

**Identifizierung und Charakterisierung
neuer Funktions- und Regulationsmechanismen
des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1}**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Denise Neise

aus Wuppertal

Düsseldorf, August 2011

aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie
der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Reiner U. Jänicke

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
1.	Der Tumorsuppressor p53	1
1.1.	Struktureller Aufbau	1
1.2.	Zellzyklus-Kontrolle.....	2
1.3.	Apoptose.....	4
1.3.1.	Transkriptions-abhängige p53-vermittelte Apoptose	6
1.3.2.	Transkriptions-unabhängige p53-vermittelte Apoptose	6
1.4.	Regulierung von p53.....	7
1.4.1.	Acetylierung.....	8
1.4.2.	Phosphorylierung	9
2.	Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21^{WAF1/CIP1}	12
2.1.	Struktureller Aufbau	12
2.2.	Funktionen und Interaktionen	13
2.3.	Regulierung von p21.....	15
3.	Die p90 ribosomalen S6-Kinasen (RSKs).....	18
3.1.	Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismus	19
3.2.	Funktionen und Substrate	22
4.	Zielsetzung	24
II	Material und Methoden.....	25
1.	Material	25
2.	Methoden	27
2.1.	Transfektion eukaryotischer Zellen	27
2.2.	Herstellung von Zellextrakten.....	27
2.3.	Immunpräzipitation.....	28
2.4.	PAGE, Coomassie-Färbung, Western-Blot.....	28
2.5.	Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-Aktivität.....	31
2.6.	Real-Time PCR-Analyse	31
2.7.	Kolorimetrischer SA-β-Gal-Nachweis	31
2.8.	Zellzyklusbestimmung nach Nicoletti	32
2.9.	Kinase-Reaktionen	33
2.10.	Massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen	34
2.11.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	36
2.12.	Hitzeschock-Transformation.....	36
2.13.	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	37
2.14.	Plasmid-Präparation.....	38
2.15.	Plasmide, Mutagenese, Klonierung lentiviraler Expressionsvektoren	39

III Ergebnisse	42
1. p21 ist ein Modulator p53-phosphorylierender Kinasen.	42
1.1. Unterschiede im bestrahlungsinduzierten Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in p21-defizienten (apoptotischen) und p21-profizienten (seneszenten) Zellen.....	42
1.2. <i>In vitro</i> Studie zur Substrat-abhängigen Modulation der Aktivität p53-phosphorylierender Kinasen durch p21.	46
1.2.1. Biochemische und funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine GST-p53 und GST-p21.	47
1.2.2. Der Einfluss von p21 auf die Aktivität verschiedener JNK-Subisofomen hängt vom Substrat ab.	49
1.2.3. Die Aktivität von p38 α kann durch p21 in Abhängigkeit vom Substrat sowohl vermindert als auch verstärkt werden.	51
1.2.4. p21 beeinflusst GSK-3 β nur bei der Phosphorylierung ausgewählter Substrate.	52
1.2.5. Keine Beeinflussung von CK1 ϵ durch p21.	53
1.2.6. Gegensätzliche Regulation verschiedener ERK-Isoformen durch p21.	54
1.3. Auswirkung der pharmakologischen MAPK-Inhibition auf die zelluläre Antwort nach ionisierender Bestrahlung.	56
2. Identifizierung von p21 als ein neues RSK-Substrat.	59
2.1. Pharmakologische RSK-Inhibition beeinflusst den Zellzyklus und schützt p21-abhängig vor strahlungsinduzierter Apoptose.	59
2.2. Die pharmakologische und spezifische (siRNA-vermittelte) RSK-Inhibition führt p53-unabhängig zu einer p21-Akkumulation.....	62
2.3. RSK2 phosphoryliert p21 <i>in vitro</i>	65
2.4. Identifizierung der RSK-spezifischen Phosphorylierungspositionen im p21-Protein.....	66
2.5. Aktivierte RSKs vermitteln Phosphorylierungs-abhängig die Degradation von p21.....	70
2.6. Klonierung eines lentiviralen Expressionsvektors zur induzierbaren Expression einer Phosphorylierungs-defizienten p21-Mutante.	72
IV Diskussion	76
1. p21 ist ein Modulator p53-phosphorylierender Kinasen.	76
2. Identifizierung von p21 als ein neues RSK-Substrat.	81
V Zusammenfassung / Abstract	87
VI Referenzen	89
VII Anhang	101
1. Lebenslauf	101
2. Veröffentlichte Ergebnisse	101
3. Danksagung	111
4. Erklärung	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Domänen des humanen p53-Proteins	2
Abbildung 2:	Vereinfachte schematische Darstellung des Zellzyklus	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege.....	5
Abbildung 4:	Zusammenfassung wichtiger post-translati- onaler p53-Modifikationen und der beteiligten modifizierenden Proteine.....	8
Abbildung 5:	Struktureller Aufbau des p21-Proteins und wichtige Phosphorylierungs- stellen	13
Abbildung 6:	Struktureller Aufbau und wichtige Phosphorylierungsstellen der humanen RSKs.....	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der RSK-Aktivierung	21
Abbildung 8:	Zelluläre Antwort p21-profizienter (wt) und p21-defizienter (p21-/-) HCT116-Zellen nach ionisierender Bestrahlung.....	43
Abbildung 9:	Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in p21-profizienten und -defizienten HCT116-Zellen nach γ -IR sowie Überprüfung der ektopischen Expression von p53-Phosphorylierungsmutanten.....	44
Abbildung 10:	Biochemische und funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine GST-p53 und GST-p21.....	48
Abbildung 11:	Bestimmung des Einflusses von p21 auf die <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität verschiedener JNK1/2-Subisoformen	50
Abbildung 12:	Bestimmung des Einflusses von p21 auf die <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität von p38 α	52
Abbildung 13:	Bestimmung des Einflusses von p21 auf die <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität von GSK-3 β	53
Abbildung 14:	Bestimmung des Einflusses von p21 auf die <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität von CK1 ϵ	54
Abbildung 15:	Bestimmung des Einflusses von p21 auf die <i>in vitro</i> Kinase-Aktivität von ERK1/2	55
Abbildung 16:	Auswirkung der pharmakologischen MAPK-Inhibition auf HCT116- Zellen nach γ -IR.....	57
Abbildung 17:	Auswirkung der pharmakologischen RSK-Inhibition auf HCT116-Zellen nach γ -IR.....	60
Abbildung 18:	Auswirkung der pharmakologischen RSK-Inhibition auf p21 in HCT116- Zellen	63
Abbildung 19:	Vergleich des pharmakologischen Inhibitors BI-D1870 mit siRNA- vermittelter Reduktion (<i>Knockdown</i>) von AuroraB / PLK1 / RSK	64
Abbildung 20:	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von p21 durch RSK2 und Einflussnahme von p21 auf die RSK2-vermittelte <i>in vitro</i> Phosphorylierung von p53.....	66
Abbildung 21:	Identifizierung der RSK-spezifischen Phosphorylierungspositionen im p21-Protein	68
Abbildung 22:	Einfluss aktivierter RSKs auf die p21-Proteinmenge <i>in vivo</i>	71
Abbildung 23:	Generierung lentiviraler Expressionsvektoren zur induzierbaren Expression von Flag-p21.....	73

Abkürzungsverzeichnis

AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Apaf-1	<i>apoptotic peptidase-activating factor 1</i>
AS	<i>Aminosäure</i>
AS160	<i>AKT substrate of 160 kDa</i>
ASK1	<i>apoptosis signal regulating kinase 1</i>
ATF-2	<i>activating transcription factor - 2</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad3 related</i>
Bak	<i>Bcl-2 homolog antagonist / killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 antagonist X</i>
Bcl	<i>b-cell lymphoma</i>
BH-Domäne	<i>Bcl-2-Homologiedomäne</i>
CaMK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CDC2	<i>cell division cycle 2</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cdkn1a	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
Chk1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CIP1	<i>CDK-interacting protein 1</i>
CK1/2	<i>casein kinase 1/2</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTD	<i>C-terminale regulatorische Domäne</i>
CTKD	<i>carboxyterminale Kinasedomäne</i>
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
DBD	<i>DNA-Bindungsdomäne</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ER α	<i>estrogen receptor α</i>
FADD	<i>fas-associating protein with death domain</i>
FasL	<i>Fas-Ligand</i>
FL	<i>full-length</i>
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase-3β</i>
GST	<i>Glutathion S-Transferase</i>
HAT	<i>Histonacetyltransferase</i>
HDAC1	<i>histone deacetylase 1</i>
HDM2	<i>human double minute 2</i>
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>
IE	<i>immediate early</i>

IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
INK4	<i>inhibitor of kinase 4</i>
IR	<i>ionizing radiation</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KIP1	<i>CDK inhibitory protein 1</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin-Basisches Protein
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
MSK1/2	<i>mitogen- and stress-activated kinase 1/2</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NTKD	aminoterminaler Kinasedomäne
p53AIP1	<i>p53-regulated apoptosis-inducing protein 1</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PGK	Phosphoglyceratkinase
PKA/B/C	<i>protein kinase A/B/C</i>
PLK1	<i>polo-like kinase-1</i>
PP2C δ	<i>protein phosphatase 2Cδ</i>
pRb	Retinoblastoma-Protein
PRD	Prolin-reiche Domäne
Puma	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
rpS6	S6-Protein der 40S ribosomalen Untereinheit
RSK	p90 ribosomale S6-Kinase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
Sdi1	<i>senescent cell-derived inhibitor 1</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Sir2 α	<i>silent information regulator 2α</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
tBid	<i>truncated Bid</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
WAF1	<i>wild-type p53-activated fragment 1</i>
WISp39	<i>WAF1/CIP1 stabilizing protein 39</i>
Δ C	carboxyterminal trunziert

I Einleitung

1. Der Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 besitzt eine zentrale Schlüsselfunktion in der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress. Seine Aufgabe besteht darin, die genomische Stabilität zu gewährleisten und die Proliferation geschädigter Zellen zu unterbinden. Dieses Ziel kann auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden. So vermittelt p53 bei leichten DNA-Schäden einen Zellzyklus-Arrest sowie die Aktivierung notwendiger DNA-Reparaturprozesse. Ist die DNA-Schädigung jedoch irreparabel, so kann p53 einen irreversiblen Zellzyklus-Arrest (zelluläre Seneszenz) bewirken oder sogar den kontrollierten apoptotischen Zelltod einleiten.¹ Aufgrund seiner zentralen Position in der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden ist die Bedeutung von p53 für die Tumorsuppression enorm. Daher verwundert es nicht, dass sich 50% aller humanen Krebserkrankungen durch Mutationen im p53-kodierenden TP53-Gen auszeichnen, welche zu einem nicht-funktionellen p53-Protein führen.^{2,3} In vielen der übrigen Tumore wird die p53-Funktion durch Fehlregulierung der beteiligten Signalwege dauerhaft eingeschränkt.²

In gesunden Zellen ist nur eine geringe Menge an p53-Protein vorhanden, da dieses einem kontinuierlichen proteasomalen Abbau unterliegt. Die kurze Halbwertszeit des p53-Proteins wird durch seine ständige Ubiquitinierung gewährleistet, welche hauptsächlich durch die E3 Ubiquitin-Ligase MDM2 (*mouse double minute 2*) in der Maus bzw. HDM2 (*human double minute 2*) im Menschen vermittelt wird.¹ Diese Ubiquitinierung wird bei zellulärem Stress unterbunden. Das stabilisierte und im Nukleus akkumulierte p53 agiert hauptsächlich als homotetramerer Transkriptionsfaktor, welcher seine Zielgene als Aktivator oder Repressor reguliert.^{1,4-6} Es wurden mehr als 150 Gene gefunden, die eine spezifische p53-Bindungssequenz aufweisen. Sie sind unter anderem an der Induktion von Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur, Apoptose und zellulärer Seneszenz beteiligt.^{1,4}

1.1. Struktureller Aufbau

Das humane p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und weist mehrere funktionelle Domänen auf (Abb. 1). Der von sauren Aminosäure-Resten geprägte Aminoterminus (N-Terminus) beinhaltet zwei Transaktivierungsdomänen (TAD). Diese werden für die transkriptionelle Aktivierung der Zielgene von p53 benötigt. Die zweite TAD überlappt zudem mit einer Prolin-reichen Domäne (PRD), welche sich durch eine Vielzahl an Interaktionen mit anderen Proteinen auszeichnet. Neben Transkriptionsfaktoren binden auch Acetyltransferasen an den N-Terminus von p53.^{1,4} Darüber hinaus findet hier auch die transkriptionell inhibierende Bindung der E3 Ubiquitin-Ligase MDM2 statt.⁷ Die zentrale

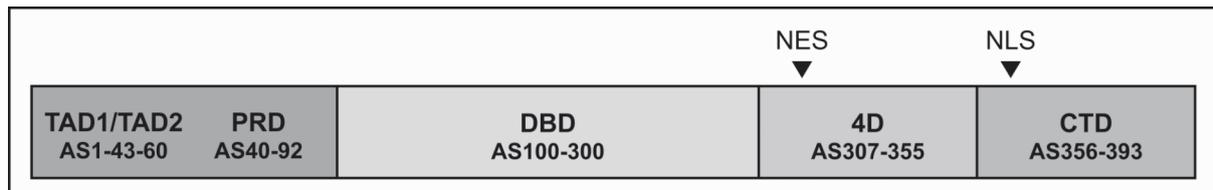


Abb. 1: Domänen des humanen p53-Proteins (verändert übernommen aus Olsson et al., 2007).⁴
 TAD: Transaktivierungsdomäne; PRD: Prolin-reiche Domäne; DBD: DNA-Bindungsdomäne; 4D: Tetramerisierungsdomäne; CTD: C-terminale regulatorische Domäne; NES: Nukleäres Exportsignal; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal (insgesamt drei); AS: Aminosäure

DNA-Bindungsdomäne (DBD) des p53-Proteins ist für seine sequenzspezifische Bindung an entsprechende Promotor-Bereiche der Zielgene verantwortlich. Mehr als 90 Prozent der p53-Mutationen betreffen diese Region. Der Carboxyterminus (C-Terminus) enthält die Tetramerisierungsdomäne (4D), welche für die Homooligomerisierung von p53 benötigt wird und darüber hinaus ein nukleäres Exportsignal (NES) aufweist.⁸ Außerdem verfügt p53 über eine von basischen Aminosäure-Resten geprägte C-terminale regulatorische Domäne (CTD), die drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) beinhaltet.^{1,4}

1.2. Zellzyklus-Kontrolle

Der p53-vermittelte Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schädigung beruht im Wesentlichen auf der Induktion von drei kritischen Zielgenen. Dabei handelt es sich um p21^{WAF1/CIP1} (*wild-type p53-activated fragment 1 / CDK-interacting protein 1*), 14-3-3 σ und GADD45 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 45*).⁹⁻¹¹ Abbildung 2 vermittelt zur Veranschaulichung einen allgemeinen Überblick über den Zellzyklus und seine Regulation durch verschiedene CDK (*cyclin-dependent kinase*) / Cyclin-Komplexe.

Die Induktion des p21-kodierenden Gens *cdkn1a* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) durch p53 führt vorwiegend zu einem G1-Arrest der Zelle, indem p21 die CDK/Cyclin-Komplexe der G1-Phase inhibiert und dadurch ein Eintreten der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus verhindert.¹² Durch die Einwirkung von p21 wird unter anderem die CDK-vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) gehemmt und dadurch dessen Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F aufrechterhalten, so dass die E2F-abhängigen S-Phase-Gene nicht transkriptionell induziert werden können.¹² Aber auch am G2-Arrest, wie er in manchen Zellen bei DNA-Schäden anstelle eines G1-Arrestes auftritt, ist p21 maßgeblich beteiligt.^{13,14} In p21-defizienten Zellen ist bei genotoxischem Stress weder ein G1- noch ein G2-Zellzyklus-Arrest möglich; stattdessen wird der kontrollierte Zelltod eingeleitet.¹⁴⁻¹⁶ Ausführliche Informationen zu p21 finden sich in Abschnitt 2. Die von p53 transkriptionell induzierten Proteine 14-3-3 σ und GADD45 verursachen bei anhaltender DNA-Schädigung einen G2-Zellzyklus-Arrest.^{10,17} 14-3-3 σ ist ein zytoplasmatisches Gerüstprotein. Nach seiner Induktion durch p53 sequestriert es CyclinB1 und CDK1 im

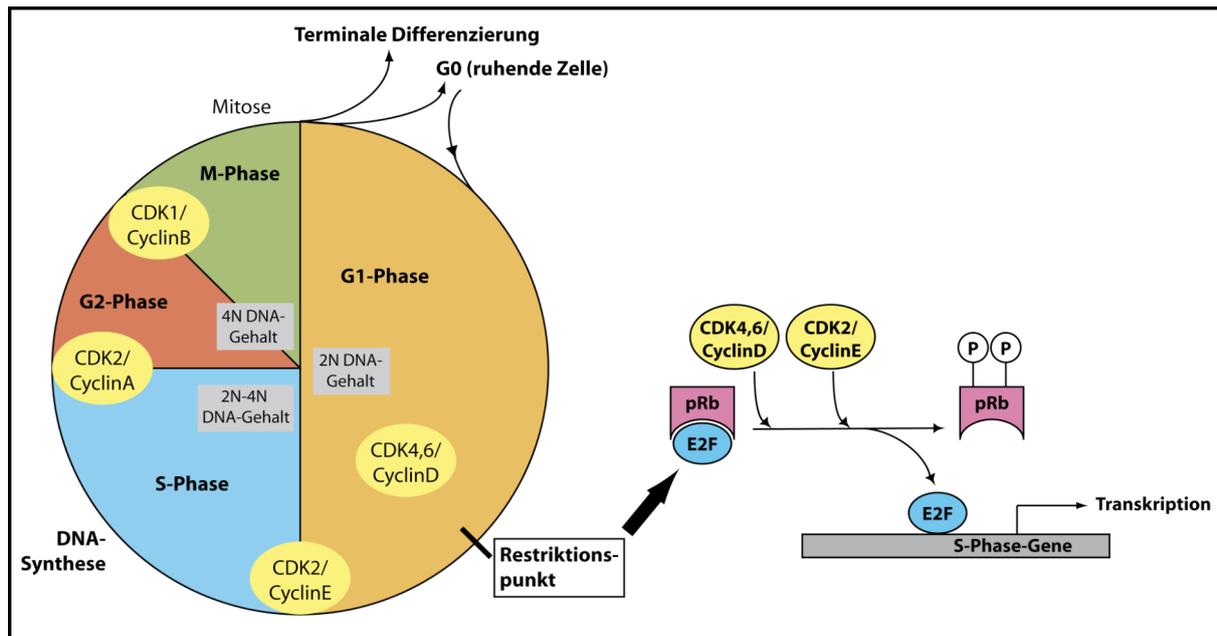


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Zellzyklus (verändert entnommen aus Schafer, 1998; ergänzt nach Mitnacht, 1998).^{18,19} Der Zellzyklus wird durch verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe gesteuert. Es werden vier Zellzyklus-Phasen unterschieden. In der S-Phase wird der DNA-Gehalt verdoppelt, in der M-Phase findet die Verteilung der Chromosomen mit anschließender Zellteilung statt, aus der zwei genetisch identische Tochterzellen hervorgehen. In den Zwischenphasen G1 und G2 werden an mehreren Kontrollpunkten die Voraussetzungen für eine fehlerfreie Zellteilung überprüft; gegebenenfalls wird ein Zellzyklus-Arrest zur Behebung aufgetretener Fehler veranlasst. Ein alterungsbedingter oder durch irreparable DNA-Schäden herbeigeführter irreversibler Zellzyklus-Arrest wird als zelluläre Seneszenz bezeichnet.

Bei terminal differenzierten Zellen kann der Zellzyklus nicht mehr durchlaufen werden und es findet keine Zellteilung mehr statt. Dem gegenüber können ruhende Zellen, welche sich in der sogenannten G0-Phase befinden, bei entsprechenden Wachstumssignalen wieder in den Zellzyklus eintreten und sich teilen. Werden die Wachstumsfaktoren entfernt, bevor die Zelle den Restriktionspunkt in der späten G1-Phase erreicht hat, so tritt sie wieder in die G0-Phase ein. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes, an dem die CDK4,6/CyclinD- sowie CDK2/CyclinE-vermittelte Phosphorylierung von pRb seine Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F aufhebt, ist das Durchlaufen des Zellzyklus unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren.

Zytoplasma und verhindert dadurch deren Import in den Zellkern.²⁰ Das Protein GADD45 ist für die Destabilisierung der CDK1/CyclinB Komplexe verantwortlich.^{21,22}

Der von p53 bewirkte temporäre Zellzyklus-Arrest als Reaktion auf DNA-schädigende Stimuli ermöglicht der Zelle, die DNA-Schäden zu beseitigen. Hierzu leitet p53 die notwendigen DNA-Reparaturprozesse transkriptionell ein.²³⁻²⁶ Ist jedoch keine ausreichende Reparatur der DNA möglich, so kommt p53 auch in der Veranlassung eines irreversiblen Zellzyklus-Arrestes, der zellulären Seneszenz, eine Schlüsselfunktion zu. Neben der Induktion von PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) ist die p53-vermittelte Expression des CDK-Inhibitors p21 entscheidend, um die Zelle in die Seneszenz zu führen.²⁷⁻²⁹

1.3. Apoptose

Beim Auftreten irreparabler DNA-Schäden kann p53 die Zelle wie oben beschrieben in die Seneszenz führen. Alternativ ist aber auch die Auslösung der Apoptose möglich. Hierbei handelt es sich um einen aktiven und in seinen Abläufen genetisch festgelegten Zelltod. Eine apoptotische Zelle zeichnet sich zunächst durch die Kondensation des Nukleus und des Zytoplasmas mit intakt bleibenden Organellen sowie durch den Verlust der Zelladhäsion aus. Im weiteren Verlauf findet eine Fragmentierung des Zellkerns statt und es kommt zur Bildung membranumhüllter Vesikel, den sogenannten apoptotischen Körperchen. Da kein Zellinhalt freigesetzt wird, können apoptotische Zellen im Organismus durch Phagozytose beseitigt werden, ohne dass eine Entzündungsreaktion erfolgt.³⁰ Um die Funktionsweise von p53 und die seiner transkriptionell regulierten Zielgene innerhalb des programmierten Zelltodes einordnen zu können, werden im folgenden die Schlüsselprozesse der Apoptose zusammenfassend erläutert.

Der apoptotische Zelltod kann grundsätzlich durch extrazelluläre Liganden über den Todesrezeptor-vermittelten extrinsischen Signalweg oder durch intrazelluläre Signale über den Mitochondrien-vermittelten intrinsischen Signalweg induziert werden (s. Abb. 3).^{31,32} Ein wesentlicher Bestandteil im Ablauf des Apoptose-Programms ist die Aktivierung von Proteinase, die zur Familie der Caspasen (Cysteiny Aspartat-spezifische Proteasen) zählen. Sie liegen in vitalen Zellen als inaktive Zymogene vor, den sogenannten Procaspasen, und werden in apoptotischen Zellen innerhalb einer Kaskade durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Initiator-Caspasen wie Caspase-8, -9 und -10 stehen am Anfang dieser Kaskade und aktivieren die Effektor-Caspasen wie Caspase-3 und -7. Diese inaktivieren unter anderem anti-apoptische Proteine und bewirken sowohl direkt als auch indirekt die Reorganisation zellulärer Strukturen.³³⁻³⁵

Beim extrinsischen Apoptose-Signalweg binden Liganden aus der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF-) Familie spezifisch an membranständige Todesrezeptoren aus der Familie der TNF-Rezeptoren und bewirken deren Trimerisierung. Über die Bildung eines hochmolekularen Aktivierungskomplexes aus verschiedenen Proteinen werden Caspase-8 und -10 aktiviert und damit die Caspasen-Kaskade ausgelöst.³¹ Der intrinsische Signalweg ist durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und der damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom c und anderer Apoptose-fördernder Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytoplasma gekennzeichnet.³⁶ Das freigesetzte Cytochrom c bindet an das zytosolische Apaf-1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*), welches daraufhin zu einem heptameren Rad-förmigen Komplex assembliert und Caspase-9 rekrutiert. In dem auf diese Weise entstandenen mehr als 1 Megadalton großen Apoptosom wird Caspase-9 durch Autoproteolyse aktiviert und damit die Caspasen-Kaskade ausgelöst.^{37,38}

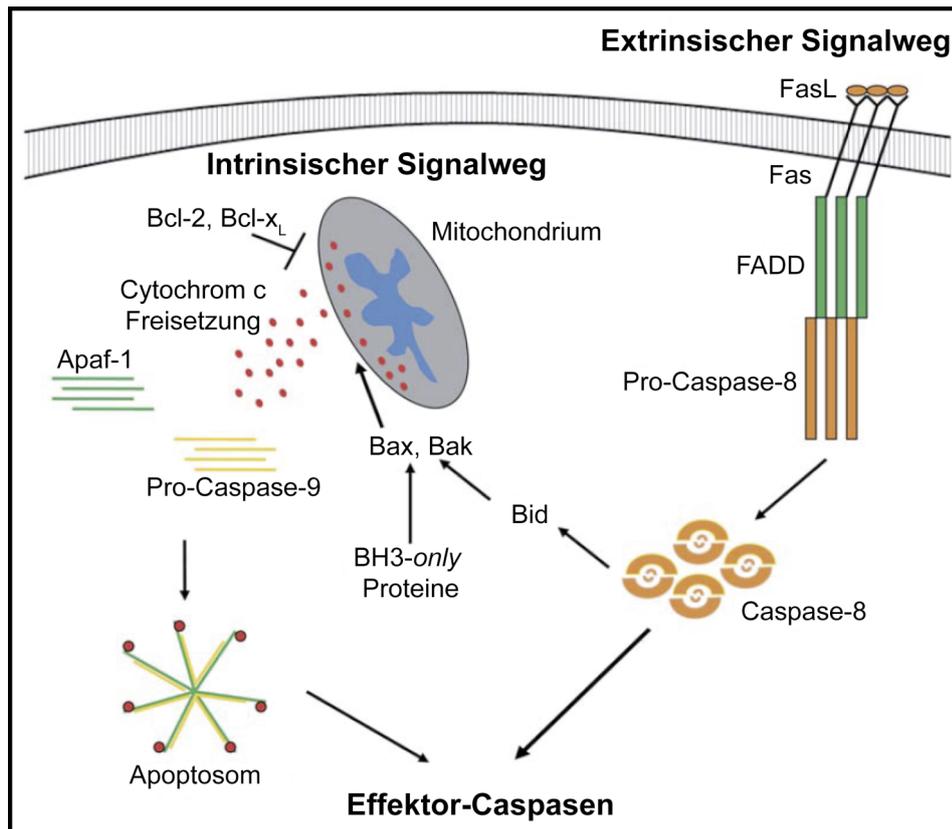


Abb. 3: Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege (verändert entnommen aus Schafer und Kornbluth, 2006).³⁹ Erläuternde Informationen zu den Signalwegen: s. Text. Fas: Todesrezeptor aus der TNF-Rezeptor-Familie; FasL: Fas-Ligand; FADD (*fas-associated protein with death domain*): Adapter-Protein zur Fas-vermittelten Caspasen-Aktivierung.

Die Kontrolle des intrinsischen Apoptose-Signalwegs obliegt den Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie (Bcl: *b-cell lymphoma*), welchen der Besitz mindestens einer von insgesamt vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH-Domänen) gemeinsam ist. Die Bcl-2-Familie wird in drei Gruppen unterteilt: Die anti-apoptotischen Bcl-2-ähnlichen Proteine (u. a. Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) stehen den pro-apoptotischen Multidomänen-Proteinen (u. a. Bak, Bax) und BH3-only Proteinen (u. a. Bad, Bim, Puma, Noxa, Bid) gegenüber.⁴⁰ Die Multidomänen-Proteine Bak (*Bcl-2 homolog antagonist / killer*) und Bax (*Bcl-2 antagonist X*) sind in vitalen Zellen inaktiv, durchlaufen jedoch in apoptotischen Zellen eine Konformationsänderung, oligomerisieren an der äußeren Mitochondrienmembran und bewirken hierdurch deren Permeabilisierung.⁴¹ Die Aktivierung von Bak und Bax ist vom Einfluss der BH3-only Proteine abhängig; die anti-apoptotischen Bcl-2-ähnlichen Proteine wirken der Aktivierung der Multidomänen-Proteine entgegen.^{40,42} Anhand ihrer Funktionsweise werden die BH3-only Proteine in Aktivatoren und De-Repressoren unterteilt. Die Aktivatoren, zu denen u. a. Bim und Bid gezählt werden, aktivieren die Multidomänenproteine direkt, indem sie deren Konformationsänderung induzieren. Demgegenüber findet durch die De-Repressoren wie z.B. Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) und Bad eine indirekte Aktivierung der Multidomänen-Proteine statt. Sie heben die inhibitorische Wirkung der anti-apoptotischen

Bcl-2-ähnlichen Proteine auf, indem sie an diese binden und dadurch das zuvor gebundene und inaktiv gehaltene Bak bzw. Bax verdrängen.^{43,44} Die BH3-*only* Proteine fungieren als zelluläre Stress-Sensoren und stehen oberhalb der Caspasen-Kaskade. Sie unterliegen einer Vielzahl an Aktivierungsmöglichkeiten, die sich von Protein zu Protein unterscheiden.⁴⁵ Bid stellt als einziges durch Caspasen-vermittelte Proteolyse aktiviertes BH3-*only* Protein einen Sonderfall dar. Das aktive Spaltprodukt tBid (*truncated Bid*) ist essentiell für die Verknüpfung des Todesrezeptor-vermittelten Signalwegs mit dem Mitochondrien-vermittelten Signalweg und trägt zur Verstärkung des Apoptose-Signals bei.^{46,47}

Die genauen Mechanismen zur Aktivierung der Multidomänen-Proteine und die Vielzahl an Interaktionen zwischen den verschiedenen Bcl-2-Familienproteinen sind noch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

1.3.1. Transkriptions-abhängige p53-vermittelte Apoptose

Zu den von p53 transkriptionell induzierbaren Zielgenen zählen unter anderem die Todesrezeptoren CD95/Fas, DR4 und DR5 sowie Apaf-1 als Schlüsselkomponente des Apoptosoms.⁴⁸⁻⁵⁰ Inwiefern deren Regulierung durch p53 jedoch für die Auslösung der Apoptose tatsächlich von Bedeutung ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Essentiell für die p53-vermittelte Apoptose ist allerdings die Induktion bestimmter BH3-*only* Proteine, welche hierdurch als zelluläre Sensoren für DNA-Schäden agieren. So werden beispielsweise Puma und Noxa nach DNA-Schädigung in strenger Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor p53 induziert⁵¹⁻⁵³ und Zellen aus Puma- oder Noxa-defizienten Mäusen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber p53-abhängigen Apoptose-Stimuli auf.⁵⁴⁻⁵⁶ Darüber hinaus erhöht p53 die Expression des Multidomänen-Proteins Bax sowie des BH3-*only* Proteins Bid und trägt damit zur Verstärkung des Apoptose-Signals bei.^{4,57,58}

Es existiert eine Vielzahl an Studien mit der Fragestellung, welche p53-Zielgene tatsächlich für die Auslösung des apoptotischen Zelltodes benötigt werden. Die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Bedeutungsgrad, der den einzelnen an der p53-vermittelten Apoptose-Induktion beteiligten Zielgenen zukommt, sowohl vom Zelltyp als auch von dem jeweiligen Stress-Stimulus abhängig ist.⁵⁹

1.3.2. Transkriptions-unabhängige p53-vermittelte Apoptose

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass p53 bei der Auslösung des apoptotischen Zelltodes auch Transkriptions-unabhängig Apoptose induziert. Der am besten untersuchte Transkriptions-unabhängige Apoptose-induzierende Mechanismus betrifft die Interaktion von p53 mit Proteinen der Bcl-2-Familie. Neben der Akkumulation von p53 im Zellkern findet auch eine Translokation zu den Mitochondrien statt. Dort agiert p53 analog zu BH3-*only*

Proteinen, indem es an pro- und anti-apoptische Bcl-2-Familienproteine bindet und ihre Funktion moduliert.⁶⁰ Seine Interaktion mit Bak bewirkt dessen Freisetzung vom anti-apoptischen Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*) mit anschließender Oligomerisierung, was zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt.⁶¹ Außerdem bindet und inhibiert p53 Bcl-2 und Bcl-x_L und verdrängt dadurch Bax und auch Bid von diesen anti-apoptischen Proteinen, worauf ebenfalls die Oligomerisierung des Multidomänenproteins und die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum folgt.⁶²⁻⁶⁴ Sowohl die Interaktion von p53 mit Bak als auch jene mit Bcl-2 und Bcl-x_L wird über (größtenteils konservierte) Sequenzen der DNA-Bindungsdomäne vermittelt.^{63,65,66}

Dieser Transkriptions-unabhängigen Funktion von p53 an den Mitochondrien wird als Ergänzung zur Transaktivierung pro-apoptischer Zielgene eine hohe Bedeutung für die p53-vermittelte Apoptose-Induktion zugeschrieben.^{59,67} Demgegenüber stehen allerdings Ergebnisse, die zeigen, dass die mitochondriale Translokation von p53 nicht nur in p53-abhängigen Apoptose-Prozessen zu beobachten ist, sondern auch während des p53-induzierten Zellzyklus-Arrestes. Darüber hinaus zeigte es sich, dass eine Mitochondrien-spezifische p53-Expression im Gegensatz zur Kern-spezifischen Expression keine Apoptose induzierte.⁶⁸ Sehr wahrscheinlich spielen hierbei noch andere Faktoren eine Rolle, deren Identität aber noch unklar ist.

