mit dem „QIAquick Gelextraction Kit“ der Firma QIAGEN extrahiert.

3.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA und ein bis zu vierfacher molarer Überschuß des DNA-Fragments mit 1 µl 10 x Ligasepuffer (MBI Fermentas), 2,5 U T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 10 µl vereinigt. Der Reaktionsansatz wurde bei 16°C über Nacht oder mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

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

3.2.1.11 Gerichtete In-Vitro-Mutagenese

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

3.2.1.12 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 μ l einer stationären Kultur von *E. coli* DH5 α oder BL21(DE3) mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 μ l 87% (w/v) Glycerin vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.13 Transformation von Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden entweder 5 μ l eines Ligationsansatzes, 5 μ l eines Mutageneseansatzes oder 1 ng Plasmid-DNA zu den Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Bakterien/DNA-Gemisch für 45 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und

danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Sodann wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 30 bis 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden variable Mengen der Bakteriensuspension (bis zu 500 µl) auf gut vorgetrocknete Agar-Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C bis zum sichtbaren Erscheinen von Bakterienkolonien inkubiert.

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

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR-Mix“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Reagenz enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte ddNTPs. Zu einem Standardansatz wurden 4 pmol Primer-DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg DNA, 4 µl Mix, und das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 96°C, durchlief der Reaktionsansatz 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 96°C, einer Hybridisierungsphase von 15 s bei 50°C und einer Synthesephase von 4 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem hausinternen Service oder einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt.

3.2.1.15 In-Vitro-Transkription von RNA

Als Matrize für die In-Vitro-Transkription von RNA dienten linearisierte Plasmide, die stromaufwärts der zu transkribierenden Sequenz einen Promotor für die SP6-RNA-Polymerase oder die T7-RNA-Polymerase aufwiesen. pCRkip1, pCRkip1ATT (siehe 3.2.4) dienten zur Synthese von p27-kodierenden RNAs und wurden mit *NotI* linearisiert. pCRΔ1 und pCRgapdh (siehe 3.2.4) dienten zur Synthese von RNAs für In-Vitro-Bindungsstudien und wurden mit *NcoI* (pCRΔ1) bzw. *HincII* (pCRgapdh) linearisiert. Die Sequenzen der Transkripte von pCRΔ1 und pCRgapdh sind im Anhang angegeben. pCR2.1-5'UTR (siehe 3.2.3) wurde mit *SpeI* linearisiert und zur Synthese einer Gegenstrang-RNA-Sonde für die „RNase protection“-Analyse eingesetzt.

Ein Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl enthielt 1 µg linearisiertes Plasmid, 10 bis 20 U SP6-RNA-Polymerase (Roche) bzw. T7-RNA-Polymerase (Promega), 10 U RNasin (Promega) und 2,5 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche bzw. Promega). Zur Synthese von RNA mit einer 7-Methyl-Guanosin-Struktur

am 5'-Ende (engl.: cap) wurden je 25 nmol ATP, CTP und UTP, 2,5 nmol GTP und 25 nmol m⁷GpppG zugegeben. Zur Synthese von RNA ohne Cap wurden je 12,5 nmol der vier NTPs, jedoch kein m⁷GpppG eingesetzt. Radioaktiv markierte RNA-Sonden wurden in Gegenwart von 12,5 nmol ATP, GTP und UTP, 300 pmol CTP und 50 µCi α-[³²P]-CTP (3000 Ci/mmol) synthetisiert. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Reinigung nicht radioaktiver Transkripte wurde der Reaktionsansatz mit 1 U RNase-freier DNase I (Promega) versetzt und weitere 20 min bei 37°C gehalten. Nicht eingebaute Nukleotide und DNA-Fragmente wurden mittels „Micro BioSpin“-Säulchen (BioRad) durch Gelfiltration an Sephadex-G25 (Sigma-Aldrich) mit SSC als Säulenpuffer entfernt. Sodann wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, präzipitiert und nach Aufnahme in ddH₂O durch Messung der Extinktion bei 260 nm quantifiziert.

Radioaktiv markierte RNAs wurden durch Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen gereinigt. Die durch Autoradiographie des feuchten Gels sichtbar gemachte RNA wurde ausgeschnitten, mit 400 µl AES versetzt und über Nacht bei 4° C in einem Überkopf-Rotator extrahiert. Anschließend wurde die RNA gefällt, getrocknet und ihre Radioaktivität nach Lösen in ddH₂O durch Messung der Cherenkov-Strahlung ermittelt.

Zur Synthese großer Mengen RNAs für In-Vitro-Bindungsstudien wurde das „RiboMax“-System der Firma Promega gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die Reinigung der RNA erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex-G25, Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation.

3.2.1.16 Elektrophorese von RNA in denaturierenden

Polyacrylamidgelen

Zur Elektrophorese von RNAs unter denaturierenden Bedingungen wurden Gele von (Breite x Höhe) 17 cm x 17 cm bzw. 17 cm x 37 cm und einer Dicke von 0,5 mm verwendet. Die Gesamtkonzentration des Polyacrylamids (4 bis 10%) richtete sich nach der Größe der zu trennenden RNAs. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen Bisacrylamid betrug 37,5:1 (w/w). Zur Präparation der Gele wurden zwei Stammlösungen von 8 M Harnstoff in TBE und 20% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid, 8 M Harnstoff in TBE im erforderlichen Verhältnis gemischt.

Zur Polymerisation wurden 150 μ l 10% (w/v) APS und 40 μ l TEMED pro 50 ml Gelvolumen zugegeben.

Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben mit dem gleichen Volumen Formamid-Probenpuffer oder dem fünffachen Volumen Harnstoff-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 0,05 W/cm² Geloberfläche mit TBE als Elektrophoresepuffer.

3.2.1.17 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen

Gesamt-RNA aus Gewebekulturzellen (maximal 6 x 10⁶ Zellen) wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ der Firma QIAGEN isoliert. Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus transient transfizierten Zellen wurde die an die Säulenmatrix gebundene RNA zusätzlich mit RNase-freier DNase I (RNase-free-DNase-Set, QIAGEN) behandelt um störende Plasmid-DNA vollständig zu entfernen. Die RNA wurde mit ddH₂O eluiert und durch Messung der Extinktion bei 260 nm quantifiziert. Die RNA-Ausbeute betrug im Durchschnitt 25 μ g pro 10⁶ Zellen. Zur Isolierung von RNA aus untransfizierten Zellen wurde alternativ das „TRI Reagent“ der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Die RNA-Ausbeute war ähnlich wie bei Verwendung des „RNeasy Mini Kits“.

3.2.1.18 Northern-Blot: Transfer von RNA auf eine Nylonmembran

Zur Analyse durch Northern-Blot wurden 5 bis 25 μ g Gesamt-RNA mit Ethanol präzipitiert, getrocknet und je nach RNA-Menge in 10 bis 25 μ l Northern-Probenpuffer aufgenommen. Die RNA wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend 2 min lang auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1/5 Volumen 6 x Northern-Auftragspuffer wurde die RNA in einem denaturierenden Agarosegel (1% Agarose, 0,44 M Formaldehyd in MOPS-Elektrophoresepuffer) bei einer Feldstärke von 5V/cm aufgetrennt. Sodann wurde das Gel dreimal für jeweils 30 min mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min mit 20 x SSC äquilibriert. Die RNA wurde aus dem Gel durch Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Dafür wurde das Gel auf drei Lagen Filterpapier (Whatman 3 MM, mit 20 x SSC-Puffer gesättigt) plaziert, wobei beide Enden des Filterpapiers in 20 x SSC-Puffer eintauchten. Auf das Gel wurden in der angegebenen Reihenfolge geschichtet: die passend zugeschnittene Nylonmembran, 5 Lagen 20 x SSC-getränktes Filterpapier und ein Stapel Zellstoff von etwa 10 cm Höhe. Der ganze

Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht (3 g/cm^2) beschwert. Nach etwa 16 h wurde die Membran entnommen und durch Bestrahlung mit UV-Licht („Autocrosslink“-Funktion des UV Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert. Zur Sichtbarmachung der ribosomalen RNAs wurde die Membran einige Minuten in Methylenblau-Färbelösung geschwenkt und anschließend zum Entfärben mit ddH₂O gespült. Die Membran wurde auf Whatman 3MM-Papier überführt, getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.1.19 Herstellung von ³²P-markierten cDNA-Fragmenten für Northern-Blot-Analysen

Radioaktive DNA-Sonden zur Detektion spezifischer RNA-Spezies wurden durch „random prime labeling“ mit Hilfe des „Prime-a-Gene Labeling Systems“ (Promega) synthetisiert. Zu einem Volumen von 50 µl wurden 20 µl ddH₂O, 10 µl 5 x Puffer mit Zufallshexanukleotiden, 2 µl dNTP-Mix ohne dCTP (je 1,5 mM), 10 µl hitzedenaturierte DNA-Matrize (25 ng), 2 µl nukleasefreies BSA (10 mg/ml), 5 µl α-[³²P]-dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol), 1 µl Klenow-Fragment (5 U) vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 bis 15 h bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise wurde das *HpaI-HindIII*-Fragment der p27-cDNA, das *NcoI-HindIII*-Fragment von pGL3 Control mit dem ORF der *Photinus pyralis*-Luziferase und die humane GAPDH-cDNA markiert.

Kurze DNA-Sonden von etwa 100 bp wurden durch PCR mit einem geeigneten Plasmid als Matrize synthetisiert. Zu einem Endvolumen von 20 µl wurden 100 pg Plasmid, je 5 pmol der beiden Primer-Oligonukleotide, je 60 pmol dATP, dGTP und dTTP, 2 µl 10 x *Taq*-Polymerasepuffer (MBI Fermentas), 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und das fehlende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C, durchlief der Reaktionsansatz 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 45 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 45 s bei 55°C und einer Synthesephase von 90 s bei 72°C.

Nicht eingebaute Nukleotide und Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von „Micro BioSpin“-Säulchen (BioRad) durch Gelfiltration an Sephadex-G25 (Sigma-Aldrich) mit STE als Säulenpuffer entfernt. Das Eluat wurde auf 200 µl mit TE verdünnt. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch Messung der Cherenkov-Strahlung von 1 µl des Eluats überprüft.

3.2.1.20 Nachweis membrangebundener RNA mit spezifischen, ³²P-markierten cDNA-Proben

Vor der Hybridisierung wurde die Blot-Membran mit 2 x SSC benetzt und 1 h lang bei 65°C in Vorhybridisierungslösung im Hybridisierungssofen rotiert. Dadurch wurde die Membran mit unspezifisch bindender DNA abgesättigt. Die DNA-Sonde wurde 10 min lang bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgeschreckt, anschließend zu der Vorhybridisierungslösung gegeben und mindestens 6 h auf der Membran belassen. Sodann wurde die Membran bei 65°C zweimal für 15 min mit 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS und zweimal für 10 min mit 1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Die Membran wurde mit 2 x SSC gespült und feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie bzw. mit einem PhosphorImager (Fujifilm BAS-2500, Fujifilm) sichtbar gemacht. Die Blot-Membran wurde zur Wiederverwendung in 2 x SSC belassen und bei -80°C gelagert.

Sollte die Blot-Membran mit einer weiteren Sonde untersucht werden, so wurde die erste durch 10minütige Inkubation in einer kochenden, 0,1%igen (w/v) SDS-Lösung entfernt. Die Membran wurde anschließend mit 2 x SSC gespült und zur Hybridisierung mit der zweiten Sonde verwendet.

3.2.1.21 „RNase protection“-Analyse

Die „RNase protection“-Analyse diente zur Detektion von p27-5'UTRs und wurde mit Hilfe des „RNase Protection Kits“ der Firma Roche durchgeführt. 14 µg Gesamt-RNA aus adhärennten HeLa-Zellen oder 14 µg Hefe-tRNA wurden einer Ethanol-Präzipitation unterzogen, in 20 µl Hybridisierungspuffer (40 mM Pipes [pH 6,4], 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 80% [v/v] Formamid) aufgenommen und mit der ³²P-markierten Gegenstrang-RNA-Sonde versetzt (jeweils 1,5 x 10⁵ cpm in 10 µl Hybridisierungspuffer). Die Sonde wurde wie unter 3.2.1.15 beschrieben durch radioaktive Transkription von *SpeI*-geschnittenem pCR2.1-5'UTR (siehe 3.2.3) mit T7-RNA-Polymerase hergestellt. Die RNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 16 h bei 45°C zur Hybridisierung inkubiert. Die Ansätze wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und zum Abbau nicht hybridisierter RNA mit 350 µl RNase-Puffer (10 mM Tris/HCl [pH 7.5], 5 mM EDTA, 300 mM Natriumacetat), 3,5 µg RNase A und 25 U RNase T1 versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 30°C wurden pro Ansatz 10 µl 20% (w/v) SDS und 50 µg Proteinase K zum Abbau der

RNasen zugegeben. Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 5 µg Hefe-tRNA versetzt. Die RNA wurde aus der wäßrigen Phase präzipitiert, in 7 µl Formamid-Probenpuffer aufgenommen und durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert.

3.2.2 Klonierung und Identifizierung von 5'- und 3'-Enden der humanen p27-mRNA

Die Klonierung des 5'-Endes wurde mit dem „5'RACE-Kit“ der Firma Life Technologies gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die dabei verwendeten Primer-Oligonukleotide sind unter 3.1.8 aufgeführt. Als Grundlage diente die Sequenzinformation einer p27-cDNA (siehe Anhang), die aus einer Genbank der Firma CLONTECH isoliert und in die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I von pBluescript SK(-) (Stratagene) ligiert worden war (Hengst und Reed, 1996). Die cDNA-Bank war aus Poly-A-mRNA aus humanem Brustdrüsengewebe hergestellt worden. Das Plasmid mit der p27-cDNA wurde als pLU209 bezeichnet.

1 µg Gesamt-RNA aus Hela-Suspensionskulturen wurde einer reversen Transkription mit einem für das p27-Gen spezifischen Primer-Oligonukleotid (GSP1) unterzogen. An das 5'-Ende der resultierenden einzelsträngigen cDNA wurde eine Oligo-dC-Sequenz angefügt. Die so modifizierte einzelsträngige cDNA wurde durch Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) mit dem Universalprimer AAP (Life Technologies) und einem zweiten genspezifischen Primer (GSP2) amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“ (Invitrogen) in pCR2.1 (Invitrogen) ligiert, kloniert und sequenziert. Das längste identifizierte Fragment (-575 bis -108) wurde mit *Eco*RI und *Bss*HII aus pCR2.1 ausgeschnitten und in die *Eco*RI und *Bss*HII-Schnittstellen von pLU209 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit pUG32 bezeichnet.

0,05% des Produkts der ersten PCR wurden mit dem Universalprimer AUAP (Life Technologies) und einem dritten genspezifischen Primer (GSP3) reamplifiziert. Das Amplifikat wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Ein Fragment von etwa 150 bp Länge wurde aus dem Gel extrahiert, in pCR2.1 ligiert und sequenziert.

Die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der p27-cDNA wurde mit Hilfe des humanen EST-Klons IMAGp998F02581 (Lennon *et al.*, 1996, DDJB/EMBL/GenBank-Nummer N21107) vervollständigt. Dieser war zuvor durch Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1997) in der Datenbank „rzd-nt“ des Ressourcenzentrums des Deutschen Humangenomprojektes identifiziert und von dieser Institution erworben worden. Das 234 bp lange *XbaI-NotI*-Fragment aus IMAGp998F02581 wurde in die *XbaI*- und die *NotI*-Schnittstelle von pUG32 ligiert. Das resultierende Plasmid mit der vollständigen p27-3'UTR wurde pUG216 genannt.

3.2.3 Herstellung von DNA-Fragmenten der p27-5'- und 3'UTR und deren Klonierung in Reporterplasmiden

Vollständige und verkürzte DNA-Fragmente der p27-5'UTR wurden durch PCR mit pUG32 als Matrize hergestellt. Dazu wurden Primer-Oligonukleotide verwendet, die an ihren 5'-Enden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *HindIII* bzw. *NcoI* (siehe 3.1.8) enthielten. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 25 ng pUG32, je 10 pmol der beiden Primer-DNA-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x *Pfu*-Polymerasepuffer (Promega), 3 U *Pfu*-DNA-Polymerase und das entsprechende Volumen ddH₂O gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 94°C, durchlief der Reaktionsansatz zwölf Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 45 s bei 94°C, einer Hybridisierungsphase von 45 s bei 55°C und einer Synthesephase von 2 min/kb bei 72°C. Es folgte eine terminale Elongationsphase von 7 min bei 72°C. Anschließend wurden 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben, und der Reaktionsansatz wurde für weitere 10 min bei 72°C inkubiert, um überhängende Desoxyadenylreste zu generieren. Das PCR-Produkt wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, in pCR2.1 (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) oder pCRII (TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert und sequenziert. Die Plasmide wurden nach ihrem Stammpiasmid und dem eingefügten DNA-Fragment benannt: pCR2.1-5'UTR leitet sich z.B. von pCR2.1 ab und enthält die vollständige 5'UTR (-575 - -3). p27-5'UTR-Fragmente mit internen Mutationen ("ATT": G-517→T, "prestop": Insertion C -514 und "ATT/ATG": G-517→T, G-486→A, T-483→G) wurden durch gerichtete In-Vitro-Mutagenese (engl.: site directed mutagenesis) hergestellt (Primer-Oligonukleotide siehe 3.1.8). Die Fragmente wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und

NcoI bzw. *EcoRI* und *NcoI* aus den Klonierungsplasmiden ausgeschnitten und in den Reporterplasmiden pGL3 Control bzw. pRF und phpRF subkloniert. Die Plasmide wurden nach ihrem Stammplasmid und dem eingefügten DNA-Fragment benannt: pGL5'UTR leitet sich z.B. von pGL3 Control ab und enthält die vollständige 5'UTR (-575 - -3), pGLATT enthält die vollständige p27-5'UTR mit der Punktmutation G-517→T.

Ein vollständiges p27-3'UTR-Fragment wurde durch PCR mit pUG216 als Matrize hergestellt. Dazu wurden Primer-Oligonukleotide (siehe 3.1.8) mit synthetischen *SpeI*-Restriktionsschnittstellen und einer Hexa-dA-Sequenz am 5'-Ende verwendet. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit *SpeI* geschnitten und in die *XbaI*-Restriktionsschnittstelle von pGL3 Control und pGL5'UTR eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden pGL3'UTR und pGL5'+3'UTR genannt.

3.2.4 Herstellung von Plasmiden zur In-Vitro-Transkription

Ein störendes Startkodon im Vektor pCRII zwischen der SP6-Transkriptionsstartstelle und der *HindIII*-Restriktionsschnittstelle wurde durch gerichtete In-Vitro-Mutagenese entfernt ($\Delta[269 - 271]$, siehe 3.1.8). Das resultierende Plasmid wurde pCR' genannt. pCRkip1 wurde durch Insertion des *HindIII-SacI*-Fragmentes von pGL5'UTR und des *SacI-NotI*-Fragmentes von pUG216 in pCR' hergestellt. pCRkip1ATT wurde erhalten, indem das *AflIII-SacI*-Fragment von pCRkip1 durch das entsprechende Fragment aus pGLATT ersetzt wurde.

pCR Δ 1, pCR Δ a und pCR Δ a-mut wurden hergestellt, indem die Fragmente Δ 1, Δ a (siehe 3.1.8) und Δ a-mut mit *HindIII* und *NcoI* aus pGL Δ 1, pGL Δ a, pGL Δ a-mut ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pCR' ligiert wurden. Δ a-mut unterscheidet sich von Δ a in einer Deletion in Position -499, die zufällig durch PCR-Mutagenese aufgetreten war.

pCRLuc wurde durch Insertion des *HindIII-BamHI*-Fragmentes von pGL3 Control, das das Luziferasegen von *Photinus pyralis* enthält, in die *HindIII*- und die *BamHI*-Schnittstelle von pCR' kreierte.

Eine humane GAPDH-cDNA (DDJB/EMBL/GenBank-Nummer NM_002046) wurde freundlicherweise von Dr. Beate Lanske zur Verfügung gestellt. Diese cDNA wurde in die *BamHI*-Schnittstelle von pCRII ligiert. Das so erhaltene Plasmid wurde mit pCRgapdh benannt.

3.2.5 Herstellung von Expressionsplasmiden für PTB und Nucleolin

Durch Datenbanksuche wurde eine cDNA identifiziert, die eine vollständige kodierende Region für das humane „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB) enthält. Es handelt sich um den EST-Klon IMAGp998N217536Q2 (Lennon *et al.*, 1996, DDJB/EMBL/GenBank-Nummer BE018038). Dieser war in die *SalI*- und die *NotI*-Schnittstellen des Säuger-Expressionsplasmids pCMV SPORT6 (Life Technologies) ligiert worden. Der EST-Klon wurde als Teil dieses Plasmids vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes erworben. Das Plasmid wurde als pCMV-PTB bezeichnet. Die Sequenzierung der cDNA ergab, daß die kodierende Region nahezu vollständig mit der für die größte PTB-Spleißisoform (PTB4) veröffentlichten Sequenz (DDJB/EMBL/GenBank-Nummer X65372 und X66975) aus HeLa-Zellen übereinstimmt. Die einzige Abweichung besteht in der Deletion der Nukleotide 435 bis 443 des offenen Leserahmens, die zum Verlust des Tripeptids RAG in den Aminosäurepositionen 146 bis 148 des Proteins führt. Da bisher keine funktionellen Unterschiede zwischen verschiedenen PTB-Isoformen beschrieben wurden, wurde pCMV-PTB ohne Veränderungen zur Überexpression von PTB in 293T-Zellen verwendet.

Um ein Plasmid zur Expression von PTB in Bakterien zu erhalten, wurde der offene Leserahmen für PTB durch PCR mit pCMV-PTB als Matrize amplifiziert und dabei mit einer *BamHI*-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *EcoRI*-Schnittstelle am 3'-Ende versehen (Primer siehe 3.1.8). Die Amplifikation erfolgte unter den in 3.2.3 angegebenen Bedingungen. Das PCR-Produkt wurde wie unter 3.2.3 beschrieben in pCR2.1 zwischenkloniert, mit *BamHI* und *EcoRI* aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten und in die *BamHI*- und die *EcoRI*-Schnittstelle von pET28a eingefügt. Das Plasmid wurde mit pUG288 bezeichnet.

Ebenfalls durch Sequenzvergleich wurde der EST-Klon IMAGp998D176269Q2 (Lennon *et al.*, 1996, DDJB/EMBL/GenBank-Nummer AI816463) als Nucleolin-cDNA identifiziert. Diese war in die *SacI*- und die *XhoI*-Schnittstellen von pBluescript SK ligiert worden und wurde in Form dieses Plasmids vom Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojektes erworben. Das Plasmid wurde mit pUG282 bezeichnet. Die DNA-Sequenzierung dieser cDNA legte offen, daß sie gegenüber der

veröffentlichten Nucleolin-cDNA (DDJB/EMBL/GenBank-Nummer NM_005381) zwei Unterschiede aufweist. Der eine Unterschied besteht in der Insertion von neun Nukleotiden (AAAGCTGCC) nach Position 1869 des offenen Leserahmens. Diese Insertion wurde bereits für eine andere humane Nucleolin-cDNA beschrieben (Pollice *et al.*, 2000). Die gleichen neun Nukleotide sind in allen anderen sequenzierten Nucleolin-cDNAs von Säugern in der gleichen Position vorhanden. Sie kodiert für drei zusätzliche Aminosäuren (AAK) nach der Aminosäure K624 von Nucleolin. Der zweite Unterschied liegt in der Deletion des Nukleotids A207 des offenen Leserahmens, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt.

Zur Generierung eines Plasmids, das die bakterielle Expression der C-terminalen RNA-Bindedomäne von Nucleolin (K286 bis E710; Nuc-p50) als Fusionsprotein mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz erlaubt, wurde der offene Leserahmen von Nucleolin durch PCR mit pUG282 amplifiziert. Dabei wurde er mit einer *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende versehen (Primer siehe 3.1.8). Das PCR-Fragment wurde in die *NdeI*- und die *BamHI*-Schnittstellen von pET28a ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit *NdeI* und *MlsI* geschnitten und nach dem Glätten der überhängenden DNA-Enden religiert. Das so erhaltene Plasmid zur Expression von Nuc-p50 wurde als pUG295 bezeichnet.

Ein Plasmid zur Überexpression von PTB in humanen Gewebekulturzellen wurde wie folgt hergestellt: pUG282 wurde mit *NotI* geschnitten, und die überhängenden DNA-Enden wurden durch Behandlung mit Klenow-Fragment geglättet. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid mit *XhoI* geschnitten und das resultierende *NotI-XhoI*-cDNA-Fragment in die *SmaI*- und die *XhoI*-Schnittstelle von pCMV SPORT6 ligiert. Die Leserastermutation $\Delta A207$ im Nucleolin-ORF wurde durch gerichtete In-Vitro-Mutagenese beseitigt (Primer-Oligonukleotide siehe 3.1.8). Das resultierende Plasmid wurde pCMV-Nucleolin genannt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die drei adhärenenten Zelllinien (HeLa, 293T und HS68) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen (Falcon, Greiner, Nunc) variabler Größe kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10% (v/v) fötales Kälberserum (Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin (Life Technologies) und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies). Das Medium für HS68-Zellen wurde zusätzlich mit 1 mM Natriumpyruvat (Life Technologies) versetzt. HeLa- und 293T-Zellen wurden alle drei Tage vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit 10 x Trypsin/EDTA (Life Technologies) von der Kulturschale abgelöst und in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:15 auf neuen Kulturschalen ausgesät. Zellzahlen wurden im allgemeinen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. HS68-Zellen wurden mehrere Tage bis mehrere Wochen unter Kontaktinhibition kultiviert, wobei das Medium alle drei Tage erneuert wurde. Bei Bedarf wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:8 in neue Kulturschalen ausgesät.

HeLa-Suspensionszellen wurden in Joklik's-Medium (Life Technologies) bei 37 °C in Spinner-Flaschen unter konstantem Rühren kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10% (v/v) fötales Kälberserum (Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin (Life Technologies) und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies). Die Zelldichte der Kulturen wurde durch tägliches Verdünnen mit frischem Medium zwischen $2,5 \times 10^5$ und 10^6 /ml gehalten.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden sie trypsiniert, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und in Einfriermedium (jeweiliges Standardmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Je 1 ml wurden in ein Einfrierröhrchen abgefüllt. Anschließend wurden die Zellen langsam auf -80°C (möglichst 1°C/min) abgekühlt und am nächsten Tag zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37°C im Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und mit frischem Kulturmedium in geeigneter Verdünnung auf Zellkulturgefäße verteilt.

3.3.3 Synchronisierung von Gewebekulturzellen

Zur Arretierung von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus wurde Lovastatin (Merck), ein Inhibitor der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase, eingesetzt (Keyomarsi *et al.*, 1991). Käuflich erhältliches Lovastatin liegt in Form eines Lactons vor, das hydrolysiert werden muß, damit die Substanz zur Arretierung von Zellen eingesetzt werden kann. Zur Aktivierung wurden 208 mg Lovastatin in 5 ml Ethanol gelöst und mit 7,5 ml 0,1 M NaOH versetzt. Die Lösung wurde 2 h bei 50°C inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1 M HCl auf pH 7,2 eingestellt. Die Endkonzentration von Lovastatin lag bei 40 mM. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Um Zellen mit aktiviertem Lovastatin in der G₁-Phase zu arretieren, wurde die Substanz dem Kulturmedium in einer Endkonzentration von 66 µM zugesetzt. Die Arretierung von Zellen in der S-Phase erfolgte durch 24stündige Behandlung mit Thymidin, das in einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt wurde.

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

3.3.4 Durchflußzytofluorimetrie

Die Durchflußzytofluorimetrie wurde eingesetzt, um die Verteilung von Gewebekulturzellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu analysieren. Alternativ wurden zwei Methoden angewandt: a) die einfache Färbung mit Propidiumjodid, bei der die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes fluoreszenzmarkiert werden, und b) die Doppelfärbung mit Propidiumjodid und anti-

BrdU FITC-Antikörperkonjugaten, bei der DNA-synthetisierende Zellen nach Inkorporation von BrdU zusätzlich mit einem zweiten Fluorophor markiert werden.

- a) Zur Färbung mit Propidiumjodid wurden die Zellen einer Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm ($0,5 \times 10^6$ bis 10^6 Zellen) mit PBS gewaschen, mit 300 μ l 10 x Trypsin/EDTA (Life Technologies) von der Kulturschale abgelöst und in 2 ml Standardmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Sodann wurden sie in 200 μ l eiskaltem PBS resuspendiert und unter kontinuierlichem Mischen („vortexen“) zu 3 ml vorgekühltem (-20°C), 70%igem Ethanol getropft. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 1 ml PI-Färbelösung aufgenommen. Nach mindestens 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit Hilfe eines Durchflußzytofluorimeters (FacsCalibur, Becton Dickinson) analysiert. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm.
- b) Zur Doppelfärbung mit Propidiumjodid und anti-BrdU FITC-Antikörperkonjugaten wurden die DNA-synthetisierenden Zellen zunächst mit BrdU markiert. Hierzu wurde BrdU in einer Endkonzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ zum Kulturmedium gegeben. Nach 30minütiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen wie unter a) trypsiniert und in Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit PBS, 1% (w/v) BSA gewaschen. Sodann wurden sie in 200 μ l eiskaltem PBS resuspendiert und unter kontinuierlichem Mischen („vortexen“) zu 3 ml vorgekühltem (-20°C), 70%igem Ethanol getropft. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1 ml 2 M HCl, 0,5% (v/v) Triton X-100 unter kontinuierlichem Mischen tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 1 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 500 g abzentrifugiert und in PBS, 0,5% (v/v) Tween-20 aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ l anti-BrdU FITC-Antikörperkonjugat wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend einmal mit PBS, 0,5% (v/v) Tween-20

gewaschen und in 1 ml PBS, 0,5 µg/ml Propidiumjodid aufgenommen. Die Zellen wurden wie unter (a) durchflußzytofluorimetrisch analysiert.

3.3.5 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Reporteranalysen wurden mittels transienter Transfektion geeigneter Plasmide in humane Gewebekulturzellen durchgeführt.

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit dem Reagenz SuperFect der Firma QIAGEN transfiziert. Die folgenden Angaben gelten für Gewebekulturschalen von 35 mm Durchmesser; für Transfektionen in größeren Schalen wurden die Reagenzienmengen proportional erhöht.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ /Schale ausgesät. 0,2 µg Luziferase-Reporterplasmid (Derivate von pGL3 Control, pRF oder phpRF) und 1,8 µg pSV-B-Gal (Promega) wurden mit 150 µl DMEM ohne FCS gemischt. Anschließend wurde die Lösung mit 5 µl SuperFect versetzt, kräftig gemischt und 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 850 µl DMEM, 10% FCS zu der SuperFect-DNA-Mischung gegeben. Nach Entfernen des alten Kulturmediums wurde das Transfektionsmedium zu den Zellen gegeben und für 3 bis 6 h auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden weitere 24 h in Standardmedium kultiviert, das keinen oder einen der folgenden Zusätze enthielt: 66 µM Lovastatin, 2 mM Thymidin, 40 µM PI3-Kinaseinhibitor LY294002 (BIOMOL) oder die entsprechende Menge Lösungsmittel (Ethanol). Zur Kontrolle der prozentualen Transfektionseffizienz wurden die Zellen bisweilen unter identischen Bedingungen mit pEGFP-C2 transfiziert, einem Plasmid das für eine Variante von GFP (green fluorescent protein) kodiert. Der Anteil der transfizierten Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

293T-Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Methode (Wigler *et al.*, 1979) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 /Zellkulturschale (Ø 60 mm) ausgesät. 5 ng Luziferase-Reporterplasmid (Derivate von pGL3 Control), 195 ng pSV-B-Gal und 4 µg eines eukaryontischen Expressionsplasmids (pCMV SPORT 6, pCMV-PTB oder pCMV-Nuc) wurden auf 189 µl mit ddH₂O verdünnt und mit 21 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt. Zu dieser Lösung

wurden 210 μ l 2 x HBS unter permanentem Mischen langsam zugetropft. Die Mischung wurde zur Bildung des Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitats 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 5 h wurde das Transfektionsmedium abgenommen und gegen das Standardmedium ausgetauscht. Nach weiteren 19 h wurden die Zellen geerntet.

3.3.6 Bestimmung von Reporter-genaktivitäten

Zur Präparation von Lysaten zur Messung von Reporter-genaktivitäten wurden transient transfizierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer von der Zellkulturschale aufgenommen. Wenn aus der gleichen Kultur auch RNA präpariert werden sollte, wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Schale gelöst, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in zwei Aliquoten separat weiterbehandelt.

Zellen, die mit Derivaten von pGL3 Control transfiziert worden waren, wurden in „Reporter Lysis Buffer“ (Promega) aufgeschlossen und die Aktivität der Leucht-käfer- (*Photinus pyralis*-)Luziferase wurde mit dem „Luciferase Assay System“ (Promega) bestimmt. Dabei wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zellen, die mit Derivaten von pRF und phpRF transfiziert worden waren, wurden mit „Passive Lysis Buffer“ (Promega) aufgeschlossen, und die Aktivitäten der Leucht-käfer-luziferase und der *Renilla reniformis*-Luziferase wurden mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) gemessen. Auch hier wurde jeweils gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen.

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

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Grundlegende Standardmethoden

3.4.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach drei alternativen Methoden. Die Proteinkonzentration von Gesamt-Zellysaten in SDS-Probenpuffer wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm abgeschätzt. Diese Abschätzung diente allein dazu, gleiche Proteinmengen verschiedener Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufzutragen. Die Konzentration von gereinigtem, rekombinantem p21 und Cyclin A/CDK2 wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels abgeschätzt. Als Standard diente Rinderserumalbumin, das in definierten Mengen auf das Gel aufgetragen worden war. In allen übrigen Fällen wurden Proteinkonzentrationen mit Hilfe des „Micro BCA-Assay Reagent“-Kits der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

3.4.1.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode (Laemmli, 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurden Trenngele mit den Ausmaßen (Höhe x Breite) 6 cm x 9 cm, 15 cm x 17 cm oder 15 cm x 27 cm. Es wurden sowohl homogene Trenngele (10%, 12%, oder 15% [w/v] Polyacrylamid) als auch Gradientengele (7,5 bis 20 % [w/v] Polyacrylamid) verwendet. Das Trenngel war jeweils mit einem 1 cm hohen 4%igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug stets 37,5:1 (w/w).

Zur Präparation eines Gels wurde die Trenngel-Lösung (7,5 bis 20% [w/v] Acrylamid, 0,2 bis 0,5% [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,033% [w/v] APS, 0,066% [v/v] TEMED in SDS-Trenngelpuffer) zwischen zwei Glasplatten, die durch 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt waren, gegossen und sogleich mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das n-Butanol vollständig entfernt, die Sammelgel-Lösung (4% [w/v] Acrylamid, 0,11% [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,05% [w/v] APS, 0,1% [v/v] TEMED in SDS-

Sammelgelpuffer) über das Trenngel gegossen und ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikal-Elektrophoresekammer eingebaut und die Reservoirs mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer oder dem 0,11fachen Volumen 10 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und die Proteine wurden entweder direkt durch Coomassie-Färbung, Silberfärbung oder Autoradiographie sichtbar gemacht oder auf eine Membran (PVDF oder Nitrozellulose) transferiert (Western-Blot).

3.4.1.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das Gel wurde zum Färben mindestens 1 h lang in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend zum Entfärben solange in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure geschwenkt bis die Proteinbanden klar sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurde das Gel auf ein Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, mit Küchenfolie abgedeckt und 1 h im Vakuum bei 80°C getrocknet.

3.4.1.4 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel mindestens 3 h in 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0,0185% (w/v) Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 20 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Es folgte eine genau einminütige Inkubation in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat. Das Gel wurde mit ddH₂O gewaschen (dreimal jeweils 20 s), anschließend 20 min in 0,2% (w/v) Silbernitrat, 0,028% (w/v) Formaldehyd inkubiert und nach erneutem Waschen mit ddH₂O (zweimal jeweils 20 s) zum Auslösen der Farbreaktion mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0,0185% (w/v) Formaldehyd versetzt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Farbreaktion mit 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure abgestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel für 1 h in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure überführt und anschließend zwischen einer Lage Filterpapier (Whatman 3MM) und Küchenfolie 1 h im Vakuum bei 80°C getrocknet.

3.4.1.5 Autoradiographie von Elektrophoresegelen

Zur Sichtbarmachung radioaktiv markierter Proteine oder Nukleinsäuren wurden die Gele in der Regel zunächst ohne weitere Behandlung auf eine Lage Filterpapier überführt, mit Küchenfolie abgedeckt und bei 80°C im Vakuum getrocknet. Gele in denen ³⁵S-haltige Proben aufgetrennt worden waren, wurden zur Verminderung des radioaktiven Hintergrundes zweimal für 30 min in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure gewaschen und anschließend getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Verstärkung der radioaktiven Signale in „TranScreen HE“ (für ³²P) oder „TranScreen LE“ (für ³⁵S und ¹⁴C) (Amersham Pharmacia Biotech) eingeschlagen und bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert. Für die Detektion von ³⁵S und ¹⁴C wurde alternativ zu „TranScreen LE“ die „Amplify“-Lösung der Firma Amersham Pharmacia Biotech als fluorographisches Reagenz eingesetzt.