1.4. Regulierung von p53

Vor wenigen Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass transkriptionelle und translationale Mechanismen zur Steuerung des p53-Proteins nach DNA-Schädigung existieren.^{69,70} Hauptsächlich erfolgt die Modulierung der p53-Aktivität aber über die verfügbare Proteinmenge sowie über post-translationale Modifikationen des p53-Proteins. Hierzu zählen neben der Phosphorylierung und Acetylierung, welche in einer Vielzahl an Studien und Mutationsanalysen untersucht wurden und bis heute Gegenstand der Forschung sind, auch die Mono- und Poly-Ubiquitinierung, Sumoylierung, Neddylierung und Methylierung (s. Abb. 4).^{1,2,4,71} Es ist hierbei vermutlich von einer Art „Strichcode-System“ auszugehen, d.h. die Gesamtheit der vorliegenden Modifikationen am p53-Protein ist entscheidend für die Stabilisierung und die zielgerichtete transkriptionelle Aktivität von p53 und dem damit verbundenen Zellschicksal.⁷²

MDM2 stellt die wichtigste p53-modifizierende E3 Ubiquitin-Ligase dar. Sie wird durch p53 transkriptionell induziert und ist somit Bestandteil einer negativen *Feedback*-Schleife zur Selbstregulierung des p53-Proteins.⁴ MDM2 vermittelt sowohl die Mono-Ubiquitinierung von p53, welche seinen nukleären Export bewirkt, als auch die Poly-Ubiquitinierung, welche das p53-Protein für den proteasomalen Abbau kennzeichnet.⁷³ Die Mono-Ubiquitinierung findet vermutlich in ungestressten Zellen bei niedriger MDM2-Menge statt, um p53 unter Kontrolle

Die Modulierung der Aktivität von p53 unterliegt unter anderem den Histonacetyltransferasen (HATs) p300, CBP (*CREB-binding protein*) und PCAF (*p300/CBP-associated factor*). Über die Histon-Acetylierung des Chromatins nehmen HATs einen bedeutenden Einfluss auf die allgemeine Regulierung der Genaktivität, da die Transkriptionsrate in acetylierten Chromatinbereichen erhöht ist. Im p53-Protein werden die Lysinreste 370, 372, 373, 381 und 382, welche in der CTD liegen, vom p300/CBP-Heterodimer acetyliert,⁷⁹ während PCAF und p300 bei DNA-Schäden durch UV- oder γ -Strahlung die Lysine 305 und 320 im NLS acetylieren.⁸⁰⁻⁸² Außerdem agieren p300/CBP und PCAF als Co-Aktivatoren für die p53-vermittelte Transkription;⁸³ ob hier jedoch die Acetylierung von p53 eine Rolle spielt, ist unklar.⁸⁴ Die Acetylierung von Lys373 bewirkt eine bevorzugte Bindung von p53 an Promotoren mit einer niedrigen p53-Bindungsaffinität. Zu diesen gehören hauptsächlich Zelltod-induzierende Gene wie z.B. Bax sowie p53AIP1 (*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*), einem pro-apoptotischen Faktor, welcher die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum fördert.⁸⁵ Darüber hinaus begünstigt acetyliertes Lys373 die Phosphorylierung N-terminal gelegener Aminosäure-Reste des p53-Proteins.⁸⁵ Dem gegenüber bindet p53 mit acetyliertem Lys320 präferentiell an Promotoren mit einer hohen p53-Bindungsaffinität und transaktiviert auf diese Weise Gene wie z.B. p21, welche das Überleben der Zelle gewährleisten und für einen Zellzyklus-Arrest benötigt werden.^{85,86} Neben den C-terminalen Lysinresten befindet sich mit Lys120 auch in der zentralen DBD eine Acetylierungsstelle. Deren Acetylierung wird durch MYST Acetyltransferasen vermittelt und bewirkt eine bevorzugte Transkription pro-apoptotischer Zielgene.^{87,88} Eine aktive Deacetylierung von p53 erfolgt durch HDAC1- (*histone deacetylase 1*-) Komplexe sowie durch Sir2 α (*silent information regulator 2 α*). Die Deacetylierung des p53-Proteins vermindert die transkriptionelle Aktivierung seiner Zielgene und damit die Induktion von Zelltod und Zellzyklus-Arrest.⁸⁹⁻⁹¹

1.4.2. Phosphorylierung

Für das humane p53-Protein sind 23 Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsstellen bekannt.² Dabei handelt es sich um Serin- und Threoninreste, welche sich hauptsächlich innerhalb der N-terminalen TAD sowie der CTD befinden. Thr55 und Ser376 zählen zu den wenigen Aminosäuren des p53-Proteins, welche in ungestressten Zellen konstitutiv phosphoryliert vorliegen und bei DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung dephosphoryliert werden.^{92,93} Die meisten Phosphorylierungsstellen werden nach Stress-Signalen von Kinasen wie ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*), Chk1/2 (*checkpoint kinase 1/2*), CK1 (*casein kinase 1*), HIPK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*) und den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) JNK (*Jun N-terminal kinase*), ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*)

und p38 phosphoryliert. Dies hat im Allgemeinen eine Erhöhung der Protein-Stabilität sowie der transkriptionellen Aktivität von p53 zur Folge und beeinflusst seine Promotor-Bindungsspezifität.¹ Allerdings wird die Relevanz der einzelnen Phosphorylierungen für die Stabilisierung und Aktivierung von p53 bis heute kontrovers diskutiert. So zeigen überexprimierte Phosphorylierungs-defiziente p53-Mutanten, welche bis zu 12 Mutationen tragen (Serin/Threonin zu Alanin), in einigen Studien keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Stabilisierung und ihrer transkriptionellen Aktivität.^{94,95} Die zelluläre Stressantwort unterscheidet sich hier nicht von jener in Zellen mit Wildtyp-p53. Möglicherweise ist jedoch die extreme Überexpression der p53-Mutanten in solchen Studien problematisch, da diese zumeist weit oberhalb physiologischer Bedingungen liegt. Außerdem verdeutlichen zum Teil gegensätzliche Ergebnisse unterschiedlicher Studien, dass die Auswirkung solcher Mutationen auf die zelluläre Stressantwort sowohl vom Zelltyp als auch von der Art des Stress-induzierenden Stimulus abhängt.⁴ Die Bestimmung der funktionellen Bedeutung und Relevanz der verschiedenen p53-Phosphorylierungen wird außerdem durch das Vorliegen einer zweifachen Redundanz erschwert. So kann eine einzelne Phosphorylierungsstelle von mehreren Kinasen phosphoryliert werden und eine bestimmte Kinase wiederum kann mehrere Serin/Threonin-Reste innerhalb des p53-Proteins phosphorylieren (s. Abb. 4).²

Die in der TAD liegenden Phosphorylierungsstellen Ser15, Thr18 und Ser20 befinden sich innerhalb oder zumindest nahe der Bindungsregion von MDM2.^{1,96} Ser15 wird u. a. von ATM in der frühen Zellantwort auf Gamma-Strahlung phosphoryliert.^{93,97} Die p53-vermittelte Transkriptions-abhängige Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose ist mit der Phosphorylierung von Ser15 in Verbindung gebracht worden; ob sie jedoch auch die Interaktion zwischen MDM2 und p53 beeinflusst, ist unklar.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Zellen, welche ausschließlich die entsprechende Phosphorylierungs-defiziente p53-Mutante (S15A) exprimieren, zeigen eine reduzierte Apoptose-Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Stimuli, die vermutlich auf die verminderte transkriptionelle Induktion von Puma zurückzuführen ist.^{101,102} Auch treten bei der S15A-Mutante Defekte in der Induktion von Noxa, p21 und 14-3-3 σ auf, wohingegen die Transaktivierung beispielsweise von Bax und Apaf-1 in den gleichen Studien unbeeinflusst bleibt.^{101,102} Die Ser15-Mutation hat also einen Promotor-spezifischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von p53. Die Phosphorylierungen von Thr18 und Ser20 finden in einer späteren Phase der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress statt und sind auf die vorhergehende Phosphorylierung von Ser15 angewiesen. Sie wirken der MDM2-Bindung an p53 und damit dessen Ubiquitinierung entgegen.⁴ Tatsächlich scheint die Chk1/2-vermittelte Ser20-Phosphorylierung kritisch für die Stabilisierung von p53 bei genotoxischem Stress zu sein, da p53 in γ -bestrahlten Chk2-defizienten Zellen nicht stabilisiert wird.¹⁰³ Jedoch reicht die

Mutation von Ser20 zu Alanin nicht aus, um in UV- oder γ -bestrahlten Zellen die p53-Stabilisierung zu beeinträchtigen.¹⁰⁴ Die Mutation nimmt hier keinen Einfluss auf die zelluläre Stressantwort und verändert weder die Menge des an p53 gebundenen MDM2 noch die transkriptionelle Induktion von MDM2 und p21.¹⁰⁴ Folglich kann die Phosphorylierung von Ser20 allein nicht die Bindung von MDM2 an p53 verhindern.

Ser46 wird u. a. von HIPK2 sowie nach UV-Strahlung von p38 MAPK phosphoryliert.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Dadurch wird die Promotor-Bindungsspezifität von p53 beeinflusst und es werden solche Zielgene transkriptionell induziert, die an der Auslösung der Apoptose beteiligt sind. Insbesondere die transkriptionelle Induktion von p53AIP1 hängt von der Ser46-Phosphorylierung des p53-Proteins ab.¹⁰⁸ Hinsichtlich der p53-Phosphorylierung an Ser315 werden gegensätzliche Auswirkungen beschrieben. Zum einen wird bei strahlungsinduzierten DNA-Schäden eine Erhöhung des p53-Transaktivierungspotentials nach Ser315-Phosphorylierung beobachtet,¹⁰⁹ zum anderen fördert die AuroraA-vermittelte Phosphorylierung von Ser315 die MDM2-abhängige Ubiquitinierung und damit den proteasomalen Abbau von p53.¹¹⁰ Auch die Phosphorylierung von Ser315 durch GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) als Reaktion auf ER- (*endoplasmic reticulum*) Stress führt neben der zytoplasmatischen Lokalisation des p53-Proteins zu dessen Destabilisierung.¹¹¹ Die aktivierende Phosphorylierung von Ser392 innerhalb der CTD wird insbesondere nach UV-Strahlung durch CK2 (*casein kinase 2*) und p38 MAPK vermittelt.⁴

Trotz der Vielzahl an Veröffentlichungen zu den post-translationalen Modifikationen von p53 bleiben viele Fragen offen, da oft (scheinbar) gegensätzliche Beobachtungen beschrieben werden und sich *in vitro* Ergebnisse zu dieser Thematik nur schwer oder gar nicht *in vivo* verifizieren lassen. Auch können in komplexen Organismen wie z.B. der Maus nicht alle auf Einzel-Zell-Modellen beruhenden Beobachtungen bestätigt werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zunächst mit dem Vergleich der Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in p21-exprimierenden seneszenten und p21-defizienten apoptotischen Zellen. Insbesondere untersucht sie aber, ob sich die wesentliche Eigenschaft von p21, Kinasen in ihrer Aktivität zu modulieren (s. Abschnitt 2.2 der Einleitung), auch hinsichtlich p53-phosphorylierender Kinasen finden lässt.

2. Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21^{WAF1/CIP1}

Das von dem Gen *cdkn1a* kodierte p21-Protein wurde von mehreren Forschungsgruppen parallel auf verschiedenen Wegen entdeckt und daher zunächst unterschiedlich benannt. So wurde es als p53-Zielgen WAF1, als CDK-Inhibitor CIP1 sowie als Sdi1 (*senescent cell-derived inhibitor 1*), einem Inhibitor der DNA-Synthese in seneszenten Fibroblasten, identifiziert.^{9,12,112} Die CDK-Inhibitor-Familie der CIP/KIP-Proteine, zu der p21 zählt, umfasst des Weiteren p27^{KIP1} (*CDK inhibitory protein 1*; kodiert von *cdkn1b*)¹¹³⁻¹¹⁵ und p57^{KIP2} (kodiert von *cdkn1c*)^{116,117}. Abgesehen von der homologen N-terminalen Region, welche die CDK-Inhibition vermittelt, haben die Mitglieder der CIP/KIP-Familie keine strukturellen Gemeinsamkeiten. Dies weist auf unterschiedliche Regulationsmechanismen und Funktionen hin.¹¹⁸ Im Gegensatz zu den Genprodukten der INK4- (*inhibitor of kinase 4*) Familie (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}), der zweiten CDK-Inhibitor-Familie in Metazoa, binden die CIP/KIP-Proteine nicht nur an CDKs, sondern an beide Untereinheiten der CDK/Cyclin-Holoenzyme. Sie inhibieren Komplexe, an denen die Cycline A, B, D und E beteiligt sind.¹¹⁹

2.1. Struktureller Aufbau

Die Proteine der CIP/KIP-Familie haben keine festgelegte Konformation, sondern liegen in ungebundener Form unstrukturiert vor und bilden erst bei ihrer Bindung an andere Proteine eine spezifische Tertiärstruktur aus.¹²⁰⁻¹²³ Diese strukturelle Flexibilität ermöglicht zum einen eine Regulierung der CIP/KIP-Proteine durch Struktur-beeinflussende Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktionen, zum anderen bietet sie aber auch die Möglichkeit zur Interaktion mit einer Vielzahl an Zielproteinen und damit zur Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse.¹¹⁸ Das p21-Protein besteht aus 164 Aminosäuren. Es besitzt zwei Cyclin-Bindungsmotive (Cy1 und Cy2), die jeweils das Motiv RXL (Arg-X-Leu) als zentralen Bestandteil aufweisen, welches typisch für CDK/Cyclin-interagierende Proteine ist. Während Cy1 N-terminal liegt, befindet sich Cy2 innerhalb des C-terminalen Bereiches (s. Abb. 5).¹²⁴ Das N-terminale CDK-Bindungsmotiv (K) ist zusammen mit der zentral gelegenen 3₁₀-Helix für die CDK-Bindung verantwortlich. Der C-Terminus von p21 beinhaltet neben Cy2 ein NLS sowie die PCNA-Bindungsdomäne (Informationen zu PCNA: s. Abschnitt 2.2).¹²⁵⁻¹²⁷

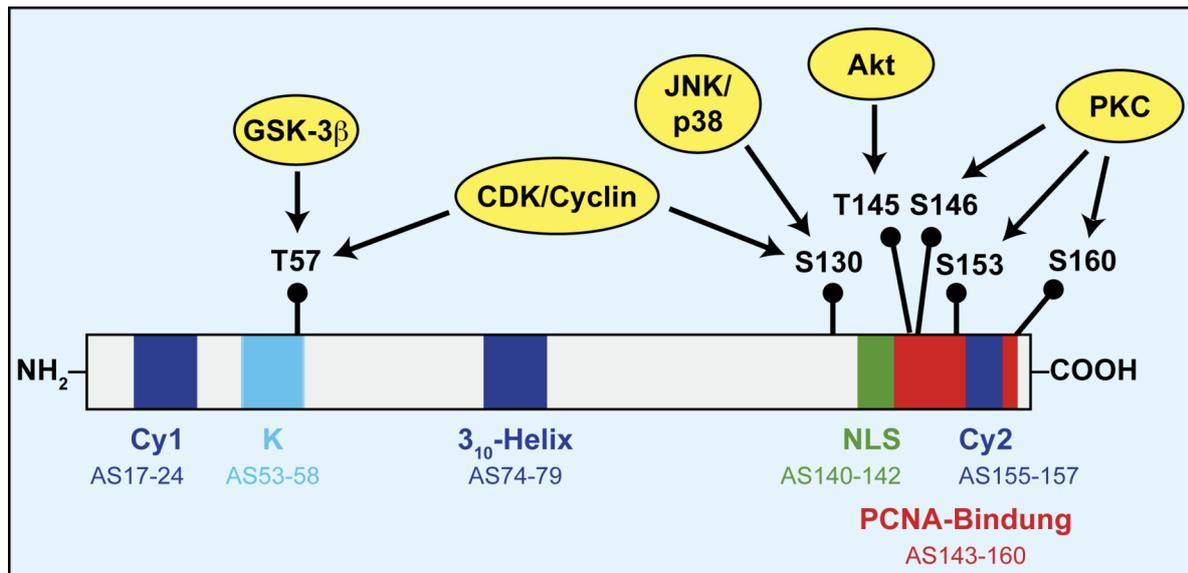


Abb. 5: Struktureller Aufbau des p21-Proteins und wichtige Phosphorylierungsstellen (verändert entnommen aus Child und Mann, 2006).¹²⁴ Cy1, Cy2: Cyclin-Bindungsmotive; K: CDK-Bindungsmotiv; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal. Die angegebenen Kinasen dienen nur als Beispiele.

2.2. Funktionen und Interaktionen

Die hauptsächliche Funktion von p21 in der p53-vermittelten Zellantwort auf genotoxischen Stress besteht in der Arretierung der Zelle in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus sowie in der Induktion zellulärer Seneszenz bei irreparablen DNA-Schäden. Dies geschieht zum großen Teil über die Inhibition entsprechender CDK/Cyclin-Komplexe, an denen CDK1 (auch bekannt als CDC2, *cell division cycle 2*), CDK2, CDK4 oder CDK6 beteiligt sind. Die Inhibition der katalytischen Aktivität dieser CDKs ist auf die Blockierung der ATP-Bindungsstelle durch Tyr77 der 3₁₀-Helix von p21 zurückzuführen.^{124,128} Außerdem verdrängt p21 mit der Bindung an die Cyclin-Untereinheit über seine Cy-Domänen solche Substrate vom CDK/Cyclin-Holoenzym, welche über vergleichbare Cy-Domänen an dieses binden.¹²⁹ Des Weiteren bindet p21 an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), ein wichtiges Hilfsprotein unter anderem für die DNA-Polymerasen δ und ϵ , und hindert dieses an seiner Funktion bei der DNA-Synthese.¹³⁰ So verdrängt p21 verschiedene für die DNA-Replikation essentielle Proteine und ist außerdem ein negativer Regulator PCNA-abhängiger DNA-Reparaturprozesse.¹²⁹

Neben der Zellzyklus-arretierenden Funktion besitzt p21 jedoch auch ein großes anti-apoptotisches Potential und kann auf diese Weise das Überleben der Zelle sichern. So erfolgt an den Mitochondrien die Bindung von p21 mittels seiner N-terminalen Domäne an Procaspase-3, wodurch die Aktivierung dieser Effektor-Caspase verhindert wird.¹³¹ Außerdem inhibiert p21 durch direkte Interaktion die pro-apoptotische Kinase ASK1 (*apoptosis signal regulating kinase 1*),¹³¹ welche bei oxidativem Stress, ER-Stress sowie

TNF-vermittelten Apoptose-Signalen die MAPKs JNK und p38 aktiviert.¹³² Diese beiden MAPKs können durch p21 aber auch direkt inhibiert werden.¹³³ Des Weiteren ist die Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen, welche innerhalb des Apoptose-Signalweges unterhalb der Mitochondrien und oberhalb der Caspase-9 Aktivierung stehen, ein wichtiger Bestandteil der anti-apoptischen Wirkungsweise von p21.^{131,134} Ein weiterer unerwarteter Aspekt der p21-Funktion ist seine Möglichkeit, unter entsprechenden Umständen Proliferations-fördernd zu wirken. Während große Mengen an nukleärem p21 durch CDK-Inhibition einen transienten oder irreversiblen Zellzyklus-Arrest induzieren oder die Zelldifferenzierung vorantreiben, zeichnet sich zytosolisches p21 durch die Förderung der Assemblierung von CyclinD mit CDK4 oder CDK6 aus und vermittelt darüber hinaus die Translokation dieser CDK/Cyclin-Komplexe in den Zellkern.^{129,135,136} Des Weiteren verhindert nukleäres p21, wenn es nur in geringen Mengen vorliegt, den Export von CyclinD1 aus dem Zellkern.¹³⁷

Die vielfältige Funktionsweise von p21 zeigt sich auch anhand seiner positiven und negativen Regulationsmöglichkeiten der Genexpression. Die durch p21 regulierbaren Gene sind an der Zellzyklus-Kontrolle, der DNA-Reparatur oder der Seneszenz-Induktion beteiligt oder besitzen anti-apoptische Funktionen.¹³⁸ Es konnte zwar eine direkte Bindung von p21 an bestimmte Promotorsequenzen nachgewiesen werden,¹³⁹ hauptsächlich findet jedoch eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Co-Aktivatoren statt. Auf diese Weise kann p21 beispielsweise ausgewählte E2F-Zielgene aktivieren oder reprimieren.^{138,140,141} Dies geschieht nicht nur indirekt durch die Inhibition des CDK/pRb-Signalweges (s. Abschnitt 1.2), sondern ist auch auf die direkte Bindung von p21 an den Transkriptionsfaktor E2F zurückzuführen.^{140,141} Die Expression des Onkogens c-Myc, welches an Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung und Apoptose-Induktion beteiligt ist und u. a. die Expression von CDK2/CyclinE positiv reguliert, kann durch p21 gehemmt werden.¹⁴² Auch zählt c-Myc ebenso wie p300/CBP zu den Transkriptionsfaktoren, mit denen p21 interagiert.^{143,144} Die Bindung von p21 an c-Myc inhibiert dessen transkriptionelle Aktivität und vermittelt wahrscheinlich einen Schutz vor c-Myc-induzierter Apoptose.¹³¹ Umgekehrt besitzt c-Myc die Fähigkeit, als transkriptioneller Repressor die Expression von p21 zu deprimieren.

Die zum Teil gegensätzlichen Funktionen von p21, welche vom zellulären Kontext und den jeweiligen Umständen abhängen, in der sich die Zelle befindet, verdeutlichen das sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Potential dieses Proteins.¹²⁹ Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit stellen Untersuchungen zur potentiellen Fähigkeit von p21 dar, als Kinase-Inhibitor die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 direkt zu beeinflussen.

2.3. Regulierung von p21

Der CDK-Inhibitor p21 wird bei genotoxischem Stress von dem Tumorsuppressor p53 transkriptionell aktiviert (s. Abschnitt 1.2). In zellulären Differenzierungsprozessen hingegen erfolgt seine Transaktivierung p53-unabhängig über eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, von denen Sp1 und Sp3 (z. T. in Kooperation mit p300 oder p300/CBP), BRCA1, E2F1 und E2F3 nur einige Beispiele darstellen.^{129,145} Aufgrund seines permanenten proteasomalen Abbaus hat das p21-Protein eine kurze Halbwertszeit von 20 bis 60 Minuten.¹²⁹ Die Erhöhung der p21-Menge nach DNA-Schädigung geht zwar auf seine transkriptionelle Aktivierung zurück, doch ist für die p21-Akkumulation auch der Schutz vor proteasomaler Degradation notwendig. Mit der Bindung von WIP39 (*WAF1/CIP1 stabilizing protein 39*) an p21 wird das Chaperon Hsp90 rekrutiert und dadurch das p21-Protein stabilisiert.¹⁴⁶ Auch die post-transkriptionelle Regulation von p21 über RNA-bindende Proteine¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ sowie durch den Einfluss von mikroRNAs^{150,151} stellt einen wichtigen Aspekt der p21-vermittelten Signalwege dar. Die Regulation des p21-Proteins auf post-translationaler Ebene erfolgt hauptsächlich über die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Resten sowie über Protein-Protein-Interaktionen, welche über Stabilität, subzelluläre Verteilung und Bindungsspezifität von p21 entscheiden. Der proteasomale Abbau von p21 wird auf unterschiedlichen Wegen reguliert. Liegt p21 in gebundener Form an CDK2/CyclinE bzw. A, CDK1/CyclinA bzw. B oder PCNA vor, so dient die Ubiquitinierung des p21-Proteins als Markierung für die proteasomale Degradation.¹²⁹ Es wurden bisher drei verschiedene E3 Ubiquitin-Ligasen identifiziert, die an verschiedenen Punkten des normalen Zellzyklus für diese Ubiquitinierung zuständig sind.¹²⁹ Für p21, welches nicht an diese CDK/Cyclin-Komplexe oder an PCNA gebunden ist, wird sein Abbau Ubiquitin-unabhängig durch eine direkte Interaktion der C-terminalen Domäne von p21 mit der C8 α -Untereinheit des Proteasoms vermittelt.^{129,152}

Das p21-Protein besitzt mehrere für seine Regulierung relevante Phosphorylierungsstellen (s. Abb. 5). Thr57 liegt innerhalb der CDK-Bindungsdomäne von p21 und ist außerdem Bestandteil der Sequenzen, welche die Bindung an E2F-1¹⁴⁰, JNK¹³³, ASK1¹⁵³ und TSG101¹⁵⁴ vermitteln. Die Phosphorylierung von Thr57 spielt keine große Rolle hinsichtlich des Einflusses von p21 auf die Aktivität der CDK/Cyclin-Komplexe der G1-Phase,¹²⁴ doch ist sie eng mit dem Übergang der Zelle von der G2- in die M-Phase verknüpft. An dieser Stelle des Zellzyklus kann neben einer erhöhten p21-Menge auch eine gesteigerte Phosphorylierung von p21 an Thr57 nachgewiesen werden, für die sich CDK2 verantwortlich zeigt.^{13,155,156} Hierdurch wird die Bindungsfähigkeit von p21 an CyclinB1 erhöht und damit die Aktivierung von CDK1/CyclinB1 gefördert.¹⁵⁶ In diesem Kontext wirkt sich die Bindung von p21 an den CDK/Cyclin-Komplex also vorantreibend auf den Zellzyklus aus. Diese nicht-inhibierende Wirkung von p21 auf den CDK1/CyclinB1-Komplex schließt folglich eine

Beteiligung der blockierenden 3₁₀-Helix an der Bindung aus. Auch GSK-3 β vermittelt die Phosphorylierung von Thr57, welche in diesem Zusammenhang allerdings mit einer verringerten p21-Stabilität korreliert.¹⁵⁷ Für GSK-3 β ist außerdem nach der Aktivierung von ATR mittels UV-Strahlung die Phosphorylierung von p21 an Ser114 beschrieben, welche ebenfalls die Degradation von p21 induziert.¹⁵⁸ Für die MAPKs JNK1 und p38 α ist *in vivo* die Phosphorylierung von p21 an Ser130 gezeigt worden, welche mit einer Stabilisierung des p21-Proteins einhergeht.¹⁵⁹ Ser130 wird darüber hinaus aber auch von CDK2/CyclinE im normalen Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase phosphoryliert, wodurch in diesem Kontext seine Ubiquitinierung und die anschließende Proteolyse eingeleitet werden.^{129,160} Erst kürzlich wurde beschrieben, dass auch ERK2 die Phosphorylierung von p21 an Ser130 sowie an Thr57 vermittelt, was nach einer Translokation des p21-Proteins vom Nukleus ins Zytoplasma ebenfalls seinen Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau zur Folge hat.¹⁶¹

Auch die Phosphorylierung sowohl von Thr145 als auch von Ser153 fördert die zytoplasmatische Lokalisation von p21.¹²⁴ Thr145 liegt in unmittelbarer Nähe zum NLS (AS140-142) und wird durch AKT1/PKB (*protein kinase B*) phosphoryliert.^{162,163} Hierdurch wird die Interaktion von p21 mit Importin und damit seine nukleäre Translokation verhindert.¹⁶⁴ In entsprechenden Mutationsstudien sind Phosphorylierungs-imitierende p21-Mutanten (T145D, T145E) unabhängig von einer AKT-Aktivierung im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen die Phosphorylierungs-defiziente Mutante (T145A) trotz aktiver AKT1 verstärkt im Nukleus zu finden ist.¹⁶³ Diese Beobachtungen sind jedoch Zelltyp-spezifisch und konnten nicht in allen untersuchten Zellsystemen bestätigt werden.^{163,165} Dies unterstreicht die wichtige kollaborierende Rolle der Phosphorylierung von Ser153 durch PKC (*protein kinase C*) bei der Vermittlung der zytoplasmatischen Lokalisation von p21.¹⁶⁶ Das an den C-Terminus von p21 (AS145-164) bindende Calmodulin vermittelt zum einen den nukleären Import von p21 und verhindert zum anderen seinen nukleären Export, indem es Ser153 unzugänglich für PKC macht.^{166,167} Die Phosphorylierung von Ser153 wiederum hat eine starke Verminderung der Bindungsfähigkeit von Calmodulin an p21 zur Folge und unterdrückt damit die p21-Translokation in den Nukleus.¹⁶⁶ Insgesamt fördert die AKT- und PKC-vermittelte zytoplasmatische Lokalisation von p21 die Proliferation, indem CDKs und PCNA nicht durch p21 inhibiert werden können.

Thr145 liegt ebenso wie Ser146 im minimalen PCNA-Konsensus-Bindungsmotiv (QT₁₄₅S₁₄₆MTDFY)¹⁶⁸. Die Phosphorylierung von Thr145 durch AKT1 destabilisiert den PCNA-p21-Komplex. Phosphorylierungs-imitierende p21-Mutanten können nicht mehr an PCNA binden, während sich die Phosphorylierungs-defiziente Mutante durch eine anhaltende starke PCNA-Bindung auszeichnet.¹⁶³ Entsprechende *in vitro* Untersuchungen lassen für AKT1 neben der bevorzugten Phosphorylierungsstelle Thr145 auch die Phosphorylierung von Ser146 erkennen.^{162,163} Diese beruht *in vivo* jedoch hauptsächlich auf PKC, welche ihrerseits von AKT aktiviert wird.¹⁶⁹ Je nach zellulärem Kontext kann nach der Ser146-Phosphorylierung eine Stabilisierung (Phosphorylierung durch PKC δ)¹⁷⁰ oder eine Destabilisierung (Phosphorylierung durch PKC ζ)¹⁶⁹ von p21 beobachtet werden. Ob die Phosphorylierung selbst die Interaktion von p21 mit dem Proteasom beeinflusst, ist unklar. Wie schon die Phosphorylierung von Thr145 beeinträchtigt auch die Phosphorylierung von Ser146 sowie die ebenfalls von PKC vermittelte Phosphorylierung von Ser160 die Bindung von p21 an PCNA.^{169,171} Auch die Bindung des Transkriptionsfaktors c-Myc an die C-terminale Region von p21 veranlasst die Freisetzung von PCNA.¹⁷² Durch die Einschränkung der p21-PCNA-Interaktion wird die DNA-Replikation und damit auch die Zellproliferation gefördert.

Inwieweit die Phosphorylierung von Thr145 auch die inhibierende Bindung von p21 an CDK2 beeinträchtigt, ist mittels Überexpression entsprechender Mutanten untersucht worden, was jedoch zu gegensätzlichen Ergebnissen führte.^{162,163} Ein allgemeines Problem bei überexprimiertem p21 besteht allerdings in der Störung des molaren Verhältnisses von p21 zu seinen Interaktionspartnern, so dass die Gefahr artifizieller Ergebnisse gegeben ist.¹²⁴ Es ist jedoch davon auszugehen, dass an Thr145 phosphoryliertes p21 unter physiologischen Bedingungen aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisation an der Interaktion mit CDK2-Komplexen gehindert wird. Die Unfähigkeit der Phosphorylierungs-imitierenden p21-Mutante, einen Zellzyklus-Arrest zu induzieren, stimmt mit dieser Annahme überein.¹⁵³ Darüber hinaus fördert nach AKT-Aktivierung zytoplasmatisch lokalisiertes p21 erwartungsgemäß die Assoziierung und damit die Aktivität von CDK4/CyclinD1.¹⁶²

Insgesamt hängt die Auswirkung einer bestimmten p21-Phosphorylierung also vom Zelltyp, dem zellulären Kontext und dem Expressionsgrad von p21 ab, was bei unterschiedlichen Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen führen kann. In der vorliegenden Arbeit wird eine neue p21-phosphorylierende Kinase vorgestellt und ihr Einfluss auf die Stabilität des p21-Proteins untersucht.

3. Die p90 ribosomalen S6-Kinasen (RSKs)

Namensgebend für die p90 ribosomalen S6-Kinasen (RSKs) ist ihre ursprüngliche Entdeckung als Serin/Threonin-Kinasen, welche das S6-Protein der 40S ribosomalen Untereinheit (rpS6) phosphorylieren.¹⁷³ Es wurden vier humane RSK-Gene (*rsk1-4*) identifiziert, deren Proteinsequenzen zu 75-80% identisch sind.¹⁷³ Die Aktivierung der RSKs erfolgt fast ausschließlich in Abhängigkeit der MAPKs ERK1 und ERK2.¹⁷⁴ Die mit den RSKs strukturell verwandten Kinasen MSK1/2 (*mitogen- and stress-activated kinase 1/2*) können darüber hinaus auch von p38 MAPK direkt aktiviert werden.^{175,176}

RSKs können regulierend auf Transkriptions- und Translationsprozesse einwirken, sie sind an Zellwachstum und Zellmotilität beteiligt und üben wichtige Funktionen hinsichtlich Proliferation und Überleben der Zelle aus.¹⁷⁷ Darüber hinaus ist aber noch relativ unbekannt, welche spezifischen Funktionen den einzelnen RSK-Isoformen zukommen und welche zellulären Aufgaben ihnen gemeinsam sind. RSK1-3 weisen ein ubiquitäres Expressionsmuster auf, was eine gewisse funktionelle Redundanz vermuten lässt.¹⁷⁸ Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Isoformen hinsichtlich ihres Expressionsgrades in den unterschiedlichen Geweben, so dass auch spezifische Funktionen anzunehmen sind.¹⁷⁸ Dem gegenüber kann die Expression von RSK4, welche allgemein deutlich geringer ist als jene von RSK1-3, nur in spezifischen Gewebetypen nachgewiesen werden.¹⁷⁹

In der Entwicklung der Maus ist eine lokal und zeitlich unterschiedliche Expression von RSK1 und RSK3 festgestellt worden. So dominiert in der frühen Phase der Entwicklung des Nervensystems, welche durch eine starke Zellproliferation gekennzeichnet ist, die Isoform RSK1, wohingegen die zelluläre Differenzierung in der späteren Entwicklungsphase von der RSK3-Expression bestimmt wird.¹⁷⁷ RSK1 wird in der späteren Phase der Gesamtentwicklung in solchen Geweben stark exprimiert, welche eine hohe Proliferationsrate aufweisen, wie z.B. in der Leber, der Lunge und dem Darmepithel.¹⁷⁷ Im Gehirn einer adulten Maus ist die höchste RSK2-Expression in Strukturen mit hoher synaptischer Aktivität zu finden, welche für das Lernen und für kognitive Fähigkeiten von großer Bedeutung sind.¹⁷⁸ Analog zu dieser Beobachtung führt der Verlust der RSK2-Funktion beim Menschen zum Coffin-Lowry-Syndrom, einem X-chromosomal vererbten Dismorphiesyndrom mit mentaler Retardierung.¹⁸⁰ Neben den geistigen Entwicklungsstörungen treten bei dieser Krankheit Fehlbildungen des Skeletts, des Gesichts und der Hände auf.¹⁸⁰

In ruhenden Zellen sind inaktive RSK1-3 hauptsächlich im Zytoplasma zu finden, doch aufgrund ihrer Bindung an ERK1/2 ist auch eine gewisse nukleäre Lokalisation zu beobachten.¹⁷⁴ Nach entsprechender Stimulation der Zellen, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, welche zur Aktivierung von ERK1/2 führt, werden die RSKs von diesen aktivierend phosphoryliert. Für RSK1-3 wurde eine anschließende Akkumulierung im Nukleus beobachtet.¹⁷⁴ Die Mechanismen der nukleären Translokation sind unbekannt, da ausschließlich RSK3 über ein NLS verfügt, dessen Funktionalität jedoch nicht bestätigt ist.¹⁸¹ Die Anwesenheit aktiver RSK2 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma weist auf eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung ihrer Substrate hin.¹⁷⁴ RSK4 unterscheidet sich deutlich von den drei anderen Isoformen, da sie hauptsächlich zytosolisch vorliegt und Wachstumsfaktor-unabhängig konstitutiv aktiv ist.¹⁷⁹ Für zytoplasmatische RSK1 ist gezeigt worden, dass vor ihrer Akkumulierung im Nukleus eine Translokation zur Plasmamembran stattfindet, die wahrscheinlich auf den Einfluss von ERK zurückzuführen ist.¹⁷³ An der Plasmamembran erfolgt eine weitere Aktivierung von RSK1, wahrscheinlich vermittelt durch eine bisher noch nicht identifizierte membranständige Kinase. Eine N-terminal myristoylierte und damit an die Plasmamembran rekrutierte RSK1-Mutante ist trotz fehlender funktioneller ERK-Bindungsdomäne dauerhaft aktiv.¹⁸²

3.1. Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismus

Die RSKs verfügen über zwei unterschiedliche funktionelle Kinasedomänen, welche durch eine konservierte, etwa 100 Aminosäuren lange regulatorische Linker-Region miteinander verbunden sind (s. Abb. 6).¹⁷³ Die aminoterminal Kinasedomäne (NTKD) gehört ebenso wie beispielsweise PKA, AKT/PKB, PKC und die S6Ks zur AGC-Kinasefamilie. Sie katalysiert die Phosphorylierung der RSK-Substrate und kann außerdem durch Autophosphorylierung die Interaktion zwischen ERK und RSK regulieren, welche über eine spezifische C-terminale ERK-Bindungssequenz, die D-Domäne, erfolgt.¹⁷³ Die carboxyterminale Kinasedomäne (CTKD) zählt zur Familie der CaMK (*Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases*), welche u. a. auch AMPK (*AMP-activated protein kinase*) sowie die MAPK-aktivierten Proteinkinase MK2 und MK3 umfasst. Die einzige bekannte Aufgabe der CTKD ist die Aktivierung der NTKD durch Autophosphorylierung.¹⁷³

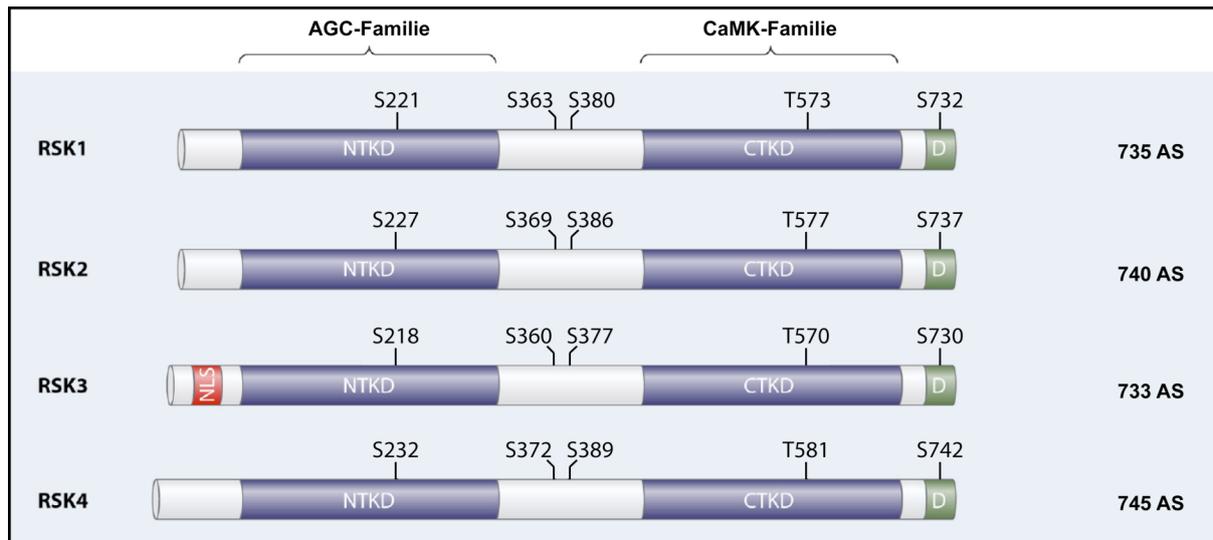


Abb. 6: Struktureller Aufbau und wichtige Phosphorylierungsstellen der humanen RSKs (verändert entnommen aus Cargnello und Roux, 2011).¹⁸³ NTKD: N-terminale Kinasedomäne; CTKD: C-terminale Kinasedomäne; D: D-Domäne (ERK-Bindungssequenz); NLS: Nukleäres Lokalisationssignal; AS: Aminosäuren

Es sind vier Phosphorylierungsstellen beschrieben, welche für die Aktivierung der RSKs essentiell sind: Ser221, Ser363, Ser380 und Thr573 (die Nummerierung bezieht sich auf humane RSK1).^{173,184} Ser221 in der Aktivierungsschleife der NTKD sowie Ser363 im Windungsmotiv und Ser380 im hydrophoben Motiv der Linker-Region liegen innerhalb von Sequenzen, welche zwischen den verschiedenen AGC-Kinasen hochkonserviert sind.¹⁸⁵ Die Aktivierung der RSKs erfolgt in mehreren Phosphorylierungsschritten (s. Abb. 7). In ruhenden Zellen liegen ERK1/2 und RSK als inaktiver Komplex aneinander gebunden vor. Nach einem entsprechenden Stimulus phosphoryliert die aktivierte ERK Thr573 in der Aktivierungsschleife der CTKD, welche daraufhin die Autophosphorylierung von Ser380 im hydrophoben Motiv der Linker-Region katalysiert. Die Phosphorylierung von Ser380 kann allerdings auch unabhängig von der CTKD erfolgen.^{173,177} ERK phosphoryliert außerdem Ser363 im Windungsmotiv der Linker-Region. Durch die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs wird eine Bindungsdomäne für die Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) geschaffen. Die rekrutierte und aktivierte PDK1 phosphoryliert Ser221 in der Aktivierungsschleife der NTKD, wodurch diese vollständig aktiviert wird.^{173,177} Das Konsensusmotiv für die Phosphorylierung der N-terminalen Aktivierungsschleife ist unter den AGC-Kinasen hochkonserviert und PDK1 ist für die Aktivierung einer Vielzahl von AGC-Kinasen essentiell,^{173,186} jedoch nicht für die konstitutiv aktive RSK4.¹⁷⁹ Am Beispiel der RSK1 ist gezeigt worden, dass die NTKD die Autophosphorylierung von S732 nahe der D-Domäne vermitteln kann und damit die Freisetzung von ERK bewirkt, was eine reduzierte RSK-Aktivität zur Folge hat.¹⁸⁷ Diese Deaktivierung durch die Freisetzung von ERK erfolgt bei aktivierter RSK3 später als bei aktivierter RSK1/2.¹⁸⁷

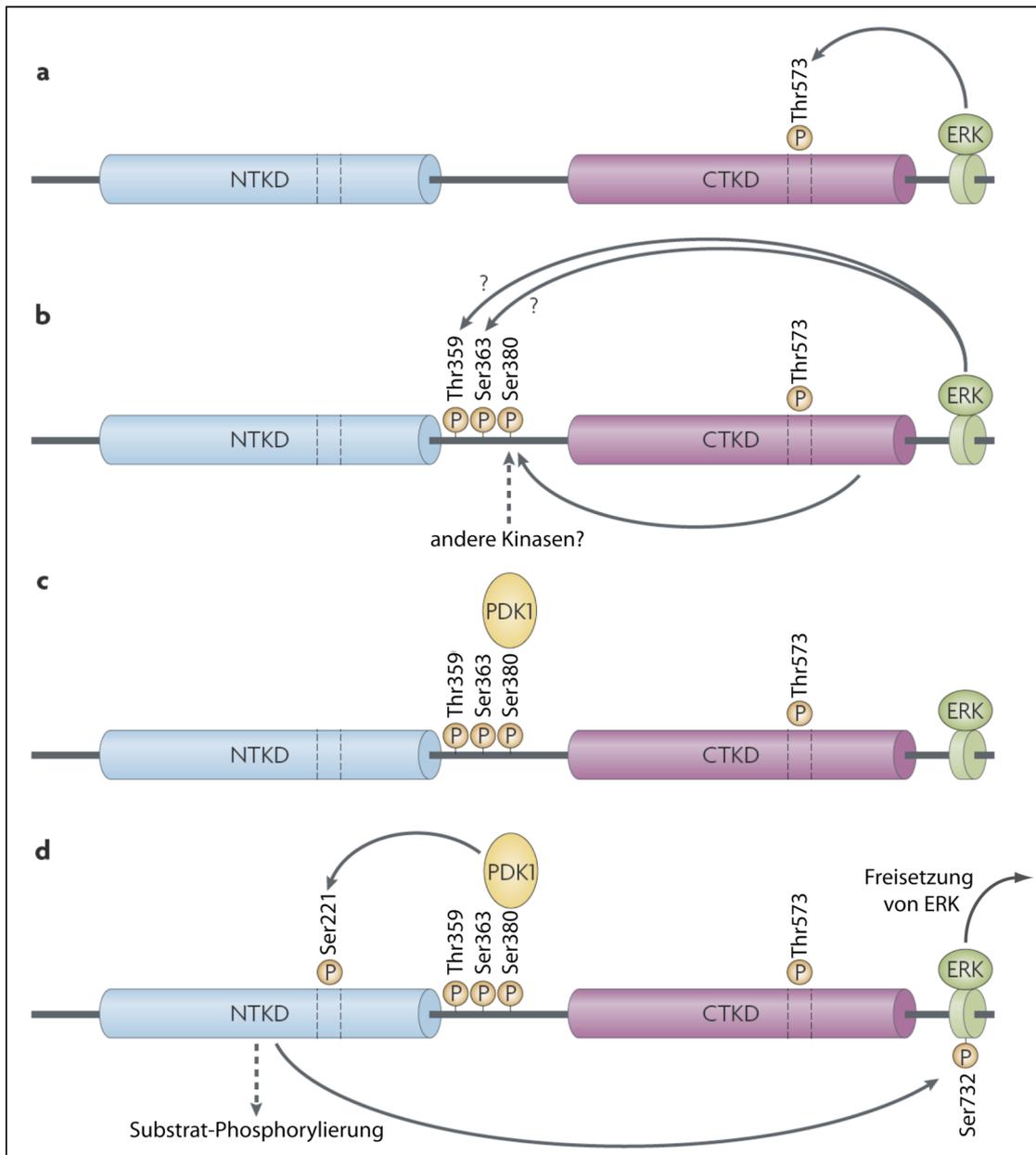


Abb. 7: Schematische Darstellung der RSK-Aktivierung (verändert entnommen aus Anjum und Blenis, 2008).¹⁷³ Die Nummerierung der Phosphorylierungsstellen bezieht sich auf humane RSK1. Abkürzungen: s. Abb. 6. Erläuternde Informationen: s. Text

Als bisher einzige mit RSKs interagierende Phosphatase wurde PP2C δ (*protein phosphatase 2C δ*) beschrieben, welche an alle vier humanen RSK-Isoformen bindet. Für RSK2 konnte *in vivo* eine Dephosphorylierung durch PP2C δ in Verbindung mit einer verminderten Kinase-Aktivität gezeigt werden.¹⁸⁸ ERK1/2 wiederum phosphorylieren PP2C δ und wirken damit deren Bindung an RSKs entgegen.¹⁷³ Außerdem findet innerhalb der aktivierten RSKs eine Bindung der Linker-Region an die NTKD statt, welche die Kinase-Aktivität erhöht und vermutlich Schutz vor einer Dephosphorylierung bietet.¹⁸⁹ Hierfür erfolgt eine Interaktion des phosphorylierten hydrophoben Motivs sowie des phosphorylierten Windungsmotivs der Linker-Region mit Phosphat-Bindungsstellen innerhalb der NTKD.^{189,190}

3.2. Funktionen und Substrate

Für die RSKs wurden bereits zahlreiche Substrate beschrieben, deren Anzahl fortwährend steigt. Im Folgenden soll ein Überblick über die zelluläre Bedeutung der RSKs gegeben und eine Auswahl an RSK-Substraten präsentiert werden.

Für RSK1 wurde eine deutliche Bevorzugung der Serin-Phosphorylierung gegenüber der Threonin-Phosphorylierung nachgewiesen.¹⁹¹ Die insbesondere von der Aktivierung durch ERK abhängigen RSKs scheinen Bestandteil einer negativen *Feedback*-Schleife zu sein und können sich *in vivo* blockierend auf ERK-vermittelte Differenzierungsprozesse auswirken.¹⁹² Die RSKs haben einen positiven Effekt auf die Translations-Initiation und die Proteinsynthese. Zum einen vermitteln sie, wie ihr Name bereits verrät, spezifische Phosphorylierungen des S6-Proteins der ribosomalen 40S-Untereinheit, dessen Phosphorylierung in somatischen Zellen jedoch hauptsächlich durch die p70 S6Ks reguliert wird.¹⁷³ Zum anderen nehmen sie durch Phosphorylierungsprozesse auf unterschiedlichen Ebenen direkt und indirekt Einfluss auf weitere Komponenten der Translationsmaschinerie.^{173,177} Hierzu zählt auch die inhibierende Phosphorylierung von GSK-3 β , wodurch deren hemmende Wirkung auf den Translations-Initiationsfaktor eIF2B aufgehoben wird.^{193,194}

Die RSKs fördern das Überleben der Zelle, indem sie sowohl pro-apoptische Proteine durch Phosphorylierung inaktivieren als auch die Expression anti-apoptischer Proteine indirekt über die Modifikation entsprechender Transkriptionsfaktoren erhöhen.¹⁷³ So werden das mitochondriale BH3-*only* Protein Bad und die pro-apoptische Kinase DAPK (*death-associated protein kinase*) durch RSKs inaktiviert.^{173,195} Des Weiteren fördert die RSK-vermittelte Phosphorylierung des BH3-*only* Proteins Bim_{EL} bzw. der Caspase-8, einer Initiator-Caspase, welche erst kürzlich als RSK2-Substrat beschrieben wurde, den proteasomalen Abbau dieser pro-apoptischen Proteine.^{196,197} Dem gegenüber aktivieren RSKs die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor κ B*) und CREB (*cAMP response element-binding protein*) und veranlassen auf diese Weise die Transaktivierung überlebensfördernder Proteine.^{177,198,199}

Nukleäre RSK1/2 phosphorylieren und regulieren u. a. die Transkriptionsfaktoren SRF (*serum response factor*)²⁰⁰, CREB^{198,201} und ER α (*estrogen receptor α*)²⁰². Auch für ATF4, einem CREB-Familien-Transkriptionsfaktor, der eine hohe Bedeutung für die Osteoblasten-Differenzierung hat, ist die Phosphorylierung durch RSK2 nachgewiesen worden.²⁰³ Genprodukte der „*immediate early*“ (IE)-Gene, also solcher Gene, deren Transkription unmittelbar nach Stimulation der Zelle erfolgt, werden von den RSKs auf transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert. Hierzu zählt c-Fos, dessen Transkriptions-Induktion über

PDGF (*platelet-derived growth factor*) und IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) im Menschen und über EGF (*epidermal growth factor*) in der Maus nachweislich von RSK2 abhängt, wahrscheinlich durch die Aktivierung des Elk1/SRF-Komplexes bzw. durch die Phosphorylierung von CREB.^{204,205} Außerdem wird c-Fos von RSK1/2 stabilisierend phosphoryliert, wodurch sein Wachstums-fördernder Effekt erhöht wird.^{173,177} Auch das IE-Genprodukt Nur77 wird durch RSK1-vermittelte Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung der IE-Genprodukte durch RSKs erfolgt jedoch nur bei fortwährender ERK- und RSK-Aktivierung und bildet somit einen molekularen Sensor für die nukleäre Lokalisation von ERK und RSK sowie für die Dauer und die Stärke des Signals.^{173,177} Die aktivierende Bindung von RSK1 an die transkriptionellen Co-Aktivatoren CBP und p300 könnte ein Mechanismus zur Regulation von Transkriptionsfaktoren wie CREB, c-Fos und NF-κB sein.^{206,207}

Die Beeinträchtigung der RSK-Funktion durch pharmakologische Inhibition oder siRNA (*small interfering RNA*) führt bei verschiedenen humanen Krebszelllinien zu einer Einschränkung ihrer Proliferation. Zusammen mit der nachgewiesenen erhöhten Expression von RSK1/2 in diesen Krebszelllinien deutet dies auf eine Proliferations-fördernde Funktion der RSKs hin.^{208,209} In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis wird die Proliferationsrate durch die ektopische Expression von RSK2 erhöht. Zudem fördern RSK1/2 die Zelltransformation und die Tumorgenese.^{177,210} Durch die transkriptionelle und translationale Regulation des Transkriptionsfaktors c-Fos, welcher beim Übergang von der G1- zur S-Phase die Expression von CyclinD1 fördert, haben die RSKs einen stimulierenden Einfluss auf den Zellzyklus und fördern damit auch das onkogene Potential von c-Fos.^{173,211} Zusätzlich phosphorylieren RSK1/2 den CDK-Inhibitor p27^{KIP1} und verhindern damit seine Translokation in den Nukleus, da diese Phosphorylierung seine Bindung an das zytoplasmatische 14-3-3 Protein bewirkt.²¹² Die Ergebnisse, welche zur Funktion von RSK3 veröffentlicht wurden, sind gegensätzlich. Einerseits kann für diese Isoform ein ebenfalls positiver Effekt auf die Proliferation beobachtet werden,¹⁸¹ andererseits verhält sich RSK3 jedoch auch wie ein potentieller Tumorsuppressor, dessen Überexpression die Proliferationsrate in Ovarialkarzinomzellen durch die Induktion eines G1-Arrestes herabsetzt und darüber hinaus Apoptose fördert.²¹³ Es ist unklar, ob in diesem Fall eine negative *Feedback*-Schleife auf den Ras/MAPK-Signalweg ausschlaggebend ist. Auch RSK4 besitzt eine Tumorsuppressor-Funktion. Für diese Isoform ist ein negativer Einfluss auf die Proliferation während der Embryogenese sowie eine Funktion im p53-vermittelten Zellzyklus-Arrest beschrieben.^{214,215} Des Weiteren zeigte eine Studie, dass die RSK4-Expression in vielen Nieren- und Kolon-Karzinomzelllinien im Vergleich zu dem jeweiligen gesunden Gewebe herunterreguliert ist.²¹⁶ In seneszenten Zellen wurde dagegen eine erhöhte Menge

an endogener RSK4 nachgewiesen und die ektopische Überexpression von RSK4 induzierte pRb-abhängig zelluläre Seneszenz, während die gezielte RSK4-Inhibition zur Immortalisierung humaner Fibroblasten führte.²¹⁶ Erst kürzlich wurde von der gleichen Arbeitsgruppe beschrieben, dass die tumorsuppressive RSK4-induzierte Seneszenz p21-vermittelt ist.²¹⁷ Doch ebenso wie für RSK3 kann auch für RSK4 ein onkogenes Potential nicht ausgeschlossen werden, da in Brustkrebszellen eine erhöhte RSK4-Expression nachgewiesen wurde.²¹⁸

Bei den RSKs handelt es sich um eine Gruppe von Kinasen, deren zelluläre Bedeutung ebenso Gegenstand aktueller Forschung ist wie die Suche nach neuen Substraten. Dabei werden ganz unterschiedliche Bereiche wie Proliferation, Zellmotilität oder auch zelluläre Stressantworten berücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit wird ein neues RSK-Substrat mit vielfältigen zellulären Funktionen vorgestellt und die Bedeutung dieser neu beschriebenen Interaktion auf zellulärer Ebene untersucht.

4. Zielsetzung

Als Schlüsselregulator bei der Vermittlung der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress ist der Tumorsuppressor p53 Gegenstand zehntausender Publikationen. Doch bis heute konnten nicht alle Aspekte seiner post-translationalen Regulation geklärt werden, zumal häufig Diskrepanzen zwischen *in vitro* Beobachtungen und *in vivo* Untersuchungen auftreten. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten zunächst Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 bei der zellulären Entscheidung zwischen Apoptose und Seneszenz nach ionisierender Bestrahlung untersucht werden. Hierbei fiel in dem verwendeten Zellsystem ein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand des p53-Proteins und der An- bzw. Abwesenheit des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1} auf. Daher sollte im Folgenden die Möglichkeit einer direkten Modulierbarkeit p53-phosphorylierender Kinasen durch das p21-Protein in einer *in vitro* Studie überprüft werden. Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei Untersuchungen zum Einfluss der MAPKs auf zelluläre Stressantworten ein Zusammenhang zwischen den ERK1/2-aktivierten RSKs und der zellulären p21-Proteinmenge aufgezeigt. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob es sich bei p21 um ein bisher nicht beschriebenes RSK-Substrat handelt. Bei Bestätigung der RSKs als p21-phosphorylierende Kinasen sollte(n) im Anschluss die entsprechende(n) Phosphorylierungsposition(en) identifiziert sowie die Auswirkung RSK-vermittelter Phosphorylierung auf die p21-Stabilität *in vivo* analysiert werden.

II Material und Methoden

1. Material

Chemikalien:

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Tabelle 1: Kinase-Inhibitoren

Bezeichnung	inhibierte Kinase	Bezugsquelle
U0126	MEK1/2	Calbiochem / Merck
SB203580	p38	Calbiochem / Merck
JNK-Inhibitor I	JNK	Calbiochem / Merck
BI-D1870	RSK	Division of Signal Transduction Therapy, The University of Dundee (Schottland, UK)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Gel Blotting</i> Papier	Whatman® Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturschalen, -platten und -flaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Hyperfilm</i> ECL	Amersham / GE Healthcare, München
<i>Hyperfilm</i> MP	Amersham / GE Healthcare
Kryoröhrchen	NUNC / Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
Nitrozellulose Transfer-Membran	Whatman® Schleicher & Schuell
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg; Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf; Molecular BioProducts / Thermo Fisher Scientific, San Diego (CA, USA)
<i>Poly-Prep</i> Chromatographie-Säulen	Bio-Rad Laboratories, München
Präzisions Dispenser- <i>Tips</i>	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen mit Verschluss	Falcon / BD Biosciences, Heidelberg; Greiner Bio-One
Skalpell	Feather, Osaka (Japan)
Sterile Einmal-Pipetten	Costar / Corning Inc., Corning (NY, USA)
Sterilfilter	Whatman® Schleicher & Schuell
Zell-Schaber	Sarstedt
Zentrifugationsgefäße mit Schraubverschluss	Falcon / BD Biosciences; Greiner Bio-One

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Ektrophoresekammer	Modell 40-1214	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Bestrahlungsgerät (γ -IR)	Gulmay Medical RS225	IsodoseControl, Bochum
Blotapparatur	MiniProtean III	Bio-Rad Laboratories
CCD-Kamera-System / <i>Software</i>	LAS 3000 / AIDA	Fujifilm Europe, Düsseldorf
	ImageQuant LAS 4000 / Multi Gauge	GE Healthcare, München
Durchflusszytometer / <i>Software</i>	FACSCalibur / CellQuest Pro	BD Biosciences
Entwicklungsmaschine	CURIX 60	Agfa-Gevaert, Bonn
Fluoreszenz-Mikroskop mit Digital-Kamera / <i>Software</i>	Axio Observer.A1 mit AxioCam MRC / AxioVision	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Geltrockner	Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H250	Roth
Inkubationsschüttelschrank	Certomat BS-1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Kolbenhubpipetten	Research Plus	Eppendorf
Licht-Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging
Mikroplatten-Fluorometer	Infinite M200	Tecan, Langenfeld
NanoDrop Spektralphotometer	NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie
pH-Meter	Orion 555A	Thermo Scientific Orion, Cambridgeshire (UK)
<i>Real-Time</i> PCR-Gerät	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Röntgenfilm-Belichtungskassette	Hypercassette	Amersham / GE Healthcare
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	MiniProtean III	Bio-Rad Laboratories
Spectrophotometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech / GE Healthcare, München
Sterilarbeitsbank	HeraSafe	Heraeus / Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<i>Thermocycler</i>	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
<i>Thermocycler</i> mit Temperaturgradient	TProfessional Standard Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
<i>Thermomixer</i>	Comfort	Eppendorf
Waagen	CPA423S / CP124S	Sartorius Stedim Biotech
Zentrifugen	Multifuge 3SR+ und Tischzentrifuge Fresco 17	Heraeus / Thermo Fisher Scientific
	Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
	RC5B Plus (<i>Superspeed</i>)	Sorvall / Thermo Fisher Scientific, , Langenselbold

2. Methoden

2.1. Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA wurde das FuGENE® 6 Transfektionsreagenz der Firma Roche Applied Science (Mannheim) bzw. das Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die vorherige Kultivierung der Zellen sowie die Durchführung der Transfektion erfolgte jeweils den Herstellerangaben entsprechend.

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA (*ON-TARGETplus SMARTpool*) wurde das DharmaFECT1 siRNA Transfektionsreagenz verwendet. Dieses wurde ebenso wie die siRNA von der Firma Dharmacon / Thermo Fisher Scientific (Epsom, UK) bezogen.

Tabelle 4: Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Charakteristika	Medium/Supplemente	Bezugsquelle
HCT116/wt	humane Kolonkarzinom-Zellen	McCoy's 5a (PromoCell, Heidelberg) mit 10% (v/v) FCS (Biowest; Miami, FL, USA), 100 Units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories; Pasching, Österreich)	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116/p21-/-	p21-defizientes Derivat der HCT116/wt	wie HCT116/wt	B. Vogelstein
HCT116/p53-/-	p53-defizientes Derivat der HCT116/wt	wie HCT116/wt	B. Vogelstein
MCF-7/Casp-3	humane Mammakarzinom-Zellen mit stabiler Re-Expression von Caspase-3	RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories), 10% (v/v) FCS (Biowest), 100 Units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 400 µg/ml G418 (PAA Laboratories)	R. U. Jänicke (Düsseldorf)

2.2. Herstellung von Zellextrakten

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, durch Zentrifugation (900 x g, 5 min, 4°C) pelletiert und mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden entweder sofort verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert. Der Aufschluss der Zellen (30 min auf Eis) erfolgte in NP-40-Lysepuffer. Zelldebris wurde nach Zentrifugation (20.800 x g, 30 min, 4°C) vom Zellextrakt abgetrennt und verworfen. Die Protein-Konzentrationsbestimmung wurde nach der Methode von Bradford mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt.

PBS:
(PAA Laboratories) 0,2 g/l KCl
 0,2 g/l KH₂PO₄
 8,0 g/l NaCl
 1,15 g/l Na₂HPO₄ wasserfrei

NP-40-Lysepuffer:	50 mM Tris/Cl pH7,4
	150 mM NaCl
	1 % (v/v) NP-40
	1 mM Natrium-Pyrophosphat
	1 mM Natriumorthovanadat
	10 µg/ml Pepstatin
	10 µg/ml Aprotinin
	10 µg/ml Leupeptin
	1 mM PMSF
	1 mM DTT

2.3. Immunpräzipitation

Zunächst wurden Zellextrakte unter Verwendung des NP-40-Lysepuffers (ohne DTT) hergestellt (s. Abschnitt 2.2). Für die Immunpräzipitation von endogenem p53-Protein wurde eine suboptimale Menge des Anti-p53-Antikörpers DO-1 (12 ng Antikörper / mg Zellextrakt) eingesetzt. Die Zellextrakte wurden über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper in einem Überkopf-Rotor inkubiert und darauf folgend zur Entfernung möglicher ausgefallener Proteine zentrifugiert (20.800 x g, 10 min, 4°C). Die Präzipitation des im Überstand an den Antikörper gebundenen Proteins erfolgte mit Hilfe von Protein G-Sepharose® Fast Flow (Sigma-Aldrich) in einer zweistündigen Inkubation im Überkopf-Rotor (4°C) mit anschließender Zentrifugation (20.800 x g, 5 min, 4°C). Das Präzipitat wurde dreimal mit NP-40-Lysepuffer (ohne DTT) gewaschen und das präzipitierte Protein schließlich mit 5 x-Laemmli-Puffer und Erhitzen (5 min, 95°C) von der Protein G-Sepharose eluiert.

Laemmli-Puffer (5 x):	250 mM Tris-Cl (pH 6,8)
	10 % (w/v) SDS
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
	50 % (w/v) Glycerin
	500 mM β-Mercaptoethanol

2.4. PAGE, Coomassie-Färbung, Western-Blot

Die zu analysierenden Proteine wurden durch Zugabe von 5 x Laemmli-Puffer und Erhitzen (5 min, 95°C) zunächst denaturiert, bevor ihre analytische Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem im PAGE-Laufpuffer bei 180 V erfolgte.

Zur Visualisierung mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine wurde eine Coomassie-Färbung unter Verwendung der PageBlue™ Protein *Staining Solution* der Firma Fermentas / Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte unter Durchlicht am *ImageQuant LAS 4000* mit der *Multi Gauge Software*.

Für immunchemische Analysen wurden 21 µg Zellextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im „*Tank-Blot*“-Verfahren im *Tank-Blot* Transferpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst in der Blockierlösung (1 Std., Raumtemperatur) und anschließend in Antikörper-haltiger BSA-Lösung (mit 0,1 % NaN₃) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten in Blockierlösung (je 20 min, Raumtemperatur) erfolgte die Inkubation in BSA-Lösung mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (2 Std., Raumtemperatur). Anschließend wurde die Membran einmal mit Blockierlösung und zweimal mit Waschpuffer (je 20 min, Raumtemperatur) gewaschen. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL-Reagenz der Firma Amersham / GE Healthcare. Das Signal wurde durch Röntgenfilm-Exposition dokumentiert und optional am LAS 3000 gemessen und mit der AIDA Software densitometrisch ausgewertet.

Sammelgel (5 %):	5 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid (29:1) 63 mM Tris/HCl (pH 6,8) 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (w/v) TEMED
Trenngel (8-16 %):	8-16 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid (29:1) 375 mM Tris/HCl (pH 8,5) 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,04 % (w/v) TEMED bzw. 0,08 % (w/v) TEMED bei 8 % Acrylamid
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
<i>Tank-Blot</i> Transferpuffer:	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,04 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung:	PBS (PAA Laboratories) 0,1 % (v/v) Tween-20 3 % (w/v) Magermilch (AppliChem, Darmstadt)
BSA-Lösung:	PBS (PAA Laboratories) 0,1 % (v/v) Tween-20 4 % (w/v) BSA (AppliChem)
Waschpuffer (PBST):	PBS (PAA Laboratories) 0,1 % (v/v) Tween-20

Tabelle 5: Antikörper

Antigen	Klon	Spezies, IgG	Bezugsquelle
Acetyl-p53 (Lys373)	EP356(2)AY	Kaninchen	Epitomics, Burlingame (CA, USA)
Acetyl-p53 (Lys382)		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology (New England Biolabs), Frankfurt am Main
AuroraB		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
Flag	M2	Maus IgG ₁	Sigma-Aldrich
GST		Ziege, polyklonal	GE Healthcare
p21	SX118	Maus IgG ₁	BD Pharmingen, Heidelberg
p53	PAb421	Maus IgG _{2a}	Calbiochem / Merck
p53	PAb1801	Maus IgG ₁	Calbiochem / Merck
p53	DO-1	Maus IgG _{2a}	Calbiochem / Merck
p53	DO-12	Maus IgG ₁	Novocastra Laboratories, Newcastle (UK)
Phospho-p53 (Ser6, Ser9, Ser15, Thr18, Ser20, Ser33, Ser37, Ser46, Ser315, Ser392)		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p53 (Ser389)		Kaninchen, polyklonal	Pierce / Thermo Fisher Scientific, Rockford (IL, USA)
Phospho-RSK1/2/3 (Ser380)		Kaninchen, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
PLK1		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
RSK1/2/3		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
RSK2		Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
β-Aktin	AC-74	Maus IgG _{2a}	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper, Meerrettichperoxidase-Konjugate

Antigen	Spezies	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	Ziege	Promega, Mannheim
Maus IgG	Ziege	Promega
Maus IgG ₁	Ziege	SouthernBiotech, über Biozol, Eching
Maus IgG _{2a}	Ziege	SouthernBiotech
Ziege IgG	Kaninchen	Calbiochem / Merck

2.5. Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-Aktivität

Für den fluorometrischen Substrattest zur Bestimmung der relativen DEVDase-Aktivität (Caspase-3 und -7) wurden zunächst Zellextrakte unter Verwendung des NP-40-Lysepuffers hergestellt (s. Abschnitt 2.2). In einer 96-Well-Platte mit flachem Boden wurde Caspase-Substrat-Puffer, welcher das fluorogene DEVDase-Substrat Ac-DEVD-AMC enthält, zu 35 µg Zellextrakt gegeben. Über einen Zeitraum von 5 Stunden erfolgte die fluorometrische Messung der Freisetzung von 7-Amino-4-methylcoumarin in zeitlichen Abständen von 10 Minuten bei einer Exzitationswellenlänge von 346 nm und einer Emissionswellenlänge von 442 nm.

Caspase-Substrat-Puffer: (Endkonzentrationen)	50 mM	HEPES pH 7,3
	100 mM	NaCl
	10 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	CHAPS
	10 mM	DTT
	50 µM	Ac-DEVD-AMC (Enzo Life Sciences, Lörrach)

2.6. Real-Time PCR-Analyse

Für die RNA-Präparation aus pelletierten Zellen wurde das *RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden) in Kombination mit dem *QIAshredder* (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. RNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die Reverse Transkription der RNA zu cDNA wurde mit dem *High Capacity cDNA Kit* (Applied Biosystems) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Für die *Real-Time* PCR wurde das *Taqman® Gene Expression Assay System* mit dazugehörigen sequenzspezifischen Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Durchführung der *Real-Time* PCR erfolgte den Herstellerangaben entsprechend.

2.7. Kolorimetrischer SA-β-Gal-Nachweis

Der Nachweis der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase- (SA-β-Gal-) Aktivität erfolgte durch eine kolorimetrische enzymatische Reaktion. Der Zellkultur-Überstand der in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurde verworfen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert (5 min, Raumtemperatur). Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen in X-Gal-haltiger Färbelösung lichtgeschützt und luftdicht verschlossen inkubiert (12 bis 16 Std., 37 °C). Das chromogene Substrat X-Gal wird von β-Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol hydrolysiert. Letzteres oxidiert zu einem blauen, wasserunlöslichen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo). Da es sich bei β-Gal um ein wichtiges Enzym des zellulären Stoffwechsels handelt, das Laktose in Galaktose und Glukose aufspaltet, ist eine gewisse β-Gal-Aktivität in jeder Zelle vorhanden. Aufgrund des suboptimalen pH-Wertes der Färbelösung erfolgt die enzymatische

Farbreaktion jedoch nur bei einer gesteigerten β -Gal-Aktivität, wie sie beim Vorliegen aktiver SA- β -Gal auftritt. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen in PBS beendet. Die Dokumentation der in PBS lichtgeschützt und luftdicht verschlossen gelagerten Zellen erfolgte bei Durchlicht am Fluoreszenzmikroskop.