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

Es wurden Membranen aus verstärkter Nitrozellulose (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schüll) oder PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) in der Größe des Trenngels verwendet. Zum Benetzen wurden PVDF-Membranen einige Sekunden mit Methanol getränkt, kurz in ddH₂O geschwenkt und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Nitrozellulose-Membranen wurden sofort mit Transferpuffer benetzt. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden nun in der angegebenen Reihenfolge geschichtet: drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier, die Membran, das Trenngel, drei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier und die Kathode. Der Transfer erfolgte für 100 min bei 1,2 mA/cm² Trenngelfläche. Zur Sichtbarmachung der transferierten Proteine wurde die Membran einige Minuten in Ponceau-Färbelösung (Nitrozellulose) oder Amidoschwarz-Färbelösung (PVDF) inkubiert und anschließend zum Entfärben mit ddH₂O (Ponceau) oder Amidoschwarz-Entfärber gespült. Anschließend wurde die Membran in TBS-T, 5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt, um damit unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in TBS-T, 5 % Magermilchpulver unter ständiger Bewegung inkubiert. Der Filter wurde dann dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper

gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Verdünnung 1/5000 in TBS-T, 5 % (w/v) Magermilchpulver) für mindestens 30 min inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch das „ECL“-System (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers. Der Filter wurde dabei für 2 min mit der ECL-Lösung bedeckt und anschließend unterschiedlich lang gegen einen Röntgenfilm exponiert. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „Supersignal West Femto“-System (Pierce) wiederholt. Zur Wiederverwendung wurden die Membranen mit PBS gespült und in PBS, 0,05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

3.4.1.7 Immunpräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Protein aus Gemischen radioaktiver Proteine abzutrennen. Bei den Proteingemischen handelte es sich entweder um Gesamtzellextrakte (nach „Pulse-chase“-Markierung), In-Vitro-Translationsansätze oder UV-Crosslink-Ansätze. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen ausgeführt.

Die Proteinlösungen wurden in der Regel mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 1 ml verdünnt und mit 1 bis 2 µg eines spezifischen Antikörpers versetzt. Der Ansatz wurde zur Bindung des Antikörpers an das Antigen 1 h auf einem Überkopffrotator sanft bewegt. Dann wurden 20 µl 50% (v/v) Protein-A-Sepharose (Sigma-Aldrich) oder 20 µl 50% (v/v) Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) hinzugegeben. Die Suspension wurde zur Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die Gelmatrix 1 h sanft bewegt und anschließend 15 s bei 10000 g zentrifugiert. Die Gelmatrix wurde in RIPA-Puffer resuspendiert und erneut in gleicher Weise abzentrifugiert. Dies wurde zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine dreimal wiederholt. Schließlich wurde die modifizierte Sepharose im doppelten Volumen 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und zur Elution gebundener Proteine 10 min gekocht. Die Gelmatrix wurde abzentrifugiert und der Überstand durch SDS-PAGE und anschließende Fluorographie des getrockneten Gels analysiert.

3.4.2 Präparation von Gesamt-Zellysaten

Gesamt-Zellysate wurden zur Immunoblot-Analyse von Gewebekulturzellen (oder Bakterien) präpariert. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und im gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer (ohne β-Mercaptoethanol und ohne

Bromphenolblau) aufgenommen. Das Lysat wurde 10 min bei 95°C inkubiert, durch kurze Behandlung mit Ultraschall homogenisiert und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.4.3 Präparation von translationsaktiven HeLa-Zellextrakten

Die Herstellung translationsaktiver, postmitochondrialer Zytoplasmaextrakte aus HeLa-Zellen wurde leicht abgewandelt nach einem Protokoll von Carrol *et al.* (1993) durchgeführt.

80 ml HeLa-Suspensionskultur wurden bei einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml (4×10^7 Zellen) in 50-ml-Polypropylenröhrchen überführt und 3 min lang bei 4°C und 650 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12 ml eiskaltem PBS resuspendiert, in 15-ml-Polypropylenröhrchen überführt und wie oben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 s lang in einer Tischzentrifuge bei 12500 g abzentrifugiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen insgesamt nicht länger als 10 min in PBS gehalten wurden. Die Zellen wurden anschließend in 2 ml eiskaltem Lysolecithin-Puffer resuspendiert und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie 10 s lang durch Zentrifugation bei 12500 g pelletiert. Die Zellen wurden in 400 µl Translationsmix aufgenommen und durch 10maliges Auf und Ab mittels einer 1-ml-Spritze und einer 26G-Kanüle lysiert. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension 20 s bei 12500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder sofort zur In-Vitro-Translation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4.4 In-Vitro-Translation

pCRΔa und pCRΔa-mut wurden zur gekoppelten In-Vitro-Transkription und In-Vitro-Translation von uORF-kodierten Peptiden eingesetzt. Dazu wurde das „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Zur radioaktiven Markierung wurde [¹⁴C]-Leucin in einer Endkonzentration von 5 nCi/µl (314 mCi/mmol) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Ein Aliquot des Reaktionsgemisches wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Fluorographie analysiert.

Zur Translation gereinigter In-Vitro-Transkripte wurde das „Flexi Rabbit-Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega verwendet. Ein Standardreaktionsansatz mit einem

Endvolumen von 10 μl enthielt 50 bis 60 ng RNA, 6 μl Retikulozytenlysat, je 200 pmol der proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 20 U RNasin (Promega), 4 μCi [^{35}S]Methionin (1000 Ci/mmol), 80 mM K^+ und 1,4 mM Mg^{2+} . Der Ansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Sodann wurde ein Aliquot durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

Der Einfluß von rekombinanten Proteinen auf die In-Vitro-Translation bestimmter RNAs in Retikulozytenlysaten wurde wie folgt untersucht: 1 μl des zu untersuchenden Proteins in 20 mM NaH_2PO_4 (pH 7,5), 250 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 5% (w/v) Glycerin wurden mit 1,5 μl einer wäßrigen RNA-Lösung vereinigt und 30 min auf Eis inkubiert. Sodann wurde eine Mixtur der übrigen Reaktionskomponenten in einem Volumen von 7,5 μl zugegeben. Die Endkonzentration einwertiger Ionen betrug 35 bis 80 mM K^+ und 25 mM Na^+ . Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend wie der Standardansatz analysiert.

Zur In-Vitro-Translation in HeLa-Zellextrakten wurden 125 ng RNA, 20 μl Extrakt, 135 pmol Methionin und 10 μCi [^{35}S]Methionin (1000 Ci/mmol) in einem Volumen von 25 μl vereinigt und 1 h bei 30°C inkubiert. p27 wurde mit einem polyklonalen anti-p27 Antikörper (C19, Santa Cruz Biotechnology) präzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

3.4.5 Messung der Gesamtproteinsynthese in Gewebekulturzellen

Zur Bestimmung der Proteinsyntheserate in unterschiedlich behandelten Gewebekulturzellen wurde [^{35}S]Methionin (1000 Ci/mmol) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{Ci/ml}$ direkt ins Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden 30 min bei Standardbedingungen kultiviert, anschließend dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem geeigneten Volumen PBS (500 μl pro 35-mm-Zellkulturschale) zusammengeschaßt. Um die gesamte von den Zellen aufgenommene Radioaktivität zu messen, wurden 50 μl der Zellsuspension direkt auf Glasfaserfilter (Whatman GF/C) getropft. Nach dem Trocknen der Filter wurde die aufgetragene Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Zur Quantifizierung der proteingebundenen Radioaktivität wurden 50 μl Zellsuspension mit 100 μl 0,1% (w/v) BSA und 1 ml 10% (w/v) TCA versehen und 30 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit eiskalter

10%iger (w/v) TCA und zweimal mit Ethanol gewaschen, getrocknet und durch Flüssigszintillationszählung analysiert. Der Anteil der proteingebundenen Radioaktivität an der gesamten aufgenommenen Radioaktivität wurde berechnet.

3.4.6 Analyse der Synthese und des Abbaus von p27 durch „Pulse-chase“-Markierung

„Pulse-chase“-Experimente wurden in 650-ml- oder 250-ml-Zellkulturflaschen mit verschließbarem Deckel durchgeführt. Die folgenden Angaben gelten für 650-ml-Flaschen. Für 250-ml-Flaschen wurden die Volumina der eingesetzten Lösungen bzw. Reagenzien entsprechend verringert.

Bei einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 10 ml PBS pro Flasche gewaschen und in je 5 ml Hungermedium unter Standardbedingungen für 30 min (oder für 60 min) kultiviert. Anschließend wurden 0,8 mCi [³⁵S]Methionin und [³⁵S]Cystein (ProMix, Amersham Pharmacia Biotech) in 1 ml Hungermedium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei fest verschlossenem Flaschendeckel 60 min bei 37°C inkubiert. Sodann wurde das radioaktive Medium von den Zellen abgenommen und durch 25 ml Chase-Medium ersetzt. Das Chase-Medium wurde entweder sofort wieder entfernt (0-h-Wert) oder unterschiedlich lange bei 37°C und fest verschlossenem Flaschendeckel auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro Flasche bei Raumtemperatur gewaschen und durch dreiminütige Behandlung bei 37°C mit 3 ml 10 x Trypsin/EDTA (Life Technologies) von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 20 ml eiskaltem Standardmedium aufgenommen, in ein 50-ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Präparation der Zellextrakte wurden die Proben auf Eis überführt und mit 1,5 ml RIPA+-Puffer versetzt. Die Zellen wurden durch zehnmaliges Passagieren durch eine 23G-Kanüle aufgeschlossen und die Zelltrümmer anschließend für 10 min bei 16000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiter analysiert. Die

proteingebundene Radioaktivität in 5 µl des Extrakts wurde durch TCA-Präzipitation und Flüssigszintillationsmessung nach dem unter 3.4.5 angegebenen Protokoll bestimmt. 2,5 µl wurden für die Bestimmung des Proteingehalts eingesetzt.

Zur weiteren Analyse der Extrakte wurden jeweils gleiche Proteinmengen auf 1 ml Endvolumen mit RIPA+-Puffer verdünnt (1,5 bis 2 mg Protein) und für 10 min bei 98°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde für 10 min bei 16000 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand hitzestabiler Proteine wurde p27 immunpräzipitiert (anti-p27 [C19], Santa Cruz Biotechnology), durch SDS-PAGE von verbliebenen Verunreinigungen getrennt und durch Fluorographie oder mit Hilfe eines PhosphorImagers (Fujifilm BAS-2500, Fujifilm) sichtbar gemacht.

3.4.7 Northwestern-Blot-Analyse

Die Northwestern-Blot-Analyse wurde zur Detektion von spezifischen RNA-Bindeaktivitäten in Proteinfractionen eingesetzt. Dazu wurden die Proteingemische wie zur Immunoblot-Analyse durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) überführt. Zur Renaturierung der immobilisierten Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4°C in NWBP (Northwestern-Bindepuffer) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten bei Raumtemperatur in NWBP, 0,5 µg/ml Heparin, 0,5 µg/ml tRNA inkubiert, bevor die ³²P-markierte RNA-Sonde zu einer Endkonzentration von 10⁵ cpm/ml für 45 min hinzugegeben wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit NWBP wurde die Membran feucht in Plastikfolie eingeschweißt und die immobilisierte Radioaktivität durch Fluorographie oder mit Hilfe eines PhosphorImagers (Fujifilm BAS-2500, Fujifilm) sichtbar gemacht.

3.4.8 RNA-Protein-Quervernetzung durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Crosslink)

Die Quervernetzung von Proteinen und RNA durch UV-Bestrahlung wurde angewandt, um spezifische RNA-Protein-Interaktionen in Lösung nachzuweisen. Dazu wurden 50 µg zytosolischer HeLa-Zellextrakt oder 100 ng rekombinantes, gereinigtes Protein oder geeignete Aliquote chromatographischer Fraktionen eingesetzt. Letztere wurden durch Zugabe von KCl auf dieselbe Salzkonzentration eingestellt. Die Proben wurden

mit RNA-Bindepuffer auf ein Endvolumen von 40 µl verdünnt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Zur Untersuchung rekombinanter Proteine und von Fraktionen geringer Proteinkonzentration wurden 0,1 mg/ml BSA zugegeben. Sollte in einem Experiment die Kompetierbarkeit einer RNA-Proteininteraktion getestet werden, wurden homologe oder heterologe Kompetitor-RNAs in diesen Ansatz mit eingeschlossen. Anschließend wurde die ³²P-markierte RNA-Sonde (96 fmol) in 5 µl ddH₂O zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min lang bei einer Wellenlänge von 254 nm in einem Abstand von 15 cm von der Lichtquelle mit UV-Licht bestrahlt (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Zum Abbau nicht quervernetzter RNA wurde die Probe für 30 min bei 37°C mit 500 U RNase T1 und 2,4 µg RNase A behandelt. Anschließend wurden die quervernetzten RNA-Protein-Komplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Identifizierung bestimmter Proteine in RNA-Proteinkomplexen wurde vor der Analyse durch SDS-PAGE und Fluorographie eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

3.4.9 Präparation zytosolischer HeLa-Zellextrakte

Die Herstellung von zytosolischen HeLa-Zellextrakten wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Dignam *et al.* (1983) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen.

6 Liter HeLa-Suspensionskultur wurden bei einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml in 500-ml-Zentrifugenbecher überführt und für 5 min bei 1800 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im fünffachen Volumen PBS resuspendiert, in zwei 250-ml-Zentrifugenbecher überführt und wie zuvor abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun im fünffachen Volumen HLP (hypotonischer Lysepuffer) resuspendiert und erneut wie zuvor abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf das dreifache des ursprünglichen Zellvolumens mit HLP verdünnt und resuspendiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch 10 Pistillstöße in einem Dounce-Homogenisator (B. Braun, Typ L) aufgeschlossen. Zelltrümmer und Zellkerne wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 3300 g vom Zytoplasma abgetrennt. Der Zytoplasmatische Überstand wurde mit 1/9 Volumen 10 x Zytosolpuffer versetzt und 1 h bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Fraktionierung durch Anionenaustausch-Chromatographie auf die geeigneten Pufferbedingungen (20 mM HEPES/KOH [pH 7,5], 100 mM KCl,

2 mM DTT) eingestellt. Für alle anderen Anwendungen wurde der Überstand für 5 h gegen ein großes Volumen Dialysepuffer dialysiert, anschließend für 20 min bei 25000 g zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.10 Reinigung CCRE-RNA-bindender Proteine

Zur Affinitätsreinigung von Proteinen, die an die RNA des CCRE (cell cycle responsive element) binden, wurde zunächst eine geeignete Säulenmatrix (CCRE-Sepharose) hergestellt. Dies erfolgte durch Kopplung von CCRE-RNA an CNBr-Sepharose (Sigma-Aldrich). Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

CCRE-RNA wurde im großen Maßstab durch In-Vitro-Transkription mit dem „RiboMax“-System (Promega) und mit pCRA1 (linearisiert mit *NcoI*) als Matrize hergestellt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. In den Transkriptionsansatz wurden 0,5 µCi α -[³²P]-CTP mit eingeschlossen, um die RNA schwach radioaktiv zu markieren und dadurch die spätere Kopplung an die Gelmatrix überprüfen zu können. Mit 20 µg Plasmid-DNA wurden in einem 200-µl-Ansatz annähernd 300 µg CCRE-RNA synthetisiert.

CNBr-Sepharose wurde zur Kopplung folgendermaßen vorbereitet: 200 mg trockene Gelmatrix wurden zur Aktivierung mit 2 ml 1 mM HCl versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Sodann wurde die Gelmatrix in einen Glasfasertrichter überführt und bei Raumtemperatur mit 60 ml 1 mM HCl und anschließend mit 10 ml ddH₂O gewaschen. Dann wurde sie in 5 ml eiskaltem ddH₂O aufgenommen, in ein 5-ml-Schnappdeckelgefäß überführt und auf Eis inkubiert, bis sich das Gel abgesetzt hatte. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 750 µl 0,4 M MES/KOH (pH 6,0) und 173 µg CCRE-RNA in ddH₂O gemischt. Die Suspension wurde zur erneuten Sedimentation des Gels auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Überstand abgenommen und der Rest des Gemisches zur Kopplung über Nacht bei 4°C in einem Überkoprotator sachte bewegt. Nach dem Absetzen des Gels wurden nochmals 20 µl Überstand entnommen und dieser anschließend vollständig entfernt. Die so erhaltene CCRE-Sepharose wurde dreimal mit ddH₂O gewaschen (durch Absetzen lassen, Abnehmen des Überstandes und Resuspendieren). Zur Absättigung noch freier reaktiver Gruppen wurde die CCRE-Sepharose 2 h bei 4°C in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,8) bewegt und anschließend mit 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0,5 mg/ml Heparin äquilibriert.

Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz wurden die Proben, die vor und nach der Kopplung vom Überstand der Gelsuspension entnommen worden waren, auf TCA-fällbare Radioaktivität hin untersucht. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Proben (20 µl) wurden mit 100 µl 0,5 mg/ml Heringsperma-DNA und 1 ml 10% (w/v) TCA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Vakuumfiltration auf Glasfaserfilter (Whatman GF/C) überführt. Die Filter wurden zweimal mit 10% (w/v) TCA und zweimal mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Die anhaftende Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die Analyse zeigte, daß die eingesetzte RNA nahezu vollständig an die Gelmatrix gekoppelt worden war.

Die Reinigung CCRE-RNA-bindender Proteine selbst erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde zytosolischer HeLa-Zellextrakt zur Anreicherung RNA-bindender Proteine durch Anionenaustausch-Chromatographie an Heparin-Sepharose vorfraktioniert. Hierzu wurde eine „HiTrap Heparin“-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Säulenbettvolumen von 5 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Säule wurde mit 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 100 mM KCl, 2 mM DTT äquilibriert, sodann mit 41 ml zytosolischem HeLa-Zellextrakt (1 mg Protein/ml) beladen und anschließend mit 50 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Salzgradienten von 100 bis 600 mM KCl in 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 2 mM DTT eluiert und in 17 Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Fraktionen, die Bindeaktivität für CCRE-RNA besaßen, wurden durch Northwestern-Blot-Analyse und UV-Crosslink identifiziert und vereinigt. Die Salzkonzentration der vereinigten Fraktionen wurde auf 350 bis 400 mM KCl geschätzt. Sie wurden 1:1 mit 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 2 mM DTT, 1 mg/ml Heparin verdünnt und mit 0,5 ml CCRE-Sepharose, die zuvor in 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0,5 mg/ml Heparin äquilibriert worden war, versetzt. Die Suspension wurde für 2 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler sachte bewegt und anschließend in eine „PolyPrep“-Tropfsäule (BioRad) überführt. Der Durchlauf wurde aufgefangen und die Säulenmatrix mit 2 ml 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 200 mM KCl, 2 mM DTT gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einem Stufengradienten steigender KCl-Konzentration (300, 400, 500, 650, 800 und 1 M KCl) in 20 mM HEPES/KOH (pH 7,5), 2 mM DTT eluiert und in Fraktionen zu 250 µl aufgefangen. Von jeder KCl-Konzentration wurden 750 µl (1,5 Säulenvolumina) aufgetragen. Aliquote der

Fraktionen wurden durch UV-Crosslink (3 μ l), Northwestern-Blot (10 μ l) und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (5 μ l) analysiert.

3.4.11 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden Plasmide in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Je nach Stärke der Expression wurde ein geeignetes Volumen Superbroth (50 μ g/ml Kanamycin) mit dem Transformationsansatz beimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,5$ bis $0,75$) wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach 4 bis 5 h wurden die Zellen abzentrifugiert und entweder direkt weiter aufgearbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.12 Reinigung von bakteriell exprimiertem PTB und Nuc-p50

PTB und Nuc-p50 (aminoterminal verkürztes Nucleolin) wurden in *E. coli* als Fusionsproteine mit einer aminoterminalen Hexahistidinsequenz exprimiert. Die Reinigung der beiden Proteine erfolgte nach einem nahezu identischen Protokoll. Sie wurden zunächst einer Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Matrix (ProBond, Invitrogen) und anschließend einer Anionenaustausch-Chromatographie an Heparinsepharose unterzogen. Alle Schritte wurden bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

Als erstes wurden die Bakterien im drei- bis siebenfachen Volumen Aufschlußpuffer (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ [pH 8,0], 300 mM NaCl, 5% [w/v] Glycerin, 10 mM Imidazol, 0,5 mM PMSF, 1 x „complete“ ohne EDTA [Roche], 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und auf Eis durch Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde 30 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,5 bis 1 ml „ProBond“-Matrix (Invitrogen) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die „ProBond“-Matrix in ein „PolyPrep“-Tropfsäulchen (BioRad) überführt und intensiv mit Aufschlußpuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einem Stufengradienten steigender Imidazolkonzentrationen (40, 100, 250, 500 mM) eluiert. Nach Analyse der Eluatfraktionen durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, vereinigt und durch Ultrafiltration mittels „Centricon 30“ (Amicon) in 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 8,0),

100 mM NaCl, 0,5 mM DTT überführt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine „HiTrap Heparin“-Säule (Amersham Pharmacia Biotech; 1 ml Säulenvolumen, Flußrate 0,5 ml/min, äquibriert mit 20 mM NaH₂PO₄/NaOH [pH 8,0], 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT) aufgetragen. Nach intensivem Waschen der Säule mit Äquibrierungspuffer wurden gebundene Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 100 mM NaCl bis 600 mM NaCl (für PTB) bzw. 100 mM NaCl bis 1 M NaCl (Nuc-p50) eluiert. Die Eluatfraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung analysiert. Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mittels „Centricon 30“ (Amicon) in 20 mM NaH₂PO₄/NaOH (pH 7,5), 250 mM NaCl, 5% (w/v) Glycerin, 0,5 mM DTT überführt. Die Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.13 Reinigung von rekombinantem p21

p21 wurde in *E.coli* als Fusionsprotein mit einer carboxyterminalen Hexahistidin-Sequenz exprimiert. Das Protein wurde zunächst durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Matrix (Ni-NTA-Agarose, QIAGEN) unter denaturierenden Bedingungen aus „inclusion bodies“ aufgereinigt. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen.

Die Zellen wurden zunächst im siebenfachen Volumen Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl [pH 8,0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,3 mg/ml Lysozym, 1 x „complete“ ohne EDTA [Roche]) resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Natriumdesoxycholat in einer Endkonzentration von 1 mg/ml wurde die Suspension für weitere 10 min inkubiert und anschließend auf Eis mit Ultraschall behandelt. Das Homogenisat wurde 15 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Sodann wurde das Pellet dreimal mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Triton X-100 gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄/NaOH (pH 7,2), 10 mM Tris/HCl gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20°C (15 min bei 15000 g und 30 min bei 100000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde 1 h lang mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Gebundene Proteine wurden nach intensivem Waschen der Ni-NTA-Agarose mit 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄/NaOH (pH 7,2), 10 mM Tris/HCl mit einem sinkenden pH-Stufengradienten (pH 5,9 und pH 4,5) eluiert.

Eluatfraktionen, die p21 enthielten, wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung identifiziert, vereinigt und bei 4°C gegen 4 M Harnstoff, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine „HighTrap SP“-Säule (Amersham Pharmacia Biotech; 1 ml Säulenvolumen, Flußrate 1 ml/min, äquibriert mit 4 M Harnstoff, 25 mM Tris/HCl [pH 8,0], 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT) aufgetragen. Nach Auswaschen des Harnstoffs mit 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT wurden gebundene Proteine mit einem steigenden Salzgradienten von 25 mM bis 600 mM NaCl eluiert. p21-haltige Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung identifiziert, vereinigt und gegen 25 mM Tris/HCl (pH 7,2), 250 mM NaCl dialysiert. Das Dialysat wurde auf 10% (w/v) mit Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.14 Reinigung von rekombinantem Cyclin A/CDK2 aus Insektenzellen

Das Ausgangsmaterial für die Reinigung wurde freundlicherweise von Steven I. Reed (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um tiefgefrorene Insektenzellen in denen humanes Cyclin A bzw. humanes CDK2 mit Hilfe rekombinanter Baculoviren exprimiert worden war. Die Baculoviruskonstrukte stammten aus dem Labor von David O. Morgan (University of California, San Francisco, USA).

Cyclin A wurde im Unterschied zu CDK2 als Fusionsprotein mit einer aminoterminalen Hexahistidinsequenz exprimiert. Beide Proteine wurden zunächst als Komplex durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Matrix (Ni-NTA-Agarose, QIAGEN) gereinigt. Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration angeschlossen. Alle Reinigungsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4°C bzw. auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

Gefrorene Pellets CDK2- bzw. Cyclin-A-exprimierender Insektenzellen wurden vereinigt, aufgetaut und mit dem gleichen Volumen 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 x „complete“ ohne EDTA (Roche), 20 mM MgCl₂, 8 mM ATP in 2 x BLP (Baculovirus-Lysepuffer) versetzt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators (Braun, Typ L) homogenisiert und 45 min bei 30°C inkubiert. Diese Inkubation diente der Bildung der humanen Cyclin A/CDK2-Komplexe und ihrer

Aktivierung durch endogene Kinasen der Insektenzellen. Das Homogenisat wurde 30 min bei 20000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und weitere 30 min bei 100000 g ultrazentrifugiert. Zur Bindung der Cyclin A/CDK2-Komplexe wurde der Überstand der Ultrazentrifugation mit Ni-NTA-Agarose versetzt und über Nacht bei 4°C sachte bewegt. Nach intensivem Waschen der Ni-NTA-Agarose mit 10 mM Imidazol in BLP wurden gebundene Proteine mit 200 mM Imidazol in BLP eluiert. Die Eluatfraktionen, die Cyclin A/CDK2 enthielten wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung identifiziert und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Ultrafiltration mittels „Centricon 30“ (Amicon) eingeeengt und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min auf eine „Superdex 200 HR 10/30“-Gelfiltrationssäule, voräquiliert mit 20 mM Tris/HCl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 1 mM DTT aufgetragen. Die Elution erfolgte in einem Säulenvolumen des gleichen Puffers. CyclinA/CDK2-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung identifiziert, vereinigt und durch Ultrafiltration mittels „Centricon 30“ (Amicon) eingeeengt. Die Proteinlösung wurde auf 5% (w/v) mit Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.15 In-Vitro-Phosphorylierung von p21 durch Cyclin A/CDK2

Für einen analytischen Ansatz wurden 3 µl p21 (25 ng) mit 3 µl Cyclin A/CDK2 variabler Verdünnung, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 10 x „complete“ ohne EDTA (Roche), 1 µl 10 x RB und 1 µl ddH₂O in einem Endvolumen von 10 µl vereinigt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit einem anti-p21 Antikörper (anti-Cip1/Waf1, Becton Dickinson) analysiert.

Für einen präparativen Ansatz zur Gewinnung von phosphoryliertem p21 wurden 10 µl p21 (1,5 µg), 40 µl Cyclin A/CDK2 (20 µg), 0,6 µl 100 mM ATP, 1,2 µl 50 x „complete“ ohne EDTA (Roche), 6 µl 10 x RB und 2,2 µl ddH₂O in einem Endvolumen von 60 µl vereinigt und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde p21 unter identischen Bedingungen ohne Cyclin A/CDK2 inkubiert. Zur Inaktivierung und Abtrennung von Cyclin A/CDK2-Komplexen wurde phosphoryliertes und kontrollbehandeltes p21 mit dem 1,5fachen Volumen IP-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 16000 g wurde der p21-haltige Überstand abgenommen, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.16 In-Vitro-Dephosphorylierung von Cyclin A/CDK2-behandeltem p21

50 ng GST-Cdc14 (Taylor *et al.*, 1997) oder 50 ng GST-Cdc14-C283S (inaktive Mutante, Taylor *et al.*, 1997) oder 7 U CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, Roche) wurden mit 16 ng Cyclin A/CDK2-behandeltem p21, 1,5 μ l 10 x Phosphatasepuffer und ddH₂O zu einem Reaktionsvolumen von 15 μ l vereinigt. Falls zur Kontrolle erforderlich, wurden 1,5 μ l 10 x Phosphatase-Inhibitor-Mix in den Ansatz mit eingeschlossen. Nach 30minütiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 μ l 2 x SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit einem anti-p21 Antikörper (anti-Cip1/Waf1, Becton Dickinson) analysiert.

3.4.17 Immobilisierung von phosphoryliertem p21 und Test seiner inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität von Cyclin A/CDK2

Etwa gleiche Mengen phosphoryliertes und unphosphoryliertes p21 (200 bis 300 ng, abgeschätzt nach Immunoblot-Analyse) wurden jeweils auf 120 μ l mit IP-Puffer verdünnt und 1 h auf Eis mit 20 μ l (2 μ g) polyklonalem anti-p21 Antikörper (C19, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. In einem dritten Ansatz wurden 4 μ l anti-Cyclin-A Antiserum (T310, Hengst *et al.*, 1994) mit IP-Puffer auf 140 μ l verdünnt. Nach Zugabe von je 20 μ l 50% (v/v) Protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich) in IP-Puffer wurden die Ansätze wiederum 1 h auf Eis gehalten und gelegentlich durchmischt. Die Gelmatrix wurde einmal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend 1 h auf Eis mit 500 ng Cyclin A/CDK2 inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenem Cyclin A/CDK2 wurde die Gelmatrix zweimal mit IP-Puffer und einmal mit RB-Puffer gewaschen. Die eine Hälfte der Gelmatrix wurde in SDS-Probenpuffer gekocht, und die dabei eluierten Proteine wurden durch Immunoblot mit anti-p21 (anti-Cip1/Waf1, Becton Dickinson) und anti-PSTAIRE Antikörpern analysiert. Die andere Hälfte wurde zur Bestimmung der immobilisierten Kinaseaktivität verwendet. Dazu wurde die Gelmatrix (5 μ l) in 10 μ l RB, 0,2 mg/ml Histon H1, 0,7 μ Ci/ μ l γ -[³²P]-ATP, 22 μ M ATP resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Sodann wurde der Reaktionsansatz mit dem gleichen Volumen

2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Der Überstand wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert. Zur Quantifizierung der Histon-H1-gebundenen Radioaktivität wurde die Cherenkov-Strahlung der aus dem trockenen Gel ausgeschnittenen Histon-H1-Bande gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur translationalen Regulation von p27^{Kip1}

Die Menge an p27 ist am höchsten in quieszenten Zellen und unterliegt in proliferierenden Zellen einer periodischen Schwankung. Sie erreicht ihr Maximum während der G₁-Phase, fällt stark ab, wenn die Zellen in die S-Phase übergehen, und bleibt niedrig bis zur nächsten G₁-Phase. Die Menge an p27-mRNA ist hingegen in den verschiedenen Zellzyklusphasen weitgehend konstant (Hengst *et al.*, 1994; Hengst und Reed, 1996).

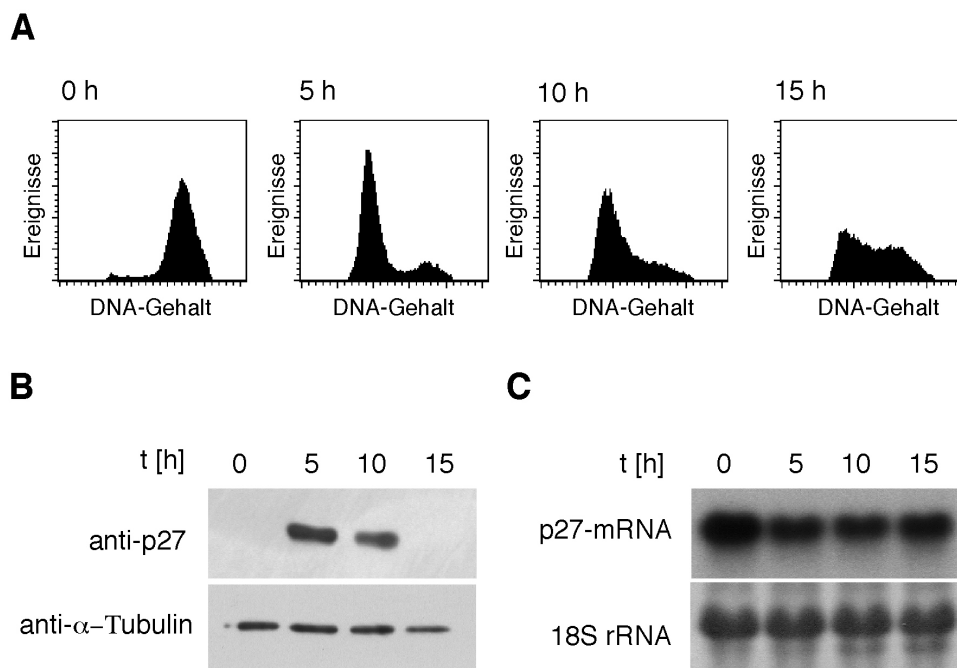


Abbildung 4.1: Analyse der p27-Expression in proliferierenden adherenten HeLa-Zellen

(A) FACS-Analyse der Zellsynchronisation. Adhärenente HeLa-Zellen wurden durch aufeinanderfolgende Behandlungen mit Thymidin und Nocodazol in der Mitose arretiert. Mitotische Zellen wurden durch Pipettieren von der Zellkulturplatte abgespült, gewaschen und replattiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Auswaschen des Nocodazols wurden die Zellen geerntet, fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

(B) Western-Blot-Analyse. Adhärenente HeLa-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Zellzyklusblockade lysiert. Endogenes p27 und α -Tubulin (Ladekontrolle) wurden durch Immunoblot-Analyse von Gesamtzellsatzen mit monoklonalen anti-p27 Antikörpern bzw. anti- α -Tubulin Antikörpern detektiert.

(C) Northern-Blot-Analyse. Gesamt-RNA aus synchronisierten adherenten HeLa-Zellen wurde mit einer radioaktiv markierten p27-cDNA-Sonde (Nukleotidposition 120 bis 1511) hybridisiert. Die 18S rRNA wurde zur Kontrolle der geladenen RNA-Menge mit Methylblau angefärbt.

Abbildung 4.1 soll die Expression von p27 im Verlauf des Zellzyklus am Beispiel von adhärennten HeLa-Zellen veranschaulichen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Nocodazol, einem Mikrotubuli-depolymerisierenden Agens, reversibel in der Mitose arretiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Auswaschen des toxischen Agens analysiert. Zur Überprüfung der Synchronisierung wurde der DNA-Gehalt der Zellen als Indikator für ihre Position im Zellzyklus bestimmt (Abbildung 4.1A). Zum Zeitpunkt „0 h“ wurden fast ausschließlich Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N detektiert. Beim ersten Zeitpunkt (5 h) nach Auswaschen des Nocodazols wiesen über 80% der Zellen einen 2N-DNA-Gehalt auf. Sie waren also in die G₁-Phase eingetreten. Nach 10 Stunden besaß ein Teil der Zellen bereits einen intermediären, also S-Phase-spezifischen DNA-Gehalt. Nach 15 Stunden befanden sich die meisten Zellen in der S-Phase. Der p27-Gehalt der synchronisierten Zellen wurde durch Immunoblot-Analyse untersucht (Abbildung 4.1B). In den nocodazolarretierten Zellen war auch nach längerer Exposition kein p27 detektierbar. Fünf Stunden nach Aufhebung der Blockade war der p27-Gehalt der Zellen übereinstimmend mit deren Eintritt in die G₁-Phase stark angestiegen. Nach 10 Stunden wurde bereits eine Abnahme der Menge an p27 beobachtet, nach 15 Stunden, als sich die Mehrzahl der Zellen in der S-Phase befand, war sie unter die Detektionsgrenze abgesunken. Die Northern-Blot-Analyse der p27-mRNA zu den verschiedenen Zeitpunkten macht deutlich, daß die Variation der p27-Menge nicht durch eine Veränderung der Transkriptionsrate oder der Stabilität des p27-Transkripts verursacht wurde (Abbildung 4.1C).

Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße Veränderungen der Translationsrate und der Proteinstabilität zur Schwankung der p27-Menge beitragen, führten Hengst *et al.* (1996) „Pulse-chase“-Analysen an arretierten HeLa-Zellen durch. Die Zellen wurden entweder mit Lovastatin in der G₁-Phase oder mit Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus arretiert. Anhand dieses experimentellen Systems wurde gezeigt, daß die Abnahme der Konzentration von p27 beim Übergang von der G₁- in die S-Phase sowohl auf die Verminderung der Translationsrate der p27-mRNA als auch auf den beschleunigten Abbau des Proteins zurückzuführen ist.

4.1.1 Identifizierung translationsregulatorischer Elemente der p27-mRNA

4.1.1.1 Klonierung und Charakterisierung einer p27-cDNA mit ausgedehnten untranslatierten Regionen am 5'- und 3'-Ende

Die Expression des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} unterliegt im Verlauf des Zellzyklus einer translationalen Regulation. Cis-wirkende Elemente in der mRNA sind im allgemeinen die Voraussetzung für eine genspezifische Translationskontrolle. Es sollte daher untersucht werden, ob p27-mRNA solche regulatorische Elemente enthält. In vielen Fällen befinden sich diese Elemente in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (5'- und 3'UTRs) der regulierten mRNA. Zu Beginn der Analyse war es daher essentiell, eine p27-cDNA zu klonieren, die möglichst vollständige 5'- und 3'UTRs enthält (Abbildung 4.2). Ausgangspunkt für die Klonierung war die Sequenzinformation einer zuvor aus menschlichem Brustdrüsengewebe isolierten p27-cDNA (Abbildung 4.2B, Fragment a).

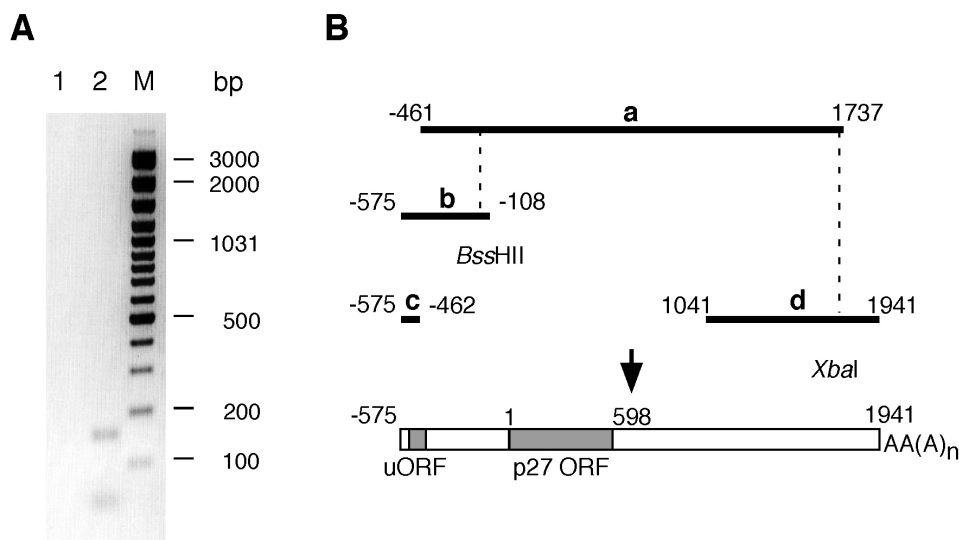


Abbildung 4.2: Klonierung einer 2526 nt langen p27-cDNA

(A) Identifizierung und Klonierung des 5'-Endes der p27-cDNA durch 5'RACE. Gesamt RNA aus HeLa-Suspensionszellen wurde mit Hilfe eines p27-spezifischen Oligonukleotidprimers revers transkribiert. Die einzelsträngige cDNA wurde am 5'-Ende mit einer Oligo-dC-Sequenz versehen und mittels universaler und genspezifischer Primer durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Spur 2). Spur 1: Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase; M: DNA-Längenstandard. Die Längen der Standard-DNAs sind in bp angegeben.