Fixierlösung: PBS (PAA Laboratories)

0,2 % Glutaraldehyd

2 % Formaldehyd

Färbelösung:

2 mM $MgCl_2$

150 mM NaCl

40 mM Zitronensäure/Sodiumphosphat-Puffer pH 6,0
(Natriumcitrat/Natriumhydrogenphosphat)

5 mM Potassiumferrocyanid
(Potassiumhexacyanoferrat (II))

5 mM Potassiumferricyanid
(Potassiumhexacyanoferrat (III))

1 mg/ml X-Gal
(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranosid)

2.8. Zellzyklusbestimmung nach Nicoletti

Zur Zellzyklusbestimmung nach Nicoletti²¹⁹ wurden die Zellen 24 Stunden nach Stimulation trypsiniert und zusammen mit dem Zellkultur-Überstand zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C). Nach zwei Waschschrritten in eiskaltem PBS wurden die pelletierten Zellen in hypotonem, Propidiumiodid-haltigem Nicoletti-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Die auf diese Weise präparierten Zellkerne mit in die DNA interkaliertem Propidiumiodid wurden mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge ab 670 nm durchflusszytometrisch analysiert (1×10^4 Kerne / Messung). Entsprechend ihres DNA-Gehaltes wurden sie der G1- (2N), der G2- (4N) oder der S-Phase (zwischen 2N und 4N) des Zellzyklus zugeordnet. Nuklei mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2N wurden als apoptotisch bewertet (Sub-G1).

Nicoletti-Puffer: 0,1 % (w/v) Sodiumcitrat

0,1 % (v/v) Triton X-100

50 μ g/ml Propidiumiodid

2.9. Kinase-Reaktionen

Die aktiven rekombinanten Kinasen wurden gegebenenfalls zunächst mit rekombinantem GST-p21 oder GST für 10 Minuten bei 30°C im jeweiligen Kinasepuffer, allerdings in Abwesenheit von ATP, DTT, Phosphatase-Inhibitoren und des Substrats, vorinkubiert.

Die Kinase-Reaktionen erfolgten nach Substrat-Zugabe im jeweils vollständigen Kinasepuffer für 60 Minuten (JNKs) bzw. 30 Minuten (CDK2/CyclinE, GSK-3 β , p38 α , ERKs, CK1 ϵ , RSKs) bei 30°C. Durch die Zugabe von 5 x Laemmli-Puffer und Erhitzen (5 min, 95°C) wurden die Reaktionen gestoppt. Es folgte eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.4). Das Polyacrylamid-Gel wurde anschließend fixiert und im Vakuum bei 80°C für 90 Minuten getrocknet. Die radioaktiven Signale wurden mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm detektiert.

JNK1/2-Kinasepuffer:	20 mM HEPES pH 7,4 10 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 20 mM NaCl 0,02 % (v/v) Tween-20 0,2 mM Na ₃ VO ₄ 0,2 mM Natriumpyrophosphat 1 mM DTT 50 μ M ATP 5 μ Ci [γ - ³² P]ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig)
CDK2/CyclinE-Kinasepuffer:	25 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 1 mM DTT 40 μ M ATP 5 μ Ci [γ - ³² P]ATP (Hartmann Analytic)
GSK-3β-, p38α-, ERK1/2-, RSK1/2/3-, AKT1-Kinasepuffer:	5 mM MOPS pH 7,2 5 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0,4 mM EDTA 2,5 mM β -Glycerophosphat 50 μ M DTT 50 μ M ATP 5 μ Ci [γ - ³² P]ATP (Hartmann Analytic)
CK1ϵ-Kinasepuffer:	12,5 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0,01 % (v/v) Triton X-100 5 mM β -Glycerophosphat 0,5 mM Na ₃ VO ₄ 2 mM DTT 0,2 mM ATP 5 μ Ci [γ - ³² P]ATP (Hartmann Analytic)
Gel-Fixierlösung:	50 % Methanol 10 % Essigsäure

Tabelle 7: Kommerziell erhältliche rekombinante Proteine

Protein	Besonderheit	Marker	Bezugsquelle
Casein	aus Kuhmilch	frei	Sigma-Aldrich
CDK2/CyclinE	humane aktive Kinase	His(-CDK2) / GST(-CyclinE)	Millipore, Schwalbach
c-Fos	humanes vollständiges Protein	GST	SignalChem, über Biozol
CK1 ϵ	humane aktive Kinase	His	Invitrogen
ERK1	humane aktive Kinase	frei	SignalChem, über Biozol
ERK2	humane aktive Kinase	GST	SignalChem, über Biozol
GSK-3 β	humane aktive Kinase	GST	Signaling Technology
JNK1 α 1	humane aktive Kinase	His	Millipore
JNK1 β 2	humane aktive Kinase	His	Enzo Life Sciences
JNK2 α 1	humane aktive Kinase	frei	Active Motif, Rixensart (Belgien)
JNK2 α 2	humane aktive Kinase	His	Millipore
MBP	aus humanem Gewebe des Zentralen Nervensystems	frei	Enzo Life Sciences
p21	humanes vollständiges Protein	GST	Calbiochem / Merck
p38	humane aktive Kinase	His	Cell Sciences, Canton (MA, USA)
RSK1	humane aktive Kinase	His	Millipore
RSK2	humane aktive Kinase	GST	SignalChem, über Biozol
RSK3	humane aktive Kinase	GST	SignalChem, über Biozol
β -Catenin	humanes vollständiges Protein	GST	Millipore
Δ -ATF-2	human, AS 1-254	GST	SignalChem, über Biozol
Δ -Axin	human, AS 275-510	GST	Millipore

2.10. Massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierungsstellen

(Text verändert übernommen von:

Anja Stefanski, AG Kai Stühler, Medizinisches Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum)

Für die massenspektrometrische Analyse von phosphoryliertem p21 wurde zunächst eine *in vitro* Kinase-Reaktion mit GST-RSK2 (SignalChem) und GST-p21 (Calbiochem / Merck) mit unmarkiertem ATP durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.9). Die im Kinasepuffer vorliegenden Proteine wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80°C zwischengelagert und auf Trockeneis transportiert. Nach ihrer Denaturierung erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE in einem vorgefertigten 4 % – 20 % Tris-Glycin Gel (anamed Elektrophorese, Groß-Bieberau). Für die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung wurden die Gelbanden ausgeschnitten, dreimal mit 10 mM Ammonium Bicarbonat Puffer (pH 7,8) gewaschen und anschließend im Gel mit Trypsin (Promega) bei 37°C über Nacht verdaut. Für die nanoHPLC/ESI-MS/MS Analysen wurden die tryptischen

Peptide zweimal mit 50 % ACN in 0,1 % Trifluoressigsäure aus dem Gelstück extrahiert. Die MS/MS Analysen wurden auf einem *high-capacity ion trap* System (HCTUltra, Bruker Daltonics) mit einem *online* gekoppelten *Reversed Phase* nano-HPLC System (Dionex U3000, Dionex LC Packings, Idstein) durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde im Sensitiv-Modus mit den folgenden Parametern betrieben: capillary voltage: 1400 V; Endplatten Offset: 500 V; Trockengasfluß: 8,0 l/min; Temperatur des Trockengases: 160°C; aimed ion charge control: 150000; Maximale Fallenfüllzeit: 500 ms. Die nano-ESI Quelle (Bruker Daltonics) wurde mit distal beschichteten Silica Nadeln ausgestattet. MS Spektren wurden als Summe von zehn individuellen Scans über einen Scanbereich von m/z 310 bis m/z 1500 und einer Scangeschwindigkeit von 8.100 (m/z)/s aufgenommen. Für die Tandem MS Analysen wurden die vier intensivsten, mehrfach geladenen Signale innerhalb eines MS Spektrums selektiert und anschließend mittels niederenergetischer *Collision induced dissociation* (CID) durch das Anlegen einer Fragmentierungsamplitude von 0,6 V fragmentiert. Für MS/MS Spektren wurden stets vier Scans über einen Bereich von m/z 100 bis m/z 3.000, gescannt bei einer Geschwindigkeit von 26.000 (m/z)/s, aufsummiert. Bereits für die Fragmentierung ausgewählte Mutterionen wurden automatisch für 1,2 min für weitere MS/MS Analysen ausgeschlossen. Für detaillierte Phosphopeptid-Analysen wurden zusätzlich MS³ Experimente, unter Berücksichtigung verschiedener Ladungszustände (+1, +2 und +3) detektierter Neutralverluste von m/z 98, 49, 32,7 (H₃PO₄) sowie m/z 40 und 26,7 (HPO₃), durchgeführt. Die Ionenfalle wurde anhand kommerziell erhältlicher Standard-Komponenten extern kalibriert. Für die Protein-Identifizierung wurden die MS/MS Rohdaten gegen die NCBI Datenbank (*version* 11.09.2010, 11759094 *entries*) unter Verwendung des Mascot-Algorithmus (Matrix Science, v.2.2.0) gesucht. Folgende Suchparameter wurden hierfür verwendet: Variable Modifikationen: Phosphorylierung an Serin oder Threonin, sowie Methionin-Oxidierung und Propionamidierung an Cysteinen. Zusätzlich Berücksichtigung einer überlesenen Schnittstelle infolge unvollständiger Trypsin-Hydrolyse. Als Massentoleranzen wurden $\pm 1,4$ Da für Mutterionen und $\pm 0,6$ Da für Fragmentionen angegeben. Ein *Peptid Score* >25 wurde vorausgesetzt, um Spektren phosphorylierter Peptide für die weitere Interpretation zu berücksichtigen. Für die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle wurden die Spektren hinsichtlich Signalintensitäten, Massengenauigkeit und S/N Verhältnis strukturell relevanter Fragmentionen manuell interpretiert.

2.11. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Bakterien des gewünschten Stammes wurden zunächst auf unerwünschte Antibiotikaresistenzen überprüft. Bei negativem Testergebnis wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Bakterien-Suspension wurde anschließend im Verhältnis 1:200 in frisches LB-Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Bakterien bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 zunächst in Suspension 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (1500 x g, 10 min, 4°C) pelletiert. Nach Resuspension der Bakterien in eiskaltem, Ca²⁺- und Mn²⁺-haltigem TB-Puffer wurden sie 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut pelletiert. Es folgte die Resuspension in TB-Puffer mit 7 % DMSO und eine weitere Inkubation auf Eis (10 min), bevor die Bakterien schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C dauerhaft gelagert wurden. Durch die Behandlung der Bakterien mit zweiwertigen Ionen während der exponentiellen Wachstumsphase werden sie chemisch kompetent, d.h. sie können mittels Hitzeschock-Transformation DNA aufnehmen (s. Abschnitt 2.12).

TB-Puffer: 10 mM PIPES
 15 mM CaCl₂
 250 mM KCl
 55 mM MnCl₂

Tabelle 8: Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> OneShot® TOP10	Amplifikation von Plasmid-DNA	Invitrogen
<i>E. coli</i> OneShot® INV110	Amplifikation unmethylierter Plasmid-DNA	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Amplifikation von Plasmid-DNA (nach Einzelmutagenese)	Stratagene / Agilent Technologies, Waldbronn
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Amplifikation von Plasmid-DNA (nach Mehrfachmutagenese)	Stratagene / Agilent Technologies
<i>E. coli</i> OneShot® BL21 Star™	Expression rekombinanter Proteine	Invitrogen

2.12. Hitzeschock-Transformation

Um Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien (s. Abschnitt 2.11) zu transformieren, wurde zu einer Suspension an kompetenten Bakterien des gewünschten Stammes 0,2 bis 0,5 µg des Plasmids bzw. der gesamte Ligationsansatz (bei Klonierungen) gegeben. Nach einer Inkubation (30 min) auf Eis erfolgte ein kurzer Hitzeschock der Bakterien (45 s, 42°C) und anschließend eine erneute Inkubation auf Eis (2 min). Darauf folgend wurde vorgewärmtes (37°C) SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und diese bei 37°C unter Schütteln inkubiert (60 min). Die Bakterien wurden anschließend zur Selektion auf vorgewärmten (37°C) Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei

37°C inkubiert. Einzelkolonien wurden mittels analytischer Plasmid-Präparation auf die Amplifikation des gewünschten Plasmids überprüft, bevor dieses über eine präparative Plasmid-Isolierung aufgereinigt wurde (s. Abschnitt 2.14).

SOC-Medium: 20 g/l Trypton
pH 7,0 5 g/l Hefeextrakt
0,5 g/l NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
20 mM Glucose

2.13. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die GST-markierten Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert. Hierfür wurde der gewünschte Plasmid-tragende *E. coli* Stamm in 2 x YTA-Medium kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,1 mM IPTG (Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid) stimuliert. Zwei Stunden nach Stimulation wurden die Bakterien pelletiert (6000 x g, 20 min, 4°C). Ihr Aufschluss erfolgte durch Inkubation in Lysozym-haltigem PBS (1 mg/ml) in einem Überkopf-Rotor (60 min, Raumtemperatur), anschließender Ultraschall-Behandlung (auf Eis) nach PMSF-Zugabe und darauf folgender Inkubation in 1 % Triton X-100 (in PBS) in einem Überkopf-Rotor (30 min, 4°C). Zelldebris wurde durch Zentrifugation (12.000 x g, 10 min, 4°C) entfernt und das GST-Fusionsprotein aus dem Überstand unter Verwendung von Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) den Herstellerangaben entsprechend im „Säulen-Aufreinigungsverfahren“ gewonnen. Die Elution des Fusionsproteins von der Sepharose erfolgte hierbei mittels Glutathion-haltigem Elutionspuffer. Zur Entfernung des Glutathions wurde das Eluat im Anschluss unter Verwendung eines D-Tube Dialyzers (Midi 6-8 kDa) der Firma Novagen / Merck bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert. In Anwesenheit von 10 % Glycerol wurde das aufgereinigte Fusionsprotein bei - 80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden 20 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (s. Abschnitt 2.4). Die Mengen der gewünschten vollständigen Fusionsproteine unterschiedlicher Aufreinigungen wurden einander durch densitometrische Analyse angepasst.

2x YTA-Medium: 16 g/l Trypton
pH 7,0 10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
100 µg/ml Ampicillin

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl
pH 8,0 10 mM L-Glutathion reduziert

GST-Δc-Jun (AS 1-135): aufgereinigt erhalten von S. Ludwig (Münster)

GST: aufgereinigt erhalten von G. Totzke (Düsseldorf)

GST-p53: bakteriell exprimiert und aufgereinigt

GST-p21: bakteriell exprimiert und aufgereinigt

2.14. Plasmid-Präparation

Zur Amplifikation eines Plasmids wurde dieses, sofern notwendig, zunächst in den gewünschten *E. coli* Stamm transformiert und anschließend eine Plasmid-tragende Einzelkolonie über Nacht bei 37°C unter Schütteln in Antibiotika-haltigem LB-Medium kultiviert. Alternativ wurden die entsprechenden Plasmid-tragenden Bakterien aus einer Glycerin-Stammkultur (30 % Glycerin in LB-Medium) in Antibiotika-haltiges LB-Medium inokuliert.

Zur analytischen Plasmid-Präparation wurden die Bakterien zunächst pelletiert (5 min, 20.800 x g, 4°C). Unter Verwendung der Puffer P1, P2 und P3 erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien. Nach Abtrennung des Zelldebris durch Zentrifugation (15 min, 20.800 x g, 4°C) wurden unerwünschte Proteine mittels Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt (Zentrifugation für 10 min bei 20.800 x g, 4°C) und die DNA in 100 % Ethanol gefällt (30 min, -20°C). Die anschließend durch Zentrifugation (10 min, 20.800 x g, 4°C) pelletierte DNA wurde mit 80 % Ethanol (eiskalt) gewaschen und in H₂O resuspendiert.

Die präparative Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem *GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit* der Firma Sigma-Aldrich den Herstellerangaben entsprechend.

DNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt.

P1 (Qiagen):	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM	EDTA
	100 µg/mL	RNase A
P2 (Qiagen):	200 mM	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
P3 (Qiagen):	3,0 M	Kalium-Acetat (pH 5,5)
LB-Medium:	1 % (w/v)	Trypton
pH 7,0	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

2.15. Plasmide, Mutagenese, Klonierung lentiviraler Expressionsvektoren

Für analytische und präparative Agarosegele wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Präparation aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction* Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

1x TAE: 40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA (pH 8,0)

Die Expressionsvektoren pcDNA4/Flag-p53wt, pcDNA4/Flag-p53S6A und pcDNA4/Flag-p53S6E wurden von K. Schulze-Osthoff (Tübingen) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pMT5/Flag-p21wt wurde von Addgene (Cambridge, MA, USA) bezogen (Addgene-Plasmid #16240). Der GST-p53-kodierende Expressionsvektor pGEX/p53 war von T. Hofmann (Heidelberg). Die GST-p21-kodierenden Plasmide pGEX-4T-3/p21wt und pGEX-4T-3/p21T145A wurden von Mien-Chie Hung (Houston, TX, USA) zur Verfügung gestellt. Die Mutagenese von Expressionsplasmiden wurde mit dem *QuikChange® Site-Directed* (Einzelmutation) bzw. *Multi Site-Directed* (Mehrfachmutagenese) *Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene / Agilent Technologies (Waldbronn) inklusive Transformationsprotokoll den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die mutierten DNA-Abschnitte wurden durch Sequenzierung (Eurofins MWG, Ebersberg) überprüft.

Oligonukleotide (5'-3'):

p53 S9A forward:	GCAGTCAGATCCTGCCGTCGAGCCCCCTC
p53 S9A reverse:	GAGGGGGCTCGACGGCAGGATCTGACTGC
p53 S9E forward:	CCGCAGTCAGATCCTGAGGTCGAGCCCCCTCTG
p53 S9E reverse:	CAGAGGGGGCTCGACCTCAGGATCTGACTGCGG
p53 S15A forward:	CGAGCCCCCTCTGGCTCAGGAAACATTTTCAGACC
p53 S15A reverse:	GGTCTGAAAATGTTTCCTGAGCCAGAGGGGGCTCG
p53 S15E forward:	CGTCGAGCCCCCTCTGGAGCAGGAAACATTTTCAGACC
p53 S15E reverse:	GGTCTGAAAATGTTTCCTGCTCCAGAGGGGGCTCGACG
p21 S116A forward:	GGACCTGTCACTGGCTTGTACCCTTGTGCC
p21 S116A reverse:	GGCACAAGGGTACAAGCCAGTGACAGGTCC
p21 T145A/S146A forward:	CGGCGGCAGGCCGCCATGACAGATTTCTACC
p21 T145A/S146A reverse:	GGTAGAAATCTGTCATGGCGGCCTGCCGCCG
p21 S146A forward:	CGGCGGCAGACCGGCCATGACAGATTTCTACC
p21 S146A reverse:	GGTAGAAATCTGTCATGGCGGTCTGCCGCCG

Ausgangsvektor für die Klonierung lentiviraler Expressionsvektoren zur induzierbaren Flag-p21-Expression war der Vektor pLKO.3G (Addgene-Plasmid #14748). Alle benötigten Oligonukleotide wurden ebenso wie die *Pfx*-DNA-Polymerase (*AccuPrime™ Pfx* DNA-Polymerase) mit zugehörigem Puffer von der Firma Invitrogen bezogen. Sämtliche für die

Klonierung verwendete *FastDigest* Restriktionsenzyme sowie der Restriktionspuffer (*FastDigest Green Buffer*) waren ebenso wie das Klenow-Fragment von der Firma Fermentas / Thermo Fisher Scientific. Die T4-DNA-Ligase mit zugehörigem Puffer war von Promega. Alle enzymatischen Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden mittels Sequenzierung der veränderten DNA-Abschnitte (Eurofins MWG) überprüft. In Abbildung 23A ist eine schematische Übersicht der Klonierungsstrategie dargestellt.

Der hU6-Promotor wurde durch Restriktion des Vektors pLKO.3G mit *Pst*I und *Nde*I größtenteils entfernt. Die nicht-kompatiblen überhängenden Vektorenden wurden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend mit der T4-DNA-Ligase ligiert (*Blunt-End* Ligation). In den auf diese Weise erhaltenen Vektor pLKO.3GminusU6 wurde eine hier als Linker bezeichnete selbst-entworfenene *Multiple-Cloning-Site* (s. Abb. 23A) eingefügt, nachdem in Kontrollrestriktionen bestätigt worden war, dass pLKO.3GminusU6 über keine Erkennungssequenzen für die im Linker schneidenden Enzyme *Sna*BI, *Bcl*II, *Mss*I, *Nhe*I, *Xba*I, *Pst*I und *Nsi*I verfügt. Da es sich bei *Bcl*II um ein methylierungssensitives Restriktionsenzym handelt, wurde der Vektor vor Durchführung der Kontrollrestriktionen in einem Methyltransferase-defizienten *E. coli*-Stamm amplifiziert. Zur Herstellung des doppelsträngigen Linkers wurde ein *in vitro Annealing* durchgeführt. Hierbei wurden je 2 µg beider Oligonukleotide ((+)-Strang und (-)-Strang) in 1 x *Annealing*-Puffer für 3 Minuten auf 90°C erhitzt und anschließend 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Der resultierende doppelsträngige Linker wies kompatible überhängende Enden zum *Eco*RI/*Pac*I-geschnittenen Plasmid pLKO.3GminusU6 auf und wurde mit diesem zum Vektor pLKO.3GL ligiert.

1 x *Annealing*-Puffer: 100 mM Kalium-Acetat
 30 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 2 mM Magnesium-Acetat

Oligonukleotide (5'-3'):

(+)-Strang: AATTCTACGTATGATCAGTTTAAACGCTAGCTCTAGACTGCAGATGCATTTAAT

(-)-Strang: TAAATGCATCTGCAGTCTAGAGCTAGCGTTTAAACTGATCATACGTAG

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde die BGH-Poly-Adenylierungssequenz (BGH-PolyA) des Plasmids pcDNA4/*myc*-His[®]A mit Schnittsequenzen für die Enzyme *Nhe*I und *Pst*I versehen und nach entsprechender Restriktion anschließend durch Ligation in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pLKO.3GL innerhalb der Linker-Sequenz eingefügt. Das Ligationsprodukt wurde als pLKO.3GLA bezeichnet und für den nachfolgenden Klonierungsschritt in unmethylierter Form amplifiziert und präpariert.

Oligonukleotide (5'-3'):**BGH-PolyA forward (inkl. NheI):** CCCTACGCTAGCCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG**BGH-PolyA reverse (inkl. PstI):** CCCTCTGCAGCCATAGAGCCCACCGCATCC

Zur Generierung des Vektors pLKO.3G/p21-Promotor wurde der p21-Promotor-Abschnitt des Plasmids pBluescript/WAF1 (zur Verfügung gestellt von T. Hofmann, DKFZ, Heidelberg) mittels PCR mit Schnittsequenzen für die Enzyme EcoRI und BclI versehen und nach entsprechender Restriktion anschließend durch Ligation in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pLKO.3GLA vor die BGH-PolyA-Sequenz eingefügt.

Oligonukleotide (5'-3'):**p21-Promotor forward (inkl. EcoRI):** CCGTGAATTCGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTG**p21-Promotor reverse (inkl. BclI):** CCGTTGATCACTGACTTCGGCAGCTGCTCACAC

Zur Generierung des Vektors pLKO.3G/MinRGC wurde der Promotor MinRGC des Plasmids prMinRGC-Luc (zur Verfügung gestellt von Florian Kühnel, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) mittels PCR mit Schnittsequenzen für die Enzyme SnaBI und BclI versehen und nach entsprechender Restriktion anschließend durch Ligation in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pLKO.3GLA vor die BGH-PolyA-Sequenz eingefügt.

Oligonukleotide (5'-3'):**MinRGC forward (inkl. SnaBI):** CCGTTACGTAAGAGCTTGATGCCAGGCAAG**MinRGC reverse (inkl. BclI):** CCGTTGATCACGTCTCCAGGCGATCTGAC

Die Konstrukte pLKO.3G/p21-Promotor und pLKO.3G/MinRGC wurden in einem Methyltransferase-defizienten *E.coli*-Stamm amplifiziert und aufgereinigt. Mittels PCR erfolgte das Anfügen von Schnittsequenzen für die Enzyme BclI und NheI an die p21-Sequenz des Vektors pGEX-4T-3/p21 (zur Verfügung gestellt von Mien-Chie Hung, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA). Zusätzlich wurde das PCR-Produkt über den *forward-Primer* um eine 5'-Kozaksequenz sowie eine 5'-Flag-kodierende Sequenz erweitert. Über die Restriktionsenzyme BclI und NheI und nachfolgender Ligation wurde das PCR-Produkt in die oben genannten methylierungsfreien Vektoren zwischen der jeweiligen Promotorregion und dem PolyA-Signal eingefügt. Bei den Ligationsprodukten handelt es sich um die gewünschten lentiviralen Expressionsplasmide pLKO.3G/p21-Promotor/Flag-p21 und pLKO.3G/MinRGC/Flag-p21.

Oligonukleotide (5'-3'):**p21 forward (inkl. Kozak, Flag, BclI):** GGCATGATCACCACCATGGACTACAAAGACGATGACG
ATAAATCAGAACCGGCTGGGGATGTCC**p21 reverse (inkl. NheI):** CCGTTGATCACGTCTCCAGGCGATCTGAC

III Ergebnisse

1. p21 ist ein Modulator p53-phosphorylierender Kinasen.

1.1. *Unterschiede im bestrahlungsinduzierten Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in p21-defizienten (apoptotischen) und p21-profizienten (seneszenten) Zellen.*

Es ist bekannt, dass bei irreparablen DNA-Schäden der Tumorsuppressor p53 sowohl in der Seneszenz- als auch in der Apoptose-Induktion eine zentrale Position einnimmt. Die hauptsächliche Funktionsweise von p53 besteht darin, als Transkriptionsfaktor unterschiedliche Zielgene zu induzieren, welche für die zellulären Prozesse der jeweiligen Stressantwort benötigt werden. Die Stabilisierung des relativ kurzlebigen p53-Proteins sowie seine transkriptionelle Aktivität werden durch post-translationale Modifikationen reguliert.²²⁰ Die genauen Mechanismen, die den Entscheidungsprozess zwischen Apoptose und Seneszenz steuern, sind jedoch noch ungeklärt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, welche Unterschiede sich beim Vergleich apoptotischer und seneszenten Zellen in den post-translationalen Modifikationen von p53 am Beispiel seiner Acetylierungen und Phosphorylierungen finden lassen.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ionisierende Gamma-Strahlung (γ -IR, *ionizing radiation*) in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 eine Stabilisierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 hervorruft und damit einhergehend zu einer deutlichen Steigerung der Expression des CDK-Inhibitors p21 führt (Abb. 8A). Wie die durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes nach der Methode von Nicoletti²¹⁹ verdeutlicht, treten diese Zellen in einen G2-Zellzyklusarrest ein (Abb. 8B) und werden schließlich seneszent. Dieser permanente irreversible Zellzyklusarrest lässt sich sowohl mikroskopisch anhand einer deutlichen Zellvolumen-Zunahme und einer Abflachung der Zellen wie auch aufgrund der kolorimetrisch nachgewiesenen gesteigerten Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) erkennen (Abb. 8C). Diese Seneszenz-Induktion ist von der Expression des CDK-Inhibitors p21 abhängig, da in seiner Abwesenheit (Abb. 8A) keine strahlungsinduzierte Seneszenz beobachtet werden kann (Abb. 8C). Die Messung der Caspase-Aktivität (DEVDase-Aktivität) mittels eines fluorometrischen Substrattests verdeutlicht, dass γ -IR in p21-defizienten Zellen stattdessen den apoptotischen Zelltod auslöst (Abb. 8D). Ionisierende Strahlung verursacht also in p21-exprimierenden Wildtyp-Zellen Seneszenz, wohingegen sie p21-defiziente Zellen in die Apoptose treibt.

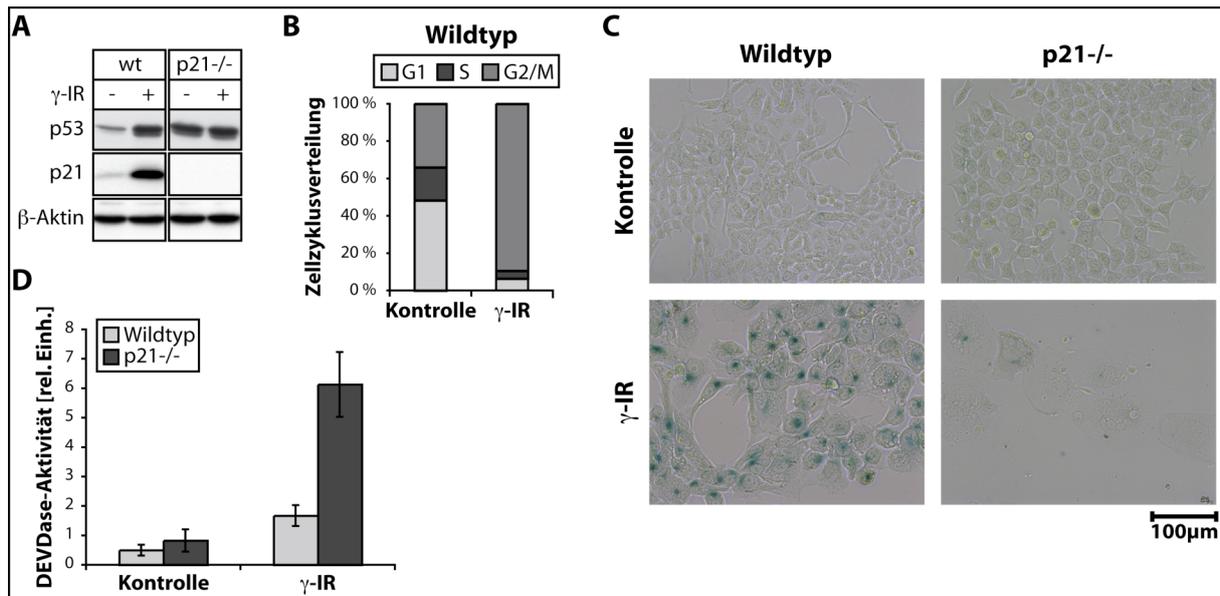


Abb. 8: Zelluläre Antwort p21-profizienter (wt) und p21-defizienter (p21^{-/-}) HCT116-Zellen nach ionisierender Bestrahlung (20 Gy bei 200 kV). (A) Western-Blot Analyse der p53- und p21-Proteinmenge in Zellextrakten unstimulierter und bestrahlter Zellen (wt und p21^{-/-}) 24 Std. nach γ -IR. Als Ladekontrolle dient β -Aktin. (B) Zellzyklusverteilung unstimulierter und bestrahlter Wildtyp-Zellen 24 Std. nach γ -IR. Die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Nicoletti.²¹⁹ Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. (C) Kolorimetrischer Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität in unstimulierten und bestrahlten Zellen (wt und p21^{-/-}) 4 Tage nach γ -IR. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. (D) Vergleich der DEVDase-Aktivität in Zellextrakten unstimulierter und bestrahlter Zellen (wt und p21^{-/-}) 3 Tage nach γ -IR. Die DEVDase-Aktivität wurde im fluorometrischen Substrattest gemessen. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten dar.

Mit Hilfe dieses zellulären Systems aus seneszenten Wildtyp-Zellen und apoptotischen p21-defizienten Zellen wurden im Folgenden die Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in zwei unterschiedlichen zellulären Prozessen miteinander verglichen. Hierfür wurde aus Extrakten unbestrahlter und γ -bestrahlter Wildtyp-Zellen sowie ihrer p21-defizienten Derivate unter Verwendung suboptimaler Antikörperkonzentrationen zunächst p53 immunpräzipitiert. Dieser Schritt diente einer annähernden Normalisierung der p53-Menge, welche in Totalextrakten p21-defizienter Zellen, wie bereits mehrfach beschrieben, wesentlich größer war als in Extrakten p21-profizienter Zellen (Abb. 8A).^{134,221,222} Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels Western-Blot unter Verwendung Acetylierungs- (Abb. 9A, linke Spalte) bzw. Phosphorylierungs-spezifischer p53-Antikörper (Abb. 9C, linke Spalte). Die anschließende densitometrische Auswertung unter Normalisierung der Acetylungssignale auf die Gesamtmenge an präzipitiertem p53 (Abb. 9A, rechte Spalte) ließ erkennen, dass als Reaktion auf ionisierende Strahlung in apoptotischen (p21^{-/-}) Zellen p53 an Lys382 etwa doppelt so stark acetyliert wird und an Lys373 sogar eine dreifach stärkere Acetylierung stattfindet, als dies in seneszenten (Wildtyp-) Zellen der Fall ist (Abb. 9B). Aufgrund fehlender Antikörper von ausreichender Qualität konnte diese Untersuchung jedoch nicht auf weitere Acetylierungspositionen ausgedehnt werden.