(B) Schematische Übersicht der Klonierung. (a) p27-cDNA aus menschlichem Brustdrüsengewebe, (b) 5'RACE-Klon, der nach der primäre Amplifikation isoliert worden war, (c) 5'RACE-Klon, der nach der zweiten Amplifikation isoliert worden war, (d) EST-Klon (DDJB/EMBL/GenBank-Nummer N21107). Die zur Verknüpfung der Fragmente benutzten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Offene Leserahmen (ORFs) sind in Grau dargestellt. Die Nukleotidsequenz ist relativ zum 5'-Ende der kodierenden Region von p27 nummeriert.

Zur Klonierung des 5'-Endes wurde eine 5'RACE-Klonierung (rapid amplification of cDNA ends) mit Gesamt-RNA aus HeLa-Suspensionskultur durchgeführt. Dabei wurde das gesuchte 5'-Ende der p27-mRNA zunächst mit einem genspezifischen Oligonukleotidprimer (GSP1) revers transkribiert. An das 5'-Ende der resultierenden, einzelsträngigen cDNA wurde ein Oligo-dC-Strang ansynthetisiert, der es ermöglichte, das gesuchte cDNA-Ende mit einem Universalprimer und einem zweiten genspezifischen Oligonukleotidprimer (GSP2) zu amplifizieren. Die aus dieser Reaktion hervorgegangenen PCR-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenfassung der erhaltenen Klone.

	1. Amplifikation	2. Amplifikation
5'-Ende der analysierten cDNA-Klone	-575, -473, -472, -471, -469, -455, -445, -443, -370	-575

Tabelle 4.1: Positionen der 5'-Enden der durch 5'RACE erhaltenen p27-cDNA-Klone.

Neben kürzeren Fragmenten wurden zahlreiche Klone identischer Länge detektiert, deren 5'-Ende der Position -575 stromaufwärts vom p27-ORF entspricht. (Abbildung 4.2B, Fragment b). Da nicht auszuschließen war, daß bei der cDNA-Amplifikation längere Fragmente mit geringerer Effizienz vervielfältigt und damit übersehen worden waren, wurde ein Aliquot des Amplifikats mit Hilfe eines dritten, weiter stromaufwärts gelegenen genspezifischen Primers (GSP3) reamplifiziert. Bei der Analyse des resultierenden Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde neben einer "Wolke" sehr kleiner Fragmente von annähernd 50 bp, die nicht weiter untersucht wurden, eine einzelne DNA-Bande von etwa 150 bp Länge detektiert (Abbildung 4.2A, Spur 2). Keine der DNAs war in einem Kontrollansatz detektierbar, dem keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden war (Spur 1). Damit konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um Amplifikate genomischer DNA handelte. Die 150 bp-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Alle analysierten Klone wiesen übereinstimmend die Position -575 als 5'-Ende auf (Abbildung 4.2B, Fragment c und Tabelle 4.1). Da keine längeren Fragmente detektierbar waren, wurde die 575 Nukleotide umfassende 5'UTR als Grundlage für die weiteren Analysen genommen. Das 3'-Ende der p27-cDNA wurde um eine 204 bp lange Sequenz eines EST-Klones (Abbildung 4.2B, Fragment d) ergänzt. Dieses Stück war aufgrund der

Klonierungsstrategie bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek verlorengelassen. Dieser EST-Klon ist einer von zahlreichen, durch Datenbanksuche identifizierten cDNA-Fragmenten, deren 3'-Enden sich etwa 20 bp stromabwärts von einem kanonischen Polyadenylierungssignal (AATAAA) befinden. Daraus wurde geschlossen, daß es sich hierbei um das physiologische 3'-Ende des p27-Transkripts handelt.

Das p27-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 in der zytogenetischen Region 12p13 lokalisiert (Pietenpol *et al.*, 1995). Wie aus dem Vergleich der cDNA mit der genomischen Sequenz (DDJB/EMBL/GenBank-Nummer AC008115) hervorgeht, besteht es aus drei Exons und zwei Introns (Abbildung 4.3). Die Exongrenzen befinden sich in der kodierenden Region beziehungsweise unmittelbar stromabwärts. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, daß alle analysierten p27-5'UTR-Klone einem durchgehenden genomischen DNA-Abschnitt entsprechen. Ihre unterschiedlichen Längen sind also nicht auf alternatives Spleißen zurückzuführen. Die Sequenz der cDNA weicht in drei Positionen von dem genomischen Datenbankeintrag ab: in Position -79 durch eine Transition von T nach C, in Position 1553 durch eine Transversion von C nach A und in Position 1643 durch eine Deletion von A.

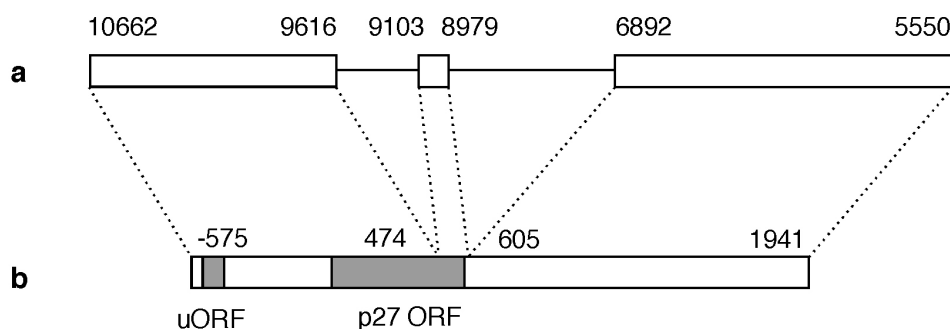


Abbildung 4.3: Die p27-cDNA ist aus drei Exons zusammengesetzt

(a) genomische Sequenz mit der DDJB/EMBL/GenBank-Nummer AC008115. Exons sind als Kästchen, Introns als Linien dargestellt. Die Größen der Introns sind nicht maßstabgetreu wiedergegeben. (b) p27-cDNA. Offene Leserahmen sind in Grau dargestellt. Die Nummern geben die Positionen der Exongrenzen wieder.

Die Nukleotidsequenz der humanen p27-5'UTR ist im Vergleich zur nichtkodierenden 5'-Region des p27-Gens der Maus bemerkenswert konserviert (78% Identität). Besonders hoch ist die Übereinstimmung im Bereich der ersten 150 Nukleotide, die eine Sequenzidentität von 91% aufweisen (Abbildung 4.4A). In diesem Bereich befindet sich in beiden Sequenzen ein kleiner offener Leserahmen (uORF), der für ein Peptid von 29

Aminosäuren kodiert (siehe auch Abbildung 4.3). Die Aminosäuresequenz der beiden Leserahmen ist mit 93% Identität ebenfalls hoch konserviert (Abbildung 4.4B). Auffallend ist weiterhin die Häufigkeit von Oligopyrimidinsequenzen im gesamten Bereich der 5'UTR. Insgesamt enthält sie 16 Sequenzbereiche von 5 oder mehr aufeinanderfolgenden Pyrimidinnukleotiden.

A

Mensch/cDNA	-575	CCACCTTAAGGCGCGCTCGCCAGCCTCGGCGGGCGGGCTCCCGCGCCGCAACCAATGG
Maus/genomisch	-605	CCACCTTAAGAGCGCGCTCGCCAGCCTCGGCGGAGCGGGCTCCCGCGCCGAGACCAATGG
Mensch/cDNA	-515	ATCTCCTCCTCTGTTTAAATAGACTCGCCGTGTCAATCATTTTCTTCTTCGTAGCCCTCC
Maus/genomisch	-545	AGCTCCTCCTCTGTTTAAATAGACTTGCAGTGTCAATAATCTTCTTCTTCGTAGCCCTCC
Mensch/cDNA	-455	CTTCCACCGCCATATGGGCACTAATAAAAA---GGGGCTCGTCTTTTGGGGTGTTTT
Maus/genomisch	-485	CTTCCACCGCCATATGGGCACTAATAAAAAGAAGGGGGCTCGTCTTTTGGGGTGTTTT
Mensch/cDNA	-398	TCTCCCC--TCCCCTGTCCCCCTTGTCTCAGGCTCTCCACTCCGACGCGGCAAGGT
Maus/genomisch	-425	TCCCCCCTCATCCCCTGTCCCCACTCACTCGCGGCTCCGACTGCG--CGGCGGCAAGGT
Mensch/cDNA	-340	TTGGAGAGCGGCTGGGTTTCGCGGACCCCGGGCTTGCAACCAGCCAGACTCGGACGGGC
Maus/genomisch	-366	TTGGAGAGCGGCTGG--TTCGCGGACACACGG--CTCGCCCAAGCTACGCTCCACTG--
Mensch/cDNA	-280	TTTGCCACCCTCTCGGCTTGCCTGGTCCCCTCTCCTCTCCGCCCTCCGCTGGCAGTCC
Maus/genomisch	-310	TTTGCCACCCTCTCC---TGCCTCCCTCCCCTCCCTCCCGGCCCTCCAGTACATTGATC
Mensch/cDNA	-220	ATTTGATCAGCG--GAGACTCGGCGGCCTGGG---CGGCGGCTTCGCCGAGCC--CCTG
Maus/genomisch	-253	ACTGAAGCTCGA--CTGCGCGGCGGCTGGGTTGTCCCTCGGCTCTCTTCCAGACCTG
Mensch/cDNA	-168	CGCGCTCCTAGAGCTCGGGCCGTGGCTCGTGGGGTCTGTGTCTTTGCT--CGGAGG
Maus/genomisch	-193	CGCGCTACTGCGGCTCGGGGCTGCTCGCTGGCTCTGCTCCATTTGACTGTCTGTGT
Mensch/cDNA	-110	CAGTCGGCTGGCTTCGAGAGGGCTTCGGCCCGGAGG--GGCCCTTTG--TTTTGTTCCG
Maus/genomisch	-133	CAGTCGCAAACTTCGAGAGGGCTTTTCCGCTCATCCCTGGCCCTTCGCTTTTGTTCGG
Mensch/cDNA	-52	TTTTGTT-----TTTTTGGAGAGTCCGAGAG---AGCGGCTGTGCAACCCG
Maus/genomisch	-73	TTTTGTTGTTTATTTTCATTTTTTTTTTTCCGAGAGGCGAGGCGGCTGTCTACACCCG
Mensch/cDNA	-8	-----GGCAAAG
Maus/genomisch	-13	CCCGAGGAGGAAG

B

1	29	
uORF-Peptid/Mensch		MDLLLCLNRLAVSIIFFVSLPSTAILGH
uORF-Peptid*/Maus		MELLLCLNRLAVSIIFFVSLPSTAILGN

Abbildung 4.4: Die humane p27-5'UTR und die nicht kodierende 5'-Region des p27-Gens der Maus sind bemerkenswert konserviert

(A) Sequenzvergleich zwischen der humanen p27-5'UTR und der nichtkodierende 5'-Region des p27-Gens der Maus (DDJB/EMBL/GenBank-Nummern U77915 und U10440). Homologe Sequenzen sind schwarz unterlegt. Die Position des kleinen offenen Leserahmens ist durch eine Linie angedeutet.

(B) Sequenzvergleich der Peptide, die von dem kleinen offenen Leserahmen der humanen p27-5'UTR bzw. der homologen Sequenz der Maus kodiert werden. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt.

(*) Bisher wurde nicht gezeigt, daß der kleine offene Leserahmen Bestandteil von p27-mRNA der Maus ist.

Die Länge der Fragmente, die zu diesem Zeitpunkt als menschliche p27-5'UTRs beschrieben und analysiert worden waren, variierte zwischen 152 und 479 Nukleotiden. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die 575 Nukleotide umfassende, ausgedehnte Form der p27-5'UTR eine Besonderheit von HeLa-Zellen darstellt. Um dies zu untersuchen, wurde RNA aus HeLa-Zellen und aus normalen diploiden Fibroblasten (HS68) in Northern-Blot-Analysen verglichen (Abbildung 4.5, Spuren 1 bis 4). Dazu wurde die RNA mit einer Sonde für das 5'-Ende (oben) und zum Vergleich mit einer Sonde für einen Bereich der kodierenden und 3'-nichtkodierenden Region (Mitte) hybridisiert.

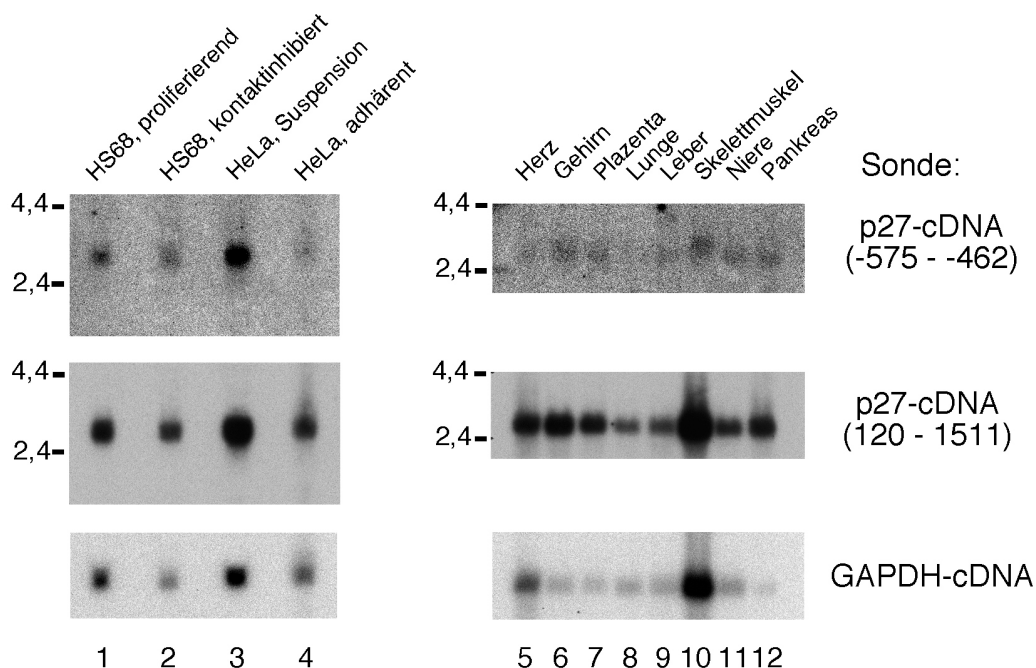


Abbildung 4.5: Das durch 5'RACE klonierte 5'-Ende der p27-mRNA ist in einer Vielzahl menschlicher Gewebe und Zelllinien nachweisbar

Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA (25 µg) aus Gewebekulturzellen (Spuren 1 bis 4) und Poly-A-RNA (2 µg) aus verschiedenen humanen Geweben (Spuren 5 bis 12). Die Blot-Membranen wurden nacheinander mit drei radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert: mit dem 5'-Ende der p27-cDNA (Nukleotidposition -575 bis -462), einem cDNA-Fragment aus dem Bereich der kodierenden und 3'-nichtkodierenden Region (Nukleotidposition 120 bis 1511) und einer GAPDH-cDNA (Ladkontrolle). Die Positionen von Standard-RNAs und ihre Größen in kb sind neben den Autoradiogrammen angegeben.

Mit den beiden Sonden wurden ähnliche Hybridisierungsmuster nachgewiesen: das weitaus stärkste Signal wurde mit der RNA aus HeLa-Suspensionszellen (Spur 3) erhalten, gefolgt von der Probe aus proliferierenden HS68-Zellen (Spur 1). Die schwächsten Signale lieferten jeweils die RNA-Proben aus kontaktinhibierten HS68-Zellen (Spur 2) und adhärennten HeLa-Zellen (Spur 4). Beide Sonden detektierten RNAs identischer Größe von etwa 2,5 bis 2,6 kb. Die Hybridisierung der RNA mit einer Sonde

gegen die GAPDH-mRNA (unten) und die Anfärbung der ribosomalen RNAs mit Metylenblau (ohne Abbildung) zeigten, daß die unterschiedlichen Signalintensitäten größtenteils Unterschiede in der Menge der aufgetragenen RNA widerspiegeln. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß die p27-mRNA mit der 575 Nukleotide langen 5'-untranslatierten Region in HeLa-Zellen wie auch in untransformierten humanen Zellen unter den genannten Wachstumsbedingungen gleichermaßen transkribiert wird.

Um eine mögliche gewebespezifische Längenvariation der p27-5'UTR zu untersuchen, wurde Poly-A-RNA verschiedener Gewebe mit den gleichen Sonden hybridisiert (Abbildung 4.5, Spuren 5 bis 12). Auch hier detektierten beide p27-cDNA-Sonden weitgehend identische Hybridisierungsmuster. In der Probe aus Skelettmuskulatur (Spur 10) wurde jedoch mit dem langen 3'-Fragment ein sehr starkes Signal detektiert. Im Vergleich dazu war das Signal, das mit dem kleinen 5'-Fragment detektiert wurde, relativ schwach und in den Bereich größerer Fragmentlängen verschoben. Zusammengefaßt wurde aus diesen Beobachtungen gefolgert, daß der Sequenzbereich -575 bis -562 in einer Reihe von Geweben als Teil der p27-5'UTR nachweisbar ist, daß aber eine spezifische Variation der Länge der p27-5'UTR in einzelnen Geweben nicht ausgeschlossen ist.

4.1.1.2 Die Länge der p27-5'UTR unterliegt keiner zellzyklus-abhängigen Variation

Bei der 5'-RACE-Klonierung wurden neben der 575 nt langen p27-5'UTR auch kürzere Fragmente variabler Länge detektiert (Tabelle 4.1). Ob es sich bei diesen Fragmenten um endogene oder exogene Abbauprodukte handelte, oder ob diese Fragmente unterschiedliche Transkriptionsstartstellen repräsentierten, konnte nicht entschieden werden. Dennoch ließ die Detektion von 5'UTR-Fragmenten unterschiedlicher Länge die Möglichkeit offen, daß die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsstartstellen oder ein 5'-terminaler Abbau der p27-mRNA die mechanistische Grundlage für die zellzyklusabhängige Regulation der p27-Translation sein könnte: Zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus könnten Transkripte unterschiedlicher Länge gebildet werden, die mit unterschiedlicher Effizienz translatiert würden. Diese Art der translationalen Regulation ist bereits für die Gene *mdm2* und *c-mos* beschrieben worden, die eine Rolle im Kontext von Zellproliferation bzw. Entwicklung spielen (Landers *et al.*, 1997; Steel *et al.*, 1996).

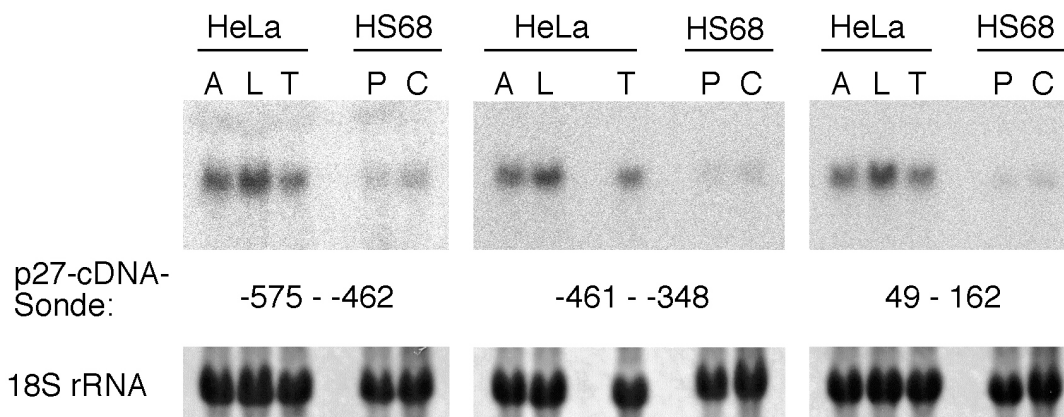


Abbildung 4.6: Northern-Blot-Analyse. Die p27-5'UTR zeigt keine zellzyklusabhängige Längenvariation

8 µg Gesamt-RNA aus asynchron proliferierenden (A), lovastatarretierten (L) und thymidinarretierten (T) HeLa-Zellen sowie aus proliferierenden (P) und kontaktinhibierten (C) HS68-Zellen wurden mit drei radioaktiv markierten cDNA-Sonden identischer Länge (114 nt) und mit ähnlichem Schmelzpunkt hybridisiert. Gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Expositionszeiten: 15 Tage (-575 - -462), vier Tage (-461 - -348) und zwei Tage (49 - 162). Die 18S rRNA wurde zur Kontrolle der geladenen RNA-Menge mit Methylblau angefärbt.

Um eine mögliche Längenvariation der p27-5'UTR in verschiedenen Zellzyklusstadien zu untersuchen, wurde eine weitere Northern-Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 4.6). Dabei wurde Gesamt-RNA aus asynchron proliferierenden (A), lovastatarretierten (L) und thymidinarretierten (T) adhären HeLa-Zellen, sowie aus asynchron proliferierenden (P) und kontaktinhibierten (C) Fibroblasten (HS68) untersucht. Es wurden drei verschiedene Sonden eingesetzt, die gegen unterschiedliche Bereiche der p27-mRNA gerichtet waren. Die erste Sonde umfaßte den Bereich von -575 bis -462 der p27-5'UTR (links). Die zweite Sonde umfaßte den Bereich von -462 bis -348 und schloß damit an die erste unmittelbar an (Mitte). Die dritte Sonde war gegen den Bereich 49 bis 162 des p27-ORFs gerichtet (rechts). Die Sonden wurden so gewählt, daß sie die gleiche Länge (114 bp) bei ähnlicher Schmelztemperatur ($83,4 \pm 1^\circ\text{C}$) und Markierungseffizienz aufwiesen. Die Ähnlichkeit der Sonden ermöglichte es, aus den von ihnen hervorgerufenen Signalen Schlüsse auf die relative Abundanz möglicher mRNA-Subpopulationen zu ziehen. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß keine Sekundärstrukturen mit der Hybridisierung der Sonden interferieren.

Um mit den drei Sonden etwa gleiche Schwärzungen des Röntgenfilms zu erhalten, waren sehr unterschiedliche Expositionszeiten von 15 Tagen (-575 - -462), vier Tagen (-461 - -348) und zwei Tagen (49 - 162) notwendig. Unter Berücksichtigung des

radioaktiven Zerfalls wurde daraus ein Verhältnis von 1:6:15 für die Mengen der jeweils detektierten RNAs berechnet. Damit bestätigte sich das Ergebnis der 5'RACE-Klonierung, wonach sich die p27-mRNA *in vitro* als Gemisch von Subpopulationen mit unterschiedlich langen 5'UTRs darstellt. Mit allen drei Sonden wurden jedoch identische Hybridisierungsmuster detektiert, d.h. es war keine Veränderung im Verhältnis der Intensitäten der einzelnen RNA-Banden und im Rahmen des Auflösungsvermögens der Methode keine Veränderung ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit festzustellen. Daraus wurde geschlossen, daß unter den getesteten Wachstumbedingungen keine wesentliche Verschiebung der Längen der p27-5'UTRs durch eine Verlagerung der Transkriptionsstartstelle oder durch 5'-terminalen Abbau der p27-mRNA stattfindet.

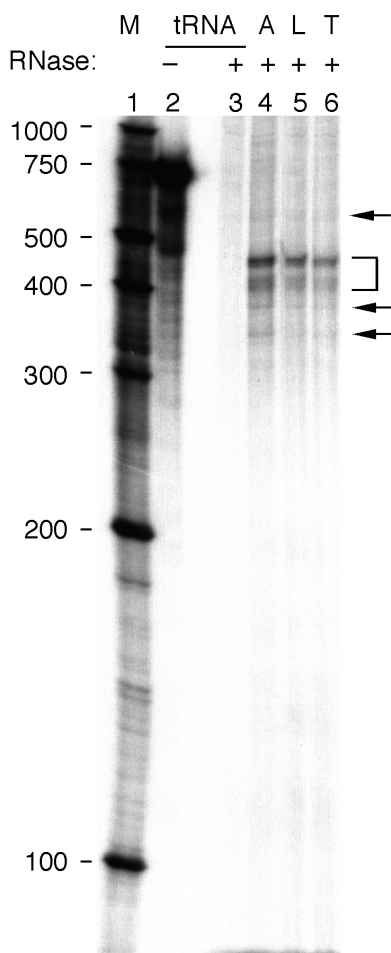


Abbildung 4.7: „RNase protection“. Die p27-5'UTR zeigt keine zellzyklusabhängige Längenvariation

Spuren 4 bis 6: 14 µg Gesamt-RNA aus asynchron proliferierenden (A), lovastatinarretierten (L) und thymidin-arretierten (T) HeLa-Zellen wurden mit einer radioaktiv markierten 681 nt langen Gegenstrang-RNA-Sonde hybridisiert, die komplementär zur p27-5'UTR-Region -3 bis -575 war. Die Ansätze wurden mit RNase behandelt und durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Geschützte, nicht abgebaute RNA wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spuren 2 und 3: Kontrollansätze mit je 14 µg Hefe-tRNA ohne RNase-Behandlung (Spur 2, intakte Sonde) und mit RNase-Behandlung (Spur 3, vollständig abgebaute Sonde). Spur 1: RNA-Standard, die Längen der Standard-RNAs sind in nt angegeben.

Um die relativen Häufigkeiten der verschieden langen p27-5'UTRs genauer zu untersuchen und auch kleinere Längenvariationen detektieren zu können, wurde eine „RNase protection“-Analyse durchgeführt (Abbildung 4.7). Dabei wurde Gesamt-RNA aus asynchron proliferierenden (A), lovastatinarretierten (L) und thymidin-arretierten (T) adhärenenten HeLa-Zellen mit einer intern markierten Gegenstrang-RNA-

Sonde hybridisiert, die zum p27-5'UTR-Bereich -3 bis -575 komplementär war. Nicht hybridisierte, überhängende Bereiche der RNA-Sonde wurden mit RNase-Behandlung abgebaut. Die verbliebenen, geschützten Fragmente der RNA-Sonde repräsentieren also p27-5'UTRs (Spuren 4 bis 6). Es wurden zwei Kontrollreaktionen mitgeführt, um die

Integrität der RNA-Sonde bzw. ihren vollständigen Abbau durch die RNasen zu überprüfen (Spuren 2 und 3). Dazu wurde die RNA-Sonde mit Hefe-tRNA, also mit nichtverwandter RNA, hybridisiert. Ein Ansatz wurde mit RNase behandelt, der andere einer Kontrollbehandlung ohne RNase unterzogen. Ohne Zugabe von RNase wurde die RNA-Sonde nahezu ausschließlich als intaktes 681 nt langes RNA-Molekül detektiert. Dies zeigte, daß die in den Spuren 4 bis 6 detektierten Signale nicht auf die Hybridisierung verkürzter RNA-Sonden zurückzuführen waren. In Gegenwart von RNase wurde die Sonde erwartungsgemäß nahezu vollständig abgebaut (Spur 3). Damit konnte weitgehend ausgeschlossen werden, daß die in den Spuren 4 bis 6 detektierten Signale auf einen unvollständigen Abbau nichthybridisierter RNA-Sonde oder eine Selbsthybridisierung der RNA-Sonde zurückzuführen waren. Die Ansätze mit Gesamt-RNA, sei es aus asynchronen, lovastatarretierten oder thymidinarretierten Hela-Zellen, lieferten ohne Unterschied ein Haupt-Cluster von Signalen im Längenbereich von etwa 470 bis etwa 400 nt (siehe Klammer), wobei das stärkste Signal bei etwa 470 nt detektiert wurde. Weitere sehr schwache Signale waren in allen drei Proben bei etwa 570, 380 und 340 nt zu erkennen (siehe Pfeile). Auch in der „RNase protection“-Analyse wurden also p27-5'UTRs unterschiedlicher Länge detektiert, wobei der Großteil der p27-5'UTRs eine Länge von 470 nt aufwies. Eine wachstumsabhängige Längenvariation wurde aber auch hier nicht detektiert.

4.1.1.3 Der kleine offene Leserahmen der p27-5'UTR inhibiert die Translation von p27 *in vitro* und wird selbst translatiert

Die 575 nt lange p27-5'UTR war bei der 5'RACE-Klonierung, in Northern-Blot- und „RNase protection“-Analysen als Teil einer Subpopulation von p27-mRNAs nachgewiesen worden. Sie diente daher als Grundlage für die weiteren Analysen der Translation von p27.

Eine interessante Eigenschaft dieser 5'UTR besteht in der Präsenz eines kleinen stromaufwärts gelegenen offenen Leserahmens (uORF). uORFs sind häufig in mRNAs von Genen zu finden, die eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen (Willis, 1999). Diese offenen Leserahmen können die Translation des stromabwärts gelegenen Haupt-ORFs beeinflussen, sofern ihr Startkodon vom ribosomalen 43S-Präinitiationskomplex während des Scanning-Prozesses erkannt wird (Morris und Geballe, 2000).

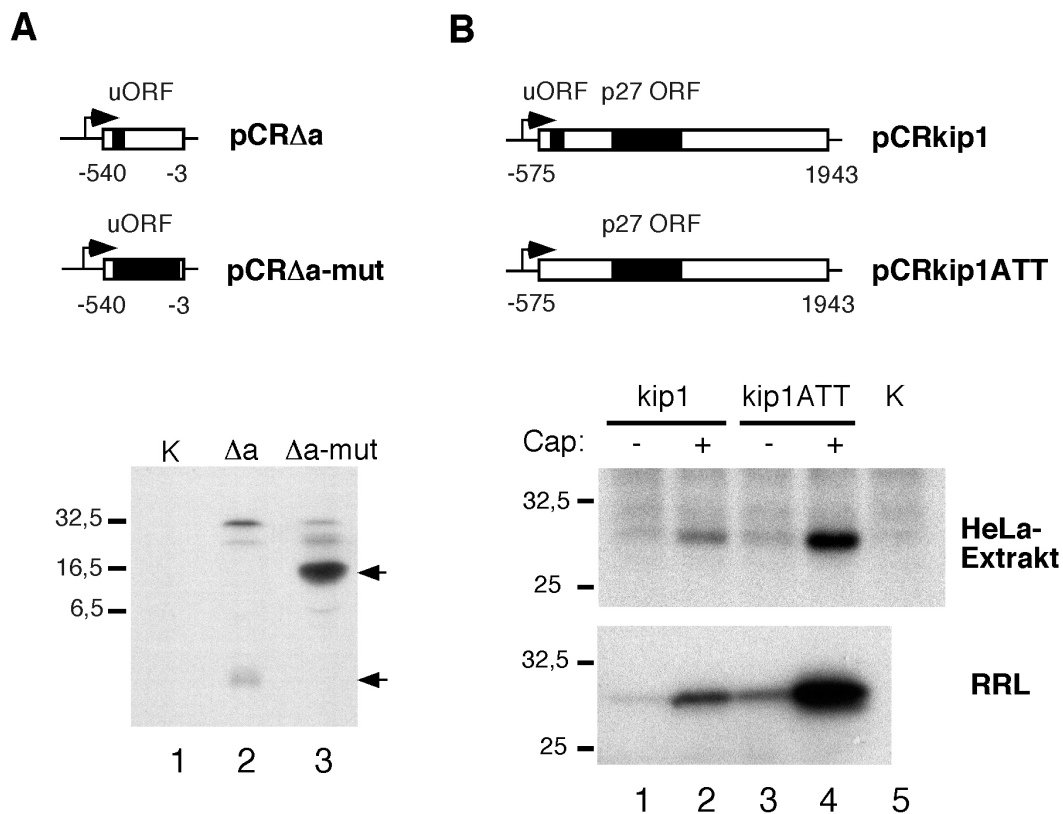


Abbildung 4.8: Der kleine offene Leserahmen (uORF) der p27-5'UTR inhibiert die Translation von p27 *in vitro* und wird selbst translatiert

(A) Der uORF der p27-5'UTR wird in Retikulozytenlysaten translatiert. Oben, schematische Darstellung der Plasmide, die durch eine gekoppelte Reaktion aus In-vitro-Transkription und In-Vitro-Translation in Gegenwart von [¹⁴C]Leucin untersucht wurden. pCRΔa enthält ein Fragment der p27-5'UTR mit dem unmutierten uORF, der für ein Peptid von 3,2 kDa mit 7 Leucinresten kodiert. pCRΔa-mut weist eine Leserastermutation auf, die zu einer Verlängerung des uORFs führt, der infolgedessen für ein Protein von 16,8 kDa mit 23 Leucinresten kodiert. Offene Leserahmen sind schwarz dargestellt. Die Transkriptionsstartstelle der SP6-RNA-Polymerase ist durch einen Pfeil markiert. Unten, Fluorographie der Translationsprodukte nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE. (K) Kontrollreaktion mit dem leeren Plasmid. Die Positionen spezifischer Translationsprodukte sind durch Pfeile markiert.

(B) Die In-Vitro-Translation von p27-mRNA ist Cap-abhängig und wird durch den uORF inhibiert. Oben, schematische Darstellung der Plasmide, die zur Generierung von p27-kodierenden Transkripten *in vitro* eingesetzt wurden. pCRkip1 besitzt die unmutierte p27-cDNA, pCRkipATT weist eine Punktmutation auf, die das Startkodon des uORFs eliminiert. Offene Leserahmen sind schwarz dargestellt. Die Transkriptionsstartstelle der SP6-RNA-Polymerase ist durch einen Pfeil markiert. Unten: Transkripte mit (+) und ohne (-) m⁷G-Cap wurden in Extrakten aus HeLa-Zellen und in Retikulozytenlysaten (RRL) in Gegenwart von [³⁵S]Methionin translatiert. p27 wurde aus den HeLa-Extrakten mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Translationsprodukte der Retikulozytenlysate wurden ohne vorherige Immunpräzipitation in gleicher Weise analysiert. (K) Kontrollreaktion ohne In-Vitro-Transkript. Die Positionen und Molekülmassen von Markerproteinen sind neben der Fluorographie in kDa angegeben.

Um der Frage nachzugehen, ob dem uORF der p27-mRNA eine regulatorische Funktion bei der Translation von p27 zukommen könnte, wurde zunächst untersucht, ob der uORF selbst translatiert werden kann (Abbildung 4.8A). Bei einer In-Vitro-Translation in Retikulozytenlysate mit einem Fragment der p27-5'UTR als Matrize wurde die

Synthese eines Peptids der erwarteten Größe von etwa 3 kDa festgestellt (Spur 2). Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde eine Leserastermutation in den uORF eingeführt, die zu einer Ausdehnung der kodierenden Region führte. Die Translation dieses Konstruktes führte zur Synthese eines Proteins mit dem erwarteten, größeren Molekulargewicht von etwa 17 kDa, das das kleine 3-kDa-Translationsprodukt der unmutierten 5'UTR ersetzte (Spur 3). Diese Beobachtungen zeigen, daß der uORF *in vitro* translatiert werden kann.

uORFs wirken sich oft inhibitorisch auf die Translation eines stromabwärts gelegenen offenen Leserahmens aus, indem sie das Scanning des 43S-Präinitiationskomplexes blockieren, bevor dieser das stromabwärts gelegene Startkodon erreichen kann. Um den Einfluß des uORFs auf die Translation von p27 zu untersuchen, wurde das Startkodon ATG des uORFs durch die Sequenz ATT ersetzt. Mutierte und unmutierte In-Vitro-Transkripte der p27-cDNA wurden in HeLa-Extrakten und Retikulozytenlysaten translatiert (Abbildung 4.8B). Die Eliminierung des Startkodons führte in beiden Systemen zu einer signifikanten Zunahme der Synthese von p27, unabhängig davon, ob Transkripte mit oder ohne 7-Methylguanosin-Kappe (m^7G -Cap) eingesetzt wurden (vgl. Spur 1 mit 3 und Spur 2 mit 4). Dies zeigte, daß der uORF die Translation von p27 *in vitro* inhibiert. Die Gegenwart der Cap-Struktur erhöhte die p27-Translation um das drei- bis vierfache (vgl. Spur 1 mit 2 und Spur 3 mit 4). Daraus wurde gefolgert, daß die Initiation der Translation von p27 unter diesen In-Vitro-Bedingungen in erster Linie durch Cap-abhängiges Scanning erfolgte.

4.1.1.4 Die p27-5'UTR enthält ein cis-wirkendes Element zur zellzyklusabhängigen Regulation der Translation

Um zu untersuchen, ob die untranslatierten Regionen der p27-mRNA an der translationalen Regulation von p27 *in vivo* beteiligt sind, wurden Reporterstudien an arretierten HeLa-Zellen durchgeführt. Zur Herstellung geeigneter Plasmide wurde die p27-5'UTR stromaufwärts und/oder die p27-3'UTR stromabwärts des Luziferase-ORFs von pGL3 Control eingefügt (Abbildung 4.9A). Nach der Transfektion der Plasmide wurden die Zellen entweder asynchron weiter kultiviert oder durch Lovastatin in der G₁-Phase bzw. durch Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus arretiert.