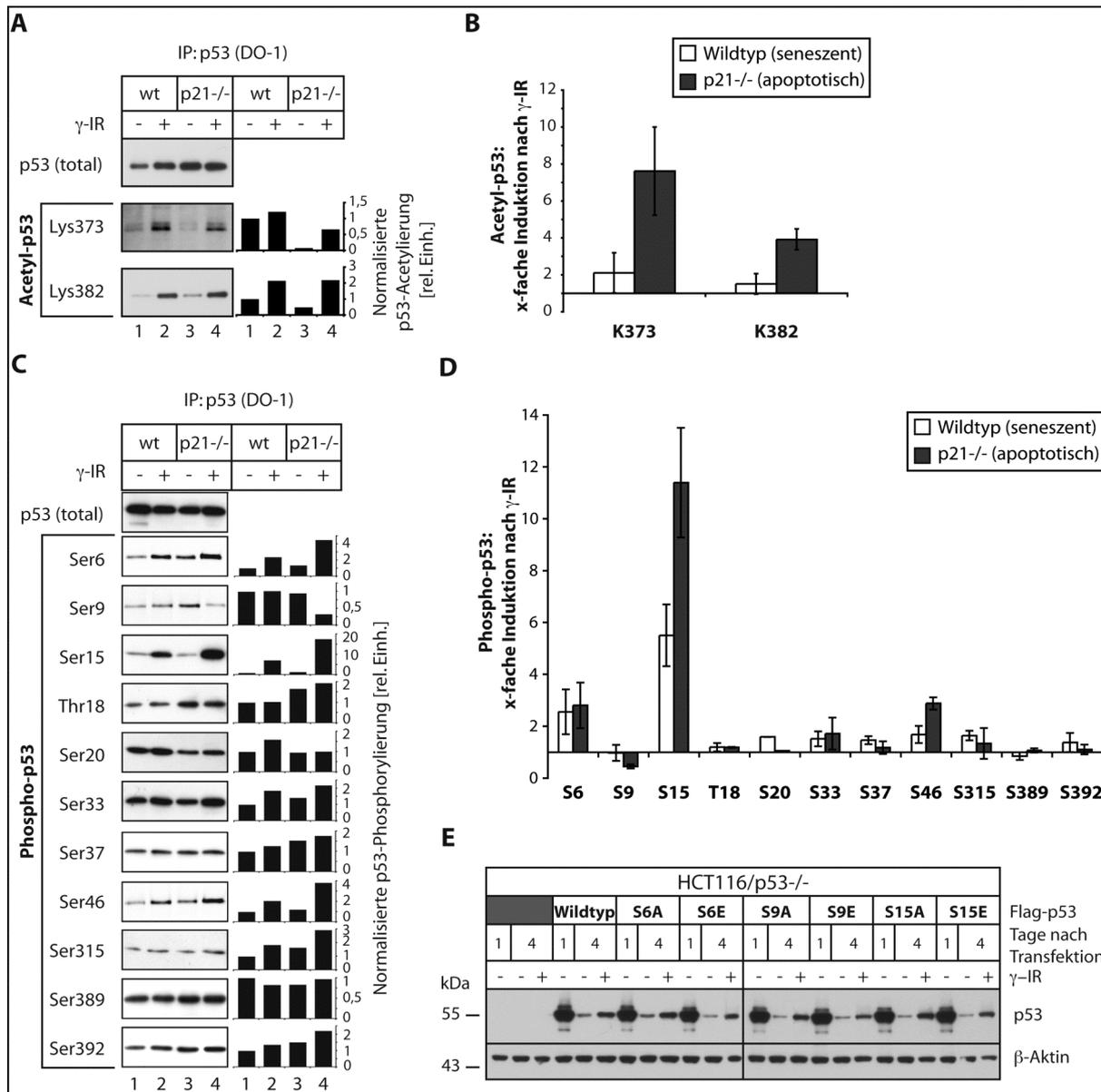


Abb. 9: Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in p21-profizienten und -defizienten HCT116-Zellen nach γ -IR (20 Gy bei 200 kV) sowie Überprüfung der ektopischen Expression von p53-Phosphorylierungsmutanten. (A/C) Linke Spalte: Western-Blot Analyse des Acetylierungs- (A) bzw. Phosphorylierungs- (C) Status von immunpräzipitiertem p53 aus Zellextrakten unstimulierter und bestrahlter Wildtyp-Zellen und ihrer p21-defizienten Derivate (24 Std. nach γ -IR). Um vergleichbare p53-Mengen zu präzipitieren, wurde der Antikörper DO-1 in suboptimaler Konzentration (12 ng / mg Zellextrakt) eingesetzt. Die präzipitierte p53-Menge wurde im Western-Blot mit dem Antikörper PAb1801 bestimmt und acetyliertes (A) bzw. phosphoryliertes (C) p53 wurde mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen. Die Immunpräzipitation (IP) in p53-defizienten (p53^{-/-}) Zellen ergab kein detektierbares p53-Signal (Daten nicht gezeigt) und belegt somit die Spezifität der IP. Rechte Spalte (Balkendiagramme): Die Stärke der Acetylierungs- (A) bzw. Phosphorylierungs- (C) Signale wurde densitometrisch bestimmt und auf die Gesamtmenge des im jeweiligen Experiment präzipitierten p53-Proteins normalisiert. Die gezeigten Western-Blots zu p53 (total) wurden hierbei nur zur Normalisierung von Acetyl-p53 Lys382 (A) bzw. von Phospho-p53 Ser15, Ser20, Ser33 und Ser315 (C) verwendet, während die übrigen Acetyl-p53- bzw. Phospho-p53-Signale auf nicht gezeigte p53 (total)-Blotte normalisiert wurden. (B/D) Densitometrische Auswertung der normalisierten Ergebnisse aus (A/C). Dargestellt ist die spezifische γ -IR-induzierte Acetylierung (B) bzw. Phosphorylierung (D) von p53. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten dar. (E) Western-Blot Analyse der ektopischen Expression Flag-markierter p53-Proteine (Wildtyp und Phosphorylierungsmutanten) in p53-defizienten Zellen. Die Zellen wurden 1 Tag nach Transfektion bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion geerntet und lysiert.

Demgegenüber ermöglichte ein großes Set qualitativ hochwertiger Phosphorylierungsspezifischer p53-Antikörper eine weitaus umfassendere Analyse der p53-Phosphorylierung nach Bestrahlung. Hierbei zeigte die densitometrische Auswertung nach Normalisierung (Abb. 9C, rechte Spalte), dass sowohl Ser15 als auch Ser46 in apoptotischen (p21^{-/-}) Zellen eine doppelt so starke strahlungsinduzierte Phosphorylierung aufweisen wie seneszente (Wildtyp-) Zellen (Abb. 9D). Demgegenüber nahm der Anteil an p53 mit einem Phosphatrest an Ser9 in apoptotischen Zellen nach ionisierender Bestrahlung etwa um die Hälfte ab, während er in seneszenten Zellen unverändert blieb. Ein leichter Anstieg der Phosphorylierung von Ser20 wurde nur in seneszenten, jedoch nicht in apoptotischen Zellen beobachtet. Hinsichtlich der strahlungsinduzierten Phosphorylierung von Ser6, Thr18 sowie Ser33, Ser37, Ser315, Ser389 und Ser392 wurden keine Unterschiede zwischen seneszenten Zellen und apoptotischen Zellen festgestellt (Abb. 9D).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten verschiedene Acetylierungs- bzw. Phosphorylierungs-defiziente Flag-markierte p53-Mutanten in p53-defizienten Zellen ektopisch exprimiert werden, um sie hinsichtlich ihrer Funktionalität in stressvermittelten Signalwegen zu untersuchen. Stabile Klone p53-überexprimierender Zellen bergen die große Gefahr von Veränderungen der p53-Signalwege, welche zu fehlerhaften Ergebnissen bei deren Untersuchung führen. Daher sollten nur transient-transfizierte Zellen für die Analysen verwendet werden. Mittels gerichteter Mutagenese wurden entsprechende Expressionsplasmide für verschiedene Phosphorylierungs-defiziente Flag-markierte p53-Einzelmutanten erzeugt und durch Sequenzierungen (Eurofins MWG) deren p53-kodierende Bereiche überprüft. Nach transienter Transfektion dieser Flag-p53-Mutanten bzw. dem Wildtyp-Flag-p53 wurde eine vergleichbare p53-Proteinmenge unabhängig von den verschiedenen Mutationen beobachtet, welche folglich keinen Einfluss auf die Stabilität des p53-Proteins zu nehmen scheinen (Abb. 9E). Jedoch konnte trotz eines hohen Expressionsgrades einen Tag nach Transfektion kein zufriedenstellendes Expressionsniveau über einen Zeitraum von 4 Tagen erzielt werden, wengleich auch eine gewisse Stabilisierung der verschiedenen Flag-p53-Proteine nach γ -IR zu beobachten war (Abb. 9E). Apoptose- und Seneszenz-Analysen γ -bestrahlter Zellen können jedoch erst nach einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen durchgeführt werden. Da die ektopische Expression der p53-Mutanten nicht so lange aufrechterhalten werden konnte, war es nicht möglich, deren Einfluss auf das langfristige Zellschicksal nach ionisierender Bestrahlung zu überprüfen und mit Wildtyp-p53 zu vergleichen.

1.2. *In vitro* Studie zur Substrat-abhängigen Modulation der Aktivität p53-phosphorylierender Kinasen durch p21.

Interessanterweise ließen sich in dem verwendeten Zellsystem die beobachteten Unterschiede in der strahlungsinduzierten Acetylierung und Phosphorylierung von p53 jedoch nicht nur mit der Seneszenz- bzw. Apoptose-Induktion in Verbindung bringen, sondern auch in einen Zusammenhang mit der An- bzw. Abwesenheit des CDK-Inhibitors p21 setzen. Damit ließen die Unterschiede im Phosphorylierungsmuster einen direkten Einfluss von p21 auf p53-phosphorylierende Kinasen vermuten. Die Anwesenheit von p21 schien auf einige dieser Kinasen eine inhibierende Wirkung auszuüben, während sie die p53-phosphorylierende Aktivität anderer Kinasen wiederum zu stimulieren schien. Erst kürzlich haben Hill *et al.*²²³ unter Anwendung eines Chrom-induzierten DNA-Schädigungsmodells postuliert, dass die erhöhte p53-Expression in p21-defizienten Zellen nicht auf einer verstärkten Transkription oder Translation dieses Tumorsuppressors beruht, sondern die Abwesenheit von p21 zu einer gesteigerten Aktivität der p53-phosphorylierenden Kinasen und damit einhergehend zu einer erhöhten p53-Stabilität führt. Eine direkte Einflussnahme von p21 auf die post-translationalen Modifikationen von p53 ist jedoch mit einer Ausnahme noch nicht beschrieben worden. Nur der inhibierende Effekt von p21 auf CK2 bei der Phosphorylierung von p53 und anderer Substrate wurde bisher publiziert.²²⁴

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig eine *in vitro* Studie zum möglichen Einfluss von p21 auf die Aktivität p53-phosphorylierender Kinasen durchgeführt. Da die Aktivierung von p53 als Reaktion auf verschiedenste Stress-Stimuli erfolgt und daher eine Vielzahl an Kinasen für die Phosphorylierung dieses Tumorsuppressor-Proteins verantwortlich ist (s. Abb. 4),^{1,4} wurde eine begrenzte Auswahl an Kinasen getroffen. In die Studie einbezogen wurden Vertreter der drei großen MAPK-Gruppen, also der JNKs, der ERKs sowie der p38 Kinasen.²²⁵⁻²³⁰ Die MAPKs sind bedeutende Serin/Threonin-Kinasen bei der Vermittlung der zellulären Antwort auf Stress und extrazelluläre Signale. Sie sind Bestandteil einer Phosphorylierungskaskade, innerhalb der sie aktiviert werden. Die MAPK-Signalwege beeinflussen die Genexpression und regulieren Mitose, Metabolismus, Motilität, Differenzierung, Überleben und Apoptose.¹⁸³ Fehlfunktionen innerhalb dieser Signalwege haben ein hohes tumorförderndes Potential. Für die *in vitro* Studie wurden des Weiteren die sowohl p53 als auch p21 regulierende GSK-3 β ausgewählt sowie die bei zellulärem Stress an der Stabilisierung von p53 beteiligte Casein Kinase 1 ϵ (CK1 ϵ).^{111,157,231}

1.2.1. Biochemische und funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine GST-p53 und GST-p21.

Vor der Durchführung entsprechender *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden die beiden rekombinanten Fusionsproteine GST-p53 und GST-p21 charakterisiert. Hierbei sollte zum einen ihre Identität mittels Detektion durch spezifische Antikörper bestätigt werden. Zum anderen wurde die Eignung von GST-p53 als *in vitro* Kinase-Substrat und die Funktionalität von GST-p21 als CDK-Inhibitor überprüft.

Das kommerziell erhältliche GST-p21 konnte wie erwartet sowohl vom GST- (Glutathion S-Transferase-) als auch vom p21-Antikörper bei einer Laufhöhe von ca. 48 kDa detektiert werden (Abb. 10A). Darüber hinaus detektierte der GST-Antikörper auch ein Protein mit einer Laufhöhe von etwas mehr als 26 kDa (Abb. 10A). Dieses Protein wurde vom p21-Antikörper, dessen Epitop im C-terminalen Bereich von p21 liegt, nicht erkannt. Somit handelte es sich hierbei vermutlich nur um das GST-Protein, wobei allerdings der Verbleib von aminoterminalen Resten des p21-Proteins nicht ausgeschlossen werden konnte. Tatsächlich weist das reine GST-Protein eine leicht niedrigere Laufhöhe auf als das zusätzliche Protein im kommerziell erhältlichen GST-p21 (Abb. 10A, oben).

Das bakteriell exprimierte und über Glutathion-Sepharose aufgereinigte GST-p53 weist zum einen wie gewünscht das ca. 80 kDa große vollständige Fusionsprotein GST-p53 FL (*full-length*) sowie das ca. 27 kDa große GST-Protein auf (Abb. 10A). Darüber hinaus wurden jedoch von dem GST-Antikörper auch mehrere Banden mit einer Größe zwischen 27 kDa und ca. 60 kDa detektiert (Abb. 10A). Diese ließen sich durch die Verwendung verschiedener monoklonaler p53-Antikörper, welche an unterschiedliche Epitope innerhalb des p53-Proteins binden (Abb. 10C), als carboxyterminal trunkierte (Δ C) Fragmente des GST-p53 Proteins identifizieren (Abb. 10B). Die Herkunft dieser Fragmente ist unklar, da auch Modifikationen der Proteinaufreinigung sowie eine erhöhte Zugabe von Protease-Inhibitoren den Anteil der Fragmente nicht vermindern konnte.

Anschließend wurden die Funktionalität des kommerziell erhältlichen GST-p21 als CDK-Inhibitor¹² sowie die Eignung des aufgereinigten GST-p53 als *in vitro* Kinase-Substrat überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro* Kinase-Reaktion mit GST-p53 und radioaktivem ATP unter Verwendung eines rekombinanten aktiven CDK2/CyclinE Komplexes in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von GST-p21 durchgeführt. Wie das Autoradiogramm erkennen lässt, fand eine Phosphorylierung von GST-p53 FL durch CDK2/CyclinE wie erwartet statt (Abb. 10D). Ebenso konnte die Phosphorylierung des GST-p53 Proteins mit steigender GST-p21 Konzentration erfolgreich reduziert werden (Abb. 10D). Des Weiteren ließ sich dieser Effekt eindeutig auf p21 zurückführen, da steigende GST- Konzentrationen die Phosphorylierung von GST-p53 nicht beeinträchtigten (Daten nicht gezeigt). Bei ausreichender Menge an GST-p21 konnte darüber hinaus, wie

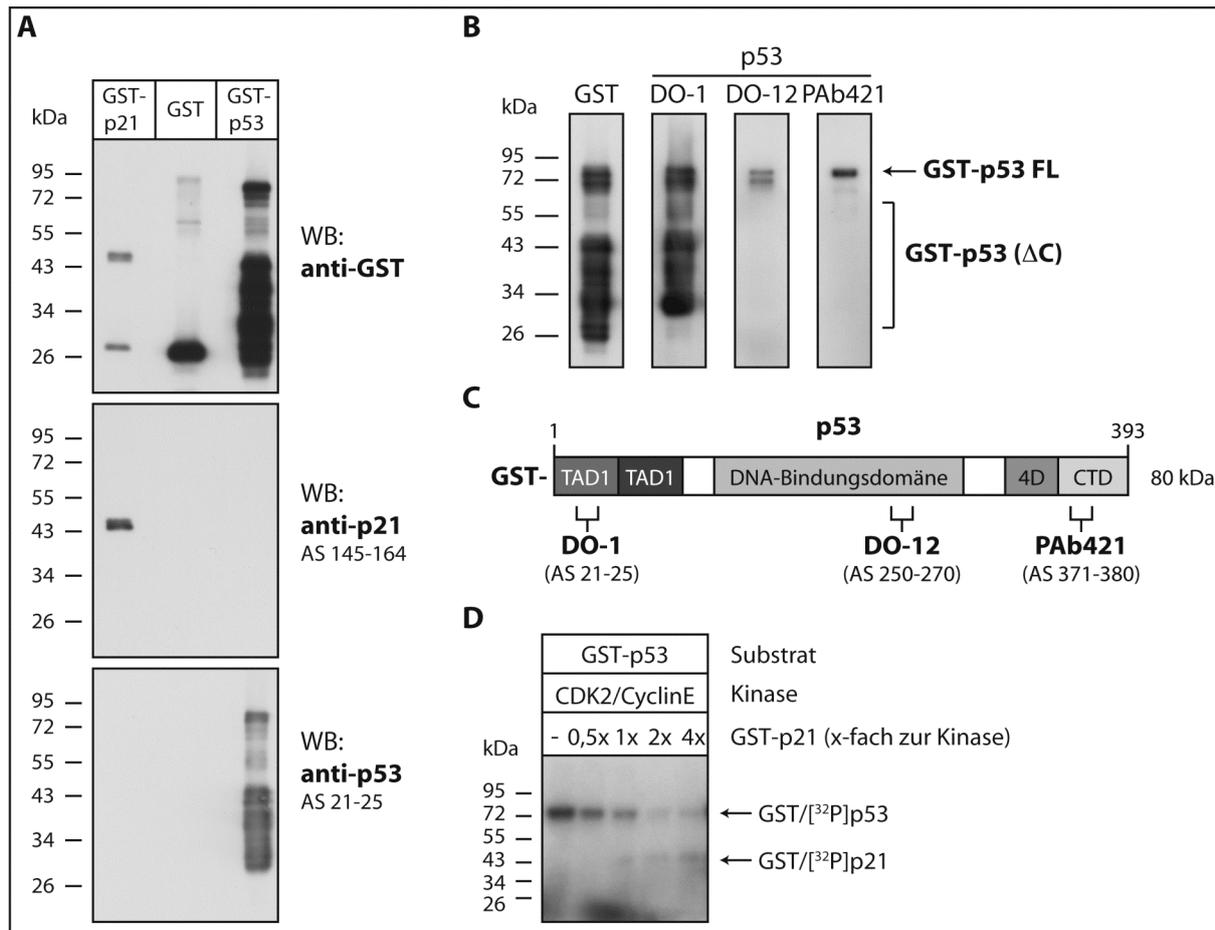


Abb. 10: Biochemische und funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine GST-p53 und GST-p21. (A) Western-Blot Analyse der rekombinanten Proteine GST-p53, GST-p21 und GST unter Verwendung der angegebenen Antikörper. AS: Aminosäure **(B)** Rekombinantes GST-p53 wurde mit den angegebenen Antikörpern im Western-Blot analysiert. **(C)** Schematische Darstellung zur Domänenstruktur des N-terminal GST-markierten p53-Proteins und Angabe der Epitope, welche von den in (B) verwendeten anti-p53 Antikörpern erkannt werden. TAD: Transaktivierungsdomäne; 4D: Tetramerisierungsdomäne; CTD: C-terminale regulatorische Domäne. **(D)** *In vitro* Kinase-Reaktionen mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP. Bei Verwendung von GST-p53 als Substrat wurde GST-p21 in den angegebenen molaren Mengenverhältnissen zu dem aktiven CDK2/CyclinE-Komplex gegeben.

erwartet,¹²⁴ auch dessen eigene Phosphorylierung durch CDK2/CyclinE in geringem Maße beobachtet werden (Abb. 10D), wohingegen die Δ C-Fragmente von GST-p53 nicht phosphoryliert wurden. Dies entspricht ebenfalls den Erwartungen, da die bekannte CDK2-Phosphorylierungsstelle im carboxyterminalen Ende des p53-Proteins liegt (s. Abb. 4).² Die p53- bzw. p21-spezifische Phosphorylierung durch CDK2/CyclinE konnte durch das Ausbleiben einer Phosphorylierung des GST-Proteins belegt werden (Daten nicht gezeigt). Es ließ sich somit die funktionelle Aktivität des GST-p21-Proteins zeigen sowie die Eignung des aufgereinigten GST-p53-Proteins als Substrat für *in vitro* Kinase-Reaktionen belegen.

1.2.2. Der Einfluss von p21 auf die Aktivität verschiedener JNK-Subisoformen hängt vom Substrat ab.

Die JNKs als große Gruppe der MAPKs werden auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet. Es sind drei verschiedene Isoformen bekannt (JNK1 / SAPK γ , JNK2 / SAPK α und JNK3 / SAPK β), die durch separate Gene kodiert werden und von denen aufgrund verschiedener Spleißvarianten jeweils mehrere Kinasen zwischen 46 kDa und 55 kDa existieren, welche im Folgenden als Subisoformen bezeichnet werden.¹⁸³ JNKs werden insbesondere als Reaktion auf zelluläre Stress-Stimuli wie beispielsweise ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, DNA-schädigenden Agenzien und oxidativen Stress aktiviert.¹⁸³ Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist ein typisches JNK-Substrat, dessen Phosphorylierung seine transkriptionelle Aktivität erhöht. Neben beispielsweise c-Myc und ATF-2 (*activating transcription factor - 2*) zählt auch p53 zu weiteren durch JNKs regulierten Transkriptionsfaktoren.¹⁸³ Hinsichtlich eines Einflusses von p21 auf JNKs wurde bereits die Hemmung der JNK-vermittelten c-Jun-Phosphorylierung für die Isoformen JNK1, 2 und 3 beschrieben.¹³³ Ob p21 auch die JNK-vermittelte p53-Phosphorylierung beeinflusst, war jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchungen. Auch fand bisher keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Subisoformen der Kinasen JNK1 und JNK2 in Bezug auf ihre mögliche Modulation durch p21 statt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig der Einfluss von p21 auf verschiedene JNK-Subisoformen bei der Phosphorylierung von p53 sowie von c-Jun überprüft. Hierbei zeigte sich, dass sich die *in vitro* Phosphorylierung von p53 durch die Kinase JNK1 α 1 in Anwesenheit von p21 dosisabhängig verringern ließ (Abb. 11A). Dies traf sowohl auf die Phosphorylierung des vollständigen p53-Proteins zu als auch auf die seiner Δ C-Fragmente, welche durch JNK aufgrund der aminoterminal gelegenen Phosphorylierungsstellen² ebenfalls phosphoryliert wurden. Die deutlichste Verringerung der Kinase-Aktivität durch p21 wurde bei einem molaren Verhältnis des GST-p21 Proteins von vier zu eins zur Kinase beobachtet. Daher wurde GST-p21 auch in den nachfolgenden *in vitro* Kinase-Reaktionen in diesem Verhältnis zur jeweiligen Kinase eingesetzt.

Nachdem der inhibierende Effekt von p21 auf die Aktivität der Subisoform JNK1 α 1 hinsichtlich der Phosphorylierung von p53 gezeigt werden konnte, wurde nun ein möglicher Einfluss von p21 auf die Aktivität weiterer JNK1/2-Subisoformen untersucht. Die *in vitro* Phosphorylierung von GST-p53 FL sowie seiner Δ C-Fragmente durch die Kinase JNK2 α 2 wurde vergleichbar effektiv von p21 gehemmt wie die p53-Phosphorylierung durch JNK1 α 1 (Abb. 11B, vgl. Spalte 1 u. 4). Demgegenüber nahm p21 auf die Aktivität von JNK2 α 1 nur einen geringen inhibierenden Einfluss (Abb. 11B, Spalte 3). Auch phosphorylierte diese Subisoform fast ausschließlich die Δ C-Fragmente. Im Gegenteil dazu ließ sich bei Verwendung von JNK1 β 2 hinsichtlich der Phosphorylierung der Δ C-Fragmente kein

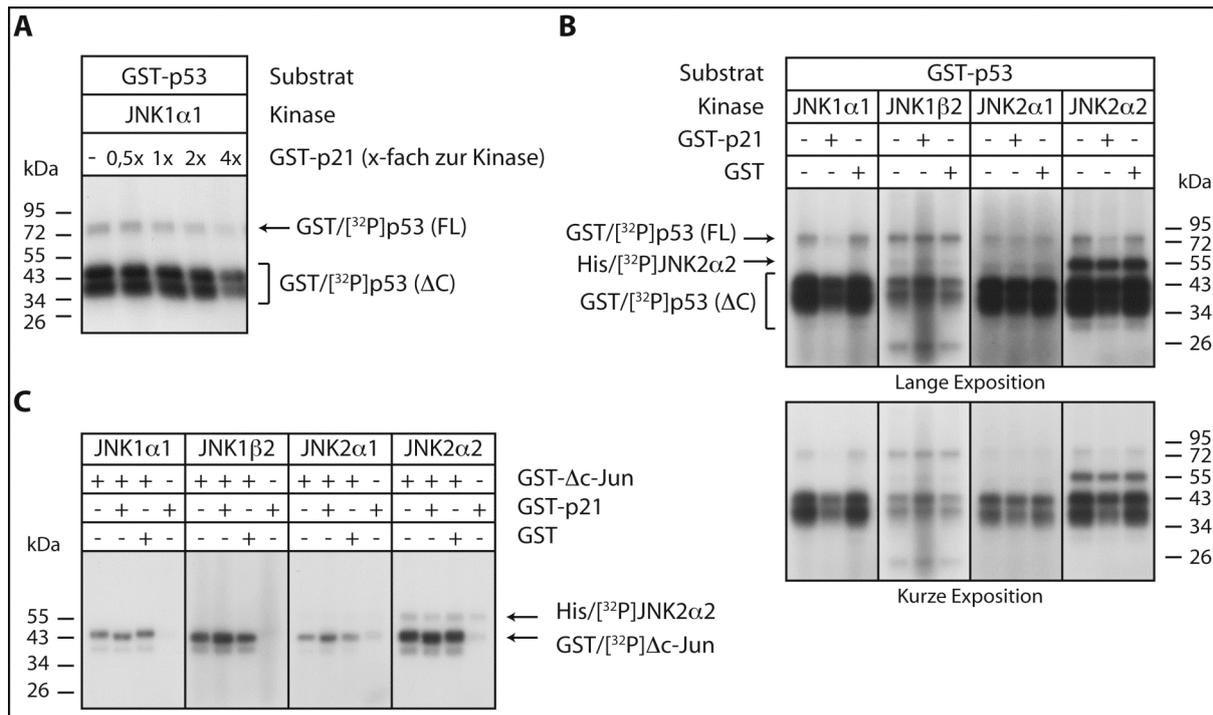


Abb. 11: Bestimmung des Einflusses von p21 auf die *in vitro* Kinase-Aktivität verschiedener JNK1/2-Subisoformen. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. **(A)** Bei Verwendung von GST-p53 als Substrat wurde GST-p21 in den angegebenen Mengenverhältnissen zu aktiver JNK1 α 1 gegeben. **(B/C)** GST-p21 oder GST wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 4:1 zu den angegebenen aktiven JNK1/2-Subisoformen gegeben. Als Substrat wurde GST-p53 (B) bzw. GST- Δ c-Jun (C) verwendet. Nur die Subisoform JNK2 α 2 wies, wie angezeigt, eine Autophosphorylierung auf. Um eine Überlagerung des Signals von phosphoryliertem GST- Δ c-Jun durch das Signal von ähnlich migrierendem phosphoryliertem GST-p21 zu vermeiden, wurden entsprechend kurze Expositionen ausgewählt (C).

inhibierender, sondern interessanterweise sogar ein leicht stimulierender Einfluss von p21 beobachten (Abb. 11B, Spalte 2). Außerdem wurde von dieser Kinase GST-p53 FL in vergleichbarem Maße wie die Δ C-Fragmente phosphoryliert, während die anderen drei untersuchten Subisoformen präferenziell die Δ C-Fragmente phosphorylierten. Bei allen untersuchten JNK-Subisoformen fand eine Modulation der Kinase-Aktivität durch GST alleine ebenso wenig statt wie eine Phosphorylierung des GST-Proteins (Abb. 11B). Diese beiden Sachverhalte trafen auch auf alle nachfolgend untersuchten Kinasen zu (p38 α , GSK-3 β , CK1 ϵ , ERK1/2), wodurch die Spezifität sowohl der Substrat-Phosphorylierungen als auch der p21-vermittelten Kinase-Modulationen dokumentiert wird (Abb. 12 bis 15).

Wurde anstelle von p53 c-Jun als Substrat eingesetzt, so ließ sich überraschenderweise entgegen der veröffentlichten Ergebnisse¹³³ keine Inhibition der hier verwendeten JNK-Subisoformen durch p21 feststellen. Stattdessen blieb die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK1 α 1 und JNK2 α 2 von p21 unbeeinflusst (Abb. 11C, Spalten 1 u. 4), während die Kinase-Aktivität von JNK1 β 2 und JNK2 α 1 sogar stimuliert wurde (Abb. 11C, Spalten 2 u. 3). Während JNK1 β 2 GST-p21 nicht phosphorylierte, trat solch eine Phosphorylierung durch die

anderen drei Subisofomen auf (Daten nicht gezeigt). Da die Lauflänge von GST-p21 und dem verwendeten GST- Δ c-Jun Fragment nahezu identisch ist, wurden hier zur Auswertung des p21-Einflusses auf die Kinase-Aktivitäten entsprechend kurze Röntgenfilm-Expositionen ausgewählt, bei denen das Signal des phosphorylierten GST-p21 nicht zum Tragen kam (Abb. 11C, s. jeweils Spur 4 in jeder Spalte) und somit das Signal des phosphorylierten c-Jun nicht überlagert wurde. Die hier dargestellten Experimente zeigen, dass die p21-vermittelte Modulation der verschiedenen JNK-Subisofomen eine bemerkenswerte Substrat-Abhängigkeit aufweist.

1.2.3. Die Aktivität von p38 α kann durch p21 in Abhängigkeit vom Substrat sowohl vermindert als auch verstärkt werden.

Neben JNKs spielen auch p38 MAPKs eine wichtige Rolle in stressinduzierten Signalwegen. Es sind vier p38-Isoformen bekannt (p38 α , β , γ und δ), die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und von denen die ubiquitär exprimierte Kinase p38 α diejenige mit dem höchsten Expressionsniveau ist.²³² Zu den von p38 phosphorylierten Substraten zählen beispielsweise die Kinasen MK2/3 und MSK1/2, die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und p53 sowie der CDK-Inhibitor p21.^{159,232} Die p38 α -vermittelte Phosphorylierung stabilisiert sowohl p53 als auch p21.^{1,159} Zwar wurde auch für die Aktivität von p38, wie schon für JNK1-3, eine negative Beeinflussung durch p21 beschrieben, jedoch wurden diese Daten weder gezeigt noch das Substrat oder die entsprechende p38-Isoform benannt.¹³³

Im Rahmen der vorliegenden *in vitro* Studie wurde deshalb die Modulierbarkeit der p38 α -Kinase durch p21 unter Verwendung verschiedener Substrate untersucht. Hierbei konnte bei der Phosphorylierung des Myelin-Basischen Proteins (MBP) der publizierte negative Einfluss von p21 auf p38 bestätigt werden (Abb. 12C). Obwohl es sich bei MBP um ein häufig verwendetes Substrat für Kinase-Aktivitätsanalysen handelt, stellt es jedoch ein artifizielles p38 α -Substrat dar, weswegen auch die natürlichen p38 α -Substrate p53 und ATF-2 in diese Experimente miteinbezogen wurden. Hierbei konnte in beiden Fällen eine bemerkenswerte Verstärkung der p38 α -vermittelten Phosphorylierung in Anwesenheit von p21 beobachtet werden (Abb. 12A+B). Hinsichtlich der p53-Phosphorylierung war insbesondere das detektierte Signal des phosphorylierten GST-p53 FL für die Beurteilung des p21-Einflusses auf die p38 α -Aktivität maßgeblich, da die Signale der phosphorylierten Δ C-Fragmente aufgrund des ähnlichen Migrationsverlaufes nicht von den Signalen des phosphorylierten GST-p21 unterschieden werden konnten (Abb. 12A, vgl. Spur 3 u. 5). Für p38 α wurde somit unter Verwendung natürlicher Substrate einschließlich p53 eine Stimulation der Kinase-Aktivität durch p21 festgestellt, wohingegen die Phosphorylierung des unnatürlichen Substrates MBP inhibiert wurde.

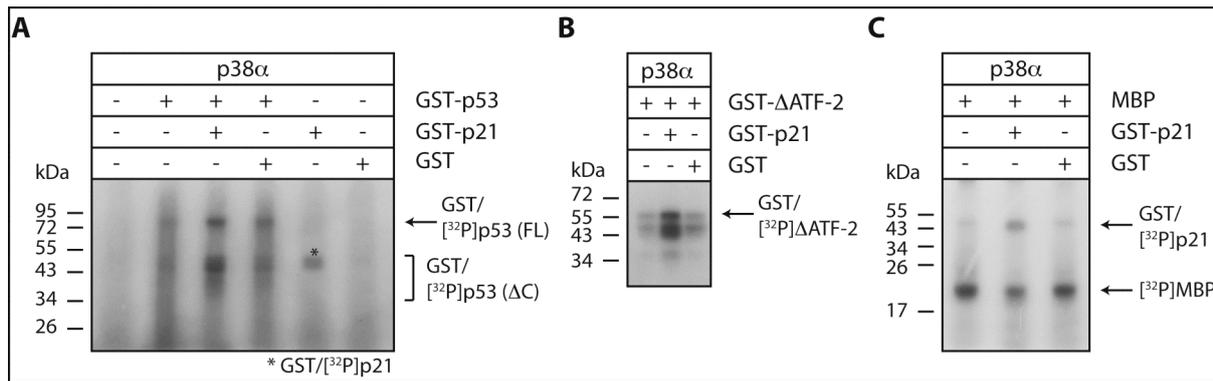


Abb. 12: Bestimmung des Einflusses von p21 auf die *in vitro* Kinase-Aktivität von p38α. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. GST-p21 oder GST wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 4:1 zu aktiver p38α gegeben. Als Substrat wurde GST-p53 (A), GST-ΔATF-2 (B) bzw. MBP (C) verwendet. Die mit einem Stern markierte Bande (A) repräsentiert phosphoryliertes GST-p21.

1.2.4. p21 beeinflusst GSK-3β nur bei der Phosphorylierung ausgewählter Substrate.