Nach 24 h wurden die Luziferaseaktivitäten in den unterschiedlich behandelten Zellen gemessen und miteinander verglichen (Abbildung 4.9B). Die 5'UTR bewirkte eine 2,4fache Zunahme der Luziferaseaktivität in lovastatarretierten Zellen (L) im Vergleich zu thymidinarretierten Zellen (T). Im Vergleich zu asynchronen Zellen (A) war die Zunahme 2,1fach. In Gegenwart der 3'UTR allein wurde keine signifikante zellzyklusabhängige Regulation beobachtet. Die Kombination beider untranslatierter Regionen verstärkte die Regulation, die durch die 5'UTR allein bewirkt wurde, nicht. Die 3'UTR bewirkte jedoch jeweils eine generelle Reduktion der Reporterexpression.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die p27-5'UTR die beobachtete Regulation durch veränderte Transkriptionsraten oder mRNA-Stabilitäten verursachte, wurden die Reporter-mRNA-Level des Leervektors und des Plasmids mit der p27-5'UTR durch Northern-Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 4.9C, rechts). Die Luziferaseaktivitäten wurden auf die ermittelten Reporter-mRNA-Mengen abgeglichen (links). Die Zunahme der Luziferaseaktivität nach Lovastatin-Behandlung in Gegenwart der 5'UTR blieb von dieser Korrektur im wesentlichen unverändert (vgl. Abbildung 4.10B und C). Daraus wurde gefolgert, daß die p27-5'UTR die Translationseffizienz der Reporter-mRNA in einer Weise beeinflußt, die der translationalen Regulation des endogenen p27 im Verlauf des Zellzyklus gleichkommt.

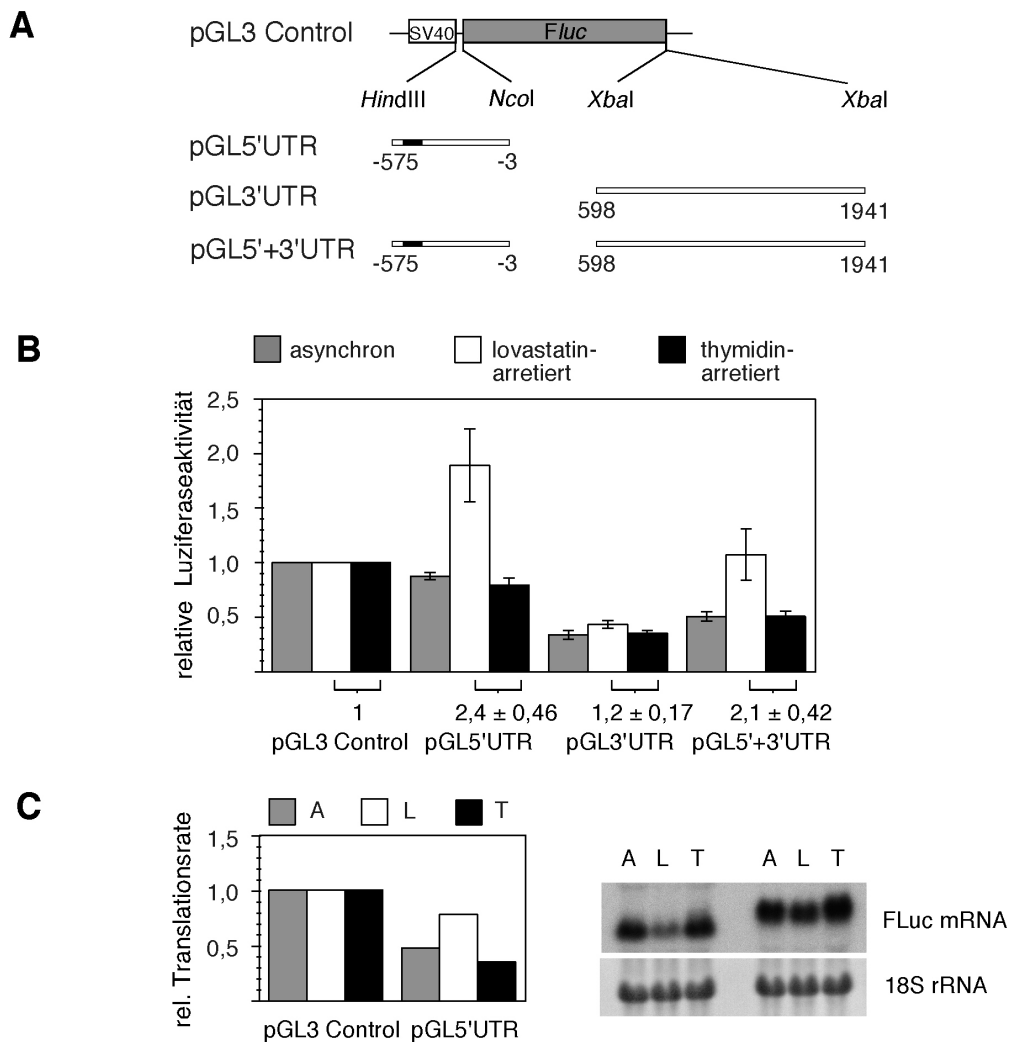


Abbildung 4.9: Die p27-5'UTR ist Vermittler zellzyklusabhängiger Translationskontrolle

(A) Schematische Darstellung der Reporterplasmide pGL3 Control, pGL5'UTR, pGL3'UTR und pGL5'+3'UTR. Der SV40-Promotor ist als weißes, der offene Leserahmen des Leuchtkäferluziferase-Gens als graues und der p27-uORF als schwarzes Kästchen dargestellt. Die Plasmide wurden zusammen mit pSV-B-Gal, das als Transfektionskontrolle diente, in HeLa-Zellen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen entweder asynchron weiterkultiviert oder durch Lovastatin in der G₁-Phase bzw. durch Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus arretiert.

(B) Relative Luziferaseaktivitäten in asynchronen, lovastatarretierten und thymidin-arretierten Zellen. Die Luziferaseaktivitäten wurden auf β -Galaktosidaseaktivitäten normalisiert, und die mit pGL3 Control erhaltenen Werte wurden gleich eins gesetzt. Das Verhältnis der Luziferaseaktivitäten in lovastatarretierten und thymidin-arretierten Zellen ist für jedes Plasmid unter dem Diagramm angegeben. Die Abbildung gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten wieder.

(C) Relative Translationseffizienz von Reporter-mRNAs in asynchronen, lovastatarretierten und thymidin-arretierten Zellen. HeLa-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben mit pGL3 Control bzw. pGL5'UTR transfiziert und arretiert. Luziferaseaktivitäten wurden auf Reporter-mRNA Mengen abgeglichen, und die mit pGL3 Control erhaltenen Werte wurden gleich eins gesetzt (links). Luziferase-mRNA wurde durch Northern-Blot-Analyse quantifiziert (rechts): Gesamt-RNA (7 μ g) asynchroner (A), lovastatarretierter (L) oder thymidin-arretierter (T) Transfektanden wurde mit einer Sonde für die kodierende Region der Luziferase-mRNA (Fluc-mRNA) hybridisiert. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurde die ribosomale 18S rRNA mit Methyleneblau angefärbt.

4.1.1.5 Die Funktion des uORFs bei der Kontrolle der zellzyklusabhängigen Translation

Nachdem festgestellt worden war, daß die p27-5'UTR die Translation eines stromabwärts gelegenen offenen Leserahmens *in vivo* zellzyklusabhängig beeinflussen kann, stellte sich die Frage nach der mechanistischen Grundlage dieser Regulation. Es war zuvor beschrieben worden, daß uORFs essentiell für die translationale Regulation eines Gens sein können, und daß dabei die Position, die Länge und die Sequenz des uORFs eine Rolle spielen können (Geballe und Sachs, 2000). Es war daher naheliegend, eine spezifische Rolle des p27-uORFs bei der regulierten Translation der Reporter-mRNA anzunehmen.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die p27-5'UTR in Reporter-gen-Analysen mit einer Reihe von Punktmutanten verglichen, bei denen die Struktur des uORFs verändert war (Abbildung 4.10A). Bei der Mutante „ATT“ wurde das Startkodon durch die Sequenz ATT ersetzt und der uORF damit eliminiert. Im Vergleich zum Wildtyp reduzierte diese Mutation die Reportertranslation in lovastatarretierten Zellen und erhöhte sie in asynchronen und thymidinarretierten Zellen (Abbildung 4.10B). Die zellzyklusabhängige Translationskontrolle wurde dadurch um etwa 50% reduziert (Abbildung 4.10C). Dies deutete an, daß der uORF die zellzyklusabhängige Translationskontrolle verstärkt.

Zwei weitere Mutanten sollten Aufschluß darüber geben, ob die Länge oder die Position des uORFs oder die Sequenz des kodierten Peptids für die Verstärkung der Translationskontrolle von Bedeutung sind. Die Mutante „ATT/ATG“ wurde aus der ATT-Mutante hergestellt, indem ein Startkodon 33 Nukleotide stromabwärts von dem ursprünglichen Startkodon wiedereingeführt wurde. Dieser verkürzte uORF führte zu einer im Vergleich zum Wildtyp verminderten Reporter-genexpression und stellte insbesondere die ursprüngliche Regulation der Wildtyp-5'UTR nicht wieder her (Abbildung 4.10B und -C). Daraus wurde geschlossen, daß die bloße Präsenz eines uORFs in diesem Szenario nicht ausreicht, um einen Beitrag zur Translationskontrolle zu leisten, und daß möglicherweise die richtige Position des Startkodons für die regulatorische Funktion des uORFs essentiell ist.

Bei der dritten Mutante „prestop“ führte eine Leserastermutation innerhalb des dritten Kodons zur Termination des uORFs nach acht Kodons. In dieser Mutante waren nur die ersten beiden Kodons konserviert (Abbildung 4.10A). Sie verhielt sich praktisch

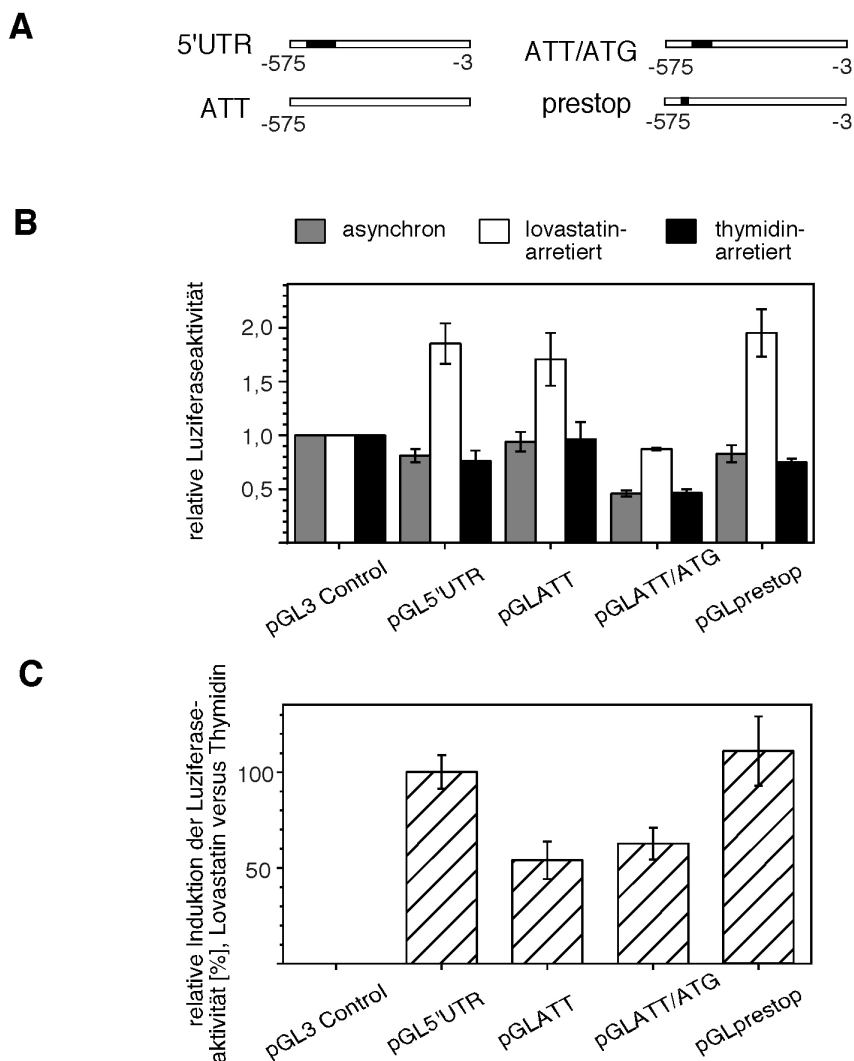


Abbildung 4.10: Das Startkodon des uORFs verstärkt die zellzyklusabhängige Regulation der Translation

(A) Schematische Darstellung der Wildtyp-p27-5'UTR und mutierter Fragmente. uORFs sind als schwarze Kästchen dargestellt. Die Fragmente wurden 5'-wärts der kodierenden Region für Leuchtkäferluziferase von pGL3 Control eingefügt und wie für Abbildung 4.9 beschrieben analysiert.

(B) Relative Luziferaseaktivitäten. Die Luziferaseaktivitäten wurden auf β -Galaktosidasaktivitäten abgeglichen, und die mit dem Leervektor erhaltenen Werte wurden gleich eins gesetzt. Die Abbildung gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten wieder. Jedes Fragment wurde mindestens dreimal getestet.

(C) Induktion der Luziferaseexpression in lovastatinarrestierten Zellen im Vergleich zu thymidin-arrestierten Zellen. Die Werte wurden aus den in (B) dargestellten Daten berechnet. Die mit der vollständigen 5'UTR gemessene Induktion wurde gleich 100% gesetzt. Die Vektorkontrolle entspricht 0%.

identisch zur unmutierten 5'UTR (Abbildung 4.10B und -C). Diese Beobachtung deutete darauf hin, daß die genaue Sequenz und die Länge des kodierten Peptids für die potentielle Funktion des uORFs nicht essentiell sind.

Insgesamt zeigen diese Experimente, daß die Mutation ATG \rightarrow ATT die zellzyklusabhängige Translationskontrolle vermindert. Der uORF wurde durch diese

Mutation eliminiert, möglicherweise wurde aber auch die Struktur der RNA oder die Bindestelle eines potentiellen trans-wirkenden Faktors beeinträchtigt. Es kann daher nicht entschieden werden, ob die Eliminierung des uORFs ursächlich für die Verminderung der Translationskontrolle war oder ob diese auf andere Weise durch die eingeführte Mutation gestört wurde.

4.1.1.6 Ein 114 Nukleotide langes Element innerhalb der p27-5'UTR, das „cell cycle responsive element“ (CCRE), ist ausreichend für die zellzyklusabhängige Regulation der Translation

Reporter-Gen-Analysen an arretierten HeLa-Zellen hatten gezeigt, daß die 5'UTR von p27 Translation zellzyklusabhängig regulieren kann. Weiterhin deutete die Untersuchung von Punktmutationen in der Nähe des 5'-Endes der 5'UTR darauf hin, daß dieser Bereich für die Regulation von Bedeutung sein könnte. Zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung regulatorischer Elemente innerhalb der 5'UTR wurde eine Serie von Deletionsmutanten hergestellt (Abbildung 4.11A). Analog zu den oben beschriebenen Experimenten, wurden die Luziferaseaktivitäten in lovastatarretierten, thymidinarretierten und asynchronen Zellen gemessen und miteinander verglichen (Abbildung 4.11B und -C). Northern-Blot-Analysen bestätigten, daß die beobachtete zellzyklusabhängige Regulation der Luziferaseaktivität nicht auf veränderte Reporter-mRNA-Mengen zurückzuführen waren (ohne Abbildung).

Die vollständige 5'UTR bewirkte im Durchschnitt eine 2,4fache Verstärkung der Reportertranslation in lovastatarretierten Zellen gegenüber thymidinarretierten Zellen (Abbildung 4.11B). Ausgedehnte Deletionen am 3'-Ende der 5'UTR führten zu keiner oder nur zu einer geringfügigen Beeinträchtigung dieser zellzyklusabhängigen Translationsregulation ($\Delta 4$ bis $\Delta 1$). Selbst das kürzeste 5'-Fragment ($\Delta 1$) mit einer Länge von 114 Nukleotiden zeigte eine regulierte Reporterinduktion nach Lovastatarrest (Abbildung 4.11B und -C). Daraus wurde gefolgert, daß diese Region ausreichend ist, die Translation von p27 in lovastatarretierten Zellen zu verstärken. Sie wurde daher als „cell cycle responsive element“ (CCRE) bezeichnet.

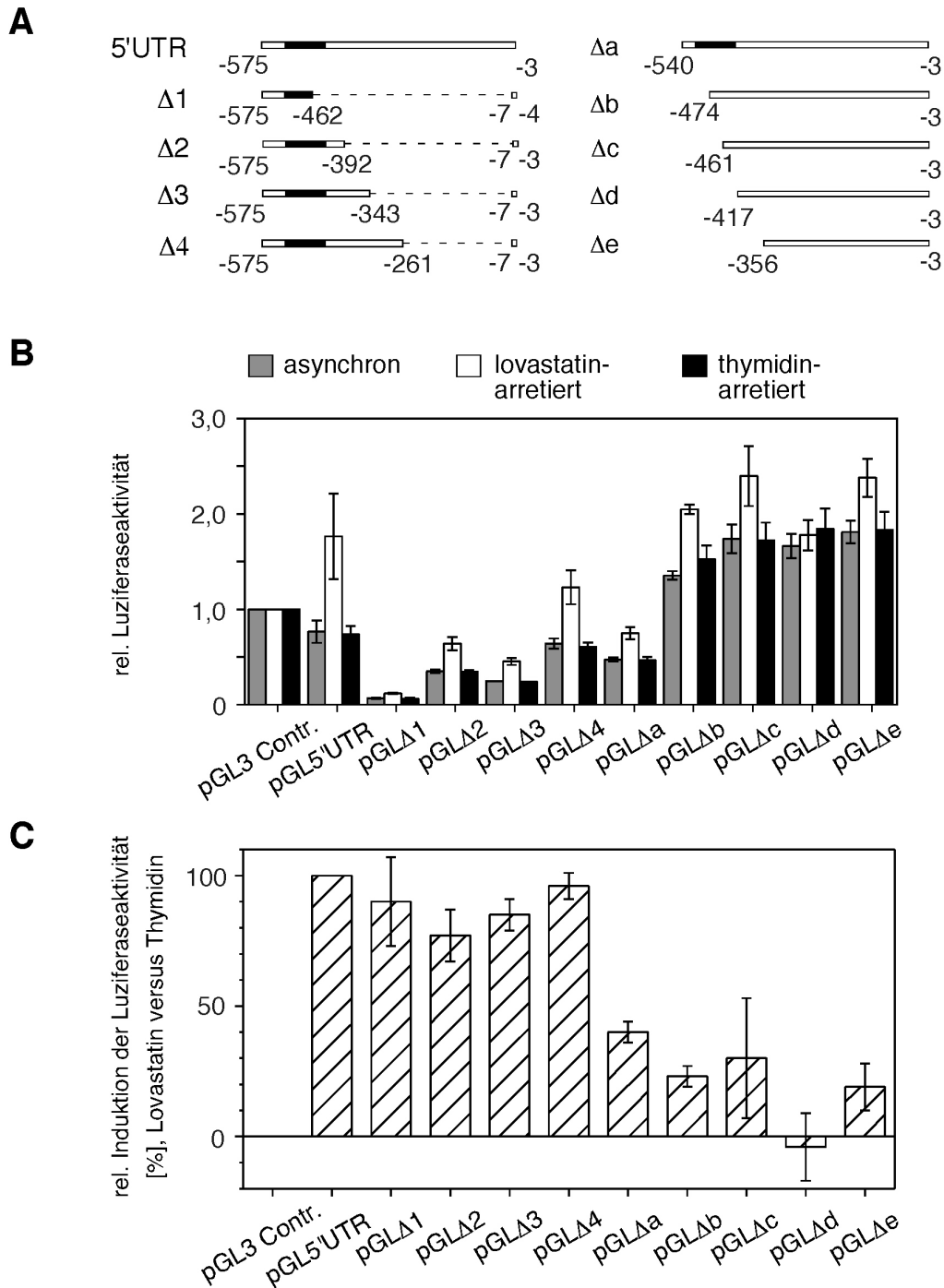


Abbildung 4.11: Deletionsanalyse der p27-5'UTR

(A) Schematische Darstellung der untersuchten p27-5'UTR-Fragmente. 3'-Deletionen sind mit Nummern (links), 5'-Deletionen mit Buchstaben (rechts) bezeichnet. Der uORF ist als schwarzes Kästchen dargestellt.

(B) Relative Luziferaseaktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die unter (A) dargestellten Fragmente wurden 5'-wärts des ORFs für Leuchtkäferluziferase von pGL3 Control eingefügt und wie für Abbildung 4.9 beschrieben analysiert. Jedes Fragment wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten getestet.

(C) Induktion der Luziferaseexpression in lovastatinarrestierten Zellen im Vergleich zu thymidin-arrestierten Zellen. Die Werte wurden aus den in (B) dargestellten Daten berechnet. Die mit der vollständigen 5'UTR gemessene Induktion wurde gleich 100% gesetzt. Die Vektorkontrolle entspricht 0%.

Das CCRE enthält lediglich den 5'-Bereich des uORFs und weiterhin eine auffallend G/C-reiche Sequenz, die eine stabile Haarnadelstruktur bilden kann ($\Delta G = -23$ kcal/mol; Abbildung 4.12). Diese Struktur befindet sich zwischen den Positionen -566 und -536, also 5'-wärts vom kleinen offenen Leserahmen, und könnte möglicherweise eine Rolle bei der Translationsregulation spielen.

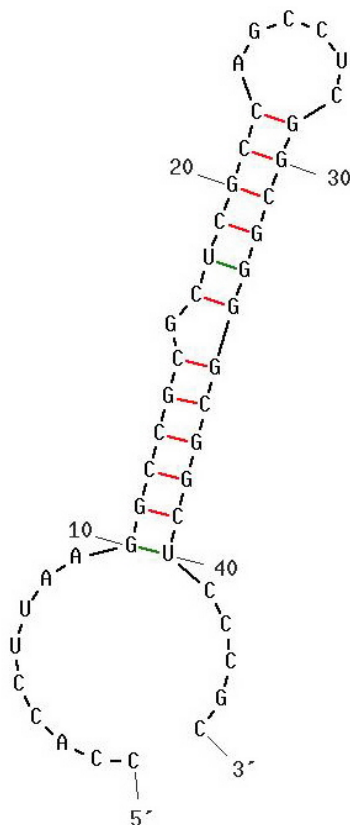


Abbildung 4.12: Eine G/C-reiche Haarnadelstruktur in der Nähe des 5'-Endes der p27-mRNA

Der Sequenzbereich der ersten 50 Nucleotide der p27-mRNA wurden mit Hilfe des Programms mfold 3.1 einer Strukturvorhersage unterzogen (Zuker *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1999). Als Faltungsbedingung wurde eine Salzkonzentration von 1 M NaCl bei 37°C eingesetzt. Standard-Basenpaare sind in Rot, „Wobble“-Basenpaare in Grün dargestellt.

Das CCRE reduzierte die Reportertranslation in asynchronen Zellen im Vergleich zum Leervektor auf weniger als ein Zehntel (Abbildung 4.11B, $\Delta 1$). Diese Inhibition wurde bei 5'-Fragmenten steigender Größe nach und nach reduziert (Abbildung 4.11B, $\Delta 2$ bis $\Delta 4$).

Kleine Deletionen am 5'-Ende der 5'UTR (35 bis 158 Nucleotide, Δa bis Δd) verminderten die zellzyklusabhängige Translationskontrolle und hoben sie schließlich vollständig auf. Bereits das Fragment

Δa , das den vollständigen uORF nicht jedoch die erwähnte G/C-reiche Sequenz enthält, zeigte eine um etwa 60 % verminderte Zellzyklusantwort (Abbildung 4.11 C). Dies bestätigte die Beobachtung, daß die bloße Präsenz eines uORFs für eine effiziente zellzyklusabhängige Regulation nicht ausreichend ist, und wurde als Hinweis gewertet, daß multiple Bereiche des CCRE an dem Regulationsmechanismus beteiligt sein müssen.

4.1.1.7 Eine interne Ribosomenbindestelle in der p27-5'UTR

Das CCRE führte zu einer starken Inhibition der Reportertranslation, und diese Inhibition wurde durch stromabwärts gelegene Bereiche der 5'UTR teilweise neutralisiert (Abbildung 4.11B). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, daß sich in dieser Region eine interne Ribosomenbindestelle (internal ribosomal entry site, IRES) befinden könnte. Solche Elemente erlauben Ribosomen, unabhängig von der 7-Methylguanosin-Kappe an mRNA zu binden und damit stromaufwärts gelegene Elemente, wie RNA-Sekundärstrukturen oder uORFs, die das ribosomale Scanning inhibieren, zu umgehen.

Um eine mögliche IRES nachzuweisen, wurde das bicistronische Reporterplasmid pRF (Coldwell *et al.*, 2000; Stoneley *et al.*, 1998) eingesetzt. 3'-Fragmente der p27-5'UTR, beginnend bei den Nukleotidpositionen -461, -417 und -356, wurden zwischen das stromaufwärts gelegene Cistron der *Renilla-reniformis*-Luziferase und das stromabwärts gelegene Cistron der Leuchtkäferluziferase eingefügt (Abbildung 4.13A). Alle Fragmente steigerten die Expression der Leuchtkäferluziferase um mehr als das 20fache (Abbildung 4.13B, oben), während die Expression der *Renilla*-Luziferase im wesentlichen unbeeinflusst blieb (Abbildung 4.13B, unten). Diese Beobachtung deutete darauf hin, daß sich innerhalb des kleinsten, 356 Nukleotide langen Fragmentes eine IRES befinden könnte.

Die Zunahme der Expression des 3'-wärts gelegenen Luziferase-Cistrons könnte aber auch auf andere Ursachen zurückzuführen sein. So könnte die eingefügte Sequenz dazu führen, daß Ribosomen nach der Translation des ersten ORFs die Translation an dem stromabwärts gelegenen Startkodon verstärkt reinitiiieren. Daneben besteht die Möglichkeit, daß durch alternatives Spleißen, durch endonukleolytische Spaltung der ursprünglich bicistronischen RNA oder durch eine interne Promotoraktivität monocistronische Leuchtkäferluziferase-mRNA gebildet wird.

Um auszuschließen, daß die Reinitiation von Ribosomen stromabwärts des *Renilla*-Luziferase-ORFs zur Expression der Leuchtkäferluziferase beiträgt, wurde ein zweites bicistronisches Plasmid verwendet. Dieses Plasmid weist stromaufwärts des *Renilla*-Luziferase-ORFs ein Palindrom auf (Abbildung 4.13A). Das Palindrom führt zur Bildung einer stabilen RNA-Sekundärstruktur, die das ribosomale Scanning inhibiert und dadurch die Translation der *Renilla*-Luziferase vermindert (Coldwell *et al.*, 2000; Stoneley *et al.*, 1998).

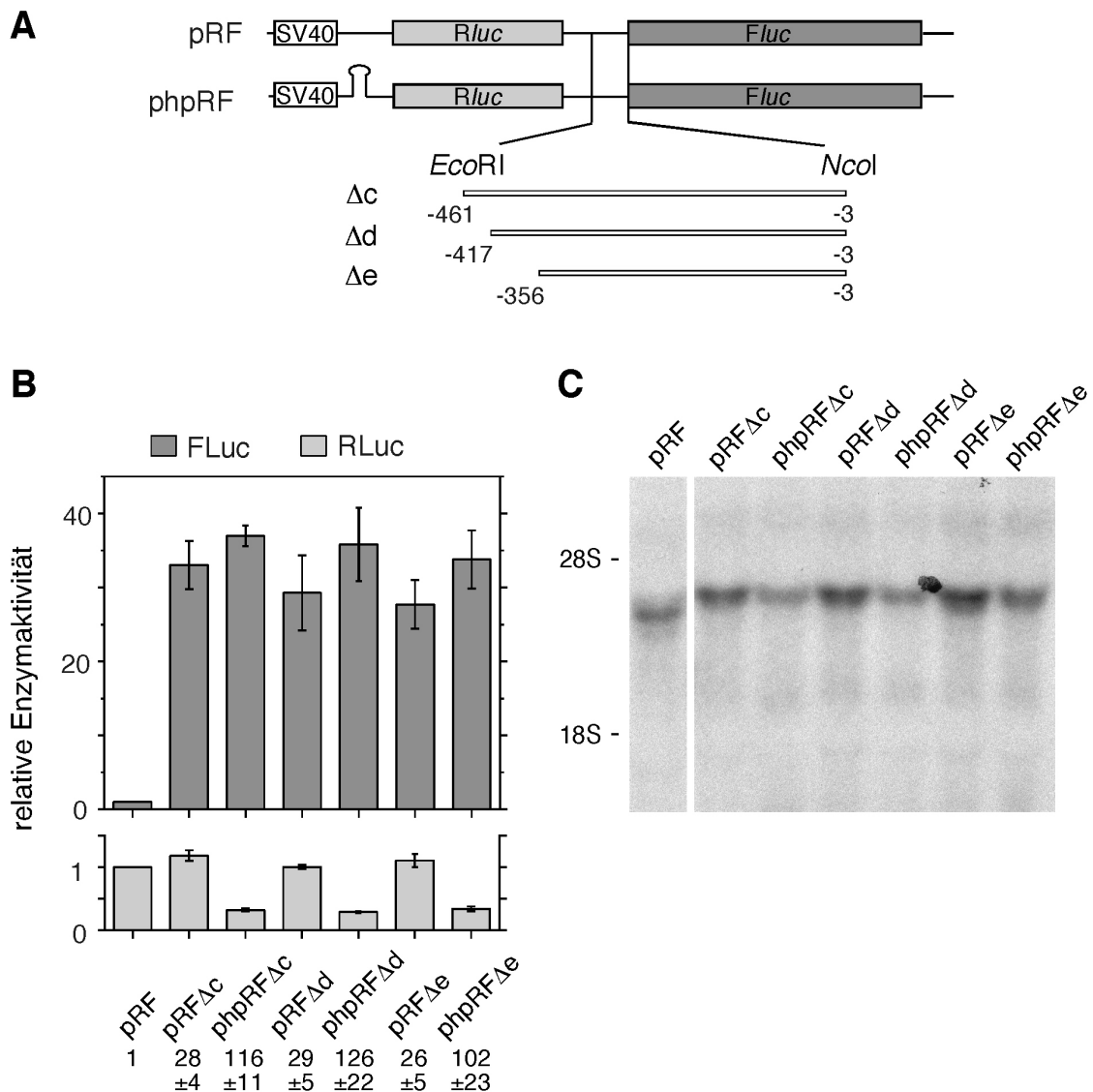


Abbildung 4.13: Eine interne Ribosomenbindestelle in der p27-5'UTR

(A) Schematische Darstellung der untersuchten bicistronischen Plasmide. Die Fragmente Δc, Δd und Δe der p27-5'UTR wurden in die intercistronische Region von pRF und phpRF einligiert. Der SV40-Promotor ist als farbloses Kästchen, die für *Renilla*-Luziferase kodierende Region (*Rluc*) als hellgraues Kästchen, und die für Leuchtkäferluziferase kodierende Region (*Fluc*) als dunkelgraues Kästchen dargestellt. phpRF enthält eine palindrome Sequenz 5'-wärts von *Rluc*, die zur Bildung einer stabilen RNA-Sekundärstruktur führt und dadurch die Cap-abhängige Translation inhibiert.

(B) Relative Aktivitäten der *Renilla*-Luziferase und der Leuchtkäferluziferase. HeLa-Zellen wurden mit den in (A) dargestellten bicistronischen Reporterplasmiden und pSV-B-Gal (Transfektionskontrolle) transfiziert. *Renilla*- und Leuchtkäferluziferaseaktivitäten wurden auf die β-Galaktosidaseaktivität normalisiert. Die für pRF gemessenen Werte wurden gleich eins gesetzt. Das Verhältnis zwischen der *Renilla*- und der Leuchtkäferluziferaseaktivität ist für jedes Plasmid unter dem Diagramm angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

(C) Northern-Blot-Analyse der bicistronischen mRNA. Gesamt-RNA (7 μg) der mit den angegebenen Plasmiden transfizierten HeLa-Zellen wurde mit einer Sonde für die kodierende Region des Leuchtkäferluziferasegens hybridisiert. Die Positionen der ribosomalen 18S und 28S RNAs sind angegeben.

Sollte die Synthese der Leuchtkäferluziferase auf die Reinitiation von Ribosomen zurückzuführen sein, so wäre zu erwarten, daß die RNA-Sekundärstruktur die Expression der Leuchtkäferluziferase in gleichem Umfang reduziert wie die der *Renilla*-Luziferase. Wie aus Abbildung 4.13B hervorgeht, beeinträchtigte die RNA-Sekundärstruktur jedoch nur die Expression der *Renilla*-Luziferase. Die Induktion der Leuchtkäferluziferase durch die p27-5'UTR-Fragmente wurde nicht beeinträchtigt, sondern sogar etwas verstärkt. Diese Beobachtung schloß Reinitiation als zugrundeliegenden Mechanismus aus.

Ein Vergleich monocistronischer und bicistronischer Transkripte in diesem experimentellen Ansatz zeigte, daß Leuchtkäferluziferase von ersteren mit vier- bis fünffach höherer Effizienz translatiert wurde (ohne Abbildung). Daher hätten geringe Mengen monocistronischer mRNA signifikant zur Expression der Leuchtkäferluziferase beitragen können. Bei Northern-Blot-Analysen mit einer Sonde für den ORF der Leuchtkäferluziferase wurde jedoch neben dem Signal der bicistronischen RNA keine weitere Bande detektiert (Abbildung 4.13C). Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, daß die Translation des stromabwärts gelegenen Cistrons für Leuchtkäferluziferase an intakter bicistronischer RNA initiiert wurde. Zusammengenommen stellten diese Ergebnisse einen starken Hinweis auf eine IRES-Aktivität innerhalb der 356 Nukleotide langen Sequenz stromaufwärts des p27-ORFs dar.

Die Stärke dieser Bona-Fide-IRES ist vergleichbar mit der anderer, kürzlich beschriebener IRES-Elemente, die mit identischen Vektoren in HeLa-Zellen untersucht wurden. So stimuliert die HRV(human rhinovirus)-IRES die Expression der Leuchtkäferluziferase etwa um den Faktor 10 (Coldwell *et al.*, 2000). Mit der IRES von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) wurde eine 10- bis 20fache, mit der *c-myc*-IRES eine 50-fache Stimulation beobachtet (Coldwell *et al.*, 2000).

4.1.1.8 Die p27-IRES verhindert die Repression der Translation von p27 durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002

Die Experimente mit bicistronischen Reporterplasmiden deuteten auf eine IRES in der p27-5'UTR hin. Dieser Befund sollte in einem zweiten experimentellen System überprüft werden. Dazu wurde folgende Überlegung angestellt: Die Inaktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges führt zur Hypophosphorylierung von eIF4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) und hat dadurch die generelle Inhibition der Cap-abhängigen Translation zur Folge. Eine IRES in der p27-5'UTR sollte die Translation von p27 unempfindlich gegenüber der Inaktivierung dieses Signalweges machen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HeLa-Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 behandelt und eingehend untersucht.

Wie die Immunoblotanalyse von Gesamtzellsaten (Abbildung 4.14A, rechts) zeigte, war die Menge des endogenen p27 in LY294002-behandelten Zellen (LY) im Vergleich zur Kontrolle (K) leicht erhöht. Zur Überprüfung der p27-mRNA-Level wurde eine Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA durchgeführt (Abbildung 4.14A, links). Die Menge der p27-mRNA (oben) blieb nach Behandlung mit LY294002 im Vergleich zur GAPDH-mRNA unverändert (unten) bzw. nahm im Vergleich zur ribosomalen RNA leicht ab (Mitte). Dies bedeutete, daß der Anstieg der p27-Menge auf posttranskriptionelle Mechanismen zurückzuführen sein mußte, also auf eine erhöhte Translationsrate der p27-mRNA und/oder eine erhöhte Stabilität des p27-Proteins. Die Behandlung der Zellen mit LY294002 änderte die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nicht (Abbildung 4.14B). Daraus wurde geschlossen, daß die Zunahme der p27 Proteinmenge nicht durch eine Arretierung der Zellen in der G₁-Phase verursacht wurde, sondern in direktem Zusammenhang mit der Inhibition der PI3-Kinase stand.

Um zu untersuchen, in welchem Umfang LY294002 die Synthese bzw. die Stabilität von p27 beeinflußt, wurde eine „Pulse-chase“-Markierung durchgeführt. HeLa Zellen wurden in Gegenwart des Inhibitors oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel kurz mit [³⁵S]Methionin und [³⁵S]Cystein radioaktiv markiert (Pulse) und anschließend mit einem Überschuß nicht radioaktiver Aminosäuren weiterkultiviert (Chase). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Pulsmarkierung geerntet.

Radioaktiv markiertes p27 wurde mittels Immunpräzipitation aus den Extrakten isoliert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Abbildung 4.14C).