Neben den MAPKs stand auch GSK-3β im Fokus der Analysen. GSK-3β ist unter anderem an Prozessen der Zellzyklus-Regulation sowie der Apoptose beteiligt und kann sowohl p53 als auch p21 phosphorylieren.²³³ Während dadurch die transkriptionelle Aktivität von p53 erhöht wird,²³⁴ führt die Phosphorylierung von p21 durch GSK-3β zu dessen proteasomaler Degradation.¹⁵⁸

Bei der Analyse eines möglichen Einflusses von p21 auf die Aktivität der GSK-3β wurde zunächst festgestellt, dass die autophosphorylierte Kinase aufgrund der identischen Laufröhre nicht vom phosphorylierten GST-p53 FL zu unterscheiden war (Abb. 13A, vgl. Spur 1 u. 2). Ebenso überlagerte das Signal des phosphorylierten GST-p21 die Signale der größeren phosphorylierten ΔC-Fragmente (Abb. 13A, vgl. Spur 2 u. 5). Anhand der kleineren ΔC-Fragmente, welche unterhalb von GST-p21 laufen, ließ sich allerdings in Anwesenheit von p21 eine deutliche Verstärkung der GSK-3β-vermittelten p53-Phosphorylierung feststellen (Abb. 13A). Unter Verwendung von Axin als weiteres natürliches GSK-3β-Substrat konnte der positive Effekt von p21 auf die Aktivität dieser Kinase bestätigt werden (Abb. 13B). Überraschenderweise ließ sich jedoch für die Phosphorylierung des β-Catenin, ein weiteres natürliches GSK-3β-Substrat, keine Modulation durch p21 feststellen (Abb. 13C). Ebenso blieb auch die GSK-3β-vermittelte Phosphorylierung des artifiziellen Substrates MBP von p21 unbeeinflusst (Abb. 13D). Damit ließ sich für GSK-3β ebenso wie schon für JNK1β2, JNK2α1 und p38α eine stimulierende Wirkung von p21 auf die Kinase-Aktivität zeigen, die allerdings nur bei der Phosphorylierung selektiver Substrate auftrat.

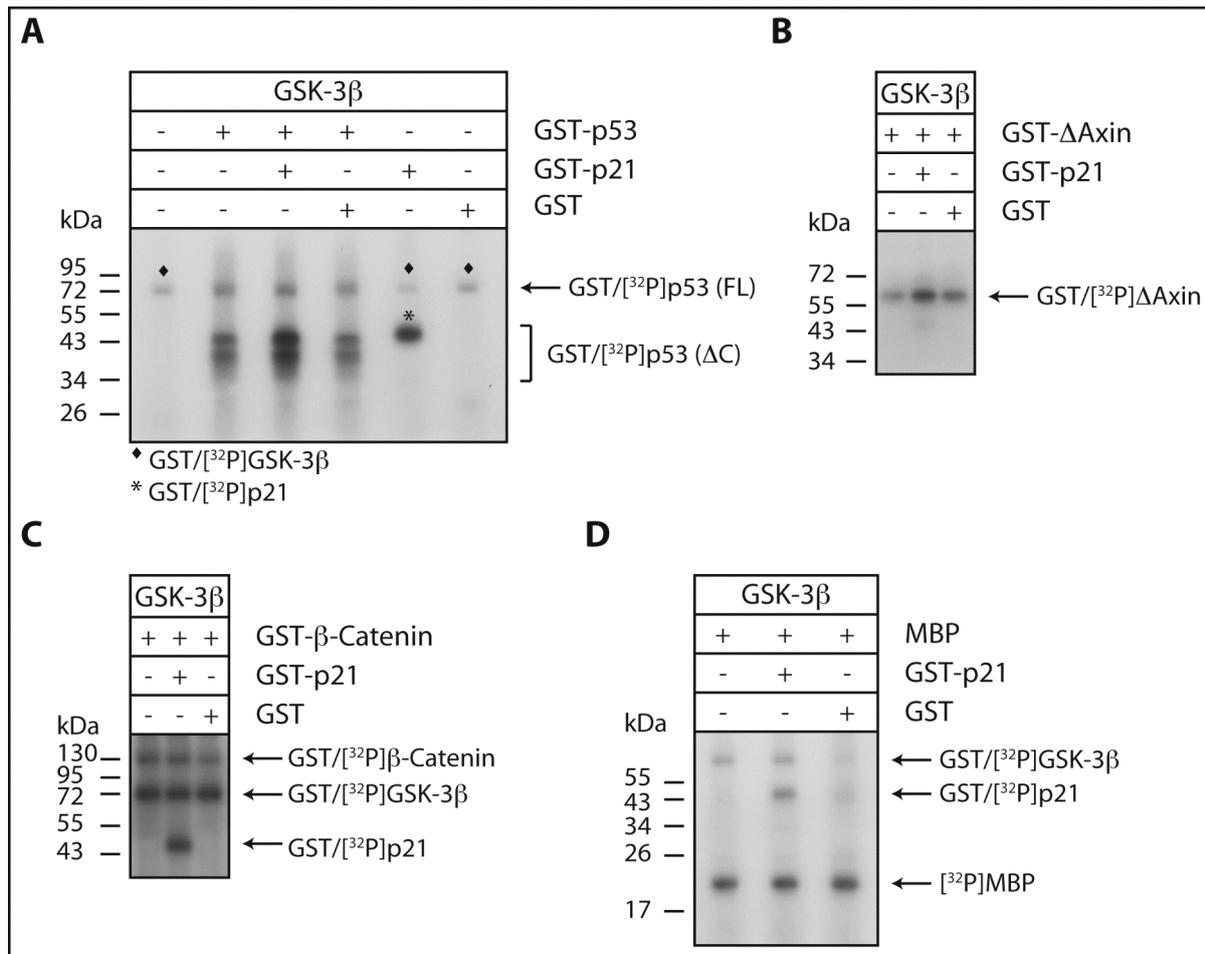


Abb. 13: Bestimmung des Einflusses von p21 auf die *in vitro* Kinase-Aktivität von GSK-3β. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. GST-p21 oder GST wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 4:1 zu aktiver GSK-3β gegeben. Als Substrat wurde GST-p53 (A), GST-ΔAxin (B), GST-β-Catenin (C) bzw. MBP (D) verwendet. Die mit einem Stern markierte Bande (A) repräsentiert phosphoryliertes GST-p21. Autophosphorylierte GSK-3β ist mit einem Diamanten (A) bzw. mit Pfeilen (C/D) gekennzeichnet bzw. aufgrund der kurzen Exposition nicht zu erkennen (B).

1.2.5. Keine Beeinflussung von CK1ε durch p21.

Als weitere p53-phosphorylierende Kinase wurde die Casein Kinase 1 (CK1ε) bezüglich einer möglichen Modulation durch p21 untersucht. Die Casein Kinasen 1 und 2, bei denen es sich um Ser/Thr-Kinasen handelt, zählen zu den ersten beschriebenen Proteinkinasen überhaupt. Die verschiedenen CK1-Isoformen haben eine Vielzahl an Substraten und sind unter anderem an der Regulierung von Differenzierungsprozessen und der Zellproliferation beteiligt.²³¹ Die CK1-vermittelte p53-Phosphorylierung bei zellulärem Stress beeinträchtigt die Bindung des Tumorsuppressors an die E3 Ubiquitin-Ligase MDM2 und führt damit zu seiner Stabilisierung und Aktivierung.²³¹

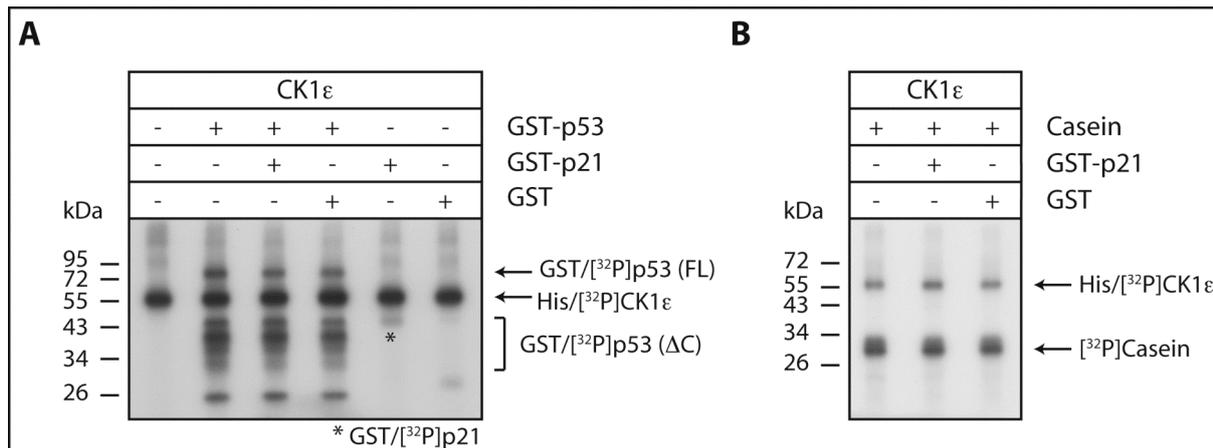


Abb. 14: Bestimmung des Einflusses von p21 auf die *in vitro* Kinase-Aktivität von CK1ε. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. GST-p21 oder GST wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 4:1 zu aktiver CK1ε gegeben. Als Substrat wurde GST-p53 (A) bzw. Casein (B) verwendet. Phosphoryliertes GST-p21 ist mit einem Stern und autophosphorylierte CK1ε ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Wie die entsprechenden *in vitro* Kinase-Reaktionen zeigen, blieb die CK1ε-vermittelte p53-Phosphorylierung unbeeinflusst von der Anwesenheit von p21 (Abb. 14A). Ebenso wurde auch kein Effekt von p21 auf die Phosphorylierung von Casein, einem weiteren natürlichen CK1ε-Substrat, festgestellt (Abb. 14B). GST-p21 selbst wurde durch CK1ε in geringem Maße phosphoryliert (Abb. 14A). Bei CK1ε handelte es sich also um eine Kinase, die keine Modulation ihrer Aktivität durch p21 erkennen ließ. Mit der p21-unabhängigen Phosphorylierung von p53 stellt CK1ε somit einen Gegensatz zu den anderen untersuchten Kinasen dar.

1.2.6. Gegensätzliche Regulation verschiedener ERK-Isoformen durch p21.

Abschließend wurden in der *in vitro* Studie die ERKs als dritte große Gruppe der MAPKs untersucht. Die beiden Isoformen ERK1 und ERK2 werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Sie sind unter anderem in Zellproliferations- sowie Zelltod-Signalwegen involviert, wenngleich auch ihre genaue Funktionsweise in diesen Signalwegen noch ungeklärt ist.²³⁵ Die Substrate der ERKs sind sehr vielfältig und auf verschiedene Zellkompartimente verteilt. Die ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung führt beispielsweise zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Fos oder zur Aktivierung der RSKs und MSKs.¹⁸³

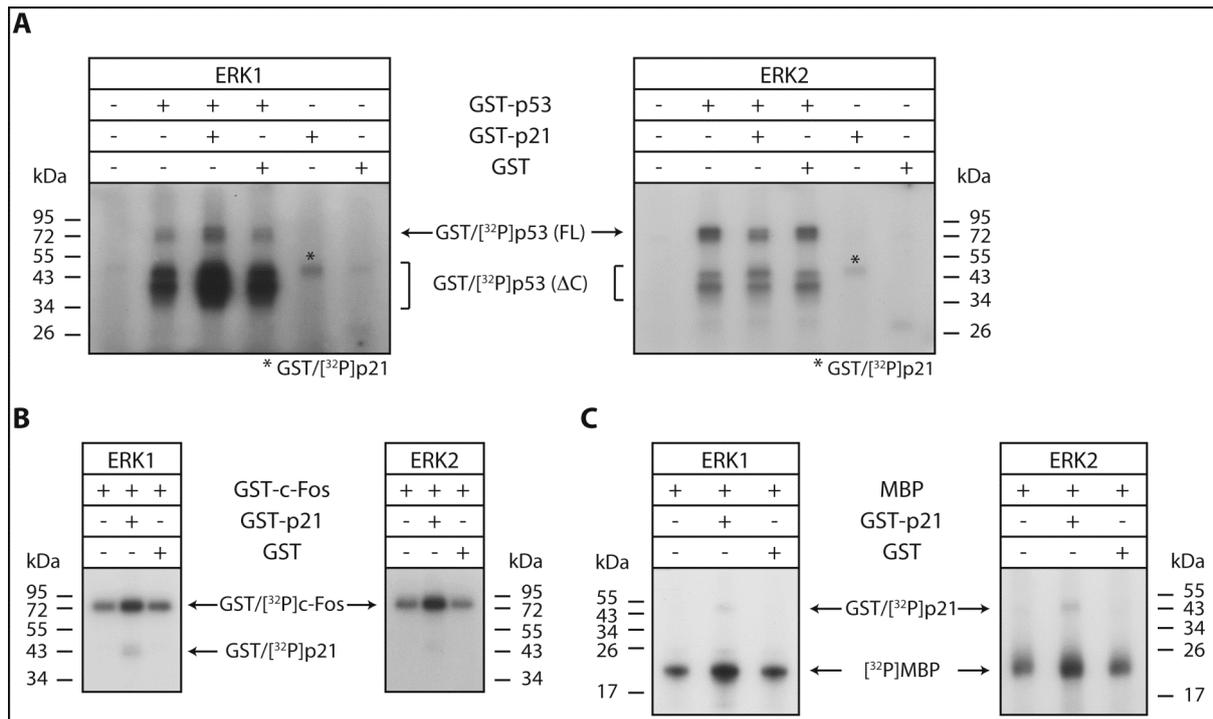


Abb. 15: Bestimmung des Einflusses von p21 auf die *in vitro* Kinase-Aktivität von ERK1/2. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. GST-p21 oder GST wurde in einem molaren Mengenverhältnis von 4:1 zu aktiver ERK1/2 gegeben. Als Substrat wurde GST-p53 (A), GST-c-Fos (B) bzw. MBP (C) verwendet. Die mit einem Stern markierten Banden (A) repräsentieren phosphoryliertes GST-p21.

Als p53-phosphorylierende Kinasen wurden sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung durch p21 analysiert. Dabei stellte sich interessanterweise heraus, dass die Phosphorylierung von p53 durch ERK1 bzw. ERK2 durch die Anwesenheit von p21 gegensätzlich moduliert wurde. Während die Kinase-Aktivität von ERK1 deutlich gesteigert wurde, zu erkennen anhand der Phosphorylierung sowohl des GST-p53 FL als auch der Δ C-Fragmente, so konnte für ERK2 stattdessen eine Verringerung der Phosphorylierung insbesondere von GST-p53 FL beobachtet werden (Abb. 15A). Beide ERK-Isoformen vermittelten hierbei eine schwache Phosphorylierung des GST-p21 Proteins (Abb. 15A). Wurde anstelle von p53 der Transkriptionsfaktor c-Fos als Substrat eingesetzt, so ließ sich nun für beide ERK-Isoformen eine p21-vermittelte Stimulation ihrer Kinase-Aktivitäten beobachten (Abb. 15B). Ebenso verhielt es sich bei Verwendung des artifiziellen Substrates MBP, dessen Phosphorylierung durch beide ERKs in Anwesenheit von p21 stark zunahm (Abb. 15C). Folglich konnte für die beiden Isoformen ERK1 und ERK2 bei der p53-Phosphorylierung eine gegensätzliche Modulation durch das p21-Protein aufgezeigt werden, während bei der ERK1/2-vermittelten Phosphorylierung von c-Fos und MBP jeweils ein stimulierender Effekt von p21 auftrat.

1.3. Auswirkung der pharmakologischen MAPK-Inhibition auf die zelluläre Antwort nach ionisierender Bestrahlung.

Wie die hier dargelegte *in vitro* Studie zeigt, wird durch p21 die Aktivität verschiedener Isoformen der p53-phosphorylierenden MAPKs JNK, p38 und ERK in einer bemerkenswerten Substrat-Abhängigkeit unterschiedlich moduliert. Diese Daten konnten zusammen mit den Ergebnissen zum Phosphorylierungszustand von p53 aus Abschnitt 1.1 bereits erfolgreich publiziert werden (s. Anhang).²³⁶ Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die pharmakologische Inhibition dieser MAPKs einen Effekt auf die zelluläre Stressantwort nach ionisierender Bestrahlung zeigt. Hierfür wurde die Caspase-Aktivität (DEVDase-Aktivität) unbestrahlter und γ -bestrahlter HCT116 Wildtyp-Zellen und ihrer p53- bzw. p21-defizienten Derivate in An- oder Abwesenheit der entsprechenden MAPK-Inhibitoren vergleichend analysiert. Für die pharmakologische Inhibition der MAPKs wurde der JNK-Inhibitor I (L-Form; ein kleines Peptid, das die Interaktion zwischen JNK1/2/3 und dem Kinase-Substrat kompetitiv hemmt), der p38-Inhibitor SB203580 (ein ATP-kompetitives Pyridinyl-Imidazol) bzw. der MEK-Inhibitor U0126 (ein nicht-kompetitiver chemischer Inhibitor) verwendet. Während der JNK-Inhibitor I ebenso wie SB203580 direkten Einfluss auf die jeweilige MAPK nimmt,^{237,238} erfolgt die Inhibition von ERK1/2 durch U0126 indirekt, indem die ERK1/2-aktivierenden Kinasen MEK1 und MEK2 gehemmt werden.²³⁹

Wie bereits beschrieben wird in Wildtyp-HCT116 nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung über eine p53-vermittelte p21-Expression Seneszenz induziert, während diese Behandlung in p21-defizienten Zellen Apoptose auslöst (Abb. 8 + 16A/B). Da die γ -IR-induzierte p21-Expression durch p53 vermittelt wird, war es nicht überraschend, dass p53-defiziente Zellen durch ionisierende Strahlung ebenfalls in die Apoptose geführt werden (Abb. 16A/B). Die Inhibition von JNK oder von p38 ließ in unbestrahlten Zellen unabhängig vom p53- oder p21-Status keinen Einfluss auf die Caspase-Aktivität erkennen (Abb. 16A). In γ -bestrahlten seneszenten Wildtyp-Zellen oder apoptotischen p53- oder p21-defizienten Zellen war ebenfalls keine Veränderung der Caspase-Aktivität durch die Anwesenheit des JNK- oder des p38-Inhibitors zu beobachten. Ebenso wenig traten morphologische Veränderungen unter dem Einfluss dieser beiden Inhibitoren auf (Daten nicht gezeigt).

Demgegenüber zeigte jedoch die U0126-vermittelte ERK-Inhibition einen deutlichen Effekt auf γ -bestrahlte p53- oder p21-defiziente Zellen, deren Caspase-Aktivitäten in Anwesenheit dieses Inhibitors jeweils dramatisch reduziert wurden und in p21-defizienten Zellen sogar auf das Niveau unbestrahlter Zellen zurückging (Abb. 16A). In unbestrahlten Zellen konnte unabhängig von der p53- bzw. p21-Expression zwar eine geringfügige Induktion der Caspase-Aktivität durch U0126 beobachtet werden, sie lag jedoch nie höher als die geringe strahlungsinduzierte Caspase-Hintergrundaktivität, wie sie selbst in Apoptose-resistenten Wildtyp-Zellen zu beobachten ist.

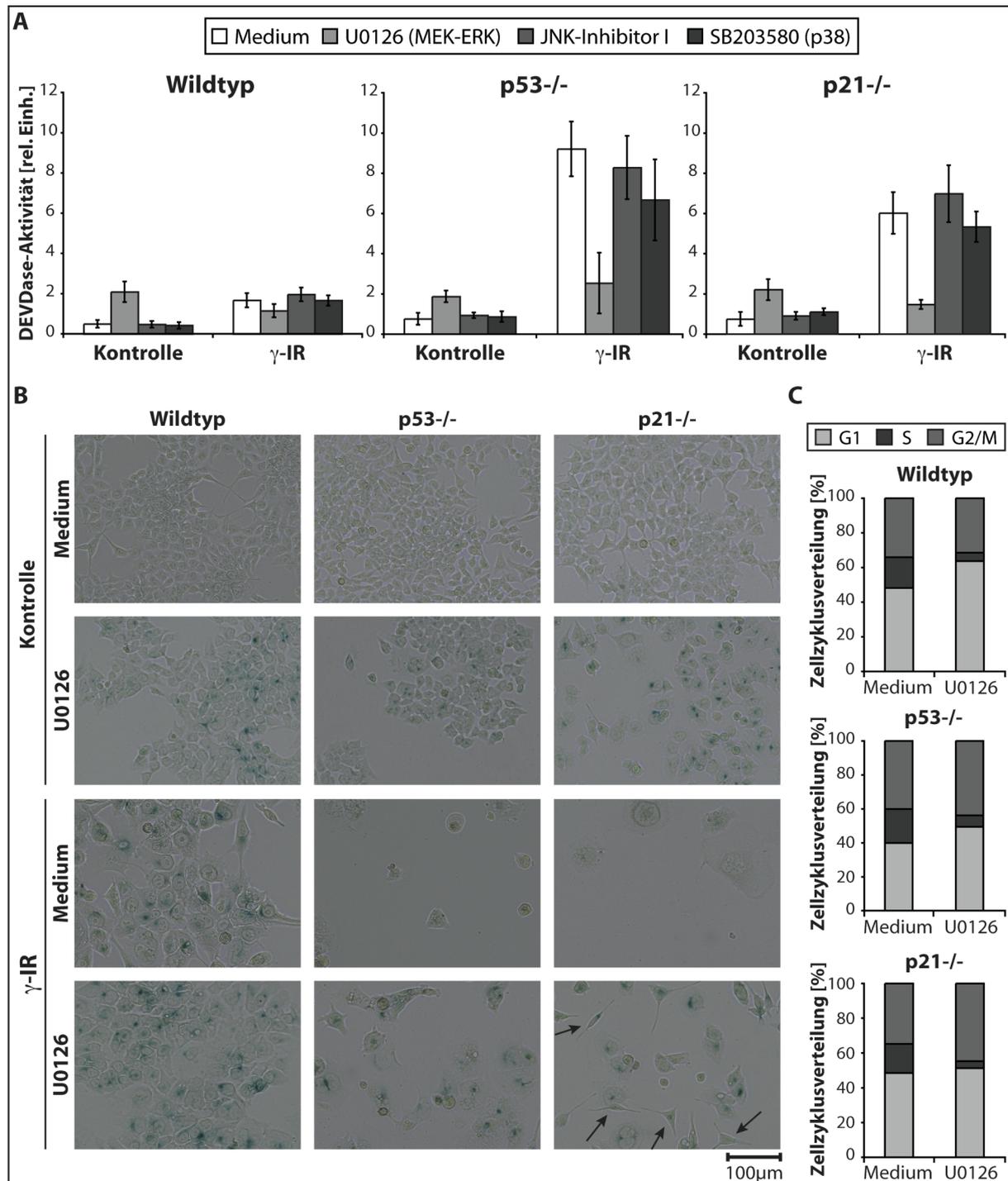


Abb. 16: Auswirkung der pharmakologischen MAPK-Inhibition auf HCT116-Zellen nach γ -IR (20 Gy bei 200 kV). Die Zellen wurden wie angegeben mit JNK-Inhibitor I (1 μ M) oder SB203580 (20 μ M) bzw. mit U0126 (20 μ M) 2 Std. bzw. 30 min vor Bestrahlung vorinkubiert. DMSO (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Zellen (Daten nicht gezeigt). **(A)** Vergleich der Caspase-3-Aktivität in Zellextrakten unstimulierter und bestrahlter Zellen 3 Tage nach γ -IR in An- oder Abwesenheit der angegebenen MAPK-Inhibitoren. Die Caspase-3-Aktivität wurde im fluorometrischen Substrattest gemessen. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten dar. **(B)** Kolorimetrischer Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität in unstimulierten und bestrahlten Zellen 4 Tage nach γ -IR in An- oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors. Die Pfeile kennzeichnen morphologisch unveränderte Zellen. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. **(C)** Zellzyklusverteilung unstimulierter und bestrahlter Zellen 24 Std. nach γ -IR in An- oder Abwesenheit des MEK-Inhibitors. Die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Nicoletti.²¹⁹ Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Aufgrund des beobachteten Schutzes vor strahlungsinduzierter Apoptose wurde nun der Einfluss der ERK-Inhibition auch hinsichtlich der Zellzyklus-Regulierung und einer möglichen Seneszenz-Induktion näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in unbestrahlten Zellen unabhängig von der p21- oder p53-Expression in Anwesenheit von U0126 eine minimale Zellvolumen-Zunahme beobachtet werden konnte, einhergehend mit einer erhöhten Aktivität der SA- β -Gal, welche in p53-defizienten Zellen jedoch nicht so ausgeprägt war wie in den beiden anderen Zelllinien (Abb. 16B, Reihe 1 u. 2). Insgesamt entsprach die Morphologie der Zellen jedoch nicht dem typischen Erscheinungsbild seneszenten Zellen, wie es bei γ -bestrahlten Wildtyp-Zellen vorzufinden ist (Abb. 16B, links, Reihe 3). Wie die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes verdeutlicht, scheinen die Wildtyp-Zellen unter dem Einfluss des MEK-Inhibitors in einen leichten G1-Zellzyklus-Arrest einzutreten (Abb. 16C, oben). Die Anhäufung der Zellen in der G1-Zellzyklusphase war jedoch nur schwach ausgeprägt, allerdings konnte eine deutliche Abnahme des S-Phase-Anteils beobachtet werden. Sowohl für p21- als auch für p53-defiziente Zellen konnte in Anwesenheit von U0126 ausschließlich solch eine Verringerung des in der S-Phase befindlichen Anteils an Zellen festgestellt werden, jedoch keine eindeutige Arretierung in der G1- oder der G2-Zellzyklusphase (Abb. 16C, Mitte u. unten). Auf γ -bestrahlte Wildtyp-Zellen hatte die ERK-Inhibition keinen sichtbaren Effekt. So unterschieden sich bestrahlte Zellen in An- oder Abwesenheit von U0126 weder in der Zunahme des Zellvolumens noch in der Aktivität der SA- β -Gal (Abb. 16B, Reihe 3 u. 4). Demgegenüber konnte in Übereinstimmung mit den Daten zur Caspase-Aktivität (Abb. 16A) sowohl in bestrahlten p53-defizienten als auch in bestrahlten p21-defizienten Zellen in Anwesenheit des MEK-Inhibitors ein deutlicher Unterschied zu entsprechenden γ -bestrahlten Zellen ohne Inhibitor festgestellt werden. Waren nach ionisierender Bestrahlung in den mikroskopischen Präparaten nur noch Zelltrümmer sowie deformierte Zellüberreste vorhanden, so ließen sich in Anwesenheit von U0126 viele seneszente Zellen nachweisen, welche in ihrer Morphologie und hinsichtlich der SA- β -Gal-Aktivität bestrahlten Wildtyp-Zellen ähnelten, wenngleich auch die Zelldichte deutlich geringer war (Abb. 16B, Reihe 3 u. 4). Bei p21-defizienten Zellen wiesen zudem viele Zellen nur eine geringe Volumenzunahme auf (Abb. 16B, rechts, Reihe 4, Pfeile).

Es ließ sich also durch die pharmakologische JNK- und p38-Inhibition kein Effekt auf die Zellmorphologie und die Caspase-Aktivität unbestrahlter und γ -bestrahlter Zellen feststellen. Demgegenüber induziert die Inhibition des MEK-ERK-Signalweges unabhängig von der p53- und p21-Expression einen Seneszenz-ähnlichen Zustand und schützt p53- und p21-defiziente Zellen wirkungsvoll vor der strahlungsinduzierten Apoptose, indem diese stattdessen in die Seneszenz geführt werden.

2. Identifizierung von p21 als ein neues RSK-Substrat.

2.1. *Pharmakologische RSK-Inhibition beeinflusst den Zellzyklus und schützt p21-abhängig vor strahlungsinduzierter Apoptose.*

Die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Daten verdeutlichen eine p53-unabhängige Involvierung ERK-vermittelter Signalwege in die γ -IR-induzierte Apoptose in HCT116-Zellen. RSKs werden fast ausschließlich von ERK1/2 aktiviert und stehen damit in der intrazellulären Signalkette direkt unterhalb dieser MAPKs. Zur Untersuchung einer Beteiligung der RSKs an der zellulären Stressantwort nach γ -IR wurden ebenfalls HCT116-Zellen verwendet. Diese exprimieren nur die RSK-Isoformen 1, 2 und 3, jedoch nicht die Isoform RSK4.²¹⁶

Zunächst wurde untersucht, ob eine pharmakologische RSK-Inhibition einen vergleichbaren Effekt auf die zelluläre Stressantwort nach ionisierender Bestrahlung erkennen ließ, wie er bereits nach der Inhibition der RSK-aktivierenden ERKs beobachtet worden war. Hierfür wurde BI-D1870 verwendet, ein niedermolekulares Dihydropteridinon,²⁴⁰ das an die ATP-Bindungsstelle der aminoterminalen RSK-Kinasedomäne (NTKD) bindet und dadurch deren Aktivität inhibiert.²⁴¹ Es zeigte sich, dass der RSK-Inhibitor sowohl auf Wildtyp-Zellen als auch auf ihre p53-defizienten Derivate einen leicht zytotoxischen Effekt ausübte, welcher sich in einer geringen Erhöhung der Caspase-Aktivität der betroffenen Zellen äußerte (Abb. 17A, links u. Mitte). Diese lag jedoch bei Wildtyp-Zellen auf einem vergleichbaren Niveau wie die geringe strahlungsinduzierte Caspase-Hintergrundaktivität, und in p53-defizienten Zellen wurde nicht annähernd der Wert erreicht, wie er in apoptotischen Zellen nach ionisierender Bestrahlung vorzufinden ist (Abb. 17A, links u. Mitte). Interessanterweise ließ sich jedoch die strahlungsinduzierte Caspase-Aktivität in p53-defizienten Zellen mit Hilfe des RSK-Inhibitors dramatisch reduzieren, so dass sie nicht höher lag als jene in γ -bestrahlten Wildtyp-Zellen. Diese Beobachtung war mit dem Effekt des MEK-Inhibitors U0126 auf die Caspase-Aktivität p53-defizienter Zellen nach Bestrahlung vergleichbar (Abb. 16A, Mitte). In p21-defizienten Zellen hingegen, in denen die strahlungsinduzierte Apoptose ebenfalls durch die U0126-vermittelte ERK-Inhibition vermindert worden war (Abb. 16A, rechts), konnte dies mit der RSK-Inhibition nicht beobachtet werden (Abb. 17A, rechts). Vielmehr übte BI-D1870 selbst schon eine stark zytotoxische Wirkung auf unbestrahlte p21-defiziente Zellen aus, welche in ihrem Ausmaß mit der strahlungsinduzierten Apoptose in dieser Zelllinie vergleichbar war (Abb. 17A, rechts). Damit unterscheidet sich sein Effekt auf p21-defiziente Zellen deutlich von der Wirkung des MEK-Inhibitors (Abb. 16A, rechts). Eine pharmakologische Inhibition der RSKs durch BI-D1870 schützt zwar effektiv, jedoch in starker Abhängigkeit von der p21-Expression, vor strahlungsinduzierter Apoptose.

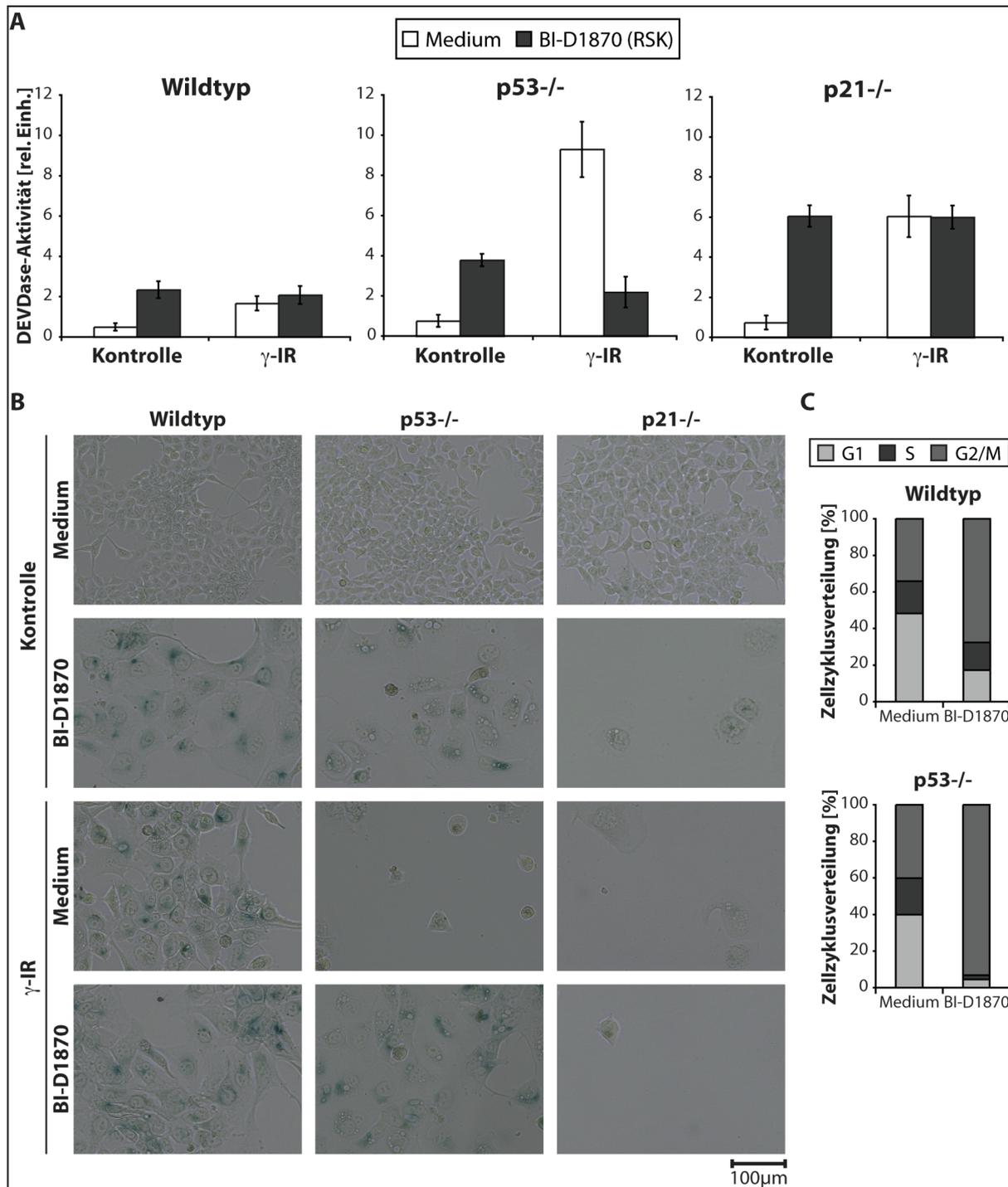


Abb. 17: Auswirkung der pharmakologischen RSK-Inhibition auf HCT116-Zellen nach γ -IR (20 Gy bei 200 kV). Die Zellen wurden wie angegeben mit BI-D1870 (10 μ M) 2 Std. vor Bestrahlung vorinkubiert. DMSO (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Zellen (Daten nicht gezeigt). **(A)** Vergleich der Caspase-3-Aktivität in Zellextrakten unstimulierter und bestrahlter Zellen 3 Tage nach γ -IR in An- oder Abwesenheit des RSK-Inhibitors. Die Caspase-3-Aktivität wurde im fluorometrischen Substrattest gemessen. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar. **(B)** Kolorimetrischer Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität in unstimulierten und bestrahlten Zellen 4 Tage nach γ -IR in An- oder Abwesenheit des RSK-Inhibitors. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. **(C)** Zellzyklusverteilung unstimulierter und bestrahlter Zellen 24 Std. nach γ -IR in An- oder Abwesenheit des RSK-Inhibitors. Die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Nicoletti.²¹⁹ Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Mikroskopische Untersuchungen der Zellen, verbunden mit dem kolorimetrischen Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität, bestätigten die Ergebnisse dieser Apoptose-Analysen. In unbestrahlten p21-defizienten Zellen konnten in Anwesenheit von BI-D1870 ebenso nur noch Zelltrümmer und deformierte Zellüberreste beobachtet werden, wie sie auch nach γ -IR auftraten (Abb. 17B, rechte Spalte), womit sich die Wirkung des RSK-Inhibitors auf p21-defiziente Zellen grundlegend von den Auswirkungen der ERK-Inhibition unterschied (vgl. Abb. 16B u. 17B, jeweils rechte Spalte). Bei p53-defizienten Zellen hingegen konnten bei pharmakologischer RSK-Inhibition trotz ionisierender Bestrahlung viele Zellen dokumentiert werden, die sich durch eine seneszente Morphologie in Kombination mit einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität auszeichneten und darüber hinaus eine Vielzahl intrazellulärer Vakuolen aufwiesen (Abb. 17B, mittlere Spalte). Bereits in unbestrahlten p53-defizienten Zellen ließen sich solche BI-D1870-vermittelten intrazellulären Vakuolen beobachten, auch hier verbunden mit einer Abflachung der Zellen und einer deutlichen Zellvolumen-Zunahme sowie einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität (Abb. 17B, mittlere Spalte). Auf Wildtyp-Zellen hingegen schien der RSK-Inhibitor keinen Effekt auf die zelluläre Stressantwort zu haben, da bestrahlte Zellen unabhängig von seiner An- oder Abwesenheit eine seneszente Morphologie sowie eine erhöhte SA- β -Gal-Aktivität aufwiesen (Abb. 17B, linke Spalte). Er bewirkte allerdings bereits in unbestrahlten Wildtyp-Zellen die Ausprägung der gleichen seneszenten Merkmale, wie sie in γ -bestrahlten Zellen vorzufinden waren (Abb. 17B, linke Spalte). Während eine Erhöhung der SA- β -Gal-Aktivität in Wildtyp-Zellen und p53-defizienten Zellen auch infolge der ERK-Inhibition aufgetreten war (Abb. 16B, linke u. mittlere Spalte), konnte die Abflachung der Zellen und die Zellvolumen-Zunahme sowie im Falle der p53-defizienten Zellen die Vakuolenbildung ausschließlich unter dem Einfluss des RSK-Inhibitors beobachtet werden (vgl. Abb. 16B u. 17B, jeweils linke u. mittlere Spalte).