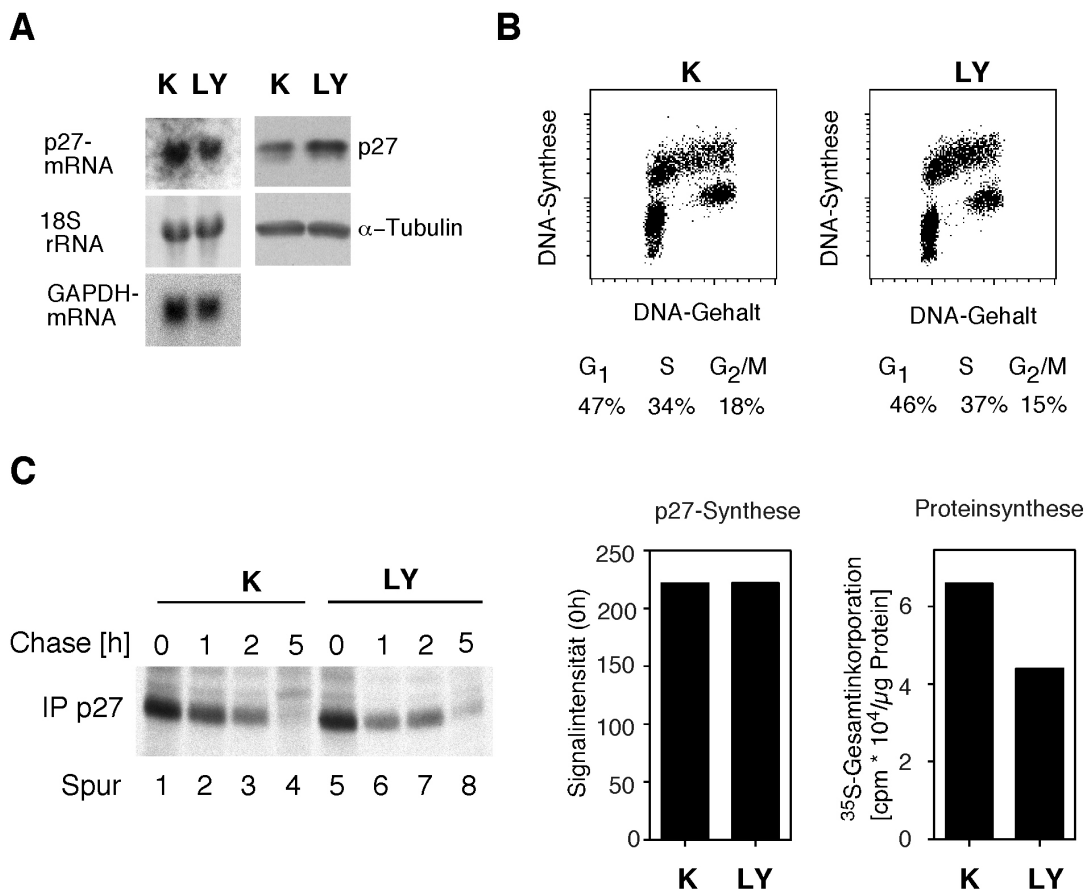


Abbildung 4.14: Die Translation von p27-mRNA wird durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 nicht beeinträchtigt

(A) Einfluß von LY294002 auf endogene p27- und p27-mRNA-Mengen. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit LY294002 (LY) oder dem Lösungsmittel Ethanol (K) behandelt. mRNA wurde durch Northern-Blot-Analyse (links) von Gesamt-RNA (7µg) mit Sonden für p27-mRNA und GAPDH-mRNA untersucht. Die ribosomale 18S RNA wurde zur Kontrolle der geladenen RNA-Menge mit Methyleneblau angefärbt. Protein-Mengen wurden durch Western-Blot-Analyse (rechts) von Gesamtlisaten mit monoklonalen Antikörpern gegen p27 und α -Tubulin (Ladekontrolle) bestimmt.

(B) FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung von HeLa-Zellen 24 h nach Zugabe von LY294002 (LY) bzw. Lösungsmittel (K). Die Zellen wurden 30 min lang mit 5-Brom-2'-desoxyuridin markiert, fixiert, mit einem FITC-konjugierten anti-BrdU Antikörper und mit Propidiumjodid angefärbt und anschließend mittels Durchflußzytofluorimetrie untersucht. Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus ist unter den Diagrammen angegeben.

(C) Synthese und Stabilität von p27 in Gegenwart von LY294002. 23 Stunden nach Zugabe von LY294002 (LY) bzw. Lösungsmittel (K) wurden die Zellen eine Stunde lang in Medium ohne Methionin und Cystein gehalten und anschließend eine Stunde lang mit [³⁵S]Methionin und [³⁵S]Cystein markiert. Danach wurden nicht radioaktives Methionin und Cystein im Überschuß zugegeben und für die angegebenen Zeitspannen auf den Zellen belassen (Chase). Zellextrakte wurden präpariert und jeweils ein Aliquot (gleiche Proteinmengen) einer Hitzedenaturierung unterzogen. p27 wurde aus den Überständen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Inkorporation von Radioaktivität in p27 nach der Pulsmarkierung wurde mit Hilfe eines PhosphorImagers quantifiziert (linkes Diagramm). Die Gesamtinkorporation von Radioaktivität wurde durch TCA-Präzipitation und Szintillationsmessung bestimmt (rechtes Diagramm).

Die Quantifizierung der radioaktiven p27-Banden zeigte, daß LY294002 die Syntheserate von p27 in HeLa-Zellen nicht beeinflusste (Spuren 1 und 5 sowie linkes Diagramm). Daneben wurde keine wesentliche Veränderung der Halbwertszeit von p27 festgestellt (vgl. Spuren 2 bis 4 und 6 bis 8). Im Gegensatz zur Synthese von p27 wurde die Gesamtproteinsynthese durch LY294002 um etwa ein Drittel vermindert (Abbildung 4.14C, rechtes Diagramm).

Diese Beobachtungen führten zu der Schlußfolgerung, daß die Translation von p27 bei einer generellen Inhibition der Cap-abhängigen Translation durch den PI3-Kinaseinhibitor LY294002 nicht beeinträchtigt wird und daß dies zum Anstieg der endogenen p27-Menge beiträgt.

Als nächstes wurde untersucht, ob die beobachtete Resistenz der p27-Translation gegenüber der Inaktivierung der PI3-Kinase auf die p27-IRES zurückzuführen ist. Dazu wurden Reporterexperimente mit LY294002 behandelten HeLa-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, welchen Einfluß LY294002 unter den hier angewandten Bedingungen auf die allgemeine Proteinsynthese hat. Dazu wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des Inhibitors mit [³⁵S]Methionin pulsmarkiert. Im Unterschied zu dem in Abbildung 4.15C beschriebenen „Pulse-chase“-Experiment wurden hier nichtradioaktives Methionin und Cystein während der Markierung im Medium belassen, um negative Effekte der Aminosäuredepletion auf das Zellwachstum auszuschließen. Zwei Stunden nach Zugabe des Inhibitors war die Proteinsyntheserate auf etwa 50% des Vergleichswertes un behandelter Zellen abgesunken und blieb für weitere 22 Stunden etwa konstant (Abbildung 4.15A). Wurden Zellen mit monocistronischen Reporterplasmiden transfiziert und anschließend für 24 h mit LY294002 behandelt, nahm die auf mRNA-Mengen bezogene Reporteraktivität bei der Vektorkontrolle und dem Fragment Δ1 um etwa 50% ab (Abbildung 4.15B). Bei den Konstrukten, die die p27-5'UTR oder das Fragment Δd enthielten, wurden die Meßwerte durch LY294002 nicht beeinflusst. Daraus wurde geschlossen, daß der 3'-Bereich der p27-5'UTR die Inhibition der Translation durch LY294002 aufheben kann. Diese Beobachtung wurde als zusätzlicher Hinweis für die Präsenz einer IRES in diesem Bereich der p27-5'UTR angesehen.

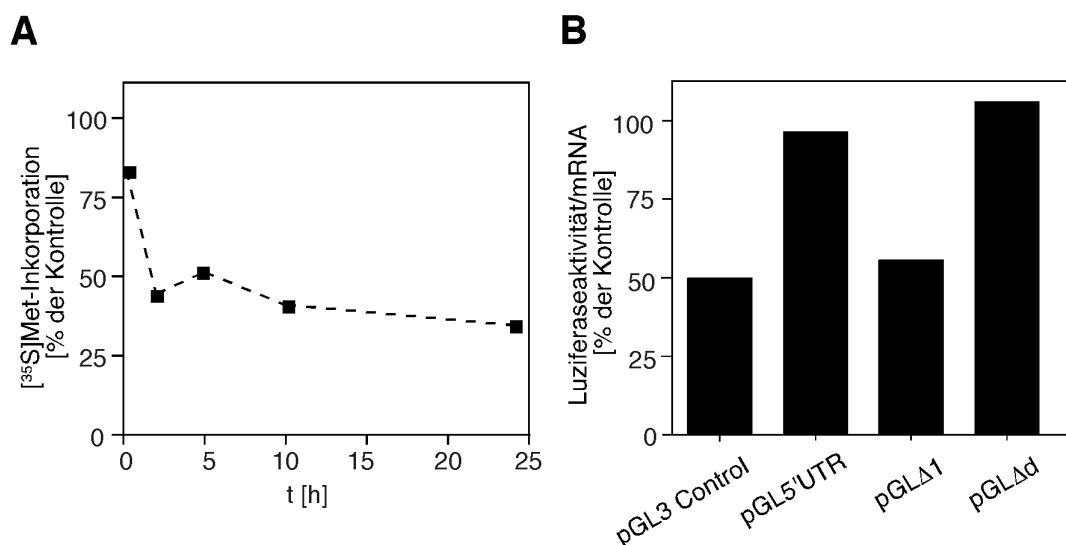


Abbildung 4.15: Der 3'-Bereich der p27-5'UTR hebt die durch LY294002 hervorgerufene Inhibition der Translation auf

(A) Proteinsyntheseraten von HeLa-Zellen nach Zugabe des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002. 10 min, 2h, 5h und 24 h nach Zugabe von LY294002 wurden die Zellen für 30 min mit [³⁵S]Methionin markiert. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch TCA-Präzipitation und Szintillationsmessung bestimmt. Der Einbau von Radioaktivität in Zellen, die mit LY294002 behandelt wurden, ist als Prozentsatz des Einbaus in Kontrollzellen angegeben.

(B) Einfluß von LY294002 auf die Translation von monocistronischen Reporter-mRNAs, die p27-5'UTR-Fragmente enthalten. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Luziferasereporterplasmiden (vgl. Abbildung 4.11A) transfiziert und für 24 h in Gegenwart von LY294002 oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel (Ethanol) kultiviert. Die Luziferaseaktivitäten wurden auf die durch Northern-Blot-Analyse bestimmten Mengen an Luziferase-RNA abgeglichen.

4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung CCRE-RNA-bindender Proteine

Durch Reportergergestudien an arretierten HeLa-Zellen konnte ein regulatorisches Element in der 5'-untranslatierten Region der p27-mRNA eingegrenzt werden, das für die zellzyklusabhängige translationale Kontrolle von p27 ausreichend ist. Es wurde deshalb als „cell cycle responsive element“ (CCRE) bezeichnet. Dieser Bereich befindet sich am 5'-Ende der p27-mRNA und umfaßt 114 Nukleotide.

Grundsätzlich können mRNA-Elemente die Translation der mRNA, auf der sie liegen, durch ihre Sekundärstruktur oder durch die Bindung eines zusätzlichen Faktors, meist eines Proteins, beeinflussen. Beide Möglichkeiten sind auch für das CCRE denkbar. Ziel war es deshalb, mittels Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA Proteine zu reinigen, die an dieses Element binden können.

4.1.2.1 Reinigung und Identifizierung zytosolischer Proteine durch Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA

Da translationale Regulation vornehmlich im Zytosol stattfindet, erschien es sinnvoll, für die Reinigung zytosolischen Zellextrakt als Ausgangsmaterial einzusetzen. Zur Anreicherung RNA-bindender Proteine wurde zunächst eine Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose durchgeführt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen Salzgradienten von 100 bis 600 mM KCl. Um die Fraktionen zu ermitteln, in denen sich Proteine mit hoher Affinität für das CCRE befanden, wurden Protein-RNA-Bindungstests (UV-Crosslink, Northwestern-Hybridisierung) mit Aliquots der Säulenfraktionen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Hauptbindeaktivitäten in die Fraktionen zwischen 300 und 400 mM KCl eluiert worden waren (ohne Abbildung). Diese Fraktionen wurden vereinigt und auf eine Salzkonzentration von 200 mM KCl verdünnt. Mit den vereinigten Fraktionen wurde eine Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA durchgeführt. Zur Präparation der RNA-Affinitätssäule wurde in-vitro-transkribierte CCRE-RNA an CNBr-Sepharose gekoppelt. Die Gelmatrix wurde mit den vereinigten Fraktionen des ersten Reinigungsschritts inkubiert und anschließend mit dem Auftragspuffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem Stufengradienten steigender KCl-Konzentration. Aliquots der Säulenfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die enthaltenen Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 4.16A).

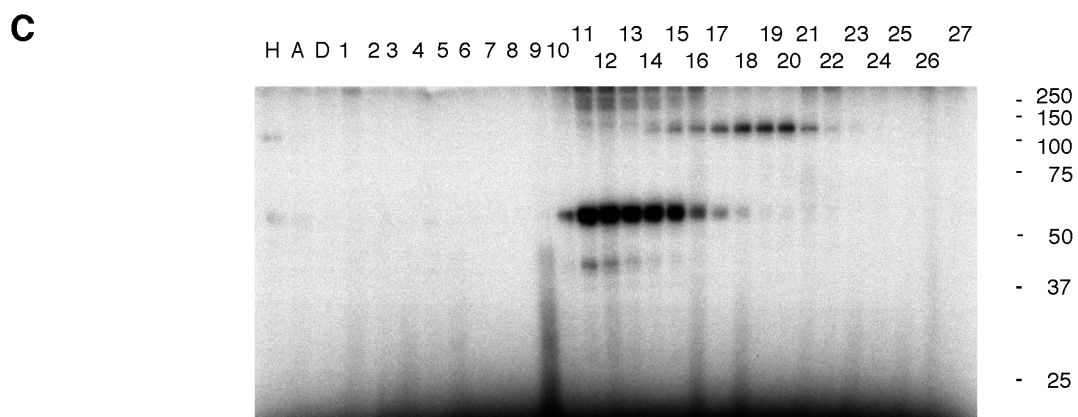
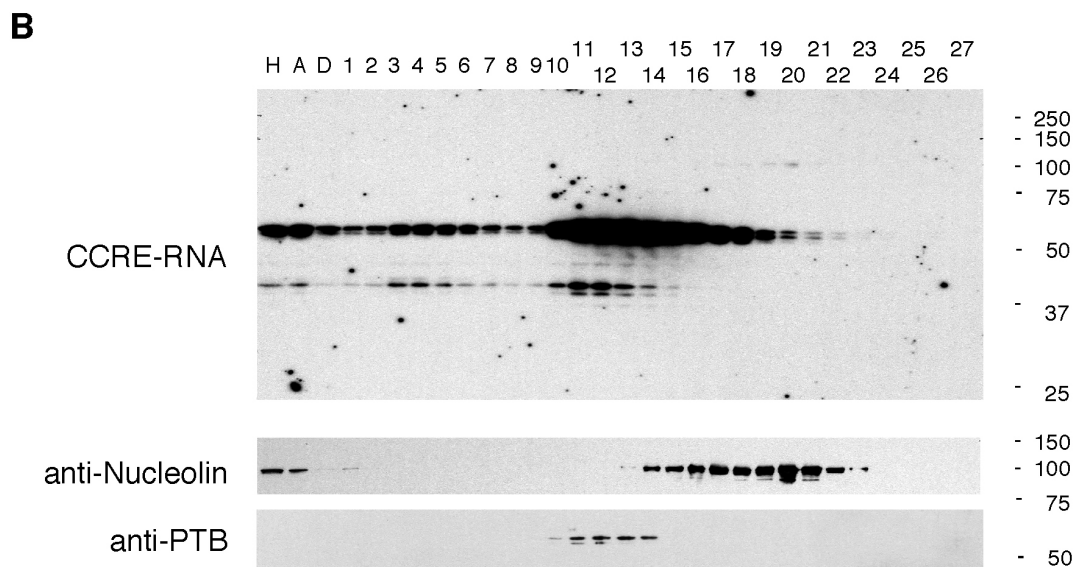
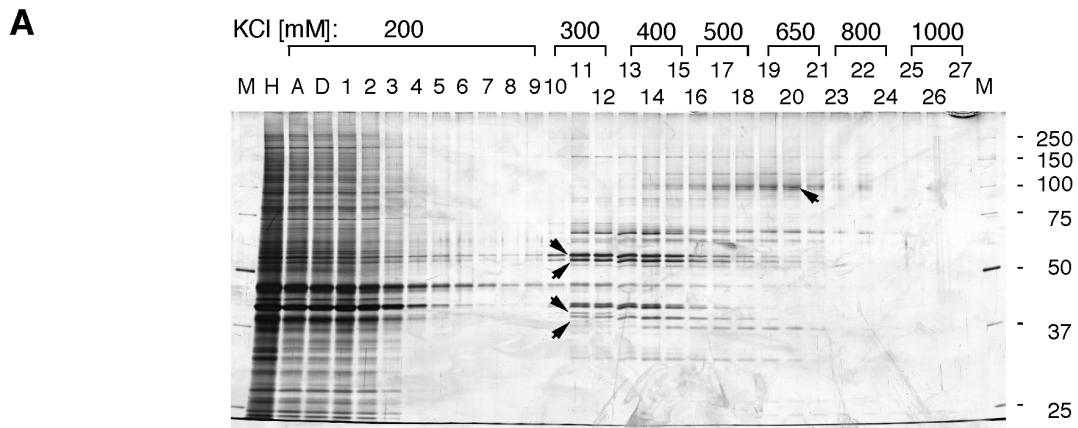
Abbildung 4.16: Affinitätsreinigung und Identifizierung CCRE-RNA-bindender Proteine

Zytosolischer HeLa-Zellextrakt wurde an Heparin-Sepharose vorgereinigt, auf eine Salzkonzentration von 200 mM KCl verdünnt und anschließend einer Affinitätschromatographie an Sepharose-gebundener CCRE-RNA unterzogen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen Stufengradienten steigender KCl-Konzentration.

(A) Gelelektrophoretische Untersuchung der Säulenfraktionen. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung analysiert. H, Eluat der Heparin-Sepharose-Chromatographie; A, Säulenauftrag, entspricht „H“ nach 1:2 Verdünnung; D, Säulendurchlauf; 1 bis 27, Wasch- bzw. Eluatfraktionen; M, Molekulargewichtsstandard. Die KCl-Konzentrationen der Fraktionen sind über der Abbildung, die Molekülmassen der Standardproteine in kDa neben der Abbildung angegeben.

(B) Northwestern- und Immunoblotanalyse der Säulenfraktionen. Aliquots der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Die Benennung der Proben entspricht der für Abbildung 4.16A beschriebenen. Oben: Autoradiographie einer Northwestern-Hybridisierung mit radioaktiv markierter CCRE-RNA. Mitte: Immunoblot mit einem monoklonalen anti-Nucleolin Antikörper. Unten: Immunoblot mit einem monoklonalen anti-PTB Antikörper.

(C) UV-Crosslink der Säulenfraktionen mit radioaktiv markierter CCRE-RNA. Aliquots der Fraktionen wurden mit radioaktiv markierter CCRE-RNA inkubiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht quervernetzt. Freie RNA wurde durch Behandlung mit RNase abgebaut. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Benennung der Proben entspricht der für Abbildung 4.16A beschriebenen.



Es zeigte sich, daß unter den eingesetzten Bedingungen eine überschaubare Anzahl unterschiedlicher Proteine an die Säulenmatrix gebunden und bei erhöhter KCl-Konzentration eluiert worden war. Der Großteil der durch Silberfärbung detektierten Proteine konnte in der Abteilung von Prof. Lottspeich (MPI für Biochemie) durch

Proteinsequenzierung oder Massenspektrometrie identifiziert werden. Tabelle 4.2 zeigt eine Zusammenstellung der identifizierten Proteine und ihrer apparenten Molekulargewichte.

Um die Wechselwirkung der eluierten Proteine mit der CCRE-RNA unter stringenteren Bedingungen zu überprüfen, wurden wiederum RNA-Protein-Bindungsversuche durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der Proteinfractionen durch SDS-PAGE aufgetrennt, durch Elektrottransfer auf eine Membran überführt und mit radioaktiv markierter CCRE-RNA inkubiert (Abbildung 4.16B, oben). Durch diese Northwestern-Hybridisierung wurde es möglich, RNA-Bindeaktivitäten mit Proteinbanden des Silbergels zu korrelieren und damit zu identifizieren (siehe Pfeile in Abbildung 4.16A). Im Northwestern-Blot wurden im wesentlichen drei RNA-Bindeaktivitäten detektiert. Eine Doppelbande bei etwa 55 kDa und eine weitere Doppelbande bei etwa 40 kDa, die beide bei einer Salzkonzentration von 300 bis 400 mM KCl eluiert wurden. Ein weiteres Signal wurde auf Höhe der 100-kDa-Markerbande mit einem Elutionsmaximum bei etwa 650 mM KCl detektiert. Aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihres Elutionsverhaltens konnten die Signale bei 55 kDa einer Doppelbande von Proteinen zugeordnet werden, die als Isoformen des „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB) identifiziert wurden. PTB ist ein RNA-bindendes Protein, das in erster Linie als Regulator alternativer Spleißprozesse beschrieben wurde (Wagner und Garcia-Blanco, 2001). In gleicher Weise korrelierte die 100-kDa-Bindeaktivität mit einer Proteinbande, die als Nucleolin identifiziert wurde. Nucleolin ist ebenfalls ein RNA-bindendes Protein, das hauptsächlich im Nucleolus vorkommt, und hier an der Biogenese und Reifung der Ribosomen beteiligt ist (Srivastava und Pollard, 1999). Um diese Zuordnungen zu überprüfen, wurde die Blot-Membran einer Immunodetektion mit anti-PTB Antikörpern und anti-Nucleolin Antikörpern unterzogen. Die durch Immunodetektion erhaltenen Signale stimmten mit den nach Northwestern-Hybridisierung detektierten Signalen überein (Abbildung 4.16B, Mitte und unten). Diese Beobachtung bestätigte, daß es sich bei der 55-kDa-Bindeaktivität um PTB, bei der 100 kDa-Bindeaktivität um Nucleolin handelte. Die 40-kDa-Bindeaktivität konnte ebenfalls einer Proteindoppelbande zugeordnet werden, deren „peptide mass fingerprint“ jedoch mit keinem Datenbankeintrag übereinstimmte. Möglicherweise wird die andauernde Verbesserung der Massenspektrometrie-Datenbanken bald eine Identifizierung des Proteins ermöglichen. Für eine aminoternale Sequenzierung tryptischer Proteine reichte die Proteinmenge dieser Doppelbande nicht aus.

Als weitere Möglichkeit die Wechselwirkung der eluierten Proteine mit der CCRE-RNA zu überprüfen, wurden UV-Crosslink-Experimente durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß beide Bindungspartner frei in Lösung vorliegen. Dazu wurden die Proteinfractionen mit radioaktiv markierter CCRE-RNA inkubiert und Protein-RNA-Kontakte durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent quervernetzt. Nach einer Behandlung mit RNasen zum Abbau ungebundener RNA wurden die Proben durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Abbildung 4.16C). Wiederum wurden im wesentlichen drei Bindeaktivitäten detektiert, die in ihrem Elutionsverhalten und ihrer elektrophoretischen Mobilität sehr gut mit den durch Northwestern-Hybridisierung detektierten Signalen bei 40, 55 und 100 kDa übereinstimmten. Die leichte Verschiebung der Signale hin zu einem höheren apparenten Molekulargewicht kam wahrscheinlich durch die gebundene RNA zustande. Daraus wurde geschlossen, daß die durch UV-Crosslink detektierten Bindeaktivitäten oberhalb der 50 bzw. 100 kDa-Markerbanden mit PTB bzw. Nucleolin identisch sind.

MW	Protein	Accession (NCBI Protein Sequence Database)
250 000	myosin heavy chain, nonmuscle type A (NMMHC-A)	P35579
150 000	high density lipoprotein binding protein (Vigilin)	Q00341
100 000	nucleolin (protein C23)	P19338
80 000	protein kinase C theta Type oder beta-I/II Type	Q04759, P05771, P05127
65 000	RRM RNA binding protein with glycine, arginine and tyrosine-rich C-terminus (Gry-rbp)	AAC12926
54 000 52 000	polypyrimidine tract binding protein, (PTB) Isoformen	S23015
45 000	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha-1)	P04720
41 000 38 000	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (hnRNP D), Isoformen	BAA09523
30 000	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1)	BAA05719

Tabelle 4.2: Proteine, die im Eluat der Affinitätschromatographie an immobilisierter CCRE-RNA identifiziert werden konnten.

Die beiden Bindeaktivitäten bei 50 kDa und 100 kDa wurden auch detektiert, wenn unfraktioniertes Zytosol mit CCRE-RNA UV-quervernetzt wurde (Abbildung 4.17, Spur 1). Durch Immunpräzipitation mit einem anti-PTB Antikörper konnte bestätigt werden, daß es sich bei der Bindeaktivität mit dem kleineren Molekulargewicht um PTB handelte (Abbildung 4.17, Spur 3). Für Nucleolin stand bisher kein präzipitierender Antikörper zur Verfügung.

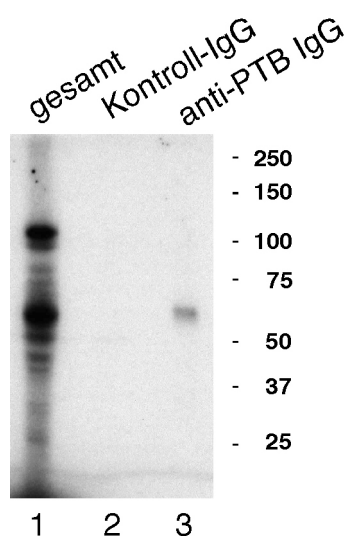


Abbildung 4.17: CCRE-RNA bindet an PTB in zytosolischem HeLa-Zellextrakt

Zytosolischer Extrakt aus HeLa-Zellen und radioaktiv markierte CCRE-RNA wurden wie für Abbildung 4.16C beschrieben durch UV-Licht quervernetzt. Ein Drittel des Ansatzes wurde direkt durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert (gesamt), der Rest zu gleichen Teilen für eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-PTB IgG bzw. einem monoklonalen Kontroll-Antikörper (Kontroll-IgG) eingesetzt. Die Präzipitate wurden wie die Gesamtreaktion analysiert. Die Molekülmassen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

4.1.2.2 PTB und Nucleolin binden spezifisch an CCRE-RNA

Um die Spezifität der Bindung von PTB und Nucleolin an die CCRE-RNA weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, inwiefern die UV-Quervernetzung der beiden Proteine mit radioaktiv markierter CCRE-RNA durch einen molaren Überschuß unmarkierter homologer bzw. heterologer RNA kompetiert werden kann. Zunächst wurden diese Versuche mit unfraktioniertem Zytosol durchgeführt (Abbildung 4.18).

Durch einen 500fachen molaren Überschuß der unmarkierten homologen CCRE-RNA konnte die Bindung von PTB an die RNA-Sonde um etwa die Hälfte reduziert werden (Abbildung 4.18, vgl. Spuren 1 und 5). Bei dem gleichen molaren Überschuß der heterologen RNA (gapdh) war hingegen keine signifikante Abnahme des Crosslink-Signals zu beobachten (vgl. Spuren 1 und 9). Daraus wurde gefolgert, daß die Bindung von PTB an CCRE-RNA in zytosolischem Extrakt durch einen hohen molaren Überschuß an homologer RNA spezifisch kompetiert wird. Im Gegensatz dazu wurde

die Bindung von Nucleolin an die RNA-Sonde durch die Zugabe von unmarkierter CCRE-RNA deutlich verstärkt (vgl. Spur 1 und Spuren 2 bis 5), während die Zugabe des heterologen Kompetitors keinen signifikanten Einfluß auf die Stärke des Signals hatte (vgl. Spur 1 und Spuren 6 bis 9).

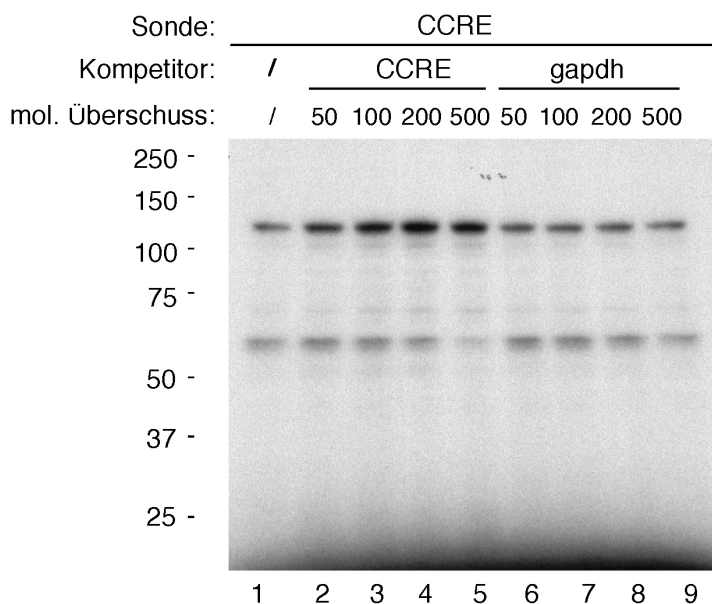


Abbildung 4.18: Die Bindung von PTB an CCRE-RNA in zytosolischem HeLa-Zell-extrakt ist durch einen hohen molaren Überschuss unmarkierter homologer RNA kompetierbar. HeLa-Zytosol wurde mit radioaktiv markierter CCRE-RNA und den angegebenen molaren Überschüssen unmarkierter homologer (CCRE) bzw. heterologer Kompetitor-RNA (gapdh) inkubiert und durch UV-Licht quervernetzt. RNA-Protein-Komplexe wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Molekülmassen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

Um ihre Wechselwirkung mit der CCRE-RNA unter definierten Bedingungen untersuchen zu können, wurden PTB und ein N-terminal verkürztes Fragment von Nucleolin (Nuc-p50) als Fusionsproteine mit einem Hexahistidin-Tag in *E. coli* exprimiert. Im Gegensatz zu PTB kann unverkürztes Nucleolin in Bakterien nicht erfolgreich exprimiert werden. Das N-terminal verkürzte Fragment besitzt jedoch die vollständige RNA-Bindedomäne und damit die gleichen RNA-Bindeeigenschaften wie das vollständige Protein (Serin *et al.*, 1997). Abbildung 4.19 zeigt einen Überblick über die Reinigung der beiden Proteine.

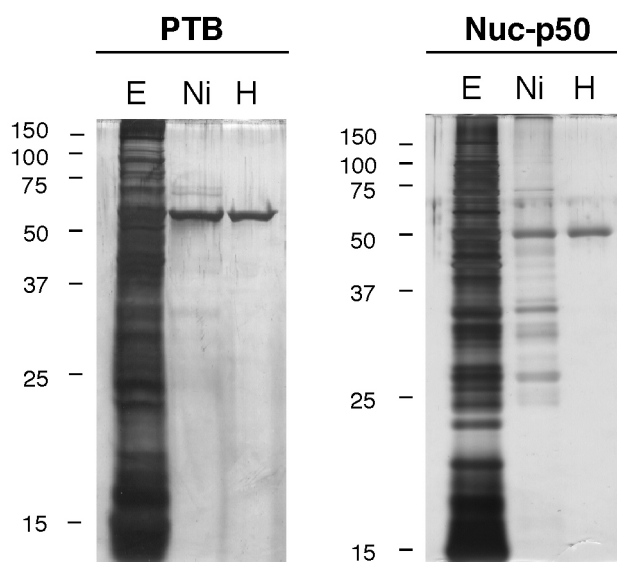


Abbildung 4.19: Bakterielle Expression und Reinigung von PTB und N-terminal verkürztem Nucleolin. PTB und das C-terminale Fragment Nuc-p50 von Nucleolin wurden als Fusionsproteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz in *E. coli* exprimiert und an Nickel-NTA-Agarose und Heparin-Sepharose gereinigt. E, Bakterienlysat (5 µg Protein); Ni, Eluat der Chromatographie an Nickel-NTA-Agarose (0,5 µg Protein); H, Eluat der Chromatographie an Heparin-Sepharose (0,5 µg Protein).

Analog zu den Versuchen mit unfraktioniertem Zytosol wurden mit den gereinigten Proteinen RNA-Crosslink-Experimente durchgeführt (Abbildung 4.20). Wie endogenes PTB wurde das rekombinante Protein mit der CCRE-RNA quervernetzt (Spur 1). Diese Quervernetzung wurde durch einen 50 bzw. 100fachen molaren Überschuß unmarkierter homologer RNA nahezu vollständig aufgehoben (Spuren 2 und 3), während entsprechende Mengen heterologer RNA nur zu einer schwachen Inhibition führten (Spuren 4 und 5). Demnach bindet auch rekombinantes PTB spezifisch an CCRE-RNA. Für Nuc-p50 wurde erst nach Zugabe homologer, unmarkierter Kompetitor-RNA eine Interaktion mit der CCRE-Sonde festgestellt (Spuren 7 und 8). Ohne Kompetitor-RNA und in Gegenwart des heterologen Kompetitors wurden hingegen keine Crosslink-Signale detektiert (Spuren 6, 9 und 10). Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Konkurrenzexperimenten mit zytosolischem Extrakt, nahm hier die Wechselwirkung von Nucleolin mit der RNA-Sonde mit steigender Konzentration unmarkierter homologer RNA zu. Aufgrund der Abwesenheit anderer RNA-bindender Proteine kann gefolgert werden, daß die Affinität von Nucleolin zu CCRE-RNA mit steigender Konzentration dieses Liganden zunimmt.

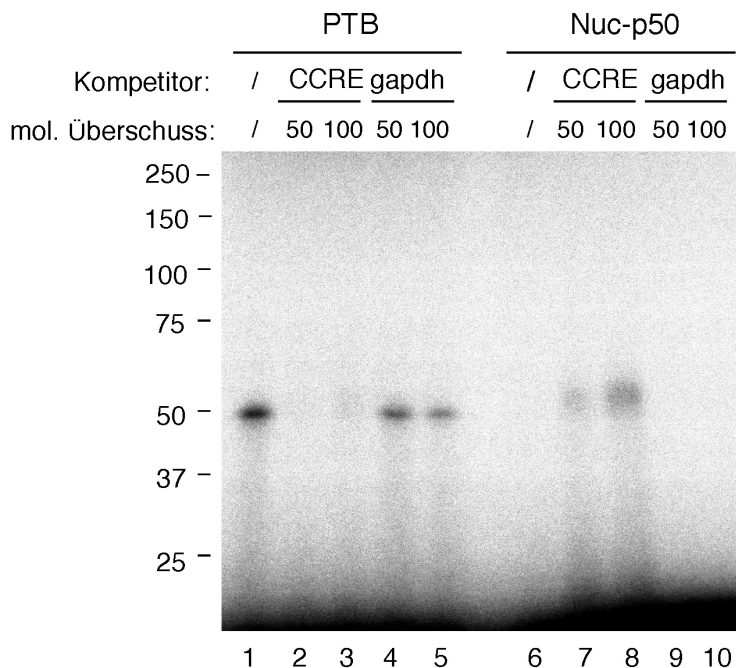


Abbildung 4.20: Die Bindung von rekombinantem PTB an radioaktiv markierte CCRE-RNA ist durch unmarkierte homologe RNA spezifisch kompetierbar

Rekombinantes PTB bzw. Nuc-p50 wurde mit radioaktiv markierter CCRE-RNA und den angegebenen molaren Überschüssen homologer (CCRE) bzw. heterologer (gapdh) Kompetitor-RNA inkubiert und durch UV-Licht quervernetzt. RNA-Protein-Komplexe wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Molekülmassen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

4.1.2.3 Die Überexpression von PTB reprimiert spezifisch die Reporterexpression von Transkripten mit p27-5'UTR

In-Vitro-Bindungsstudien hatten gezeigt, daß PTB und Nucleolin an die p27-5'UTR binden können. Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob beide Proteine eine funktionelle Rolle bei der Translation von p27 spielen könnten.

Um dies zu untersuchen, wurden Transkripte der p27-cDNA mit rekombinantem PTB bzw. Nuc-p50 vorinkubiert und anschließend in Retikulozytenlysaten translatiert. Luziferase-kodierende Transkripte wurden als interne Translationskontrolle während der Vorinkubation und der Translationsreaktion mitgeführt (Abbildung 4.21). In den bisherigen Experimenten wurden mit beiden Proteinen in einer Endkonzentration von bis zu 40 µg/ml keine signifikanten spezifischen Effekte auf die Translation von p27 beobachtet. Auch veränderte Salzkonzentrationen im Translationsansatz änderten daran bisher nichts. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine Optimierung der Vorinkubation der rekombinanten Proteine mit den In-Vitro-Transkripten zu

eindeutigeren Ergebnissen führen könnte. Möglicherweise ist auch die Endkonzentration beider Komponenten im Translationsansatz eine kritische Größe, die weiter optimiert werden könnte.

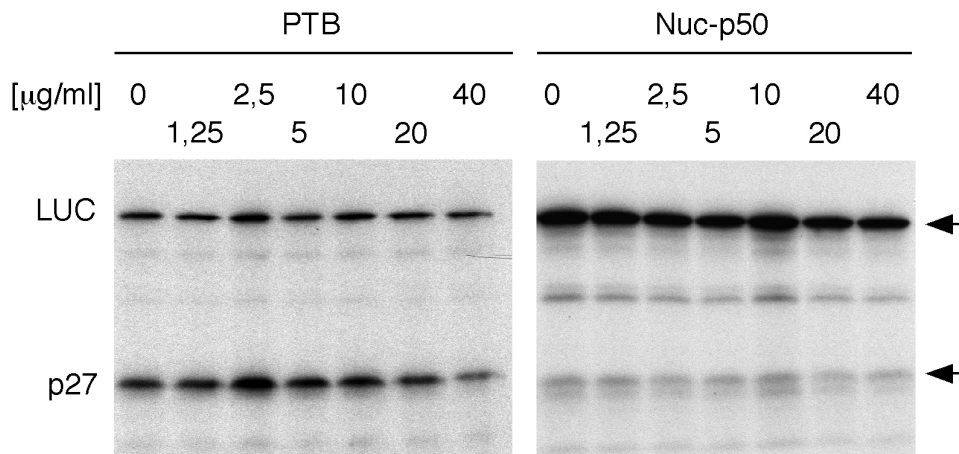


Abbildung 4.21: Die Translation von p27 wurde *in vitro* durch PTB und aminoterminal verkürztes Nucleolin (Nuc-p50) in Konzentrationen von bis zu 40 µg/ml nicht signifikant beeinflusst. In-Vitro-Transkripte der p27-cDNA (50 ng linke Versuchsreihe, 90 ng rechte Versuchsreihe) und Luziferase-kodierende Transkripte, die als interne Translationskontrolle dienen (1,5 ng linke Versuchsreihe, 10 ng rechte Versuchsreihe), wurden mit PTB, Nuc-p50 oder dem gleichen Volumen Puffer auf Eis inkubiert und anschließend in Retikulozyten-Lysat in Gegenwart von [³⁵S]Methionin translatiert. Die Translationsprodukte p27 und Leuchtkäferluziferase (LUC) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Endkonzentration von PTB und Nuc-p50 in den Reaktionsansätzen ist angegeben. Die Positionen der Leuchtkäferluziferase und von p27 sind mit Pfeilen markiert.