Abschließend wurde die Auswirkung der RSK-Inhibition auf die Zellzyklusverteilung unbestrahlter Wildtyp-Zellen und ihrer p53-defizienten Derivate untersucht. Aufgrund der BI-D1870-vermittelten Apoptose wurden p21-defiziente Zellen von dieser Zellzyklus-Analyse ausgenommen. In Wildtyp-Zellen konnte in Anwesenheit des RSK-Inhibitors ein deutlicher G2-Zellzyklusarrest festgestellt werden (Abb. 17C, oben), welcher zwar nicht so ausgeprägt war wie jener nach ionisierender Bestrahlung (Abb. 8B), sich aber dennoch klar von dem G1-Arrest unterschied, welcher durch die ERK-Inhibition induziert wurde (Abb. 16C, oben). Während p53-defiziente Zellen in Anwesenheit von U0126 zwar eine Verringerung des Anteils der in der S-Phase befindlichen Zellen gezeigt hatten, jedoch kein G1- oder G2-Arrest erkennbar gewesen war (Abb. 16C, Mitte), traten sie nun durch den RSK-Inhibitor in einen eindeutigen G2-Arrest ein (Abb. 17C, Mitte), welcher in seiner Deutlichkeit sogar mit dem G2-Arrest bestrahlter Wildtyp-Zellen (Abb. 8B) vergleichbar war.

Damit induziert die pharmakologische RSK-Inhibition durch BI-D1870 in einer bemerkenswerten p21-Abhängigkeit, aber unabhängig von der p53-Expression, zelluläre Seneszenz. Diese ist durch einen G2-Zellzyklusarrest, durch die charakteristische Morphologie einer extremen Zellvolumen-Zunahme bei gleichzeitiger Abflachung der Zellen sowie durch eine gesteigerte SA- β -Gal-Aktivität gekennzeichnet.

2.2. Die pharmakologische und spezifische (siRNA-vermittelte) RSK-Inhibition führt p53-unabhängig zu einer p21-Akkumulation.

Die pharmakologische RSK-Inhibition vermittelt einen wirkungsvollen Schutz vor strahlungsinduzierter Apoptose und induziert darüber hinaus einen G2-Zellzyklusarrest und zelluläre Seneszenz (s. Abschnitt 2.1). Diese Effekte weisen eine starke Abhängigkeit von der Expression des CDK-Inhibitors p21 auf, einem bekannten Zellzyklus-Regulator mit hohem anti-apoptotischem Potential. Mittels Western-Blot wurde nun der zelluläre p21-Status in Anwesenheit von BI-D1870 analysiert.

Tatsächlich konnte in HCT116 Wildtyp-Zellen unter dem Einfluss des RSK-Inhibitors nach 24 Stunden eine deutliche Akkumulation des p21-Proteins beobachtet werden, welche sich nach 48 Stunden noch verstärkte und bei der alleinigen Zugabe des Lösungsmittels DMSO nicht stattfand (Abb. 18A). Diese Erhöhung der p21-Menge erfolgte ohne eine Veränderung des p53-Niveaus (Abb. 18A) und war sogar in p53-defizienten Zellen zu beobachten (Abb. 18B). Aufgrund des fehlenden Transkriptionsfaktors ist p21 in ungestressten p53-defizienten Zellen im Western-Blot nicht detektierbar, und auch ionisierende Strahlung, welche in Wildtyp-Zellen über eine Stabilisierung des p53-Proteins zu einem deutlichen Anstieg der p21-Expression führt, kann in p53-defizienten Zellen die p21-Menge nicht erhöhen (Abb. 18B). *Real-Time* PCR-Analysen zeigten, dass sich die Menge der p21 mRNA-Transkripte nur nach γ -IR erhöhte, nicht aber nach Zugabe von BI-D1870 (Abb. 18C). Diese Daten weisen darauf hin, dass die p53-unabhängige BI-D1870-vermittelte p21-Induktion nicht auf transkriptioneller, sondern auf post-translationaler Ebene stattfindet. Auch in MCF-7/Casp-3-Zellen als weiteres Zellsystem konnte diese p53-unabhängige p21-Akkumulation infolge einer 24stündigen Inkubation mit BI-D1870 beobachtet werden (Abb. 18D).

Für BI-D1870 ist neben der RSK-Inhibition allerdings auch ein inhibierender Effekt auf die *in vitro* Aktivität der Kinasen PLK1 (*polo-like kinase-1*) und AuroraB beschrieben worden, welche beide wichtige Regulatoren der Zellzykluskontrolle darstellen. Bei einer BI-D1870-Konzentration, welche die Aktivität von RSK1/2 nahezu vollständig inhibiert und die Aktivität von RSK3/4 auf 10 % bis 15 % vermindert,²⁴⁰ konnte auch eine Einschränkung der Aktivität von PLK1 auf weniger als 10 % und von AuroraB auf weniger als 30 % festgestellt werden.²⁴²

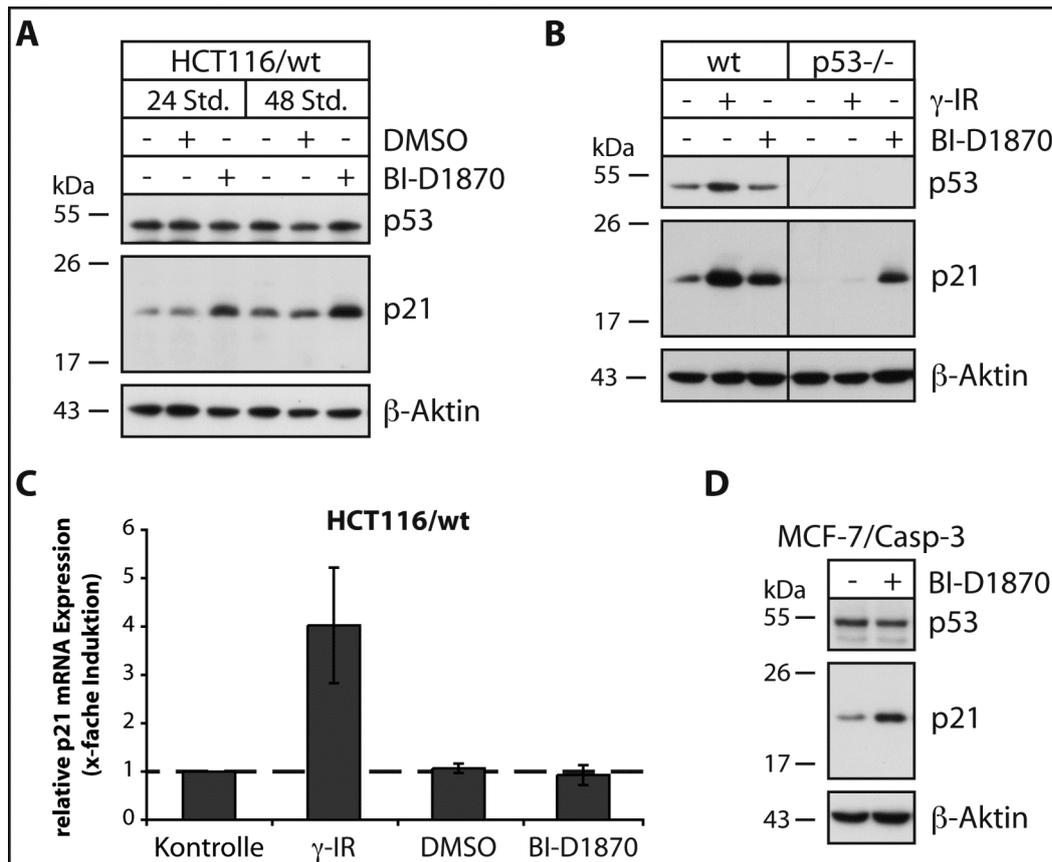


Abb. 18: Auswirkung der pharmakologischen RSK-Inhibition auf p21 in HCT116-Zellen. Zur RSK-Inhibition wurden die Zellen wie angegeben mit BI-D1870 (10 μ M) inkubiert. Die gezeigten Western-Blotte (A/B/D) sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. Als Ladekontrolle dient β -Aktin. **(A)** Western-Blot Analyse der p21- und p53-Proteinmenge in Zellextrakten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation der Zellen mit dem RSK-Inhibitor bzw. mit DMSO (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle. **(B)** Western-Blot Analyse der p21-Proteinmenge in Zellextrakten 24 Std. nach Stimulation der Zellen mit dem RSK-Inhibitor bzw. nach Bestrahlung (20 Gy bei 200 kV). Die für die beiden Zelllinien gezeigten Banden gehen auf die gleiche Exposition derselben Membran zurück. **(C)** Vergleich der relativen p21 mRNA Expression 24 Std. nach Stimulation der Zellen mit dem RSK-Inhibitor bzw. mit DMSO (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle bzw. nach Bestrahlung (20 Gy bei 200 kV). Die relative p21-Transkriptmenge wurde mittels *Real-Time* PCR bestimmt und auf die relative GAPDH-Transkriptmenge normalisiert. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar. **(D)** Western-Blot Analyse der p21- und p53-Proteinmenge in Zellextrakten 24 Std. nach Stimulation der Zellen mit dem RSK-Inhibitor.

Diese Tatsache könnte bedeuten, dass die hier beobachteten BI-D1870-vermittelten Effekte (Induktion der Seneszenz und p21-Expression) nicht auf RSK-, sondern auf PLK1- und/oder AuroraB-Inhibition beruhen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde in HCT116 Wildtyp-Zellen die Expression dieser Kinasen mittels spezifischer siRNAs herunterreguliert („*Knockdown*“). Während sich eine unspezifische Kontroll-siRNA nicht auf die p21-Expression auswirkte, war sowohl durch den AuroraB- als auch durch den PLK1-*Knockdown* (Abb. 19A/C) eine Zunahme der p21-Proteinmenge zu beobachten. Allerdings lag die p53-Expression in den entsprechenden Zellen auch wesentlich höher, als dies in untransfizierten oder mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu beobachten war (Abb. 19A/C). Daher konnte hier eine p53-Abhängigkeit der erhöhten p21-Proteinmenge vermutet werden.

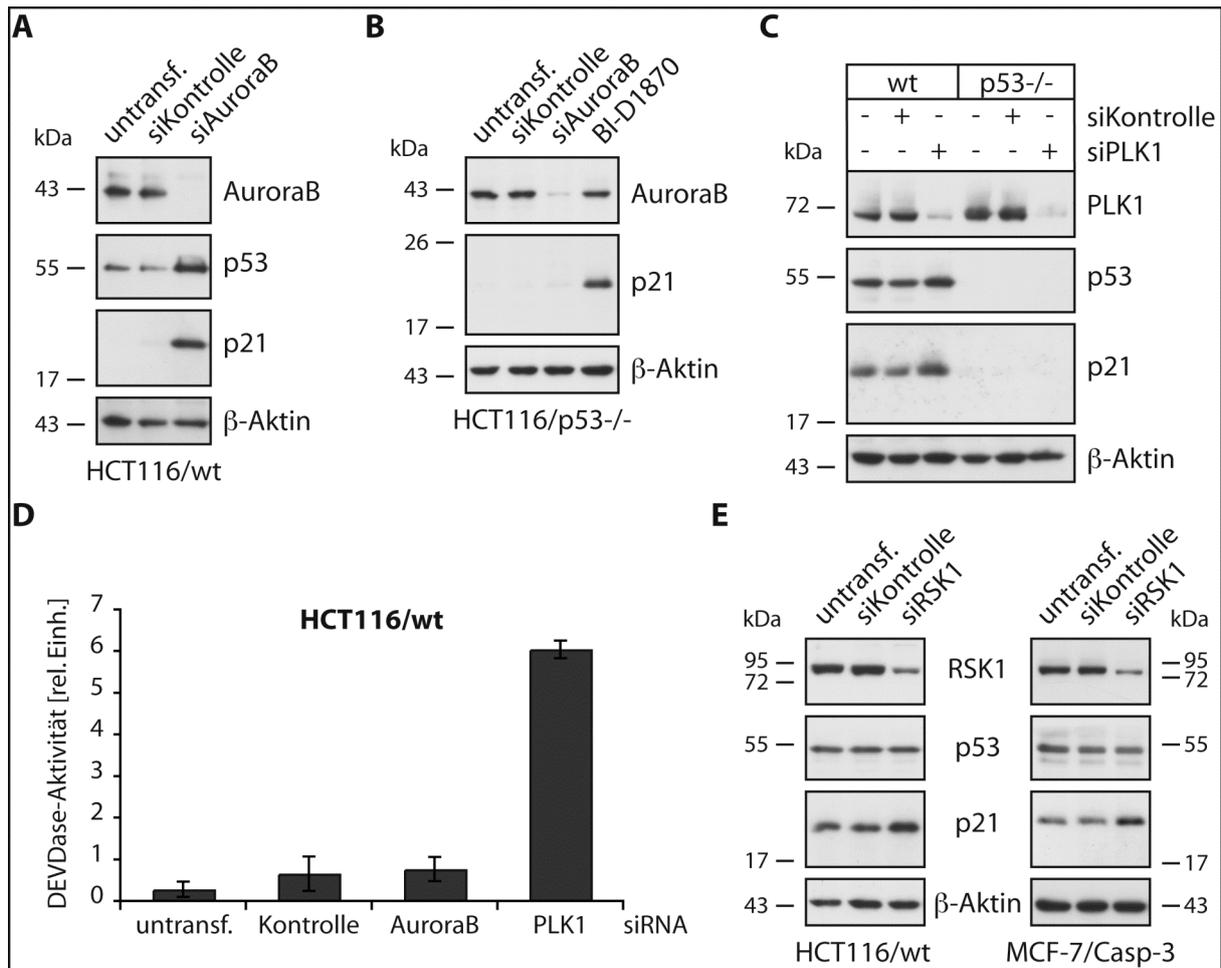


Abb. 19: Vergleich des pharmakologischen Inhibitors BI-D1870 mit siRNA-vermittelter Reduktion (*Knockdown*) von AuroraB / PLK1 / RSK. Alle Analysen wurden mit Zellextrakten 48 Std. nach siRNA-Transfektion der angegebenen Zellen durchgeführt. Die gezeigten Western-Blotte (A-C/E) sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. Als Ladekontrolle dient β -Aktin. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit unspezifischer siRNA (siKontrolle) transfiziert. **(A)** Western-Blot Analyse der p21- und p53-Proteinmenge nach AuroraB-*Knockdown*. **(B)** Western-Blot Analyse der p21-Proteinmenge bei fehlender p53-Expression nach AuroraB-*Knockdown* oder nach Zugabe von BI-D1870 (10 μ M). **(C)** Western-Blot Analyse der p21- und p53-Proteinmenge nach PLK1-*Knockdown*. **(D)** Vergleich der Caspase-3-Aktivität nach AuroraB- bzw. PLK1-*Knockdown*. Die Caspase-3-Aktivität wurde im fluorometrischen Substrattest gemessen. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte inklusive Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar. **(E)** Western-Blot Analyse der p21- und p53-Proteinmenge nach RSK1-*Knockdown* in den angegebenen Zelllinien.

Tatsächlich ließ sich in p53-defizienten Zellen trotz eines erfolgreichen AuroraB- bzw. PLK1-*Knockdowns* keine Akkumulation des p21-Proteins feststellen (Abb. 19B/C). Dies stand im deutlichen Gegensatz zur Wirkung des Inhibitors BI-D1870, der auch in Abwesenheit von p53 eine deutliche Steigerung der p21-Menge hervorrief (Abb. 18B + 19B). Darüber hinaus trieb der PLK1-*Knockdown*, wie schon zuvor beschrieben,²⁴³ die Zellen in die Apoptose. Ihre Caspase-Aktivität war mit jener vergleichbar, wie sie in p53- oder p21-defizienten Zellen nach γ -IR vorlag (vgl. Abb. 17A u. 19D). Dies konnte jedoch nicht mit AuroraB- oder Kontroll-siRNA beobachtet werden. Der spezifische RSK1-*Knockdown* führte schließlich sowohl in HCT116 Wildtyp-Zellen als auch in MCF-7/Casp-3-Zellen zu einer Erhöhung der

p21-Expression, ohne hierbei eine gesteigerte p53-Expression zu bewirken (Abb. 19E). Damit wurde nur mit RSK-siRNA, jedoch nicht mit PLK1- oder AuroraB-siRNA, die gleiche p53-unabhängige p21-Akkumulation beobachtet wie mit dem pharmakologischen Inhibitor BI-D1870. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die p53-unabhängige Erhöhung der zellulären p21-Proteinmenge durch BI-D1870 sehr wahrscheinlich auf seine RSK-inhibierende Funktion zurückzuführen ist.

2.3. RSK2 phosphoryliert p21 *in vitro*.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 2.2 legen eine Regulationsmöglichkeit der p21-Proteinmenge über den RSK-Signalweg nahe. Hierbei ist eine direkte Einflussnahme der RSKs mittels Phosphorylierung des p21-Proteins denkbar. Um dies zu überprüfen, wurde eine *in vitro* Kinase-Reaktion mit rekombinalem GST-p21 und aktiver rekombinanter RSK2 unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. In der Tat konnte auf diese Weise die *in vitro* Phosphorylierung von GST-p21 durch RSK2 nachgewiesen werden, welche sich ebenso wie die Autophosphorylierung der Kinase mit steigenden Konzentrationen des pharmakologischen RSK-Inhibitors BI-D1870 in zunehmendem Maße verringern ließ (Abb. 20A). Eine Phosphorylierung von p21 durch RSK2 ist bisher noch nicht beschrieben worden. Daher wurde die Untersuchung der Beziehung, in der p21 und Vertreter der RSK-Familie zueinander stehen, in den Mittelpunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit gestellt.

Der Tumorsuppressor p53 wurde von Cho *et al.*²⁴⁴ ebenfalls als Substrat für die Isoform RSK2 beschrieben wurde. Wie schon für die MAPKs JNK, p38 und ERK sowie für GSK-3 β und CK1 ϵ (s. Abschnitt 1.2) wurde nun auch die RSK2-vermittelte *in vitro* Phosphorylierung von p53 hinsichtlich einer möglichen Modulation durch p21 analysiert. Neben der starken RSK2-vermittelten Phosphorylierung von GST-p21 konnte den Erwartungen entsprechend auch die Phosphorylierung des GST-p53-Proteins detektiert werden (Abb. 20B). Diese Phosphorylierung wurde nur in Anwesenheit von GST-p21 deutlich vermindert, nicht aber durch das GST-Protein selbst, welches darüber hinaus auch nicht von RSK2 phosphoryliert wurde (Abb. 20B).

verschiedenen GST-p21 Fusionsproteine (Wildtyp-p21 und Mutanten) wurden bakteriell exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Unter Verwendung von radioaktiv markiertem ATP und aktiver RSK2 wurden die einzelnen Mutanten hinsichtlich ihrer Phosphorylierbarkeit im Vergleich zum Wildtyp-p21 *in vitro* analysiert. Da bei der Aufreinigung der rekombinanten GST-p21 Fusionsproteine auch ein hoher Anteil an GST-p21-Fragmenten gewonnen wurde (Abb. 21B oben), war eine densitometrische Angleichung der vollständigen Fusionsproteine unter Verwendung eines Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gels notwendig. Die Vergleichbarkeit der in den Kinase-Reaktionen eingesetzten Mengen an vollständigem Wildtyp-p21 bzw. vollständigem mutierten p21 wurde mit einer Coomassie-Färbung bestätigt (Abb. 21B, oben).

Die autoradiographische Auswertung der Kinase-Reaktionen zeigte, dass die Phosphorylierung der S116A-p21-Mutante verglichen mit der Phosphorylierung des p21 Wildtyp-Proteins deutlich abnahm (Abb. 21B, Mitte). Im Vergleich hierzu führte die Mutation von Ser146 zu einer noch stärkeren Verminderung der RSK2-vermittelten Phosphorylierung von p21 (Abb. 21B, Mitte). Die p21-Mutante T145A hingegen wurde von RSK2 stärker phosphoryliert als die unmutierte Wildtyp-Form (Abb. 21B, Mitte). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zusätzlich eine Doppelmutante generiert, welche sowohl für Ser116 als auch für Ser146 einen Aminosäureaustausch zu Alanin aufwies. Das Ziel war die vollständige Aufhebung der Phosphorylierbarkeit von p21 durch RSK2. In der Tat konnte im Vergleich zum Wildtyp-p21 eine Phosphorylierung dieser Doppelmutante durch RSK2 wie erwartet nahezu nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 21B, Mitte). Damit stellten sich innerhalb des p21-Proteins Ser116 und Ser146 als die beiden wesentlichen und wahrscheinlich sogar einzigen RSK-Phosphorylierungspositionen heraus.

Diese Ergebnisse wurden mit der Phosphorylierbarkeit der generierten Mutanten durch die AGC-Kinase AKT1 verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Mutation von Ser116 ohne Effekt blieb, jedoch die Mutation von Thr145 erwartungsgemäß eine drastische Reduzierung der p21-Phosphorylierung durch AKT1 bewirkte (Abb. 21B, unten). Bei der Mutation von Ser146 hingegen wurde p21 von AKT1 stärker phosphoryliert (Abb. 21B, unten), weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die Phosphorylierung von p21 nur an Thr145, nicht aber an Ser146 stattfindet. Darüber hinaus ähnelte diese Beobachtung dem oben beschriebenen Effekt der Thr145-Mutation auf die p21-Phosphorylierung durch RSK2. Bei der Doppelmutation von Ser116 und Ser146 zu Alanin ließ sich allerdings keine Verstärkung der p21-Phosphorylierung durch AKT1 beobachten (Abb. 21B, unten).

Nach der Identifizierung von Ser116 und Ser146 als p21-Phosphoakzeptor-Positionen für RSK2 wurde die Möglichkeit einer p21-Phosphorylierung durch andere RSK-Isoformen untersucht. Hierfür wurde aktive rekombinante RSK1 bzw. RSK3 verwendet.

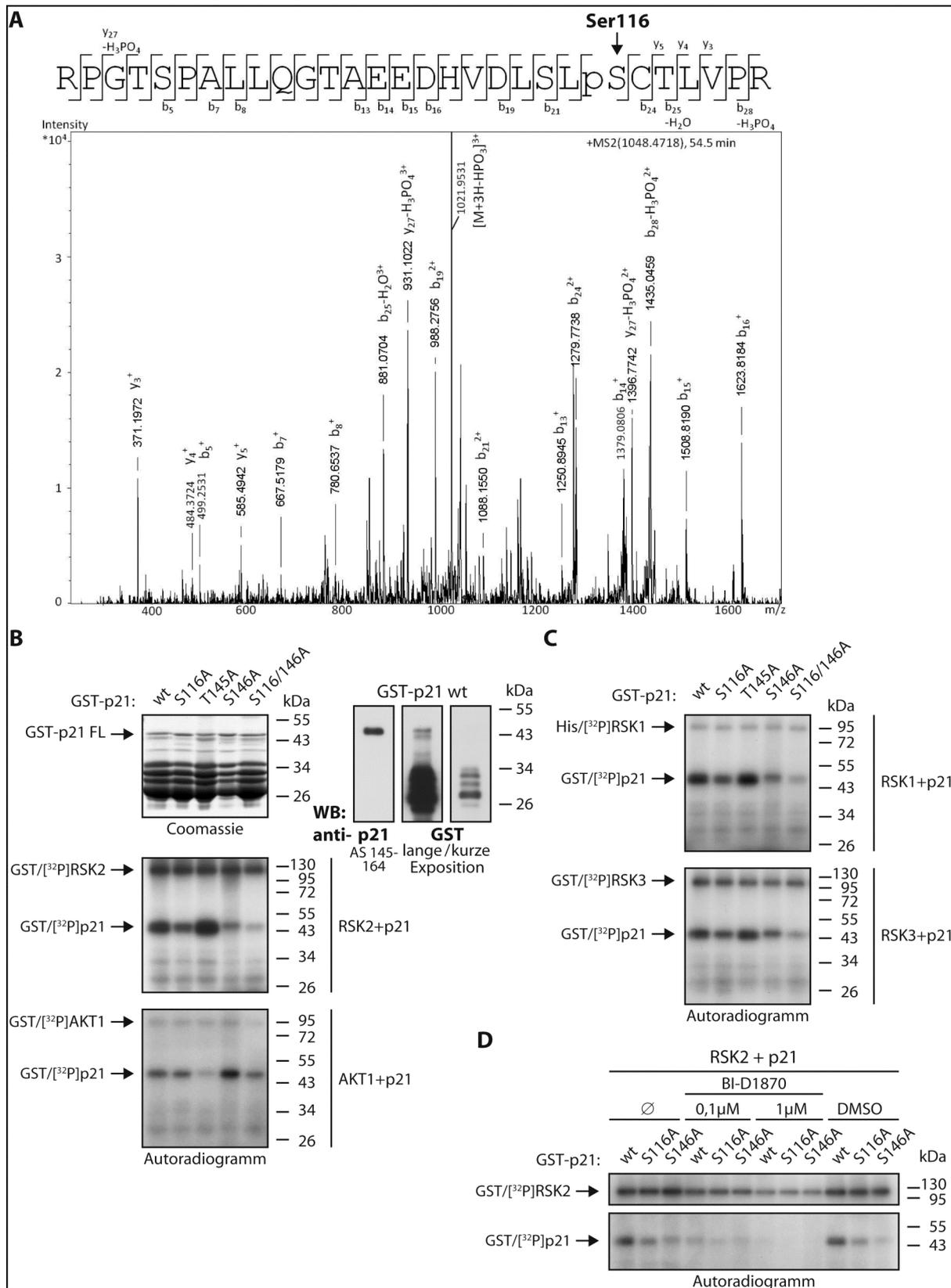


Abb. 21: Identifizierung der RSK-spezifischen Phosphorylierungspositionen im p21-Protein. (A) CID Fragmentationen-Spektrum eines dreifach geladenen monophosphorylierten Peptid-Ions (m/z 1048.47) des Proteins p21. Ein dominanter Neutralverlust von 80 Da wird beobachtet. b- und y-Fragmentationen-Serien weisen auf Ser116 als mögliche Phosphorylierungsstelle hin. Diagramm und Text: Anja Stefanski, AG Kai Stühler, Medizinisches Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum.

Fortsetzung Abb. 21:

(B/C) Mengenvergleich der angegebenen aufgereinigten rekombinanten GST-p21-Proteine (Wildtyp und Phosphorylierungsmutanten) mittels Coomassie-Färbung (B, oben links), Identifizierung des aufgereinigten GST-p21 Wildtyp-Proteins im Western-Blot (B, oben rechts) und Verwendung der GST-p21-Proteine als Substrate in *in vitro* Kinase-Reaktionen mit aktiver RSK2 (B, Mitte), aktiver AKT1 (B, unten), aktiver RSK1 (C, oben) bzw. aktiver RSK3 (C, unten). Autophosphorylierte Kinasen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **(D)** Die angegebenen GST-p21-Proteine wurden als Substrate für aktive RSK2 verwendet. Die Kinase-Reaktionen wurden in An- oder Abwesenheit des RSK-Inhibitors BI-D1870 mit den angegebenen Konzentrationen durchgeführt. DMSO (0,1 %) diente als Lösungsmittelkontrolle. Autophosphorylierte RSK2 ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Alle *in vitro* Kinase-Reaktionen wurden mit rekombinanten Proteinen und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die gezeigten Autoradiogramme sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente (B-D).

Tatsächlich stellte sich hierbei heraus, dass das p21 Wildtyp-Protein auch von diesen beiden RSK-Isoformen *in vitro* phosphoryliert werden kann (Abb. 21C). Dabei wirkten sich die verschiedenen Mutationen auf die Phosphorylierbarkeit von p21 durch RSK1 in gleicher Weise aus wie für RSK2 beschrieben (vgl. Abb. 21B, Mitte u. 21C, oben). Auch die Phosphorylierung durch RSK3 ließ sich durch die Mutation sowohl von Ser116 als auch von Ser146 reduzieren, hier allerdings in gleichem Maße (Abb. 21C, unten), während bei RSK1/2 die S146A-Mutante weniger stark phosphoryliert wurde als die S116A-Mutante (Abb. 21B, Mitte + 21C, oben). Die S116/146A-Doppelmutante wurde von RSK1 und RSK3 ebenso wie auch von RSK2 nur noch sehr gering phosphoryliert. Die Mutation von Thr145 verstärkte auch für RSK1, wie schon für RSK2, die Phosphorylierbarkeit von p21 (Abb. 21C, oben), wohingegen sie keinen Effekt bei Verwendung von RSK3 als p21-phosphorylierende Kinase zeigte (Abb. 21C, unten).

Ser146 liegt in dem RSK-Konsensus-Phosphorylierungsmotiv BXBXX(S/T), wobei B eine basische Aminosäure darstellt und X durch jede Aminosäure ersetzt werden kann. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Ser116 um eine atypische RSK-Phosphorylierungsstelle (VDLSLS). Um sicherzustellen, dass Ser116 tatsächlich von der Substrat-relevanten NTKD und nicht auf einem *in vitro* Artefakt basierend von der CTKD phosphoryliert wird, wurden die verschiedenen p21-Mutanten mit aktiver RSK2 in Gegenwart von BI-D1870 inkubiert, welcher spezifisch die NTKD inhibiert. Durch die Anwesenheit dieses NTKD-spezifischen RSK-Inhibitors konnte nicht nur wie schon zuvor gezeigt die Phosphorylierung des p21 Wildtyp-Proteins fast vollständig gehemmt werden (Abb. 20A), sondern auch jene der p21 Mutanten, welche entweder nur noch über Ser116 (S146A-Mutante) oder aber nur noch über Ser146 (S116A-Mutante) als RSK-Phosphorylierungsstelle verfügen (Abb. 21D). Damit konnte eindeutig demonstriert werden, dass Ser116 und Ser146 innerhalb des p21-Proteins von der NTKD der RSK2 phosphoryliert werden und nicht von der CTKD, für die *in vivo* abgesehen von der aktivierenden Autophosphorylierung bisher keine weiteren Funktionen bekannt sind.¹⁷⁷

Somit führten die Mutationsanalysen, welche sich auf die Zugehörigkeit der N-terminalen RSK-Kinasedomäne zur AGC-Kinasefamilie sowie auf massenspektrometrische Erkenntnisse gestützt hatten, zur Identifizierung von Ser116 und Ser146 als neue und bisher nicht bekannte *in vitro* RSK1/2/3-Phosphorylierungsstellen innerhalb des p21-Proteins, deren Phosphorylierung von der NTKD der RSKs katalysiert wird.

2.5. Aktivierte RSKs vermitteln Phosphorylierungs-abhängig die Degradation von p21.

Die Inhibition der zellulären RSK-Aktivität hat eine Akkumulation von p21 zur Folge (s. Abschnitt 2.2) und darüber hinaus findet eine *in vitro* Phosphorylierung des p21-Proteins durch RSK1/2/3 statt (s. Abschnitte 2.3 + 2.4). Daher lässt sich vermuten, dass *in vivo* die RSK-vermittelte p21-Phosphorylierung dessen Degradation herbeiführt. Nun wurde die Auswirkung aktivierter endogener RSKs auf die p21-Menge *in vivo* untersucht.