Es erschien jedoch zunächst aufschlußreicher, zu untersuchen, ob PTB und Nucleolin die Translation von p27 *in vivo* beeinflussen könnten. Zu diesem Zweck wurde getestet, wie sich die Überexpression beider Proteine in humanen Zellkulturzellen auf die Luziferaseexpression von Transkripten mit und ohne p27-5'UTR auswirkt (Abbildung 4.22). Durch die Überexpression von PTB wurde die Luziferaseexpression von Transkripten mit p27-5'UTR spezifisch reprimiert (um bis zu 3/4), wohingegen bei Überexpression von Nucleolin kein signifikanter Unterschied zwischen Konstrukten mit und ohne p27-5'UTR festgestellt wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß PTB auch *in vivo* spezifisch an die p27-5'UTR binden und die Translation eines cis-ständigen ORFs inhibieren kann.

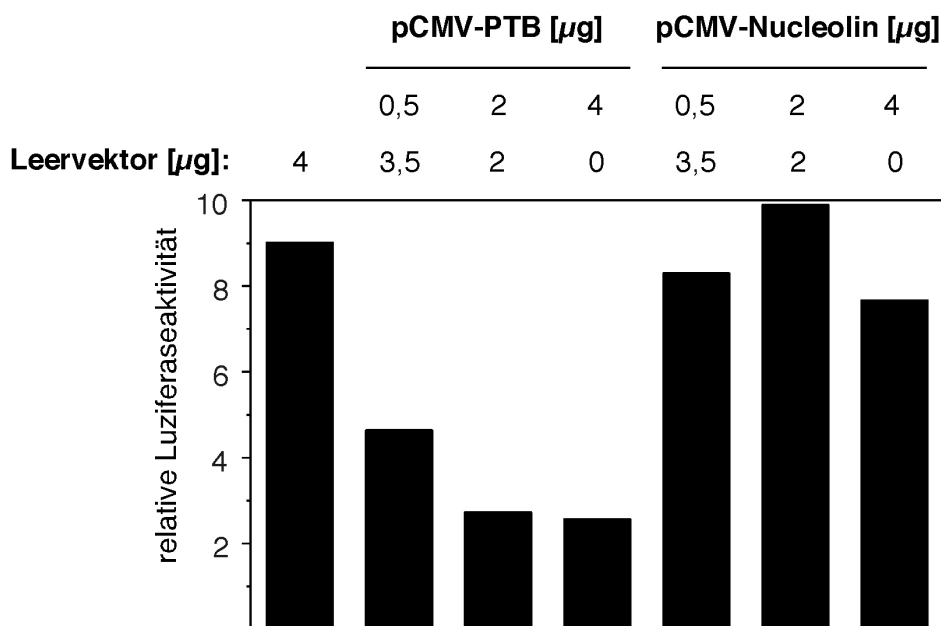


Abbildung 4.22: Die Überexpression von PTB in 293T-Zellen reprimiert spezifisch die Reporterexpression von Transkripten mit p27-5'UTR

HEC(human embryonic kidney)-293T-Zellen wurden mit steigenden Mengen eines eukaryontischen Expressionsplasmids für PTB (pCMV-PTB) bzw. Nucleolin (pCMV-Nucleolin) und einem Luziferasereporterplasmid kotransfiziert - entweder mit dem leeren Reporterplasmid pGL3 Control oder mit pGL5'UTR, das die p27-5'UTR besitzt. Die DNA-Gesamtmenge wurde durch Zugabe von leerem Expressionsvektor (pCMV SPORT6) in jedem Transfektionsansatz konstant gehalten. Das Diagramm zeigt die Luziferaseaktivitäten für pGL5'UTR nach Abgleich auf die für pGL3 Control erhaltenen Werte.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob ein bestimmter Bereich der p27-5'UTR für den Einfluß der PTB-Überexpression auf die Reporterexpression notwendig oder ausreichend sein könnte. Daher wurden verschiedene Reporterplasmide, die Fragmente der p27-5'UTR enthalten, unter der Bedingung der PTB-Überexpression getestet (Abbildung 4.23). Überraschenderweise wurde bei dem Konstrukt pGL Δ 1, dessen 5'UTR-Insert mit dem CCRE übereinstimmt, keine spezifische Repression der Luziferaseaktivität festgestellt, obwohl dieses Fragment *in vitro* als Bindungspartner von PTB identifiziert worden war. Bei dem Konstrukt pGL Δ 2, das sich von pGL Δ 1 um zusätzliche 70 bp unterscheidet, wurde hingegen eine etwa 40- bis 50%ige Repression und damit ein im Vergleich zu pGL5'UTR (etwa 70- bis 80%ige Repression) partieller Effekt beobachtet. Die Konstrukte pGL Δ b, pGL Δ d und pGL Δ e, die 3'-Bereiche der p27-5'UTR enthalten, verhielten sich identisch zu pGL5'UTR. Dies

zeigte, daß der 3'-Bereich der p27-5'UTR unter den angewandten Bedingungen ausreichend für die maximale Repression der Reporterexpression ist. Da die Fragmente $\Delta 2$ und Δe nicht überlappen, muß es jedoch im 5'-Bereich der p27-5'UTR mindestens ein weiteres Sequenzmotiv geben, an das PTB *in vivo* binden und dadurch die Expression eines cis-ständigen ORFs inhibieren kann.

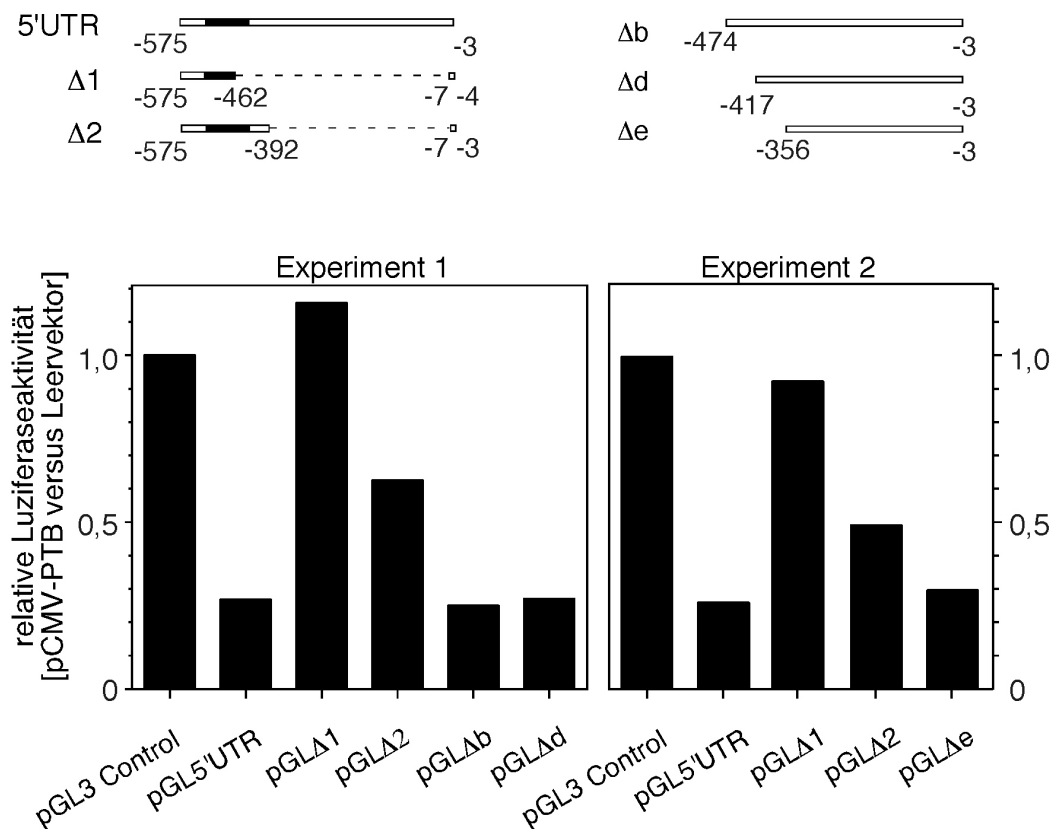


Abbildung 4.23: Für die Verminderung der Reporterexpression bei Überexpression von PTB ist der 3'-Bereich der p27-5'UTR ausreichend

HEK-293T-Zellen wurden mit einem der angegebenen Luziferasereporterplasmide und dem eukaryontischen Expressionsplasmid pCMV-PTB bzw. dem leeren Vector pCMV SPORT6 kotransfiziert. Die für leere Reporterplasmid pGL3 Control erhaltenen Werte wurden gleich eins gesetzt. Angegeben ist jeweils das Verhältnis der Reporterexpression bei Überexpression von PTB gegenüber der Reporterexpression bei Transfektion mit dem leeren Expressionsplasmid.

4.2 Phosphoisoformen von p21^{Cip1} als Inhibitoren von Cyclin A/CDK2

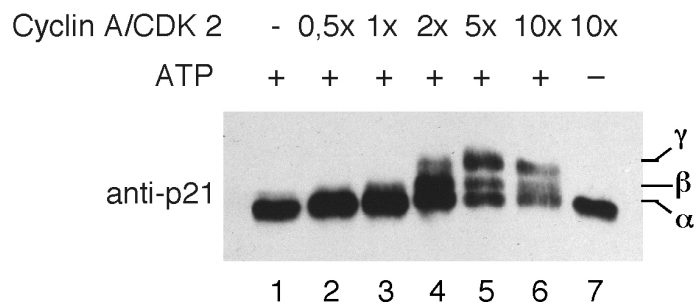
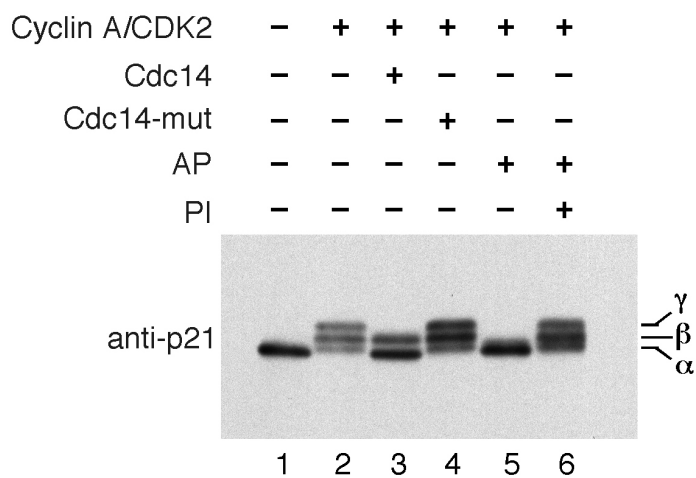
Die Stöchiometrie der Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen durch p21 wird kontrovers diskutiert. Gestützt auf Untersuchungen an p21-Immunpräzipitaten wurde für Cyclin A/CDK2 ein Modell vorgeschlagen, wonach der Kinase-Komplex nach Bindung von nur einem Molekül p21 katalytisch aktiv bleibt und erst durch die Bindung von weiteren p21-Molekülen inhibiert wird (Harper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Dieses Modell wurde durch Untersuchungen in Frage gestellt, die zeigten, daß ein ternärer 1:1:1-Komplex aus Cyclin A, CDK2 und p21, der aus rekombinanten Proteinen gebildet worden war, frei in Lösung vorlag und katalytisch inaktiv war (Hengst *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß rekombinantes p21, das in Lösung als Monomer vorlag, nach Immobilisierung und Vereinzelung an einer Gelmatrix Cyclin A/CDK2 inhibierte (Hengst *et al.*, 1998). Daher wurde gefolgert, daß ein Molekül p21 ausreicht, um Cyclin A/CDK2 zu inhibieren.

Da bei letzteren Studien rekombinantes p21 eingesetzt worden war, stellte sich die Frage, ob fehlende posttranslationale Modifikationen möglicherweise zu abweichenden inhibitorischen Eigenschaften geführt haben könnten. Mehrere Indizien sprechen dafür, daß p21 Cyclin-abhängige Kinasen nicht nur inhibiert, sondern auch ein Substrat dieser Enzyme ist. So ist die Phosphorylierung des verwandten CDK-Inhibitors p27^{Kip1} durch Cyclin E/CDK2 bereits beschrieben worden. Diese Modifikation ist eine Voraussetzung für den Abbau des Proteins am G₁/S-Übergang (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). Außerdem enthält die Primärstruktur von p21 drei Kopien des minimalen Konsensmotivs für die Phosphorylierung durch CDKs, bestehend aus einem Serin- oder Threoninrest in Verbindung mit einem darauffolgenden Prolinrest. Weiterhin wurden in zellulären Cyclin-A-Komplexen zwei p21-Isoformen detektiert, die sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit unterschieden und bei denen es sich um Phosphoisoformen des Inhibitors handeln könnte (Dulic *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des Inhibitors könnte seine Fähigkeit beeinträchtigen, Cyclin/CDK-Komplexe zu binden und zu inhibieren. Die Untersuchung dieser Frage war Gegenstand der im Folgenden beschriebenen Experimente.

4.2.1 p21 wird *in vitro* von Cyclin A/CDK2 phosphoryliert

Um zu untersuchen, ob p21 von Cyclin A/CDK2 phosphoryliert werden kann, wurde rekombinantes p21 mit steigenden Mengen an rekombinantem Cyclin A/CDK2 eine Stunde lang inkubiert und anschließend durch Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 4.24A). Im Vergleich zur Kontrolle, bei der p21 einer identischen Behandlung ohne Zugabe von Cyclin A/CDK2 unterzogen wurde (Spur 1), war bei einem molaren Überschuss von p21 (Spur 2) und unter äquimolaren Verhältnissen von p21 und Cyclin A/CDK2 (Spur 3) eine minimale Verschiebung der p21-Bande hin zu einer geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit zu beobachten. Diese neuauftretende p21-Isoform wurde mit α bezeichnet. Bei einem molaren Überschuss von Cyclin A/CDK2 erschienen zwei weitere p21-Isoformen, β und γ , mit noch geringerer elektrophoretischer Beweglichkeit, deren Auftreten mit einer Abnahme der schneller wandernden α -Form verbunden war (Spuren 4, 5 und 6). Durch Verlängerung der Inkubationszeit und Erhöhung der Konzentration von Enzym und Substrat konnte p21 größtenteils in die beiden Isoformen β und γ überführt werden (Abbildung 4.24B, Spur 2). Diese tragen vermutlich zwei bzw. drei Phosphatreste.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den drei p21-Isoformen α , β und γ wie vermutet um Phosphoisoformen handelte, wurden diese mit Phosphatasen behandelt und anschließend durch Western-Blot-Analyse auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit hin untersucht (Abbildung 4.24B, Spuren 3 bis 6). Zum Vergleich wurden unbehandeltes und Cyclin A/CDK2-behandeltes p21 mitanalysiert (Spuren 1 und 2). Die Behandlung der drei modifizierten p21-Isoformen mit der Phosphatase Cdc14 führte zum Verschwinden der α - und der γ -Isoform bei gleichzeitigem Auftreten von unmodifiziertem p21 (Spur 3). α -, β - und γ -Isoform blieben erhalten, wenn statt Cdc14 eine inaktive Mutante eingesetzt wurde (Spur 4). Alkalische Phosphatase überführte die β - und die γ -Isoformen vollständig in die unmodifizierte Form. Die α -Isoform war hingegen noch zu detektieren (Spur 5). Bei gleichzeitigem Einsatz von Alkalischer Phosphatase und Phosphatase-Inhibitoren blieben wiederum alle drei modifizierten Isoformen weitgehend erhalten (Spur 6). Zusammengenommen wurde daraus geschlossen daß α , β und γ Phosphoisoformen von p21 darstellen. Diese wurden nun auf ihre Fähigkeit hin untersucht Cyclin A/CDK2 zu inhibieren.

A**B****Abbildung 4.24:** p21 wird *in vitro* durch Cyclin A/CDK2 phosphoryliert

(A) Bei der Inkubation von p21 mit Cyclin A/CDK2 treten ATP-abhängig drei p21-Isoformen mit veringertem elektrophoretischer Mobilität auf. p21 wurden mit dem jeweils angegebenen molaren Überschuss an Cyclin A/CDK2 für 1 h bei 37°C mit oder ohne ATP inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit einem monoklonalen anti-p21 Antikörper analysiert. Die neu auftretenden p21-Isoformen mit veränderter elektrophoretischer Beweglichkeit sind mit α, β und γ bezeichnet.

(B) Die drei modifizierten p21-Isoformen α, β und γ können durch Phosphatasebehandlung wieder in die unmodifizierte Form überführt werden. Anti-p21 Western-Blot-Analyse. Spur 1, unbehandeltes p21; Spur 2, Cyclin A/CDK2-behandeltes p21; Spuren 3 - 6, Cyclin A/CDK2-behandeltes p21 nach 30minütiger Inkubation mit Phosphatase: Spur 3, Cdc14; Spur 4, inaktive Cdc14-Mutante (Cdc14-mut); Spur 5, Alkalische Phosphatase (AP); Spur 6, Alkalische Phosphatase inklusive Phosphatase-Inhibitoren (PI).

4.2.2 Phosphoryliertes p21 ist ein wirksamer Inhibitor der Kinaseaktivität von Cyclin A/CDK2

Rekombinantes, monomeres p21, das an einer Gelmatrix immobilisiert und dadurch vereinzelt wird, bindet und inhibiert Cyclin A/CDK2 (Hengst *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von p21 die inhibitorischen Eigenschaften dieses Proteins verändert, wurde auch phosphoryliertes p21 auf diese Weise untersucht und mit unphosphoryliertem p21 verglichen (Abbildung 4.25).

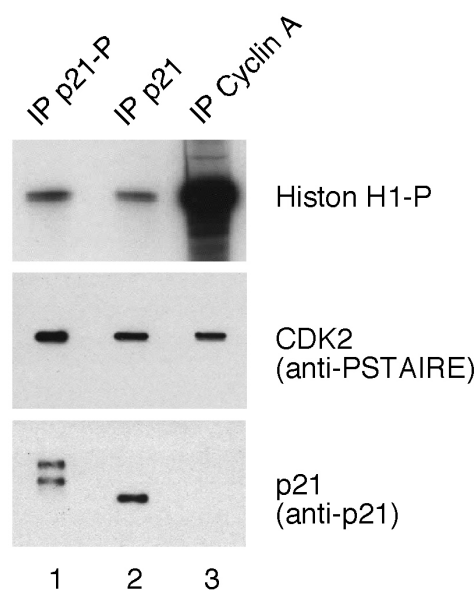


Abbildung 4.25: Phosphoryliertes p21 ist ein wirksamer Inhibitor der Kinaseaktivität von Cyclin A/CDK2

p21 wurde durch Inkubation (1,5 h bei 37°C) mit ATP und einem zweifachen molaren Überschuss an Cyclin A/CDK2 phosphoryliert oder einer identischen Behandlung in Abwesenheit von Cyclin A/CDK2 unterzogen. Phosphoryliertes (p21-P) und unphosphoryliertes p21 (p21) wurden gereinigt und durch Immunpräzipitation an einer Gelmatrix aus Protein-A-Sepharose immobilisiert (jeweils etwa 120 ng). Diese Gelmatrices wurden mit 250 ng Cyclin A/CDK2 inkubiert und gewaschen. Die gleiche Menge Cyclin A/CDK2 wurde durch Immunpräzipitation mit einem anti-Cyclin-A Antiserum an Protein-A-Sepharose gebunden. Gleiche Aliquots der drei Gelmatrices wurden auf ihre assoziierte Kinaseaktivität und die Mengen der präzipitierten Proteine getestet. Die Menge an präzipitiertem p21 (p21, anti-p21) und an präzipitierter CDK2-Kinaseuntereinheit (CDK2, anti-PSTAIRES) wurde durch Immunoblot-Analyse bestimmt. Die mit den Gelmatrices assoziierte Kinaseaktivität wurde in Gegenwart von γ -[^{32}P]-ATP mit Histon H1 als Substrat bestimmt. Die an Histon H1 gebundene Radioaktivität wurde nach Auftrennung der Reaktionsansätze durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (Histon H1-P).

Beide Proteine wurden durch Antikörper gegen den Carboxyterminus von p21 an Protein-A-Sepharose gebunden und mit rekombinantem Cyclin A/CDK 2 inkubiert. Als Kontrolle für die Kinaseaktivität immobilisierter Cyclin A/CDK2-Komplexe wurde die aktive Kinase direkt mit anti-Cyclin-A Antikörpern an Protein-A-Sepharose gebunden. Die Mengen der auf den Gelmatrices immobilisierten Proteine wurde durch Immunoblot-Analyse bestimmt (Abbildung 4.2, Mitte und unten). Ähnliche Mengen an phosphoryliertem (Spur 1) und unphosphoryliertem p21 (Spur 2) banden ähnliche Mengen Cyclin A/CDK2. Die Kinase-Aktivität der p21-gebundenen Kinasekomplexe wurde mit derjenigen immunopräzipitierter Kinasekomplexe (Spur 3) verglichen (Abbildung 4.2, oben). Die Kinaseaktivität der an p21 gebundenen Kinase-Komplexe war um mehr als 98 % reduziert, unabhängig davon ob p21 phosphoryliert vorlag oder nicht. Daraus wurde gefolgert, daß phosphoryliertes p21 die Kinaseaktivität von Cyclin A/CDK2 mit ähnlicher Effizienz inhibiert wie unphosphoryliertes p21. Um eine mögliche Dimerisierung räumlich benachbarter p21-Moleküle auf der Gelmatrix auszuschließen wurde der Versuch mit einer um 75% geringeren Dichte an immobilisiertem p21 durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde eine mehr als 98%ige Inhibition der Kinaseaktivität durch phosphoryliertes und unphosphoryliertes p21 beobachtet (ohne Abbildung). Damit wurde gezeigt, daß auch ein einzelnes phosphoryliertes p21-Monomer den Cyclin A/CDK2-Komplex inhibieren kann.

5 Diskussion

5.1 Translationale Regulation von p27^{Kip1}

Die intrazelluläre Abundanz des CDK-Inhibitors p27 spielt eine kritische Rolle bei der Entscheidung zwischen Proliferation und Wachstumsarrest in der G₁- und der G₀-Phase. Die translationale Kontrolle der p27-Synthese ist ein wichtiger Regulationsmechanismus, der die Menge an p27 am Übergang von der G₁- in die S-Phase, beim Eintritt in die G₀-Phase und bei der Rückkehr in den Zellzyklus mitbestimmt.

In dieser Arbeit wurde eine p27-cDNA mit ausgedehnten untranslatierten Regionen am 5'- und 3'-Ende identifiziert. In ihrer 5'-untranslatierten Region (5'UTR) wurden zwei translationsregulatorische, cis-wirkende Elemente charakterisiert. Am 5'-Ende der 5'UTR befindet sich ein „cell cycle responsive element“ (CCRE), das eine Änderung der Translationsrate am Übergang von der G₁ zur S-Phase herbeiführt. Stromabwärts davon befindet sich eine interne Ribosomenbindestelle (IRES), die erlaubt, daß p27 unter Bedingungen verminderter Cap-abhängiger Translation effizient exprimiert werden kann. Mit PTB und Nucleolin wurden zwei Proteine gereinigt und charakterisiert, die spezifisch an die CCRE-RNA binden können. Reporterstudien an 293T-Zellen unter den Bedingungen der Überexpression von PTB unterstützten die Hypothese, daß dieses Protein als trans-wirkender Faktor an der Translationsregulation von p27 beteiligt sein könnte, möglicherweise durch direkte Wechselwirkung mit weiteren Sequenzbereichen der p27-5'UTR. Abbildung 5.1 faßt diese Ergebnisse schematisch zusammen.

5.1.1 Eine humane p27-cDNA mit ausgedehnter 5'-untranslatierter Region

Ausgehend von der Sequenzinformation einer humanen p27-cDNA aus Brustdrüsengewebe mit einer 5'UTR von 461 nt wurde eine cDNA aus HeLa-Zellen kloniert, deren 5'UTR 575 nt lang war und deren zusätzliche Sequenz einen kleinen offenen Leserahmen (uORF) enthielt. Daneben wurden kürzere cDNAs kloniert, deren 5'UTRs variable Längen von 370 bis 473 nt aufwiesen.

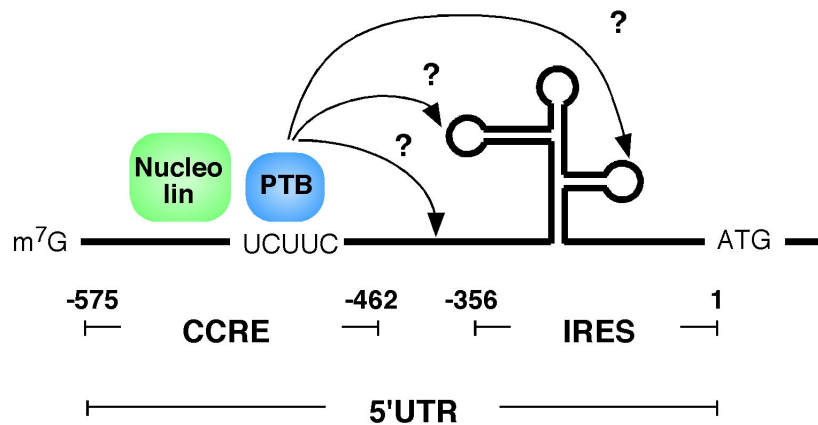


Abbildung 5.1: Übersicht zur Diskussion der translationalen Regulation von p27

Innerhalb einer 575 nt langen p27-5'UTR befinden sich zwei Elemente, die regulatorisch in die Translation von p27 eingreifen können, ein „cell cycle responsive element“ (CCRE, -575 bis -462) und eine interne Ribosomenbindestelle (IRES, -356 bis -1). Nucleolin und PTB binden *in vitro* spezifisch an das CCRE. Die Bindestelle für PTB besteht möglicherweise in einer Tandem-Wiederholung des Sequenzmotivs UCUUC am 3'-Ende des CCRE. PTB kann *in vivo* wahrscheinlich mit weiteren stromabwärts gelegenen Bereichen der p27-5'UTR wechselwirken und dabei die Translation von p27 beeinflussen (mit Pfeilen angedeutet).

Zu Beginn dieser Analysen gab es drei Publikationen, die den Transkriptionsstart des p27-Gens zum Gegenstand hatten. Minami *et al.* (1997) detektierten den Transkriptionsstart des p27-Gens in den humanen Osteosarkomzelllinien MG63 und Saos2 auf der Basis von „primer extension“ übereinstimmend bei 153 bp stromaufwärts des p27-Translationsstarts, also in Position -153. Abweichend davon detektierten Kwon *et al.* (1996) mit Hilfe von „primer extension“ und „nuclease S1 protection“ den Haupt-Transkriptionsstart in quieszenten Maus-T-Zellen bei -200 und einen zweiten bei -253, wohingegen Zang und Lin (1997) auf der Basis von „RNase protection“ die Position -495 als Transkriptionsstart in Maus-Nierengewebe abschätzten. Die Informationen über den Transkriptionsstart des p27-Gens in Maus und Mensch waren also widersprüchlich. Eine Veröffentlichung von Ito *et al.* (1999) machte das Bild noch komplexer. Sie detektierten in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 ein Haupt-Kluster von Transkriptionsstarts in der Region von -479 bis -403 und zwei weitere Transkriptionsstarts bei -280 und -273. Diese waren mit Hilfe einer auf RT-PCR-basierenden Klonierungsstrategie identifiziert worden, die für intakte mRNA mit 7-Methylguanidin-Kappe am 5'-Ende selektierte, um 5'-verkürzte, partiell abgebaute mRNAs auszuschließen. Über die Häufigkeit, mit der die einzelnen Startstellen genutzt werden, machten die Autoren keine Angaben.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden p27-cDNAs mit variablen 5'-Enden detektiert, in diesem Fall ausgehend von RNA aus HeLa-Zellen in Suspensionskultur. Die als erstes eingesetzte Methode (5'RACE) basierte wie bei den Arbeiten von Ito *et al.* (1999) auf RT-PCR, beinhaltete jedoch keine Selektion für RNAs mit 7-Methylguanosin-Kappe. Daher war es nicht ausgeschlossen, daß 5'-verkürzte endogene oder exogene RNA-Abbauprodukte detektiert wurden. Ähnlich dem von Ito *et al.* (1999) beschriebenen Kluster, wurde eine Serie von cDNAs erhalten, deren 5'UTRs zwischen 473 und 370 nt lang waren. Daneben wurde eine p27-cDNA-Population mit einem 5'-Ende in Position -575 detektiert.

Die 575 nt lange p27-5'UTR war länger als die längste, die zum damaligen Zeitpunkt in der Literatur beschrieben worden war (479 nt, Ito *et al.*, 1999). Es stellte sich also die Frage, ob die 575 nt lange 5'UTR eine Besonderheit von HeLa-Zellen oder anderen transformierten Zellen darstellte. Dies konnte ausgeschlossen werden, denn eine Sonde, die komplementär zum Bereich -575 bis -462 des humanen p27-Gens war, detektierte nicht nur eine Fraktion der p27-mRNA von HeLa-Zellen, sondern auch von normalen humanen Fibroblasten und von verschiedenen humanen Geweben. Die dabei eingesetzten Waschbedingungen (1 x SSC, 65°C) wurden so gewählt, daß die sehr kurze Sequenz zwischen -479 bis -462 nicht zu einem Signal führen sollte.

Northern-Blot- und „RNase protection“-Analysen ermöglichten auch eine Abschätzung der relativen Häufigkeiten der unterschiedlich langen p27-5'UTRs in adhärennten HeLa-Zellen: Bei der Northern-Blot-Analyse wurden weniger als 10% der p27-RNAs mit einer Sonde gegen den 5'UTR-Bereich -575 bis -462 detektiert, etwa 40% mit einer Sonde gegen den Bereich -461 bis -348. Die „RNase protection“-Analyse zeigte als Hauptsignal ein Kluster von 5'UTRs im Längenbereich von 470 bis 400 nt, wobei das weitaus stärkste Signal bei etwa 470 nt detektiert wurde. Zusammengenommen deuteten diese Ergebnisse darauf hin, daß der Transkriptionsstart des p27-Gens in HeLa-Zellen nicht präzise festgelegt ist, sondern in einem relativ weiten Sequenzbereich variieren kann. Der bevorzugte Transkriptionsstart scheint im Bereich von -470 nt zu liegen.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Coleman *et al.* (2001) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Auf der Grundlage der bereits von Ito *et al.* (1999) eingesetzten, Cap-selektiven RT-PCR-Methode sowie „RNase protection“-identifizierten sie die Position -472 als Haupttranskriptionsstart in der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 und der untransformierten humanen Lungenzelllinie MRC5.

Daneben beschrieben die Autoren in MCF7-Zellen eine weniger bevorzugte Startstelle bei -403 sowie weitere sehr schwache Startstellen bei -667, -316 und -289. In MRC5-Zellen wurde Position -403 als schwache Transkriptionsstartstelle nachgewiesen. In derselben Veröffentlichung wurde die Position -502 in Maus-Leber und NIH3T3-Mausfibroblasten als Haupttranskriptionsstart beschrieben. Interessanterweise ist die Position -502 homolog zur Position -472 des menschlichen p27-Gens. Daneben wurden die Positionen -200 und -253 als schwache Transkriptionsstarts detektiert. Die Autoren führten damit die divergierenden Ergebnisse von Kwon *et al.* (1996) einerseits und Zhang und Lin (1997) andererseits zusammen. Offenbar konnten in diesen beiden frühen Arbeiten nicht alle drei Startstellen gleichzeitig detektiert werden, denn in keinem der jeweils durchgeführten „Protection“-Experimente wurde eine Sonde verwendet, die alle drei Positionen abdeckte.

Der Nachweis von p27-5'UTRs variabler Länge in ein und derselben Zelllinie und die Beschreibung voneinander abweichender Transkriptionsstarts in verschiedenen Zelllinien implizierte die Möglichkeit, daß die Expression von p27 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus, beim Übergang in die Quieszenz oder bei der Differenzierung durch eine Variation des Transkriptionsstarts erfolgen könnte. Ein derartiger Mechanismus der Genregulation ist z.B. für das Onkoprotein MDM2 beschrieben worden: Das Gen für MDM2 besitzt zwei Promotoren, einen konstitutiv aktiven und einen p53-aktivierbaren Promotor (Piette *et al.*, 1997). Der erste Promotor vermittelt die Transkription einer mRNA, deren 5'UTR 300 nt lang ist und zwei uORFs enthält. Diese mRNA wird mit weit geringerer Effizienz translatiert als das Transkript des p53-induzierten Promotors, dessen 5'UTR nur 68 nt umfaßt und keinen uORF aufweist (Landers *et al.*, 1997). Da MDM2 ein molekularer Gegenspieler von p53 ist, wird auf diese Weise ein negativer Feedback-Mechanismus etabliert. Eine gewebespezifische Variation der 5'-UTR-Länge wird bei der *c-mos*-mRNA beobachtet, die in erster Linie in Keimzellen exprimiert wird. Die mRNA aus Hodengewebe ist etwa 300 nt lang und enthält vier überlappende uORFs, während die mRNA aus Ovarien rund 80 nt lang ist und nur einen uORF enthält. Erwartungsgemäß inhibiert die mRNA aus Hoden die Translation eines Reportergens weit stärker als die mRNA aus Ovarien (Steel *et al.*, 1996).

Northern-Blot-Analysen mit drei kurzen cDNA-Sonden, die zu verschiedenen Bereichen der p27-mRNA komplementär waren, ließen keine zellzyklusabhängigen

Variationen des p27-Transkriptionsstarts in asynchronen und arretierten HeLa-Zellen erkennen. Auch in quieszenten Fibroblasten war mit dieser Methode keine Verschiebung des Transkriptionsstarts im Vergleich zu proliferierenden Fibroblasten zu erkennen. Die „RNase protection“-Analyse der p27-5'UTR-Länge in HeLa-Zellen, die im Vergleich zur Northern-Blot-Analyse eine höhere Auflösung von RNA-Fragmentlängen gewährleistet, zeigte ebenfalls keine zellzyklusabhängigen Längenvariationen in HeLa-Zellen. Eine Regulation von p27 über alternative Transkriptionsstarts ist somit in den hier untersuchten Szenarien unwahrscheinlich.

Es bleibt letzten Endes offen, worauf die divergierenden Ergebnisse bezüglich des p27-Transkriptionsstarts, die in der vorliegenden Arbeit und in den genannten Veröffentlichungen erzielt wurden, zurückzuführen sind. Sie könnten Unterschiede im experimentellen Vorgehen, aber auch zelltyp- oder gewebespezifische Variationen repräsentieren. Zusammengenommen deuten die bisher verfügbaren Informationen darauf hin, daß der bevorzugte Transkriptionsstart des p27-Gens bei etwa -470 liegt, daß daneben aber auch alternative Startstellen genutzt werden. Die Positionen dieser Startstellen und ihre Effizienz variieren offenbar zwischen Zelltypen und Geweben. Auch wenn in den in dieser Arbeit untersuchten Szenarien keine zellzyklus- oder wachstumsabhängigen Längenvariationen detektiert wurden, ist nicht ausgeschlossen, daß in anderen Szenarien, in denen die Expression von p27 reguliert wird, eine solche Variation erfolgt und zur Regulation der p27-Expression beiträgt.

5.1.2 Ein cis-wirkendes Element zur zellzyklusabhängigen Translationsregulation von p27

Reporterstudien an asynchron proliferierenden bzw. arretierten HeLa-Zellen zeigten, daß die 575 nt lange p27-5'UTR die Translation eines stromabwärts gelegenen offenen Leserahmens in einer Weise beeinflussen kann, die von der Position der Zellen im Zellzyklus abhängig ist: In Zellen, die mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert wurden, bewirkte die 5'UTR im Vergleich zu asynchron proliferierenden Zellen eine 2,1fache Zunahme der Reportertranslation. Im Vergleich zu Zellen, die mit Thymidin in der S-Phase arretiert wurden, war die Induktion 2,4fach. Es konnte kein Beitrag der p27-3'UTR zur zellzyklusabhängigen Translationsregulation nachgewiesen werden.

Hengst und Reed (1996) hatten gezeigt, daß die Translationsrate von p27 in lovastatarretierten HeLa-Zellen im Vergleich zu asynchronen Zellen um etwa den Faktor 3, im Vergleich zu thymidinarretierten Zellen um den Faktor 9 erhöht ist. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene zellzyklusabhängige Variation der Reportertranslation ist dagegen vergleichsweise schwach. Über die möglichen Ursachen, kann spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung besteht in der Natur des chimären Reportertranskripts, das sich in vielerlei Hinsicht von der endogenen p27-mRNA unterscheidet: (a) Der Transkriptionsstart des Reporterplasmids pGL3 Control befindet sich innerhalb des SV40-Promotors etwa 60 Nukleotide stromaufwärts der *HindIII*-Schnittstelle, die zur Insertion der p27-5'UTR-Fragmente benutzt wurde. Dies hat zur Folge, daß die Reportertranskripte an ihrem 5'-Ende mit einer Plasmidsequenz beginnen, die möglicherweise mit einem regulatorischen Prozeß interferieren könnte. (b) Der p27-ORF ist naturgemäß durch den ORF der Leuchtkäferluziferase ersetzt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß der p27-ORF cis-regulatorische Elemente aufweist, die zur Kontrolle der p27-Translation beitragen. Andererseits könnte die Sequenz des Luziferase-ORFs mit der Struktur regulatorischer Elemente der 5'- oder 3'UTR interferieren. (c) Bei den Konstrukten mit p27-3'UTR besteht die Möglichkeit, daß sich am 3'-Ende der Transkripte Plasmidsequenz in Form des SV40-Polyadenylierungssignals befindet. Es wurde nicht überprüft, ob bei diesen Konstrukten das p27-Polyadenylierungssignal oder das stromabwärtsgelegene SV40-Polyadenylierungssignal genutzt wird.

Die Möglichkeit, daß durch eine zu hohe intrazelluläre Konzentration der Reportertranskripte etwaige trans-wirkende Faktoren im Unterschuß vorhanden waren und die Regulation nicht in vollem Umfang stattfinden konnte, ist ebenfalls gegeben. Aus den Signalintensitäten der Northern-Blot-Analysen und den erzielten Transfektionseffizienzen (durchschnittlich 20 bis 30 % transfizierte Zellen) konnte jedoch abgeschätzt werden, daß die Menge an Reporter-mRNA in den Zellen etwa in der Größenordnung der endogenen p27-mRNA-Menge lag und damit zumindest keine massive Überexpression vorlag.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte ein Bereich innerhalb der 575-nt-5'UTR eingegrenzt werden, der ausreicht, die zellzyklusabhängige Induktion der Translationseffizienz weitgehend zu gewährleisten. Dieser Sequenzbereich erstreckt sich von Position -575 bis -462 und wurde als CCRE (cell cycle responsive element)

bezeichnet. Vollständige oder teilweise Deletionen dieses Bereiches hatten signifikante Beeinträchtigungen der Translationskontrolle zur Folge.

Da sich das Startkodon des uORFs innerhalb des CCRE befindet, lag die Vermutung nahe, daß der uORF an der zellzyklusabhängigen Translationskontrolle beteiligt sein könnte. Es wäre beispielsweise denkbar, daß das Startkodon des uORFs, das sich in einem suboptimalen Sequenzkontext befindet (CCAATGG), im Verlauf des Zellzyklus mit wechselnder Effizienz vom Ribosom erkannt würde. Bei effizienter Translationsinitiation am uORF würde die Translation des p27-ORFs inhibiert werden, wohingegen eine ineffiziente Translationsinitiation am uORF den gegenteiligen Effekt hätte.

Die Transversion G-517 nach T, die vorgenommen wurde um das Startkodon des uORFs zu entfernen, führte zu einer partiellen Reduktion der zellzyklusabhängigen Translationskontrolle auf annähernd 50 %. Dies zeigte, daß der Sequenzbereich des Startkodons notwendig ist, um den vollen Umfang der Translationsregulation zu gewährleisten. Die Integrität des uORFs und die Sequenz des kodierten Peptids waren für seine potentielle Funktion bei der Translationskontrolle nicht von Bedeutung, da eine verkürzte Mutante, die nur für die ersten beiden Aminosäuren des Wildtyp-uORFs und sechs weitere Aminosäuren kodierte, den vollen Umfang der Translationsregulation zeigte. Im Gegensatz dazu konnte eine 5'-verkürzter uORF die Translationskontrolle nicht in vollem Umfang gewährleisten. Wie könnten diese Beobachtungen erklärt werden? Möglicherweise wird die Translationsregulation durch die Bindung eines Faktors an das Startkodon des uORFs unterstützt. Dabei könnte es sich um das Ribosom oder um einen anderen trans-wirkenden Faktor handeln. Dagegen erscheint es eher unwahrscheinlich, daß die Punktmutation AUG nach AUU eine kritische RNA-Sekundärstruktur zerstört haben könnte.

Das G/C-reiche 5'-Ende des CCRE ließ ebenfalls eine kritische Funktion bei der zellzyklusabhängigen Translationsregulation vermuten. Für diesen Bereich wird eine mäßig stabile Haarnadelstruktur vorhergesagt ($\Delta G = -23$ kcal/mol), die sich von Position -566 bis einschließlich -536 erstreckt. Die Deletion dieses Elementes verminderte die zellzyklusabhängige Translationsregulation, hob sie aber nicht auf. Zusammengefasst wurde aus den Deletionsexperimenten geschlossen, daß kein definiertes kleines RNA-Element innerhalb des CCRE allein für die Translationsregulation verantwortlich ist, sondern offenbar multiple Sequenzbereiche dazu beitragen. Um diese genauer zu definieren, könnte eine Serie von Mutanten

hergestellt werden, bei denen jeweils ein kleiner Sequenzbereich von beispielsweise 10 nt durch eine nichtverwandte Sequenz ausgetauscht würde. Auf diese Weise könnte die komplette CCRE-Sequenz „durchmutiert“ werden. Diese Analyse wurde jedoch zunächst zurückgestellt, da die Eingrenzung des CCRE auf 114 nt ausreichend für die weiteren Analysen erschien.

Der Sequenzbereich des CCRE (-575 bis -462) ist in vielerlei Hinsicht bemerkenswert. Er ist hoch konserviert bei Maus und Mensch und Promotorstudien haben gezeigt, daß er sowohl basale als auch induzierbare Promotoraktivität aufweist (Inoue *et al.*, 1999; Kamiyama *et al.*, 1999; Zhang und Lin, 1997). In einer Reihe humaner Zelllinien (U937, Myelomonocyten; U2OS und MG63, Osteosarkomzellen; C33A, Cervixkarzinomzellen) führte die Deletion des Sequenzbereiches von -549 bis -511 zu einem wesentlichen Verlust an Promotoraktivität (Inoue *et al.*, 1999; Kamiyama *et al.*, 1999). Innerhalb dieser Sequenz wurden mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) jeweils eine Bindestelle für die ubiquitären Transkriptionsfaktoren SP1 (-543 bis -538) und NF-Y (-522 bis -518, CCAAT-Box) identifiziert. Punktmutationen innerhalb dieser Elemente setzten die Promotoraktivität signifikant herab und führten in U937-Zellen zu einem Verlust der Vitamin-D3-Induzierbarkeit des Promotors (Inoue *et al.*, 1999; Kamiyama *et al.*, 1999). Die DNA-Matrize für die CCRE-RNA kann offenbar auf zwei unterschiedliche Arten Genregulation vermitteln, transkriptionell als Teil des p27-Promotors und translational als Teil der p27-mRNA.

Wie oben dargestellt, verdichten sich vor allem durch jüngste Ergebnisse (Coleman *et al.*, 2001) die Hinweise, daß der Haupttranskriptionsstart des p27-Gens in einer Reihe von Zelllinien etwa bei der Position -470 liegt, und daß es daneben stromauf- wie stromabwärts schwächere alternative Transkriptionsstartstellen gibt. Dies bedeutet, daß das CCRE wahrscheinlich nur auf einem Bruchteil der p27-Transkripte vorhanden ist. Dies wirft die Frage nach der physiologischen Relevanz der beobachteten translationalen Kontrolle durch das CCRE auf. Unter der Annahme daß p27-mRNAs mit und ohne CCRE effizient translatiert werden, käme dem CCRE wohl keine allgemeine Bedeutung zu. Es wäre allenfalls denkbar, daß die translationale Kontrolle durch das CCRE ein Spezialfall der p27-Regulation in bestimmten Zelltypen darstellt. Sollte es jedoch so sein, daß kürzere mRNAs ohne das CCRE nicht aktiv translatiert werden, sondern Teil eines ruhenden mRNA-Pools sind, wäre eine generelle Funktion

des CCRE möglich. Die *oskar*-mRNA von *Drosophila melanogaster* bietet ein Beispiel dafür, daß ein Element in der 5'UTR zur Derepression einer mRNA notwendig sein kann, deren Translation durch ein Element in der 3'UTR unterdrückt wird (Gunkel *et al.*, 1998). Eine ähnliche dereprimierende Funktion wäre auch für das CCRE denkbar. Diese Hypothese könnte in der Zukunft durch Erstellung von Polyribosomenprofilen zytoplasmatischer mRNPs und deren Analyse durch Northern-Blot oder „RNase protection“ überprüft werden. Sollten die p27-Transkripte, die das CCRE-tragen, selektiv translatiert werden, würden diese Transkripte vor allem in den Polyribosomenfraktionen, die übrigen in den Fraktionen der freien mRNPs und Monosomen detektiert werden.

Millard *et al.* (2000) untersuchten die translationale Regulation von p27 anhand einer 152 nt langen p27-5'UTR. Die Fähigkeit dieser kurzen 5'UTR, die Expression eines Luziferase-Reportergens in lovastatinbehandelten MDA468-Zellen zu induzieren, war nur sehr gering. Es wurde im Vergleich zu asynchronen Zellen lediglich eine 1,3fache Induktion nachgewiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen bezüglich der zellzyklusabhängigen Translationsregulation insofern, daß diese 3'-Region der p27-5'UTR allein nicht ausreicht, um zellzyklusabhängige Translationsregulation in relevantem Umfang zu gewährleisten.

5.1.3 Eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) in der p27-5'UTR

Die p27-5'UTR enthält eine interne Ribosomenbindestelle, die es Ribosomen ermöglicht, die Translation von p27 unabhängig von der 7-Methylguanosin-Kappe zu initiieren und p27 unter Bedingungen verminderter Cap-abhängiger Translation effizient zu exprimieren. Sie befindet sich innerhalb von 356 nt stromaufwärts des p27-ORFs.

Zwei experimentelle Beobachtungen, ließen zunächst eine IRES in der p27-5'UTR vermuten: 1) Das 5'-Ende der 575 nt langen 5'UTR, das CCRE, enthält mit einer G/C-reichen Haarnadelstruktur und dem Startkodon des uORFs zwei Elemente, von denen man annehmen konnte, daß sie das ribosomale Scanning und dadurch die Cap-abhängige Translation potentiell reprimieren können. Erwartungsgemäß reprimierte dieses Element die Translation eines Reportergens *in vivo* auf etwa 1/15 der

Vektorkontrolle. 2) Bei 5'-Fragmenten steigender Größe, die also zusätzlich zum CCRE weitere Bereiche der p27-5'UTR umfaßten, wurde diese Inhibition schrittweise reduziert.

Diese Hypothese wurde durch zwei experimentelle Ansätze bestätigt: durch Experimente mit bicistronischen Reportergenkonstrukten und durch die Analyse der Translation monocistronischer Reportertranskripte bei gleichzeitiger Inhibition der Cap-abhängigen Translation durch den PI3-Kinaseinhibitor LY294002.

Im Gegensatz zu den *in vivo* gemachten Beobachtungen konnte die p27-IRES weder in HeLa-Zellysaten noch in Retikulozytenlysaten in nennenswertem Umfang Cap-unabhängige Translation vermitteln. Die p27-IRES war also unter den eingesetzten Bedingungen *in vitro* nicht aktiv. Eine Reihe von Ursachen kommt hierfür in Frage. Möglicherweise lag die IRES-RNA des In-Vitro-Transkriptes nicht in der korrekten Sekundär- und Tertiärstruktur vor, möglicherweise fehlte ein zellulärer trans-wirkender Faktor in den Lysaten. Die Beobachtung, daß eine zelluläre oder virale IRES *in vitro* nicht oder nur schwach aktiv ist, ist nicht ungewöhnlich. So ist die IRES der mRNA von *c-myc* in Retikulozytenlysaten nicht aktiv (Stoneley *et al.*, 2000), und eine Reihe von IRES-Elementen von Picornaviren werden in Retikulozytenlysaten erst dann effizient zur Translationsinitiation genutzt, wenn zusätzliche, zelluläre transaktivierende Proteine zugegeben werden (Pestova *et al.*, 2001). Es wurde daher versucht, durch Supplementation von Retikulozytenlysaten mit fraktionierten zytosolischen HeLaS100-Zellextrakten potentiellen transaktivierenden Faktoren zu detektieren. In den bisher durchgeführten Experimenten verloren die Retikulozytenlysate durch die Zugabe der HeLa-Fractionen jedoch einen großen Teil ihrer Translationsaktivität, sehr wahrscheinlich aufgrund inadäquater Salzkonzentrationen im Reaktionsansatz. Offenbar war die Dialyse der HeLa-Fractionen unvollständig. Eine Optimierung der Dialyse-Bedingungen könnte hier in Zukunft zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

5.1.4 Die Rolle der p27-IRES im Kontext von Wachstumsarrest und Differenzierung

Die p27-IRES ist offenbar für die translationale Regulation am Übergang von G₁- und S-Phase nicht erforderlich, da das CCRE allein für die zellzyklusabhängige Translationsregulation ausreicht. Dies schließt jedoch nicht aus, daß das CCRE die Effizienz der IRES-vermittelten Translation regulieren kann. So zeigten Ostarek *et al.*

(2001; 1997) daß IRES-vermittelte Translation durch ein Element, das in der RNA-Primärstruktur weit entfernt ist, beeinflusst werden kann. Das „differentiation control element“ (DICE) in der 3'UTR der 15-Lipoxygenase-mRNA reprimiert im Komplex mit hnRNP K und hnRNP E1 die Bildung des 80S-Initiationskomplexes unabhängig davon, ob die Initiation Cap-abhängig oder Cap-unabhängig erfolgt, indem es die Bindung der großen ribosomalen Untereinheit an den Präinitiationskomplex am Startkodon inhibiert. So wäre es vorstellbar, daß auch das CCRE sowohl Cap-abhängige als auch Cap-unabhängige Translation regulieren kann.

Was könnte die physiologische Funktion der p27-IRES sein? p27 wird nicht nur in der G₁-Phase proliferierender Zellen, sondern auch in quieszenten Zellen effizient translatiert. Gleichzeitig ist jedoch die Aktivität des Cap-bindenden Komplexes eIF-4F und einhergehend die Proteinsyntheserate in quieszenten Zellen gering (Gingras *et al.*, 1999). Die p27-IRES könnte dazu beitragen, die Expression von p27 trotz der generellen Inhibition der Cap-abhängigen Translation zu induzieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Aktivität der p27-IRES in proliferierenden und kontaktinhibierten Rattenfibroblasten (RAT1-Zellen) mittels bicistronischer Reportergenplasmide gemessen. Dabei wurde keine Aktivierung der p27-IRES in den kontaktinhibierten, quieszenten Fibroblasten festgestellt (Michael Kullmann, persönliche Mitteilung). Anders in einer jüngst erschienen Veröffentlichung von (Miskimins *et al.*, 2001). Die Autoren detektierten eine IRES-Aktivität innerhalb einer 214 nt langen Maus-p27-5'UTR, und die Aktivität dieser IRES wurde mehr als verdoppelt, wenn D6P2T-Ratten-Neurinomzellen durch Behandlung mit Isobutylmethylxanthin arretiert und zur Differenzierung angeregt wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die p27-IRES nicht in jedem Fall aktiviert wird, wenn Zellen in die G₀-Phase übergehen bzw. beginnen, sich zu differenzieren, sondern daß diese Aktivierung vom Zelltypus und von dem antiproliferativen Stimulus abhängt.

Neben der p27-IRES gibt es weitere Beispiele für zelluläre IRES-Elemente, die selektiv unter Bedingungen verminderter Cap-abhängiger Translation aktiv sind. Die mRNAs, die für die Ornithindecaboxylase bzw. die CDK-verwandte Kinase p58^{PITSLRE} kodieren, tragen zellzyklusregulierte IRES-Elemente, die selektiv während der G₂/M-Phase aktiv sind, wobei anzumerken ist, daß die Cap-abhängige Proteinsynthese während der Mitose stark inhibiert ist (Bonneau und Sonenberg, 1987; Pyronnet *et al.*, 2001). Die IRES der *c-sis*-mRNA, die für die B-Untereinheit von PDGF kodiert, wird während der

Differenzierung von K562-Zellen zu Megakaryozyten aktiviert, also ebenfalls in einer Situation, für die eine Inhibition der Cap-abhängigen Translation angenommen werden kann (Sella *et al.*, 1999). Andere IRES-Elemente tragen vermutlich dazu bei, daß die Expression von bestimmten Proteinen unter Stressbedingungen aufrechterhalten werden kann. Zu ihnen gehören z.B. VEGF und das anti-apoptotische Protein XIAP (Holcik *et al.*, 2000). Auch der p27-IRES könnte unter einigen dieser Stressbedingungen, z.B. unter Hypoxie, eine Bedeutung für die Expression von p27 zukommen.

5.1.5 Trans-wirkende Proteinfaktoren bei der zellzyklusregulierten Translation von p27

Es lag nahe zu vermuten, daß trans-wirkende Faktoren an der zellzyklusabhängigen Translationskontrolle von p27 beteiligt sind, seien es allgemeine Translationsinitiationsfaktoren oder spezifische regulatorische Proteine. Zu ihrer Identifizierung und zur Analyse ihres Wirkmechanismus erschien es sinnvoll ein In-Vitro-Translationssystem zu etablieren, mit dem die *in vivo* beobachtete zellzyklusabhängige Translationsregulation unter definierten Bedingungen nachvollzogen werden könnte. Zu diesem Zweck wurden Translationsextrakte aus asynchron proliferierenden, sowie aus lovastatin- bzw. thymidinarretierten HeLa-Zellen hergestellt und zur Translation von *in vitro* synthetisierten Reporter-mRNAs eingesetzt. Die Hoffnung bestand darin, daß eine Reporter-mRNA mit der p27-5'UTR in Extrakten aus lovastatinarretierten Zellen effizienter translatiert würde als in Extrakten aus thymidinarretierten oder proliferierenden Zellen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. Sie könnten z.B. in der Herstellung der Translationsextrakte liegen, bei der es zu Modifikationen von Translationsinitiationsfaktoren kommen kann. So wurde gezeigt, daß bei der hypotonen Lyse von Zellen der Translationsinitiationsfaktor eIF2 phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden kann (Carroll und Lucas-Lenard, 1993). Gleiches wäre auch für andere Proteinfaktoren vorstellbar. Denkbar ist auch, daß ein essentieller Faktor unter den eingesetzten Bedingungen nicht effizient extrahiert wurde. Möglicherweise könnten also durch Variationen der Extraktpräparation Verbesserungen erzielt werden. Ein weiteres Problem könnte darin bestanden haben, daß in diesen Experimenten In-vitro-Transkripte ohne Poly-A-Sequenz am 3'-Ende verwendet wurden. Dies könnte in zweierlei Hinsicht von Bedeutung gewesen sein: 1) Die 5'-Kappe und die Poly-A-

Sequenz einer „normalen“ mRNA stehen durch die Interaktion des Translationsinitiationsfaktors eIF-4G und des Poly-A-Bindeproteins (PABP) physikalisch miteinander in Verbindung und beide Strukturen können synergistisch Translationsinitiation verstärken (Preiss und Hentze, 1999; Sachs, 2000). Sollte diese Interaktion zwischen 5'- und 3'-Ende bei der hier untersuchten Regulation der p27-Translation von Bedeutung sein, könnte die fehlende Poly-A-Sequenz für den negativen Ausgang der Experimente ursächlich sein. 2) Während der Oogenese und der frühen Embryogenese von Metazoen wird die Translation zahlreicher mRNAs durch Verlängerungen und Verkürzungen der Poly-A-Sequenz im Zytoplasma reguliert (Richter, 2000). Allerdings erfolgt diese Regulation primär durch Elemente in der 3'UTR der betreffenden mRNAs. Dies läßt die fehlende Poly-A-Sequenz in dem hier untersuchten Szenario weniger kritisch erscheinen.

Nachdem der Versuch, einen funktionellen Test zur Identifizierung möglicher trans-wirkender Faktoren zu etablieren, nicht erfolgreich war, wurde ein alternativer Weg mit dem gleichen Ziel eingeschlagen. Proteine sollten zunächst aufgrund ihrer Bindung an die CCRE-RNA identifiziert und anschließend auf ihre potentielle Rolle bei der Translation von p27 hin untersucht werden.

Durch Affinitätschromatographie von zytosolischem HeLa-Extrakt an immobilisierter CCRE-RNA wurde eine überschaubare Anzahl von Proteinen angereichert. Die meisten dieser Proteine konnten durch aminoterminaler Peptidsequenzierung oder Massenspektrometrie identifiziert werden. Bei einigen von ihnen erschien eine direkte Funktion bei der Translationsregulation jedoch unwahrscheinlich (schwere Kette von Myosin, Vigilin, Proteinkinase C). Sie wurden daher zunächst nicht näher analysiert. Unter den identifizierten Proteinen waren aber auch Faktoren mit bekannter RNA-Bindeaktivität (eEF-1-alpha-1, hnRNP A1, hnRNP D, Gry-rbp, PTB, Nucleolin). Unter den stringenteren Bedingungen der Northwestern-Hybridisierung und der UV-Quervernetzung zeigten lediglich PTB und Nucleolin eine Interaktion mit der CCRE-RNA. Konkurrenzexperimente wiesen auf eine spezifische Affinität dieser Proteine für die CCRE-RNA hin: Die Bindung von PTB an radioaktiv markierte CCRE-RNA wurde durch einen Überschuß unmarkierter homologer RNA spezifisch kompetiert, während die Wechselwirkung von Nucleolin mit radioaktiv markierter CCRE-RNA durch Zugabe homologer Kompetitor-RNA noch verstärkt wurde. Beide Proteine

wurden daher als potentielle trans-wirkende Proteinfaktoren angesehen und funktionell charakterisiert.

Die Überexpression von PTB in 293T-Zellen reprimierte selektiv die Reporterexpression von Transkripten mit p27-5'UTR. PTB konnte diesen inhibitorischen Einfluß sowohl über den 5'-Bereich (-575 bis -392) als auch über den 3'-Bereich (-356 bis -3) der p27-5'UTR ausüben. Dies wurde als Hinweis gewertet, daß PTB *in vivo* an mindestens zwei Bereiche der p27-5'UTR binden und dabei die Translation eines cis-ständigen ORFs inhibieren kann. Überraschenderweise hatte PTB keinen Einfluß auf ein Konstrukt, das lediglich das CCRE als 5'UTR aufwies, obwohl dieses Element *in vitro* als Interaktionspartner charakterisiert worden war. Die Überexpression von Nucleolin zeigte keinen spezifischen Effekt.

In Western-Blot-Analysen wurde unter den Bedingungen der PTB-Überexpression eine 3- bis 4fache Zunahme der Menge an PTB festgestellt. Die Menge an Nucleolin wurde durch die Überexpression hingegen nur mäßig gesteigert (etwa um den Faktor 1,5), wobei unter den hier eingesetzten Transfektionsbedingungen im allgemeinen zwischen 50 und 100% der Zellen transfiziert werden (Michael Kullmann, persönliche Mitteilung). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Steigerung der ohnehin hohen endogenen Nucleolin-Menge nicht ausreichend war, um sich auf die Reporterexpression auszuwirken. Als Alternative zur Überexpression von Nucleolin könnte die RNAi-Technologie (RNA interference) eingesetzt werden, um die Expression von Nucleolin herabzusetzen. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich die Reduktion der Nucleolin-Expression auf die Reporterexpression von Transkripten mit p27-5'UTR auswirkt.

Die Supplementation von Retikulozytenlysaten mit rekombinantem PTB oder dem RNA-bindenden carboxyterminalen Fragment von Nucleolin hatte in den bisher durchgeführten Experimenten keinen deutlichen Einfluß auf die Translation eines p27-In-Vitro-Transkripts. Eine Optimierung der experimentellen Bedingungen könnte möglicherweise zu eindeutigeren Ergebnissen führen. So könnten die Bedingungen, unter denen die rekombinanten Proteine mit der RNA vorinkubiert werden, variiert werden. Denkbar ist zum Beispiel, daß eine vorherige Hitzedenaturierung der RNA zu einer besseren Zugänglichkeit von Proteinbindestellen führen könnte. Möglicherweise ist auch die Endkonzentrationen beider Komponenten im Translationsansatz eine

kritische Größe. Daneben besteht die Möglichkeit, daß die beiden Proteine nur gemeinsam oder zusammen mit einem weiteren limitierenden Faktor die Translation von p27 in Retikulozytenlysaten beeinflussen können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die bisher bekannten Funktionen und Eigenschaften von PTB lassen eine Funktion des Proteins bei der Translation von p27 plausibel erscheinen.

PTB, das auch als hnRNP I bezeichnet wird, ist ein RNA-bindendes Protein mit vier schwach konservierten RNA-Bindedomänen vom RNP-Typ. Die höchste Affinität besitzt PTB gegenüber dem RNA-Motif UCUU(C), wenn dieses Teil einer pyrimidinreichen Sequenz ist (Perez *et al.*, 1997). Dieses Motiv ist in der CCRE-RNA in Form eines Tandems (UCUUCUUC, -473 bis -466) vorhanden. Die p27-5'UTR (-575 bis -1) ist jedoch über ihre gesamte Länge reich an Oligopyrimidinsequenzen. Insgesamt enthält sie 16 Abschnitte von 5 oder mehr aufeinanderfolgenden Pyrimidinnukleotiden. In Übereinstimmung mit diesen Eigenschaften der RNA-Primärstruktur wurde *in vitro* eine starke, spezifische Bindung von PTB an das CCRE (diese Arbeit) und eine sehr schwache Bindung an die p27-IRES (Michael Kullmann, unveröffentlichte Ergebnisse) nachgewiesen.

PTB wurde zum einen als spezifischer Spleißregulator beschrieben, der für den gewebespezifischen Ausschluß von Exons im Rahmen alternativer Spleißprozesse notwendig ist (Wagner und Garcia-Blanco, 2001). Ferner gibt es Hinweise für eine Beteiligung von PTB bei der translationalen Regulation sowohl viraler als auch zellulärer Gene. So bindet PTB an alle picornavirale IRES-Motive und stimuliert die Translationsinitiation zumindest an einigen dieser RNA-Regionen *in vitro* (Pestova *et al.*, 2001). Auch *in vivo* wurde eine Stimulation picornaviraler (und flaviviraler) IRES-Aktivität beobachtet (Gosert *et al.*, 2000). Footprinting-Analysen zeigten, daß PTB die IRES von EMCV (Enzephalomyocarditis-Virus) an multiplen Stellen bindet (Kolupaeva *et al.*, 1996). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde ein Modell entwickelt, nach dem PTB und andere ITAFs (IRES transacting factors) wie ITAF₄₅, PCBP2 (poly[rC]-binding protein 2) und unr (upstream of N-ras) picornavirale IRES-Elemente in einer Konformation stabilisieren, die die Bindung des ribosomalen 43S-Komplexes und kanonischer Translationsinitiationsfaktoren ermöglicht (Pestova *et al.*, 2001). Dieses Modell könnte auch für zelluläre IRES-Strukturen, beispielsweise die p27-IRES gelten. Besonders interessant ist, daß PTB in Synergie mit unr die Aktivität der

zellulären IRES von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) *in vitro* und *in vivo* steigert (Mitchell *et al.*, 2001).

Die Vermutung liegt nahe, daß PTB ein physiologischer Regulator der p27-IRES sein könnte, wobei es die Rolle eines Aktivators aber auch eines Repressors spielen könnte. Die translationale Repression von p27-5'UTR-Reporterkonstrukten unter den Bedingungen der Überexpression von PTB schließt die erste Möglichkeit nicht aus. PTB hat vier RNA-Bindedomänen. Es wäre daher denkbar, daß bei hohen intrazellulären PTB-Konzentrationen die verschiedenen potentiellen PTB-Bindestellen nicht von einem PTB-Molekül gebunden werden, sondern von mehreren. Dies könnte eine Störung der IRES-Konformation und damit eine Repression der IRES-Aktivität zur Folge haben, die unter physiologischen Bedingungen nicht auftritt.

Neben einer potentiellen Rolle bei der Regulation der p27-IRES ist auch eine Modulation der Cap-abhängigen Translation vorstellbar, sei es, indem PTB die Bindung des 43S-Komplexes an das Cap erleichtert oder erschwert, sei es, indem es eine RNA-Konformation herstellt, die das ribosomale Scanning inhibiert oder erleichtert.

Es erscheint daher aussichtsreich, die potentielle Rolle von PTB bei der Translationsregulation von p27 eingehender zu untersuchen. Der Nachweis einer direkten, selektiven Interaktion von PTB mit der p27-mRNA *in vivo* würde eine unmittelbare Rolle dieses Proteins bei der translationalen Kontrolle von p27 wahrscheinlich machen. Ein solcher Nachweis könnte durch die Detektion von p27-mRNA in anti-PTB Immunpräzipitaten erbracht werden, z.B. durch RT-PCR, „RNase Protection“- oder Northern-Blot-Analyse. Da die intrazelluläre PTB Menge in G₁- bzw. S-Phase-arretierten Zellen gleich ist, kann eine potentielle Rolle von PTB bei der zellzyklusabhängigen Translationskontrolle nicht auf eine Veränderung der Abundanz des Proteins beruhen. Es sind jedoch andere Mechanismen denkbar, die einer translationalen Regulation durch PTB zugrunde liegen könnten. So könnte PTB selbst durch postrtranslationale Modifikationen oder durch wechselnde Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert werden. Dies könnte z.B. dazu führen, daß PTB in den verschiedenen Zellzyklusphasen in wechselndem Umfang an die p27-mRNA bindet. Diese Möglichkeit könnte ebenfalls durch die Analyse von anti-PTB Immunpräzipitaten untersucht werden.

Andere RNA-bindende Proteine sind mit der Translationsregulation von p27 in Verbindung gebracht worden. Millard *et al.* (2000) zeigten durch UV-Crosslink- und EMSA-(electrophoretic mobility shift assay-)Analysen, daß die RNA-bindenden Proteine HuR, hnRNP C1 und hnRNP C2 an eine U-reiche Sequenz etwa 40 nt stromaufwärts des p27-ORFs binden, die für die effiziente Translation von Reporter-mRNAs notwendig ist. Da diese Region mit der p27-IRES überlappt, liegt die Vermutung nahe, daß die genannten Proteinfaktoren für die IRES-Funktion von Bedeutung sein könnten. Dies gilt insbesondere für hnRNP C, da dieses Protein an die IRES der *c-sis*-mRNA bindet. Interessanterweise tritt die IRES-Bindeaktivität von hnRNP C verstärkt in der Ribosomenfraktion (ribosomal salt wash fraction) von K562-Zellen auf, wenn diese zu Megakaryozyten differenzieren und die IRES der PDGF2-mRNA dabei aktiviert wird (Sella *et al.*, 1999). Da auch die p27-IRES der Maus im Rahmen eines Differenzierungsprozesses aktiviert werden kann (Miskimins *et al.*, 2001), liegt die Vermutung nahe, daß hnRNP C auch hier eine Rolle spielen könnte.

Durch Hybridisierung von Protein-Filterarrays mit radioaktiv markierter p27-5'UTR wurde eine Reihe weiterer interessanter RNA-bindender Proteine identifiziert, die als potentielle trans-wirkende Faktoren an der translationalen Regulation von p27 beteiligt sein könnten (Michael Kullmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise wird die Translation von p27 in den verschiedenen Szenarien von Proliferation, Wachstumsarrest und Differenzierung durch ein komplexes Netzwerk von RNA-Protein-Interaktionen reguliert. Es bleibt eine große Herausforderung für die Zukunft, diese Prozesse *in vitro* in einem zellfreien Translationssystem nachzuempfinden, um schließlich die molekularen Mechanismen, die ihnen zugrunde liegen, aufzuklären.

5.1.6 Die Translationale Regulation von p27 im Kontext des G₁/S- und des G₁/G₀-Überganges

Die Abnahme der intrazellulären p27-Menge in der späten G₁-Phase ist das Ergebnis einer verminderten Translation der p27-mRNA und eines beschleunigten ubiquitinabhängigen Abbaus des p27-Proteins. Die Halbwertszeit von p27, gemessen an arretierten HeLa-Zellen, nimmt in diesem Zeitraum von 2,5 h auf weniger als 0,5 h ab, und die Translationseffizienz der p27-mRNA sinkt um mindestens den gleichen Faktor (Hengst und Reed, 1996). Die Abnahme der p27-Menge geht mit der Aktivierung von Cyclin E/CDK2 einher, und diese Aktivierung ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt beim Übergang der Zelle von der G₁- in die S-Phase (Dulic *et al.*, 1992; Ohtsubo *et al.*, 1995; Resnitzky *et al.*, 1994).

Welche relative Bedeutung kommt nun den beiden Mechanismen bei der Regulation des G₁/S-Überganges zu und könnten sie eventuell miteinander in Beziehung stehen? Die Phosphorylierung von p27 an T187 durch CDK2 ist notwendig für die Ubiquitinierung und den raschen Abbau von p27 in der späten G₁-, der S- und G₂-Phase (Malek *et al.*, 2001; Montagnoli *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995; Sheaff *et al.*, 1997). Das Auftreten aktiver CDK2 setzt jedoch die vorherige Reduktion der p27-Menge bzw. die Inaktivierung von p27 voraus. Diese Überlegung läßt ein Modell plausibel erscheinen, demzufolge eine Verminderung der Translationsrate in der späten G₁-Phase dazu führt, das eine gewisse Menge freier, aktiver Cyclin E/CDK2-Komplexe auftritt, die anschließend p27 an T187 phosphorylieren und dadurch in Form einer positiven Rückkopplung die p27-Menge weiter vermindern (Abbildung 5.2). Die Präsenz aktiver CDK2 würde die Reakkumulation von p27 in der S- und G₂-Phase auch dann verhindern, wenn die Translation von p27 durch antiproliferative Signale in diesem Zeitraum stimuliert würde. Diesem Modell zufolge könnte die Verminderung der Translationsrate von p27 in der späten G₁-Phase das Ereignis sein, das für die Überschreitung des Restriktionspunktes ursächlich ist und die Zelle für den weiteren Verlauf des Zellzyklus mitogenunabhängig macht.

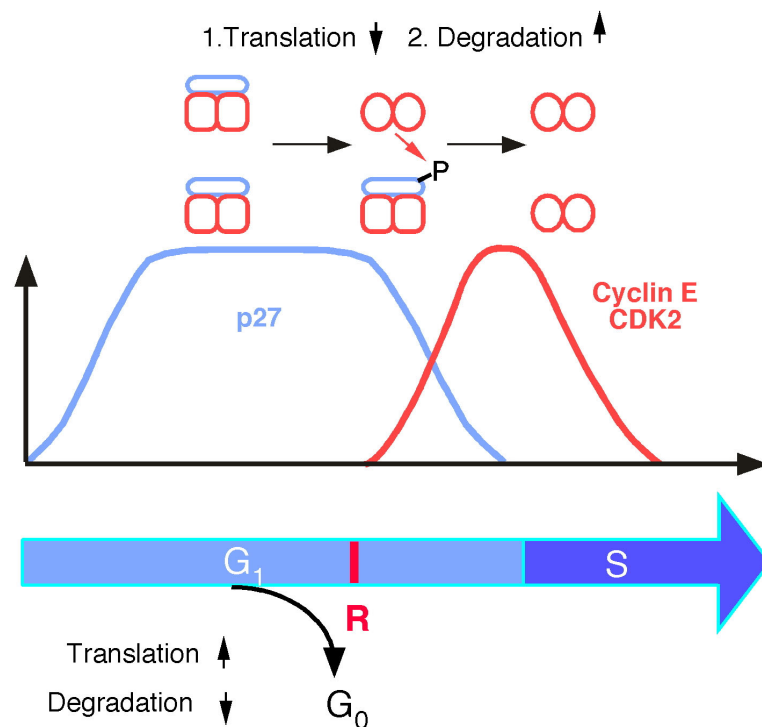


Abbildung 5.2: Modell zur translationalen Regulation von p27 im Kontext des G_1/S - und des G_1/G_0 -Überganges

Durch die Verminderung der Translation von p27 (blau) in der späten G_1 -Phase wird ein Teil der Cyclin E/CDK2-Komplexe (rot) aktiv. Die aktiven Cyclin E/CDK2-Komplexe phosphorylieren das restliche p27 und induzieren dadurch seinen raschen Abbau. Dies führt zu einer weiteren Verstärkung der Cyclin E/CDK2-Aktivität und zum Übergang in die S-Phase. Die Verminderung der Translation könnte für die Überschreitung des Restriktionspunktes (R) entscheidend sein. Aufgrund antiproliferativer Signale während der frühen und mittleren G_1 -Phase geht die Zelle in die G_0 -Phase (Quieszenz) über und es kommt zu einer verstärkten Translation und einem verminderten Abbau von p27.

Die Expression von p27 in der G_1 -Phase trägt also dazu bei, daß ein Zeitfenster entsteht, innerhalb dessen die Zelle auf pro- und antiproliferative Stimuli reagieren kann. Antiproliferative Signale führen dazu, daß die Degradation von p27 unabhängig von der Phosphorylierung an T187 weiter inhibiert wird (Hara *et al.*, 2001; Malek *et al.*, 2001). Zusammen mit einer nochmals verstärkten Translation der p27-mRNA (Agrawal *et al.*, 1996; Hengst und Reed, 1996; Millard *et al.*, 1997) führt dies zu einer starken Akkumulation von p27 und damit einhergehend zum Übergang in die G_0 -Phase (Abbildung 5.2). Die hohe p27-Menge in ruhenden Zellen kann dann als Puffer dienen, der die Rückkehr in die G_1 -Phase und die Überschreitung des Restriktionspunktes erst dann erlaubt, wenn genügend wachstumsstimulierende Signale auf die Zelle eingewirkt haben.

5.2 Phosphoisoformen von p21^{Cip1} als Inhibitoren von Cyclin A/CDK2

Für das Verständnis der Funktion von CDK-Inhibitoren ist es von großer Bedeutung, die Stöchiometrie zu kennen, in der die Proteine Cyclin/CDK-Komplexe inhibieren. Der Nachweis katalytisch aktiver Cyclin/CDK-Komplexe in anti-p21 Immunpräzipitaten, führte zu einem Modell, demzufolge Cyclin/CDK-Komplexe, die nur mit einem p21-Molekül assoziiert sind, aktiv bleiben, und erst durch die Bindung von mehr als einem p21-Molekül inhibiert werden (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Hengst *et al.* (1998) konnten jedoch zeigen, daß ein Molekül rekombinantes p21 ausreicht, den Komplex aus Cyclin A und CDK2 zu inhibieren. Aufgrund verschiedener Hinweise wurde vermutet, daß p21 durch Cyclin/CDK-Komplexe *in vivo* phosphoryliert und dadurch in seiner Fähigkeit, die Kinase-Komplexe zu binden und zu inhibieren, beeinträchtigt werden könnte.

In dieser Arbeit konnte p21 durch Cyclin A/CDK2 *in vitro* zu drei Phosphoisoformen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit umgesetzt werden. Unter optimierten Inkubationsbedingungen wurde p21 zum überwiegenden Teil in die beiden Isoformen β und γ mit der geringsten elektrophoretischen Beweglichkeit überführt, wobei gleichzeitig eine Abnahme der Phosphoisoform α mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität zu beobachten war. α und β enthielten daher vermutlich mehr als einen Phosphatrest. Es konnte weiter gezeigt werden, daß diese p21-Phosphoisoformen als Monomere Cyclin A/CDK2 binden und inhibieren.

Die Beobachtung, daß p21 *in vitro* von Cyclin A/CDK2 phosphoryliert wird, führt natürlich zu der Frage, ob diese Phosphorylierung auch *in vivo* auftritt und was ihre Funktion sein könnte.

Da p21 in denaturierten Gesamtzelllysaten, bei deren Präparation eine Dephosphorylierung nahezu ausgeschlossen ist, als singuläre Proteinbande detektiert wird, kann nur ein kleiner Teil des endogenen p21 auf diese Art phosphoryliert sein. Eine denkbare Ursache dafür könnte darin bestehen, daß die Phosphorylierung durch eine Phosphatase rasch wieder entfernt wird. Dies kann leicht überprüft werden, indem man Zellen mit Phosphatase-Inhibitoren behandelt. Möglicherweise würde dies zu einer detektierbaren Akkumulation von p21-Phosphoisoformen führen.

Um der Frage nach der Funktion der Phosphorylierung nachzugehen, müßten zunächst die Cyclin A/CDK2-Phosphorylierungsstellen in der Primärstruktur von p21 identifiziert werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei ihnen um T57, S98 und S130. Diesen Aminosäureresten folgt jeweils ein Prolinrest, so daß sie in dem minimalen Sequenzkontext vorliegen, der für die Phosphorylierung durch CDKs notwendig ist (Holmes und Solomon, 1996). Um diese Hypothese zu überprüfen wurde bereits eine Mutante hergestellt, bei der alle drei Aminosäurereste durch Alanin ersetzt wurden. Diese Mutante könnte rekombinant exprimiert oder *in vitro* translatiert werden, um dann auf ihre Phosphorylierbarkeit mit Cyclin A/CDK2 hin untersucht zu werden. Nach Identifizierung der Phosphorylierungsstellen könnte die entsprechende nichtphosphorylierbare Mutante *in vitro* und *in vivo* mit dem unmutierten Protein verglichen werden.

Da der ubiquitinabhängige Abbau von p27 am G₁/S-Übergang von Cyclin E/CDK2 durch Phosphorylierung induziert wird, liegt die Vermutung nahe, daß auch die Phosphorylierung von p21 durch Cyclin A/CDK2 die Stabilität des Proteins verändern könnte. Diese Hypothese könnte überprüft werden, indem man die nichtphosphorylierbare Mutante und das Wildtyp-Protein jeweils als Fusionsprotein mit einer Erkennungssequenz („tag“) in Gewebekulturzellen exprimiert und durch „Pulse-chase“-Markierung auf ihre Stabilität hin untersucht. Andere Beobachtungen lassen einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von p21 durch CDKs einerseits und der intrazellulären Lokalisation und Funktion andererseits möglich erscheinen: p21 besitzt ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) in seiner carboxyterminalen Domäne, und seine Fähigkeit die Zellproliferation zu inhibieren ist an die Lokalisation im Kern gebunden (Goubin und Ducommun, 1995; Sherr und Roberts, 1995). Daneben besitzt p21 auch zwei Kernexportsignale, und die gemeinhin nukleäre Lokalisation des Inhibitors ist das Ergebnis eines kontinuierlichen Kernimports und Kernexports (Raffaella Lupetti, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Phosphorylierung von p21 durch aktive Cyclin A/CDK2- oder Cyclin E/CDK2-Komplexe - beide Komplexe sind im Kern lokalisiert - könnte zu einem beschleunigten Kernexport führen und dadurch den Inhibitor teilweise oder vollständig ins Zytoplasma verlagern. Dadurch würde der Inhibitor von seinen Zielenzymen räumlich getrennt und in seinem inhibitorischen Potential abgeschwächt werden. Dies würde eine positive Rückkopplung bedeuten, die zu einer Verstärkung der CDK2-Aktivität führt.

Der Effekt einer potentiellen Phosphorylierung von p21 durch CDK2 auf den nukleozytoplasmatischen Transport von p21 kann anhand von Fusionsproteinen mit GFP (green fluorescent protein) *in vivo* getestet werden. Erste Versuche in diese Richtung mit vielversprechenden Ergebnissen sind bereits unternommen worden (Raffaella Lupetti und Ansgar Resch, unveröffentlichte Ergebnisse).

Translokationen von CDK-Inhibitoren ins Zytoplasma sind bereits beobachtet und in einen funktionellen Zusammenhang gestellt worden.

Ein Teil des kernständigen p27 wird nach Serumstimulation von ruhenden RAT1-Zellen (Rattenfibroblasten) ins Zytoplasma verlagert, und es wurde vorgeschlagen, daß damit eine Stimulierung der Cyclin/CDK2-Komplexe im Kern verbunden ist. Für diese Translokation ist die Phosphorylierung des Serinrestes S10 notwendig (Rodier *et al.*, 2001). In einer jüngst veröffentlichten Untersuchung wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung von p21 durch die Kinase Akt an einem Threoninrest (T145) im Bereich des Kernlokalisationssignals zur Translokation des Proteins ins Zytoplasma und zu einer Verminderung seiner antiproliferativen Wirkung führt. Dieser Mechanismus könnte in die onkogene Aktivität von Akt involviert sein (Zhou *et al.*, 2001). Bei der Differenzierung von myelomonocytyischen U937-Zellen zu Monozyten nimmt p21 ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation ein, und es wurde vorgeschlagen, daß die damit einhergehende Resistenz gegen Apoptose-induzierende Stimuli auf eine direkte Assoziation von zytoplasmatischem p21 mit der apoptosis-signal-regulating kinase 1 (ASK1) zurückzuführen sei (Asada *et al.*, 1999).

Die Veränderung der intrazelluläre Lokalisation von CDK-Inhibitoren stellt offenbar eine weitere Ebene der CDK-Regulation dar. Phosphorylierungen der CDK-Inhibitoren spielen möglicherweise hierbei eine wichtige Rolle, und es erscheint sehr aussichtsreich, diese Zusammenhänge weiter zu untersuchen.

6 Literatur

- Adams, P.D. (2001) Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta*, **1471**, M123-133.
- Agrawal, D., Hauser, P., McPherson, F., Dong, F., Garcia, A. und Pledger, W.J. (1996) Repression of p27kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 4327-4336.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. und Mizutani, S. (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J*, **18**, 1223-1234.
- Bartek, J., Bartkova, J. und Lukas, J. (1996) The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 805-814.
- Belsham, G.J., und Jackson, R.J. (2000) Translational initiation on picornavirus RNA (2000). In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 869-900.
- Blain, S.W., Montalvo, E. und Massague, J. (1997) Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem*, **272**, 25863-25872.
- Blomberg, I. und Hoffmann, I. (1999) Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **19**, 6183-6194.
- Bonneau, A.M. und Sonenberg, N. (1987) Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem*, **262**, 11134-11139.
- Brandeis, M. und Hunt, T. (1996) The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *Embo J*, **15**, 5280-5289.
- Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archer, S.J., Serrano, M., Brenner, S.L., Blundell, T.L. und Laue, E.D. (1998) Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature*, **395**, 244-250.
- Brown, J.P., Wei, W. und Sedivy, J.M. (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, **277**, 831-834.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. und Hannon, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, **377**, 552-557.
- Carnero, A. und Hannon, G.J. (1998) The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 43-55.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. und Pagano, M. (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, **1**, 193-199.
- Carroll, R. und Lucas-Lenard, J. (1993) Preparation of a cell-free translation system with minimal loss of initiation factor eIF-2/eIF-2B activity. *Anal Biochem*, **212**, 17-23.
- Chellappan, S.P., Giordano, A. und Fisher, P.B. (1998) Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 57-103.

- Chen, P. und Segil, N. (1999) p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development*, **126**, 1581-1590.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M. und Sherr, C.J. (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J*, **18**, 1571-1583.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M. und Roberts, J.M. (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev*, **10**, 1979-1990.
- Coats, S., Flanagan, W.M., Nourse, J. und Roberts, J.M. (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, **272**, 877-880.
- Coats, S., Whyte, P., Fero, M.L., Lacy, S., Chung, G., Randel, E., Firpo, E. und Roberts, J.M. (1999) A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. *Curr Biol*, **9**, 163-173.
- Coldwell, M.J., Mitchell, S.A., Stoneley, M., MacFarlane, M. und Willis, A.E. (2000) Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene*, **19**, 899-905.
- Coleman, J., Hawkinson, M., Miskimins, R. und Miskimins, W.K. (2001) The major transcription initiation site of the p27Kip1 gene is conserved in human and mouse and produces a long 5'-UTR. *BMC Mol Biol*, **2**, 12.
- Current Protocols in Cell Biology* (2000) Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. und Yamada, K.M. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Current Protocols in Molecular Biology* (1994-1998) Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Current Protocols in Protein Science* (1995-1997) Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. und Wingfield, P.T. (Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc..
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. und Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.
- Denhardt, D.T. (1999) In Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. und Denhardt, D.T. (Hrsg.), *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. Wiley & Sons Inc., 225-304.
- Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P.K. und Dotto, G.P. (1998) Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science*, **280**, 1069-1072.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**, 3499-3511.
- Diehl, J.A., Zindy, F. und Sherr, C.J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **11**, 957-972.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-1489.
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. und Beach, D. (1989) Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, **56**, 829-838.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. und Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase

- activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.
- Dulic, V., Lees, E. und Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**, 1958-1961.
- Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. und Reed, S.I. (1998) Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol*, **18**, 546-557.
- Ekholm, S.V. und Reed, S.I. (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 676-684.
- Ekholm, S.V., Zickert, P., Reed, S.I. und Zetterberg, A. (2001) Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol*, **21**, 3256-3265.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. und et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, **54**, 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R. und et al. (1995) Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*, **55**, 2910-2919.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M. und Kemp, C.J. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, **396**, 177-180.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K. und Roberts, J.M. (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, **85**, 733-744.
- Furuno, N., den Elzen, N. und Pines, J. (1999) Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol*, **147**, 295-306.
- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L. und Dang, C.V. (2000) Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem*, in press.
- Gartel, A.L., Serfas, M.S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G.S., el-Deiry, W.S. und Tyner, A.L. (1996) p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res*, **227**, 171-181.
- Gartel, A.L. und Tyner, A.L. (1999) Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, **246**, 280-289.
- Geballe, A.P. und Sachs, M.S. (2000) Translational control by upstream open reading frames. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 595-614.
- Gingras, A.-C., Raught, B. und Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, **68**, 913-963.
- Gingras, A.C., Raught, B. und Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, **15**, 807-826.

- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. und Lamb, N.J. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, **67**, 1169-1179.
- Gorospe, M., Wang, X. und Holbrook, N.J. (1998) p53-dependent elevation of p21Waf1 expression by UV light is mediated through mRNA stabilization and involves a vanadate-sensitive regulatory system. *Mol Cell Biol*, **18**, 1400-1407.
- Gosert, R., Chang, K.H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D.V. und Lemon, S.M. (2000) Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites In vivo. *Mol Cell Biol*, **20**, 1583-1595.
- Goubin, F. und Ducommun, B. (1995) Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene*, **10**, 2281-2287.
- Gray, N.K. und Wickens, M. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 399-458.
- Gu, Y., Turck, C.W. und Morgan, D.O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, **366**, 707-710.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F.H., Olsen, L.C. und Ephrussi, A. (1998) Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev*, **12**, 1652-1664.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C. und Walsh, K. (1995) MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol*, **15**, 3823-3829.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K. und Pines, J. (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, **9**, 680-689.
- Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D. und Lassar, A.B. (1995) Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, **267**, 1018-1021.
- Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K. und Hatakeyama, S. (2001) Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem*, **276**, 48937-48943.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. und Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, **98**, 859-869.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. und et al. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*, **6**, 387-400.
- Hartwell, L.H. und Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.
- Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J.M., Lees, E. und Reed, S.I. (1994) A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5291-5295.
- Hengst, L., Göpfert, U., Lashuel, H.A. und Reed, S.I. (1998) Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes Dev*, **12**, 3882-3888.
- Hengst, L. und Reed, S.I. (1996) Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, **271**, 1861-1864.
- Hengst, L. und Reed, S.I. (1998) Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**, 25-41.

- Hershey, J.W.B. und Merrick, W.C. (2000) The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 33-88.
- Hirama, T. und Koeffler, H.P. (1995) Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, **86**, 841-854.
- Holcik, M., Sonenberg, N. und Korneluk, R.G. (2000) Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet*, **16**, 469-473.
- Holmes, J.K. und Solomon, M.J. (1996) A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. *J Biol Chem*, **271**, 25240-25246.
- Howard, A. und Pelc, S.R. (1951) Nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res*, **2**, 178-187.
- Inoue, T., Kamiyama, J. und Sakai, T. (1999) Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem*, **274**, 32309-32317.
- Isoherranen, K., Westermarck, J., Kahari, V.M., Jansen, C. und Punnonen, K. (1998) Differential regulation of the AP-1 family members by UV irradiation in vitro and in vivo. *Cell Signal*, **10**, 191-195.
- Ito, E., Iwahashi, Y., Yanagisawa, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Yuasa, Y. und Maruyama, K. (1999) Two short sequences have positive effects on the human p27Kip1 gene transcription. *Gene*, **228**, 93-100.
- Jackson, R.J. (2000) A comparative view of initiation site selection mechanisms. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 127-183.
- Kaldis, P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 284-296.
- Kaldis, P., Russo, A.A., Chou, H.S., Pavletich, N.P. und Solomon, M.J. (1998) Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell*, **9**, 2545-2560.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. und Sherr, C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, **91**, 649-659.
- Kamiyama, J., Inoue, T., Ohtani-Fujita, N., Minami, S., Yamagishi, H. und Sakai, T. (1999) The ubiquitous transcription factor NF-Y positively regulates the transcription of human p27Kip1 through a CCAAT box located in the 5-upstream region of the p27Kip1 gene. *FEBS Lett*, **455**, 281-285.
- Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, C.W., Park, D., Spirin, K.S., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., Wilczynski, S. und et al. (1995) Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res*, **55**, 2266-2269.
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V. und Pardee, A.B. (1991) Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*, **51**, 3602-3609.
- Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. und Koff, A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, **85**, 721-732.

- Knoblich, J.A. und Lehner, C.F. (1993) Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J*, **12**, 65-74.
- Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*, **294**, 173-177.
- Kolupaeva, V.G., Hellen, C.U. und Shatsky, I.N. (1996) Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *Rna*, **2**, 1199-1212.
- Kozak, M. (1986) Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2850-2854.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8125-8148.
- Kozak, M. (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol*, **9**, 5134-5142.
- Kozak, M. (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol*, **115**, 887-903.
- Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, **234**, 187-208.
- Kwon, T.K., Nagel, J.E., Buchholz, M.A. und Nordin, A.A. (1996) Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene*, **180**, 113-120.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A. und Harlow, E. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, **11**, 847-862.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landers, J.E., Cassel, S.L. und George, D.L. (1997) Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res*, **57**, 3562-3568.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I. und Massague, J. (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, **9**, 639-649.
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. und Soares, M.B. (1996) The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics*, **33**, 151-152.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Li, J., Meyer, A.N. und Donoghue, D.J. (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 502-507.
- Li, X.S., Rishi, A.K., Shao, Z.M., Dawson, M.I., Jong, L., Shroot, B., Reichert, U., Ordonez, J. und Fontana, J.A. (1996) Posttranscriptional regulation of p21WAF1/CIP1 expression in human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, **56**, 5055-5062.
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. und Xiong, Y. (1994) Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, **9**, 2261-2268.

- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M. und Freedman, L.P. (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*, **10**, 142-153.
- Lowenheim, H., Furness, D.N., Kil, J., Zinn, C., Gultig, K., Fero, M.L., Frost, D., Gummer, A.W., Roberts, J.M., Rubel, E.W., Hackney, C.M. und Zenner, H.P. (1999) Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4084-4088.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M. und DeCarprio, J.A. (1993) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 367-372.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M. und DeCaprio, J.A. (1990) The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell*, **60**, 387-396.
- Lukas, C., Sorensen, C.S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J.M., Bartek, J. und Lukas, J. (1999) Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature*, **401**, 815-818.
- Lundberg, A.S., Hahn, W.C., Gupta, P. und Weinberg, R.A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 705-709.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. und Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**, 463-473.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. und Jacks, T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev*, **9**, 935-944.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. und Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-1429.
- Malek, N.P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T.R., Roberts, J.M. und Kyriakidis, T.R. (2001) A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, **413**, 323-327.
- Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P. und Serrano, M. (2001) Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res*, **61**, 6234-6238.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. und Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-940.
- Mathews, M.B., Sonenberg, N. und Hershey, J.W.B. (2000) Origins and principles of translational control. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1-31.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*, **9**, 650-662.
- Matsuoka, S., Thompson, J.S., Edwards, M.C., Bartletta, J.M., Grundy, P., Kalikin, L.M., Harper, J.W., Elledge, S.J. und Feinberg, A.P. (1996) Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3026-3030.
- Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, **71**, 323-334.

- Millard, S.S., Vidal, A., Markus, M. und Koff, A. (2000) A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol*, **20**, 5947-5959.
- Millard, S.S., Yan, J.S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H. und Koff, A. (1997) Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem*, **272**, 7093-7098.
- Minami, S., Ohtani-Fujita, N., Igata, E., Tamaki, T. und Sakai, T. (1997) Molecular cloning and characterization of the human p27Kip1 gene promoter. *FEBS Lett*, **411**, 1-6.
- Miskimins, W.K., Wang, G., Hawkinson, M. und Miskimins, R. (2001) Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol*, **21**, 4960-4967.
- Mitchell, S.A., Brown, E.C., Coldwell, M.J., Jackson, R.J. und Willis, A.E. (2001) Protein factor requirements of the Apaf-1 internal ribosome entry segment: roles of polypyrimidine tract binding protein and upstream of N-ras. *Mol Cell Biol*, **21**, 3364-3374.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A. und Pagano, M. (1999) Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev*, **13**, 1181-1189.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-291.
- Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R. und Yasuda, H. (2000) Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 1093-1096.
- Morosetti, R., Kawamata, N., Gombart, A.F., Miller, C.W., Hatta, Y., Hiramata, T., Said, J.W., Tomonaga, M. und Koeffler, H.P. (1995) Alterations of the p27KIP1 gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, **86**, 1924-1930.
- Morris, D.R. und Geballe, A.P. (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation [In Process Citation]. *Mol Cell Biol*, **20**, 8635-8642.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. und Hentze, M.W. (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*, **2**, 383-388.
- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsichlis, P.N. und Rosen, N. (1998) Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 29864-29872.
- Müller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W. und Eilers, M. (1997) Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene*, **15**, 2561-2576.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I. und Loh, D.Y. (1996) Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, **85**, 707-720.
- Nguyen, H., Gitig, D.M. und Koff, A. (1999) Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol*, **19**, 1190-1201.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. und Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, **211**, 90-98.

- O'Hagan, R.C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I.M., Alt, F.W., Kaelin, W.G., Jr. und DePinho, R.A. (2000) Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev*, **14**, 2185-2191.
- Oelgeschlager, T. (2002) Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol*, **190**, 160-169.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. und Pagano, M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, **15**, 2612-2624.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N. und Hentze, M.W. (2001) Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, **104**, 281-290.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M. und Hentze, M.W. (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, **89**, 597-606.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. und Draetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*, **11**, 961-971.
- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. und Rolfe, M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, **269**, 682-685.
- Pantoja, C. und Serrano, M. (1999) Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*, **18**, 4974-4982.
- Paraskeva, E., Gray, N.K., Schlager, B., Wehr, K. und Hentze, M.W. (1999) Ribosomal pausing and scanning arrest as mechanisms of translational regulation from cap-distal iron-responsive elements. *Mol Cell Biol*, **19**, 807-816.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-608.
- Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1995) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, **267**, 1024-1027.
- Passegue, E. und Wagner, E.F. (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J*, **19**, 2969-2979.
- Patton, E.E., Willems, A.R. und Tyers, M. (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet*, **14**, 236-243.
- Pavey, S., Conroy, S., Russell, T. und Gabrielli, B. (1999) Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res*, **59**, 4185-4189.
- Perez, I., Lin, C.H., McAfee, J.G. und Patton, J.G. (1997) Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *Rna*, **3**, 764-778.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. und Hellen, C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7029-7036.
- Pietenpol, J.A., Bohlander, S.K., Sato, Y., Papadopoulos, N., Liu, B., Friedman, C., Trask, B.J., Roberts, J.M., Kinzler, K.W., Rowley, J.D. und et al. (1995) Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res*, **55**, 1206-1210.
- Piette, J., Neel, H. und Marechal, V. (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, **15**, 1001-1010.

- Pines, J. und Hunter, T. (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, **346**, 760-763.
- Pines, J. und Rieder, C.L. (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol*, **3**, E3-6.
- Planas-Silva, M.D. und Weinberg, R.A. (1997) The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 768-772.
- Pollice, A., Zibella, M.P., Bilaud, T., Laroche, T., Pulitzer, J.F. und Gilson, E. (2000) In vitro binding of nucleolin to double-stranded telomeric DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 909-915.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. und Massague, J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- Ponten, F., Berne, B., Ren, Z.P., Nister, M. und Ponten, J. (1995) Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol*, **105**, 402-406.
- Preiss, T. und Hentze, M.W. (1999) From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 515-521.
- Puri, P.L., MacLachlan, T.K., Levrero, M. und Giordano, A. (1999) In Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A. und Denhardt, D.T. (Hrsg.), *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. Wiley & Sons Inc., 15-79.
- Pyronnet, S., Dostie, J. und Sonenberg, N. (2001) Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev*, **15**, 2083-2093.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*, **7**, 1559-1571.
- Raught, B., Gingras, A.-C. und Sonenberg, N. (2000) Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 245-293.
- Reed, S.I. (1997) Control of the G1/S transition. *Cancer Surv*, **29**, 7-23.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und Reed, S.I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, **14**, 1669-1679.
- Resnitzky, D., Hengst, L. und Reed, S.I. (1995) Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol*, **15**, 4347-4352.
- Resnitzky, D. und Reed, S.I. (1995) Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol*, **15**, 3463-3469.
- Richter, J.D. (2000) Influence of polyadenylation-induced translation on metazoan development and neuronal synaptic function. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1-31.
- Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J. und Pouyssegur, J. (1996) Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem*, **271**, 18337-18341.
- Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G.F., Pagano, M. und 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.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. und Pavletich, N.P. (1996a) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, **382**, 325-331.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D. und Pavletich, N.P. (1996b) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, **3**, 696-700.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D. und Pavletich, N.P. (1998) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature*, **395**, 237-243.
- Sachs, A. (2000) Physical and functional interactions between the mRNA Cap structure and the Poly(A) tail. In Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. und Mathews, M.B. (Hrsg.), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 447-465.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, I. und Dynlacht, B.D. (1996) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 318-324.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sella, O., Gerlitz, G., Le, S.Y. und Elroy-Stein, O. (1999) Differentiation-induced internal translation of c-sis mRNA: analysis of the cis elements and their differentiation-linked binding to the hnRNP C protein. *Mol Cell Biol*, **19**, 5429-5440.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. und Massague, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*, **3**, 400-408.
- Serin, G., Joseph, G., Ghisolfi, L., Bauzan, M., Erard, M., Amalric, F. und Bouvet, P. (1997) Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem*, **272**, 13109-13116.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. und DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, **85**, 27-37.
- Servant, M.J., Coulombe, P., Turgeon, B. und Meloche, S. (2000) Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol*, **148**, 543-556.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. und Clurman, B.E. (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*, **11**, 1464-1478.
- Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**, 1059-1065.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.
- Sherr, C.J. und Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, **9**, 1149-1163.
- Sherr, C.J. und Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Singer, J.D., Gurian-West, M., Clurman, B. und Roberts, J.M. (1999) Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev*, **13**, 2375-2387.
- Slingerland, J. und Pagano, M. (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, **183**, 10-17.

- Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.R. und Reed, S.I. (1994) A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 3683-3694.
- Sonenberg, N. und Gingras, A.C. (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 268-275.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martin, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M. und Barbacid, M. (2001) Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *Embo J*, **20**, 6637-6647.
- Spirin, K.S., Simpson, J.F., Takeuchi, S., Kawamata, N., Miller, C.W. und Koeffler, H.P. (1996) p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res*, **56**, 2400-2404.
- Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A.P., Ryan, A., Krek, T.W. und Reed, S.I. (2001) A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell*, **7**, 639-650.
- Srivastava, M. und Pollard, H.B. (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J*, **13**, 1911-1922.
- Steel, L.F., Telly, D.L., Leonard, J., Rice, B.A., Monks, B. und Sawicki, J.A. (1996) Elements in the murine c-mos messenger RNA 5'-untranslated region repress translation of downstream coding sequences. *Cell Growth Differ*, **7**, 1415-1424.
- Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A. und Willis, A.E. (1998) C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, **16**, 423-428.
- Stoneley, M., Subkhankulova, T., Le Quesne, J.P., Coldwell, M.J., Jopling, C.L., Belsham, G.J. und Willis, A.E. (2000) Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res*, **28**, 687-694.
- Strohmaier, H., Spruck, C.H., Kaiser, P., Won, K.A., Sangfelt, O. und Reed, S.I. (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*, **413**, 316-322.
- Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. und Krek, W. (1999) p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 207-214.
- Takizawa, C.G. und Morgan, D.O. (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 658-665.
- Takuwa, N., Fukui, Y. und Takuwa, Y. (1999) Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19**, 1346-1358.
- Tautz, D. und Renz, M. (1983) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem*, **132**, 14-19.
- Taylor, G.S., Liu, Y., Baskerville, C. und Charbonneau, H. (1997) The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *J Biol Chem*, **272**, 24054-24063.
- Thompson, S.R. und Sarnow, P. (2000) Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 366-370.
- Toyoshima, H. und Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**, 67-74.
- Tsai, L.H., Harlow, E. und Meyerson, M. (1991) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, **353**, 174-177.

- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H. und Zhang, H. (1999) p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol*, **9**, 661-664.
- Tyers, M. und Jorgensen, P. (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 54-64.
- Vidal, A. und Koff, A. (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, **247**, 1-15.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. und Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.
- Vlach, J., Hennecke, S. und Amati, B. (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J*, **16**, 5334-5344.
- Wagner, E.J. und Garcia-Blanco, M.A. (2001) Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol*, **21**, 3281-3288.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N. und Gorospe, M. (2000) HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*, **20**, 760-769.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Weinert, T. (1997) Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv*, **29**, 109-132.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. und Chasin, L. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1373-1376.
- Willis, A.E. (1999) Translational control of growth factor and proto-oncogene expression. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 73-86.
- Won, K.A. und Reed, S.I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J*, **15**, 4182-4193.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. und Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704.
- Yan, Y., Frisen, J., Lee, M.H., Massague, J. und Barbacid, M. (1997) Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev*, **11**, 973-983.
- Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A. und Kornbluth, S. (1998) Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev*, **12**, 2131-2143.
- Zachariae, W. und Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zhang, H., Hannon, G.J. und Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*, **8**, 1750-1758.
- Zhang, H., Xiong, Y. und Beach, D. (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell*, **4**, 897-906.
- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W. und Dean, D.C. (2000) Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*, **101**, 79-89.
- Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A. und Elledge, S.J. (1997) Altered cell differentiation

- and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, **387**, 151-158.
- Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1999) p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev*, **13**, 213-224.
- Zhang, Y. und Lin, S.C. (1997) Molecular characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoter. *Biochim Biophys Acta*, **1353**, 307-317.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. und Hung, M.C. (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 245-252.
- Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M. und McIntosh, J.R. (1980) Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res*, **126**, 397-405.
- Zuker, M., Mathews, D.H. und Turner, D.H. (1999) Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. In Barciszewski, J. und Clark, B.F.C. (Hrsg.) *RNA Biochemistry and Biotechnology*. NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, 11-43.

7 Anhang

7.1 DNA- und RNA-Sequenzen

7.1.1 p27-cDNA (-575 - 1941)

Die Sequenz der humanen p27-cDNA aus Brustdrüsengewebe ist unterstrichen. Die 5'-Enden der cDNA-Fragmente, die durch 5'RACE erhalten wurden, sind mit Pfeilen markiert.

```

-575  ▼ CCACCTTAAG GCCGCGCTCG CCAGCCTCGG CGGGGCGGCT CCCGCCGCCG
      CAACCAATGG ATCTCCTCCT CTGTTTAAAT AGACTCGCCG TGTC AATCAT
-475  ▼▼▼▼▼ TTTCTTCTTC GTCAGCCTCC CTTCCACCGC CATATTGGGC CACTAAAAAA
      AGGGGGCTCG TCTTTTCGGG GTGTTTTTCT CCCCTCCCC TGTCCCCGCT
-375  ▼ TGCTCACGGC TCTGCGACTC CGACGCCGGC AAGGTTTGGA GAGCGGCTGG
      GTTCGCGGGA CCCGCGGGCT TGCACCCGCC CAGACTCGGA CGGGCTTTGC
-275  CACCCTCTCC GCTTGCCTGG TCCCCTCTCC TCTCCGCCCT CCCGCTCGCC
      AGTCCATTTG ATCAGCGGAG ACTCGGCGGC CGGGCCGGGG CTTCCCCGCA
-175  GCCCCTGCGC GCTCCTAGAG CTCGGGCCGT GGCTCGTCGG GGTCTGTGTC
      TTTTGGCTCC GAGGGCAGTC GCTGGGCTTC CGAGAGGGGT TCGGGCCGCG
-75   TAGGGGCGCT TTGTTTTGTT CGGTTTTGTT TTTTGTAGAG TGCGAGAGAG
      GCGGTCGTGC AGACCCGGGA GAAAGATGTC AAACGTGCGA GTGTCTAACG
26    GGAGCCCTAG CCTGGAGCGG ATGGACGCCA GGCAGGCGGA GCACCCCAAG
      CCCTCGGCCT GCAGGAACCT CTTCGGCCCG GTGGACCACG AAGAGTTAAC
126   CCGGGACTTG GAGAAGCACT GCAGAGACAT GGAAGAGGCG AGCCAGCGCA
      AGTGGAATTT CGATTTTCAG AATCACAAAC CCCTAGAGGG CAAGTACGAG
226   TGGCAAGAGG TGGAGAAGGG CAGCTTGCCC GAGTTCTACT ACAGACCCCC
      GCGGCCCCCC AAAGGTGCCT GCAAGGTGCC GGCGCAGGAG AGCCAGGATG

```


326 TCAGCGGGAG CCGCCCGGCG GCGCCTTTAA TTGGGGCTCC GGCTAACTCT
GAGGACACGC ATTTGGTGGA CCCAAAGACT GATCCGTCGG ACAGCCAGAC

426 GGGGTTAGCG GAGCAATGCG CAGGAATAAG GAAGCGACCT GCAACCGACG
ATTCTTCTAC TCAAAACAAA AGAGCCAACA GAACAGAAGA AAATGTTTCA

526 GACGGTCCC CAAATGCCGG TTCTGTGGAG CAGACGCCCA AGAAGCCTGG
CCTCAGAAGA CGTCAAACGT AACAGCTCG AATTAAGAAT ATGTTTCCTT

626 GTTTATCAGA TACATCACTG CTTGATGAAG CAAGGAAGAT ATACATGAAA
ATTTTAAAAA TACATATCGC TGACTIONCATG GAATGGACAT CCTGTATAAG

726 CACTGAAAAA CAACAACACA ATAACACTAA AATTTTAGGC ACTCTTAAAT
GATCTGCCTC TAAAAGCGTT GGATGTAGCA TTATGCAATT AGGTTTTTCC

826 TTATTTGCTT CATTGTACTA CCTGTGTATA TAGTTTTTAC CTTTTATGTA
GCACATAAAC TTTGGCGAAG GGAGGGCAGG GTGGCGCTGA GGAAGTACG

926 TGGAGCGGGG TATGAAGAGC TTGCTTTGGA TTTACAGCAA GTAATAAATA
TTTGACTIONTGC ATGAAGAGAA GCAATTTTGG GGAAGGGTTT GAATTGTTTT

1026 CTTTAAAAGA TGTAATGTCC CTCAGAGAC AGCTGATACT TCATTTAAAA
AAATCACCAA AAATTTGAAC ACTGGCTAAA GATAATTGCT ATTTATTTTT

1126 ACAAGAAGTT TATTCTCATT TGGGAGATCT GGTGATCCTC CCAAGCTATC
TAAAGTTTGT TAGATAGCTG CATGTGGCTT TTTTAAAAA GCAACAGAAA

1226 CCTATCCTCA CTGCCCTCCC CAGTCTCTCT TAAAGTTGGA ATTTACCAGT
TAATTACTCA GCAGAATGGT GATCACTCCA GGTAGTTTGG GGCAAAAATC

1326 CGAGGTGCTT GGGAGTTTTG AATGTTAAGA ATTGACCATC TGCTTTTATT
AAATTTGTTG ACAAATTTT CTCATTTCTT GTCACTTCGG GCTGTGTA

1426 CACAGTCAAA ATAATTCTAA ATCCCTCGAT ATTTTAAAA GATCTGTAAG
TAACTTCACA TTAATAAATG AAATATTTTT TAATTTAAAG CTTACTCTGT

1526 CCATTTATCC ACAGGGAAGT GTTATTTTTA AAGGAAGGT CATGTAGAGA

```

AAAGCACACT TGTAGGATAA GTGAAATGGA TACTACATCT TTAAACAGTA
1626 TTTCATTGCC TGTGTATGGA AAACCATTTG AAGTGTACCT GTGTACATAA
CTCTGTAAAA AACTGAAAA ATTATACTAA CTTATTTATG TTTAAAAGATT
1726 TTTTTTAATC TAGACAATAT ACAAGCCAAA GTGGCATGTT TTGTGCATTT
GTAAATGCTG TGTTGGGTAG AATAGGTTTT CCCCTCTTTT GTTAAATAAT
1826 ATGGCTATGC TTAAAAGGTT GCATACTGAG CCAAGTATAA TTTTTTGTA
TGTGTGAAAA AGATGCCAAT TATTGTTACA CATTAAAGTAA TCAATAAAGA
1926 AACTTCCAT AGCTATTC

```

7.1.2 CCRE-RNA-Sonde

Die RNA wurde durch In-Vitro-Transkription von pCRΔ1 nach Linearisierung mit *NcoI* hergestellt.

```

1 GAAUACUCAA GCUCAUCAAG CUUCCACCUU AAGGCCGCGC UCGCCAGCCU
51 CGGCGGGGCG GCUCCCGCCG CCGCAACCAA UGGAUCUCCU CCUCUGUUUA
101 AAUAGACUCG CCGUGUCAAU CAUUUUCUUC UUCGUCAGAG ACCAUG

```

7.1.3 gapdh-RNA-Sonde

Die RNA wurde durch In-Vitro-Transkription von pCRgapdh nach Linearisierung mit *HincII* hergestellt.

```

1 GAAUACUCAA GCUAUGCAUC AAGCUUGGUA CCGAGCUCGG AUCCAUGGGG
51 AAGGUGAAGG UCGGAGUC

```

7.2 Veröffentlichungen, Posterpräsentation

Artikel

bereits erschienen:

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

Zur Publikation eingereicht:

Göpfert, U.*, Kullmann, M.* und Hengst, L..ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR.

* Diese Autoren trugen gleichermaßen zu der Arbeit bei.

Posterbeitrag

Göpfert, U., Kullmann, M. und Hengst, L. (2000) p27 translation control is mediated by distinct elements in its 5'UTR. *Cold Spring Harbor Meeting on Translational Control*.

7.3 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

Biochemie	H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, U. Fischer, K.-U. Fröhlich, R. Gebhardt, B. Hamprecht, T. Ilg, L. Hengst, D. Mecke, P. Overath, H. Probst, W. Voelter, U. Weber, K. Wegmann, U. Weser
Organische Chemie	E. Bayer, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, H. Stegmann
Anorganische Chemie	E. Lindner, U. Nagel, J. Strähle
Physikalische Chemie	G. Gauglitz, H. Oberhammer, D. Oelkrug
Immunologie	H.-G. Rammensee
Anatomie	K. Reutter
Physik	W. Nakel, G. Staudt
Botanik	W.-E. Mayer
Zoologie	H. Günzl, W. Pfeiffer
Mathematik	H. Pommer
Mikrobiologie	V. Braun, W. Wohlleben
Zytogenetik	P. Kaiser

7.4 Lebenslauf

Ulrich Martin Göpfert

geboren am	24. Mai 1972
Eltern	Aribert Göpfert und Edith Göpfert, geb. Müller
1978 - 1982	Grundschule in Hüttersdorf
1982 - 1991	Staatliches Realgymnasium in Lebach
1991	Allgemeine Hochschulreife
1991 - 1992	Wehrdienst
1992 - 1998	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1995	Vordiplom
1997 - 1998	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen in der Abteilung Membranbiochemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Overath Thema: Klonierung und Sequenzierung eines Proteophosphorykangens von <i>Leishmania mexicana</i>
1998	Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie
06/1998 - 03/2002	Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe „Regulation der Zellproliferation“ unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Utz Fischer Thema: Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation der CDK-Inhibitoren p27 ^{Kip1} und p21 ^{Cip1}