Da p21 in ungestressten Zellen nur äußerst schwach exprimiert wird, wurden MCF-7/Casp-3-Zellen mit Flag-markierten p21-Konstrukten transient transfiziert, um einerseits eine ausreichende p21-Menge für die Analyse zu erzeugen und zusätzlich die Möglichkeit zu haben, den postulierten Degradationsprozess eines p21 Wildtyp-Proteins und einer Phosphorylierungs-defizienten p21-Mutante (S116/146A) zu vergleichen. Mittels PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), eines PKC-Aktivators, der den MEK1/2-ERK1/2-RSK-Signalweg induziert,²⁴⁵ wurde in entsprechend transfizierten Zellen die endogene RSK-Aktivität stimuliert. Die erfolgreiche RSK-Aktivierung wurde im Western-Blot unter Verwendung eines Phosphorylierungs-spezifischen RSK-Antikörpers nachgewiesen, welcher die Phosphorylierung im hydrophoben Motiv der Linker-Region erkennt (Abb. 22). Um die untersuchende mögliche Degradation des Flag-p21 Wildtyp-Proteins nicht durch eine konstitutiv stattfindende Neusynthese zu maskieren, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) inkubiert. In Wildtyp-Flag-p21 exprimierenden Zellen konnte auf diese Weise eindrucksvoll gezeigt werden, dass bei einer Inkubationsdauer von 15, 30 und 60 Minuten jeweils eine geringere Flag-p21-Menge in solchen Zellen zu finden war, welche mit PMA (und CHX) stimuliert wurden, als in jenen, die nur dem Translationsinhibitor ausgesetzt waren (Abb. 22A). Zwar bewirkte nach 60 Minuten die Inhibition der Proteinsynthese selbst ebenfalls eine Verminderung der Flag-p21-Proteinexpression, doch bei zusätzlicher Anwesenheit von PMA wurde das Flag-p21-Niveau noch weiter herabgesetzt (Abb. 22A). Da PMA kein spezifischer RSK-Aktivator ist, sondern über PKC die ERK- und auch die JNK-Signalwege aktiviert,²⁴⁵ wurde im Folgenden überprüft, ob die PMA-induzierte Verringerung der Flag-p21-Proteinmenge mit Hilfe des RSK-spezifischen Inhibitors BI-D1870 aufgehoben werden kann. Tatsächlich wirkte eine zweistündige Vorinkubation der Zellen mit dem RSK-Inhibitor der PMA-vermittelten

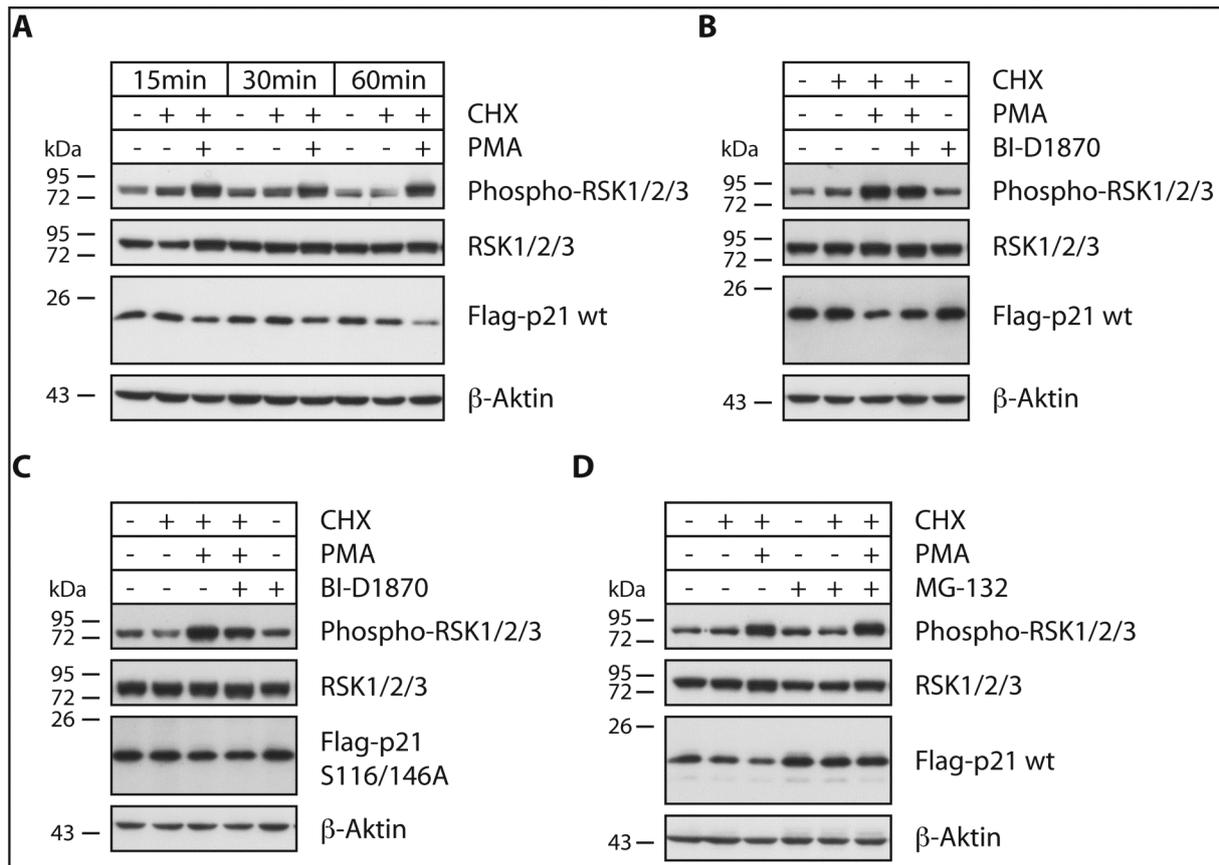


Abb. 22: Einfluss aktivierter RSKs auf die p21-Proteinmenge *in vivo*. Western-Blot Analysen von Zellextrakten Flag-p21-exprimierender MCF-7/Casp-3-Zellen (24 Std. nach Transfektion), welche wie angegeben mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX, 10 µg/ml), dem PKC-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 10 ng/ml), dem RSK-Inhibitor BI-D1870 (10 µM) oder dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (10 µM) stimuliert wurden. Als Ladekontrolle dient β-Aktin. Die gezeigten Western-Blotte sind repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Experimente. **(A)** Wildtyp-Flag-p21 exprimierende Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in An- oder Abwesenheit von CHX und PMA inkubiert. **(B/C)** Wildtyp-Flag-p21 exprimierende Zellen (B) bzw. Zellen, welche Phosphorylierungs-defizientes Flag-p21 (S116/146A) exprimieren (C), wurden wie angegeben für 2 Std. mit BI-D1870 vorinkubiert und für 30 min mit CHX und PMA stimuliert. **(D)** Wildtyp-Flag-p21 exprimierende Zellen wurden für 45 min in An- oder Abwesenheit von CHX, PMA und MG-132 inkubiert.

Flag-p21-Degradation deutlich entgegen (Abb. 22B). Unter dem alleinigen Einfluss von BI-D1870 wurde hier innerhalb des kurzen Zeitraumes von maximal 3 Stunden im Gegensatz zur 24stündigen Inkubationszeit keine Erhöhung der Flag-p21-Menge herbeigeführt (vgl. Abb. 18A u. 22B).

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass aktive RSKs die Degradation des p21-Proteins vermitteln. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob hierbei tatsächlich die direkte Phosphorylierung von p21 durch die RSKs eine maßgebliche Rolle spielt, wurde in entsprechend transfizierten Zellen eine für RSKs nach den Ergebnissen aus Abschnitt 2.4 nicht phosphorylierbare Flag-markierte S116/146A-p21-Mutante transient exprimiert. Die Verifizierung der erfolgreichen Mutagenese geschah dabei über Sequenzierung (Eurofins MWG) des p21-kodierenden Bereichs des Expressionsvektors. Unter dem Einfluss von CHX

in An- oder Abwesenheit von PMA sowie BI-D1870 zeigte diese Flag-p21-Mutante ein anderes Verhalten als das Flag-markierte Wildtyp-p21-Protein. Im Gegensatz zu diesem hatte die Zugabe von PMA nur einen geringen reduzierenden Effekt auf die Proteinmenge von Flag-p21 S116/146A, welche beim Vergleich CHX-stimulierter Zellen mit oder ohne PMA jeweils nahezu gleich hoch war (Abb. 22C). Diese leichte Verringerung der Proteinmenge von mutiertem Flag-p21 in Anwesenheit von PMA ließ sich zudem, anders als beim Wildtyp-Protein, nicht durch den RSK-Inhibitor beeinflussen (Abb. 22C).

Die Regulierung der zellulären p21-Proteinmenge und die kurze Halbwertszeit des p21-Proteins sind eng mit seinem proteasomalen Abbau verknüpft. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass auch die PMA-induzierte p21-Degradation über das Proteasom erfolgt. Der Proteasom-Inhibitor MG-132 verursachte zum einen wie erwartet eine Akkumulation von Flag-p21 (Abb. 22D). Darüber hinaus blieb die Zugabe von PMA bei gleichzeitiger Inkubation mit CHX in Anwesenheit von MG-132 ohne Auswirkung auf die Flag-p21-Proteinmenge (Abb. 22D). Dies stellte einen deutlichen Gegensatz zur Wirkung des PMA in Kombination mit CHX auf die Flag-p21-Proteinexpression in Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors dar (Abb. 22A+D). Damit liefern diese Ergebnisse einen starken Hinweis darauf, dass *in vivo* die RSK-vermittelte p21-Phosphorylierung an Ser116 und/oder Ser146 die proteasomale Degradation von p21 bewirkt.

2.6. Klonierung eines lentiviralen Expressionsvektors zur induzierbaren Expression einer Phosphorylierungs-defizienten p21-Mutante.

Um über die vorliegende Arbeit hinaus die Beziehung zwischen RSK und p21 *in vivo* eingehender untersuchen zu können, sollen nachfolgend aus p21-defizienten HCT116 Zellen generiert werden, welche induzierbares Flag-p21 in seiner Wildtyp-Form oder in mutierter Form exprimieren. Zu diesem Zweck wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt und durchgeführt, welche die Generierung eines entsprechenden lentiviralen Expressionsvektors zum Ziel hatte (Abb. 23A). Damit die Induktion der exogen exprimierten Flag-p21-Proteine möglichst mit einer natürlichen Expression vergleichbar ist, wurde vor die kodierende Sequenz des Flag-p21-Konstruktes ein Teil des natürlichen humanen p21-Promotors eingefügt. Dieser enthält unter anderem die p53-Bindungssequenzen und hat sich bereits in einem Luziferase-kodierenden Vektor (pBluescript/WAF1) als funktionell erwiesen, wie entsprechende publizierte Daten von El-Deiry *et al.* zeigen.⁹ In einer parallel durchgeführten Klonierung wurde außerdem ein p21-Expressionsvektor generiert, welcher anstelle des natürlichen p21-Promotors ein Promotorkonstrukt enthält, der sich aus dem CMV-Minimalpromotor und einer 13fachen Wiederholung der p53-Konsensus-Bindungssequenz²⁴⁶ zusammensetzt und hier als MinRGC bezeichnet wird. Dieser Promotor hat sich ebenfalls innerhalb eines entsprechenden Luziferase-kodierenden Vektors (prMinRGC-Luc) als

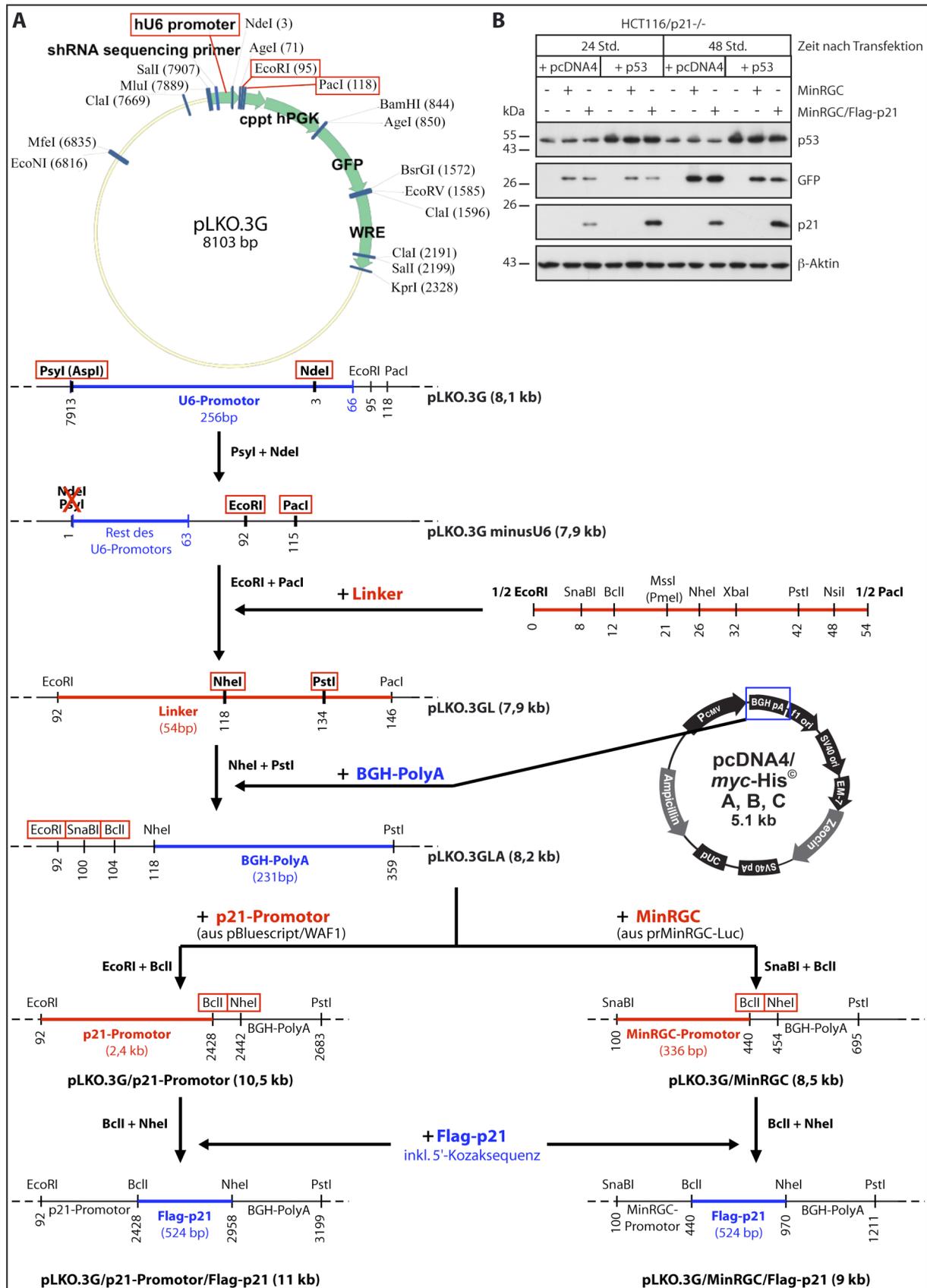


Abb. 23: Generierung lentiviraler Expressionsvektoren zur induzierbaren Expression von Flag-p21. (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie (nicht maßstabsgerecht). **(B)** Western-Blot Analyse der ektopischen Flag-p21- und GFP-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten in Zellextrakten p21-defizienter Zellen, welche mit dem generierten lentiviralen Expressionsvektor pLKO.3G/MinRGC/Flag-p21 oder mit dem Leervektor pLKO.3G/MinRGC transfiziert wurden.

Fortsetzung Abb. 23:

Zur p21-Induktion erfolgte die Co-Transfektion mit einem p53-kodierenden Expressionsvektor. Zur Kontrolle wurde der entsprechende Leervektor (pcDNA4) transfiziert. Als Ladekontrolle dient β -Aktin.

funktionell erwiesen und ist durch p53 stark induzierbar.²⁴⁷ Als Ausgangsvektor wurde der lentivirale Expressionsvektor pLKO.3G (Addgene-Plasmid #14748) verwendet, welcher ursprünglich zur Expression von shRNA (*short hairpin RNA*) generiert wurde. Er besitzt daher nicht nur einen U6-Promotor, sondern zu Selektionszwecken außerdem eine GFP (*green fluorescent protein*)-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des humanen PGK (*Phosphoglyceratkinase*)-Promotors. Die Flag-p21-kodierende Sequenz wurde in diesen Vektor an Stelle einer shRNA-Sequenz eingefügt.

Um eine mögliche Störung der Flag-p21-Expression zu vermeiden, wurde zunächst der U6-Promotor mittels Restriktion größtenteils aus dem Vektor entfernt. Zur Vereinfachung der nachfolgenden Klonierungsschritte wurde ein entsprechend entworfener Linker in den Vektor eingefügt, welcher eine definierte Reihenfolge von Schnittsequenzen ausgewählter Restriktionsenzyme enthält. Bei der Enzymauswahl wurde darauf geachtet, dass sowohl der Ausgangsvektor pLKO.3G als auch die einzufügenden Sequenzen nicht von den zu verwendenden Enzymen geschnitten werden können. Der auf diese Weise entstandene Vektor wurde als pLKO.3GL (*Linker*) bezeichnet. Damit sich dieser Vektor für die gewünschte Protein-Expression eignet, wurde eine Poly-Adenylierungssequenz eingefügt, welche aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pcDNA4/*myc*-His (Invitrogen) stammt. Der resultierende Vektor pLKO.3GLA (*PolyA*) diente als Ausgangsvektor für das nachfolgende Einfügen der jeweils gewünschten Promotorsequenz (p21-Promotor oder MinRGC) sowie der Flag-p21-kodierenden Sequenz, welche zudem über eine 5'-Kozaksequenz verfügt. Auf diese Weise entstanden die beiden lentiviralen Expressionsvektoren pLKO.3G/p21-Promotor/Flag-p21 und pLKO.3G/MinRGC/Flag-p21. Mittels gerichteter Mutagenese dieser beiden Vektoren ist außerdem zukünftig die Generierung der Phosphorylierungs-defizienten p21-Mutante S116/146A geplant, um dadurch auch deren *in vivo* Auswirkungen auf RSK-induzierte Signalwege zu untersuchen.

Nach entsprechender transients Transfektion p21-defizienter HCT116-Zellen mit dem generierten Vektorkonstrukt pLKO.3G/MinRGC/Flag-p21 (in Abwesenheit lentiviraler Verpackungsplasmide) wurde die Induzierbarkeit der Flag-p21-Expression mittels Co-Transfektion eines p53-kodierenden Expressionsvektors überprüft. Hierbei wurde die p21-Proteinmenge in Anwesenheit des p53-kodierenden Vektors mit der p21-Proteinmenge in Anwesenheit des entsprechenden Leervektors pcDNA4/*myc*-His verglichen. Als Kontrolle dienten mit dem Vektor pLKO.3G/MinRGC ohne Flag-p21-kodierende Sequenz transfizierte Zellen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der transfizierten Zellen ließ zwar eine geringe Transfektionseffizienz erkennen (Daten nicht gezeigt), dennoch konnte im

Western-Blot die Induktion der Flag-p21-Expression nachgewiesen und somit die Funktionalität des generierten Expressionsvektors bestätigt werden (Abb. 23B). Auch das generierte Vektorkonstrukt pLKO.3G/p21-Promotor/Flag-p21 wurde über transiente Transfektion in p21-defiziente HCT116-Zellen eingebracht. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte jedoch, dass die transiente Transfektion der Zellen mit diesem Vektorkonstrukt, vermutlich wegen seiner enormen Größe von 11 kb, nahezu erfolglos war. Zukünftige Transduktionen der Zellen mit Lentiviren, welche die generierten Vektorkonstrukte tragen, werden mit Sicherheit eine wesentlich höhere Effizienz aufweisen, als es transiente Transfektionen vermögen. Obwohl die Herstellung entsprechender Lentiviren sowie die Transduktion p21-defizienter Zellen mit diesen Viren essentiell für unser Verständnis der *in vivo* Bedeutung der RSK-p21-Interaktion sind, konnten diese Experimente im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation leider nicht mehr durchgeführt werden.

IV Diskussion

1. p21 ist ein Modulator p53-phosphorylierender Kinasen.

Die Aktivität und Zielgen-Spezifität des Tumorsuppressors p53 wird hauptsächlich durch seine post-translationalen Modifikationen reguliert. Von diesen sind die Acetylierungen und insbesondere die Phosphorylierungen bisher am besten untersucht, doch hat es sich in der Vergangenheit als nahezu unmöglich erwiesen, einzelne modifizierte Aminosäuren in einen direkten Zusammenhang mit der p53-Funktion und dem daraus resultierenden Zellschicksal zu bringen.⁴ Deshalb geht man zur Zeit davon aus, dass die Gesamtheit der vorliegenden Proteinmodifikationen als eine Art „Strichcode“ über die Auswirkung einer p53-Aktivierung entscheidet.⁷²

In der vorliegenden Arbeit sowie der daraus entstandenen Publikation²³⁶ (s. Anhang) wird anhand von verschiedenen γ -bestrahlten HCT116-Zelllinien gezeigt, dass sich das Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in apoptotischen und seneszenten Zellen erheblich voneinander unterscheidet (s. Abb. 9). So findet in apoptotischen Zellen im Vergleich zu seneszenten Zellen nach γ -IR eine vermehrte Acetylierung von p53 an Lys373 und Lys382 sowie eine verstärkte Phosphorylierung an Ser15 und Ser46 statt. Demgegenüber tritt eine Phosphorylierung von Ser20 nur in seneszenten Zellen auf, wogegen in apoptotischen Zellen die p53-Phosphorylierung an Ser9 deutlich abnimmt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bereits beschriebenen Apoptose-fördernden p53-Modifikationen. So reduziert die Phosphorylierungs-defiziente p53-Mutante S15A die Apoptose-Sensitivität der betroffenen Zellen,^{101,102} während die p53-vermittelte Induktion des pro-apoptotischen Zielproteins p53AIP1 insbesondere von der p53-Phosphorylierung an Ser46 abhängig ist.^{108,248} Außerdem begünstigt die Acetylierung von Lys373 die Bindung von p53 an Promotoren mit niedriger p53-Bindungsaffinität, zu denen hauptsächlich Zelltod-induzierende Gene zählen.⁸⁵

Die hier verwendeten apoptotischen und seneszenten Zellen weisen einen essentiellen Unterschied hinsichtlich ihres p21-Status auf: Während sich seneszente Zellen durch die induzierbare Expression von p21 auszeichnen, erfolgt die Ausführung der strahlungsinduzierten Apoptose ausschließlich in Zellen, die kein p21 exprimieren (p21^{-/-}; p53^{-/-} HCT116-Zellen) (s. Abb. 8+16). Basierend auf diesen Tatsachen vermuteten wir, dass die hier beobachteten Unterschiede im bestrahlungsinduzierten p53-Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster auf die An- oder Abwesenheit des p21-Proteins zurückzuführen sind. Am Beispiel verschiedener p53-phosphorylierender Kinasen kann hier zumindest *in vitro* tatsächlich deren direkte Modulation durch das p21-Protein gezeigt werden (s. Abschnitt 1.2 der Ergebnisse). So war zwar beschrieben, dass p21 mit unterschiedlichen

Kinasen interagiert und diese inhibiert, wie z.B. CDKs, JNKs, p38 und CK2, dies wurde aber mit der Ausnahme von CK2²²⁴ nie in Bezug auf die Phosphorylierung von p53 untersucht. Damit wird in der vorliegenden Arbeit und der daraus resultierenden Publikation²³⁶ (s. Anhang) erstmalig gezeigt, dass p21 die Phosphorylierung von p53 *in vitro* beeinflusst, indem es die Aktivität von GSK-3 β sowie der MAPKs JNK, p38 und ERK moduliert. Da sich hingegen die Kinase-Aktivität der CK1 ϵ nicht durch p21 beeinflussen ließ, zumindest nicht hinsichtlich der hier verwendeten Substrate p53 und Casein, unterstreicht diese Beobachtung die Spezifität des p21-vermittelten Effektes auf die oben genannten Kinasen.

In diesem Zusammenhang wurde wie schon oben erwähnt bisher lediglich publiziert, dass die CK2-vermittelte Phosphorylierung von p53 durch p21 beeinträchtigt wird.²²⁴ Des Weiteren beschrieben Shim *et al.* einen inhibierenden Effekt von p21 auf p38 sowie auf JNK1/2/3, jedoch im letzteren Fall nur hinsichtlich der c-Jun-Phosphorylierung, nicht aber unter Verwendung von p53 als Substrat.¹³³ Auch konnte diese Arbeitsgruppe aus methodischen Gründen (Verwendung immunpräzipitierter Kinasen) nicht zwischen den einzelnen JNK-Subisoformen unterscheiden und es wurden weder die Daten zur beschriebenen p38-Inhibition gezeigt noch das verwendete Substrat benannt.¹³³ Wie in der vorliegenden Arbeit *in vitro* eindrucksvoll gezeigt wird, übt p21 auf die einzelnen JNK-Subisoformen tatsächlich unterschiedliche Einflüsse aus, die in einer bemerkenswerten Weise vom jeweiligen Substrat abhängig sind. Während z.B. die Phosphorylierung eines Substrates gehemmt wird, kann die eines anderen Substrates bei Verwendung der gleichen JNK-Subisoform von p21 entweder unbeeinflusst bleiben oder sogar noch verstärkt werden. Diese Substrat-Abhängigkeit des p21-Einflusses auf die Kinase-Aktivität besteht auch bei p38 MAPK sowie bei ERK1/2 und GSK-3 β . Denkbar ist, dass hier eventuell die strukturelle Flexibilität von p21 zum Tragen kommt. Da p21 wie alle Mitglieder der CIP/KIP-Familie keine festgelegte Tertiärstruktur besitzt,^{120,122} ist es durchaus vorstellbar, dass sich die p21-Konformation bei verschiedenen Substraten, die mit der Kinase interagieren, voneinander unterscheidet. Auf diese Weise könnte beispielsweise durch p21 in Anwesenheit des einen Substrats das katalytische Zentrum der Kinase blockiert oder die Bindung des Substrates an dieses behindert werden, was zu einer verminderten Phosphorylierung des Substrates führen würde. Bei der Interaktion der Kinase mit einem anderen Substrat hingegen könnte p21 eine andere Konformation annehmen, welche eine Inhibition der Kinase nicht zulässt. Geht man von einer möglichen kompetitiven Inhibition aus, so können auch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen der Kinase und p21 bzw. den verschiedenen Substraten eine Rolle spielen. Kann p21 z.B. ein bestimmtes Substrat erfolgreich von der Kinase verdrängen, so ist dies unter Umständen bei einem anderen Substrat nicht möglich, da dieses eine höhere Bindungsaffinität zur Kinase aufweist.

Interessanterweise konnte darüber hinaus in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass p21 die Aktivität selektiver Kinasen wie z.B. p38 MAPK, ERK1/2 sowie GSK-3 β zum Teil sogar stimulieren kann. Dabei handelt es sich um eine überraschende Entdeckung, da p21 bisher nur als Inhibitor verschiedener Kinasen wie z.B. von CDK/Cyclin-Komplexen und von ASK1 bekannt war (s. Abschnitt 2.2 der Einleitung).¹¹⁸ Zwar wurde für p21 die Steigerung der Kinase-Aktivität von CDK4/CyclinD1, CDK6/CyclinD1 und CDK1/CyclinB1 beschrieben, allerdings nimmt p21 hier keinen direkten Einfluss auf die Kinasen selbst. Vielmehr fördert p21 die nukleäre Lokalisation von CDK4, CDK6 und CyclinD1 und unterstützt damit ihre Assemblierung zum funktionellen Holoenzym,¹³⁶⁻¹³⁸ wie es auch die Assemblierung und damit die Aktivierung von CDK1 und CyclinB1 vorantreibt.¹⁵⁶ Obwohl die in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Kinasen bereits aktiv sind, ist p21 dennoch in der Lage, ihre Aktivität weiter zu erhöhen. Hierbei ist es durchaus denkbar, dass p21 bei einer spezifischen Konformation, die sowohl auf seiner möglichen Interaktion mit der Kinase als auch auf einer Interaktion mit dem Substrat begründet sein könnte, als eine Art Cofaktor die Bindung zwischen Kinase und Substrat unterstützen kann. Auf ähnliche Weise (Bindung an CyclinB1) fördert p21 auch die Assemblierung von CDK1 mit CyclinB1, wengleich auch in diesem Fall zusätzlich noch spezifische Phosphorylierungen der drei beteiligten Komponenten eine wesentliche Rolle spielen.¹⁵⁶

Für die hier beschriebene *in vitro* Studie wurden keine zellulären immunpräzipitierten Kinasen verwendet, sondern ausschließlich aktive rekombinante Kinasen. Auf diese Weise sollten kontrollier- und vergleichbare Bedingungen für die Kinase-Reaktionen geschaffen werden, da eine Immunpräzipitation immer das Risiko unspezifisch präzipitierter oder co-präzipitierter Proteine birgt, deren mögliche Einflussnahme das Ergebnis der Kinase-Reaktionen verfälschen könnte. Außerdem bedarf es zur Aktivierung zellulärer Kinasen intrinsischer und/oder extrinsischer Faktoren, welche die Vergleichbarkeit der einzelnen Kinase-Reaktionen weiter erschweren würden. Darüber hinaus könnte bei immunpräzipitierten Kinasen mangels spezifischer Antikörper nicht zwischen einzelnen Kinase-Isoformen und -Subisoformen unterschieden werden. Allerdings musste infolge der ausschließlichen Verwendung aktiver rekombinanter Kinasen darauf verzichtet werden, typische stressinduzierte p53-Kinasen wie ATM (350kDa), ATR (300kDa) oder HIPK2 (130kDa) in die Untersuchungen mit einzubeziehen, da diese Kinasen ein sehr großes Molekulargewicht aufweisen und deshalb in ihrer vollständigen Form als rekombinante Proteine nicht kommerziell erhältlich sind. Gerade weil aber unklar ist, wo die entscheidende Interaktion zwischen p21 und der jeweiligen Kinase stattfindet, kann die Fähigkeit von p21 zur Modulation einer Kinase nur unter Verwendung des vollständigen Proteins sinnvoll untersucht werden.

Selbstverständlich lassen die gewonnenen *in vitro* Daten noch keine verbindlichen Aussagen zur Modulierbarkeit p53-phosphorylierender Kinasen *in vivo* zu. Allerdings liefern die Daten von Hill *et al.*²²³ sowie die hier beschriebenen unterschiedlichen p53-Phosphorylierungsmuster in p21-exprimierenden und -defizienten Zellen (s. Abb. 9) einen starken Hinweis auf eine mögliche intrazelluläre Einflussnahme von p21 auf die p53-Phosphorylierung. Damit postuliert die vorliegende Arbeit einen neuen *Feedback*-Mechanismus, durch den die Stabilität und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 durch sein transaktiviertes Zielprotein p21 direkt beeinflusst werden kann. Entsprechende *in vivo* Studien zur möglichen Einflussnahme von p21 auf p53-phosphorylierende Kinasen sind allerdings extrem schwierig, da p53 wie bereits erwähnt über eine Art „Strichcode“-System seiner post-translationalen Modifikationen gesteuert wird⁷² und außerdem mehrere Kinasen die gleiche Position innerhalb des p53-Proteins phosphorylieren können (s. Abb. 4).² Damit ist die Mutation einer einzelnen Phosphorylierungsstelle meist ebenso ohne erkennbare Auswirkung auf die p53-Funktion wie die Inaktivierung einer einzelnen Kinase. Darüber hinaus ist die Bedeutung bestimmter Kinasen für die p53-Phosphorylierung abhängig vom Zelltyp und Stimulus und die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren des p53-Proteins erfolgt oft in mehreren und voneinander abhängigen Schritten.⁴ So ergibt sich ein komplexes, Zelltyp-spezifisches Netzwerk aus Bedingungen und Abhängigkeiten, welches es bei der Analyse eines Einflusses von p21 auf die intrazelluläre p53-Phosphorylierung zu berücksichtigen gilt.

Nachdem sich die Aktivität der MAPKs JNK, ERK und p38 *in vitro* als p21-modulierbar erwies, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit deren Einfluss auf stressinduzierte Signalwege untersucht. Kim *et al.*^{249,250} haben für Zervixkarzinom-Zellen zeigen können, dass diese durch ionisierende Bestrahlung über die Aktivierung von Bak und Bax bei gleichzeitiger Verminderung der Bcl-2 Proteinmenge in die Mitochondrien-vermittelte Apoptose geführt werden. Dieser strahlungsinduzierte Zelltod stand dabei in Abhängigkeit zu JNK-vermittelten Signalwegen, wohingegen p38-induzierte Signalwege ihm entgegenwirkten.^{249,250} Da sich jedoch im hier verwendeten HCT116-Zellsystem herausstellte, dass weder die pharmakologische Inhibition von JNK noch von p38 einen erkennbaren Effekt auf die γ -IR-induzierten zellulären Stressantworten ausübte, kann davon ausgegangen werden, dass JNK- und p38-vermittelte Signalwege hier keinen Einfluss auf die Induktion von Seneszenz bzw. Apoptose haben. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass die Inhibition des ERK-induzierten Signalweges in HCT116 einen effektiven Schutz vor strahlungsinduzierter Apoptose vermittelt. Stattdessen werden die betroffenen Zellen infolge der ERK-Inhibition in einer p53- und p21-unabhängigen Weise in die Seneszenz geführt (s. Abb. 16). Interessanterweise verursacht die ERK-Inhibition bereits in unbestrahlten Zellen einen Seneszenz-ähnlichen Zustand, gekennzeichnet durch eine erhöhte SA- β -Gal-Aktivität,

es erfolgt jedoch keine Anhäufung der Zellen in der G1- oder G2-Phase, wie es für einen Zellzyklus-Arrest typisch ist. Da sich im Vergleich zu Kontrollzellen unter dem Einfluss des MEK-Inhibitors jedoch weniger Zellen in der S-Phase befinden, werden diese Zellen vermutlich sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase arretiert, je nachdem, in welcher dieser beiden Phasen sie sich gerade befinden.

Diese Daten verdeutlichen, dass ERK-vermittelte Signalwege in die γ -IR-induzierte Apoptose involviert sind. Aufgrund seiner Proliferations- und Zellmigrations-fördernden Funktionen sowie der Sicherung des Zell-Überlebens wurde ERK hauptsächlich als tumorgener Faktor angesehen,²⁵¹ doch mittlerweile ist bekannt, dass ERK auch infolge zellulären Stresses einschließlich γ -IR aktiviert wird^{252,253} und hier pro-apoptotisch wirken kann.^{254,255} Bei der Vermittlung stressinduzierter Apoptose scheint in diesem Zusammenhang die aktivierende p53-Phosphorylierung an Ser15 durch ERK eine Rolle zu spielen.²⁵⁴ Da jedoch in der vorliegenden Arbeit auch für p53-defiziente Zellen der Schutz vor strahlungsinduzierter Apoptose durch die Inhibition der ERK-Aktivierung gezeigt werden konnte, sind vermutlich auch p53-unabhängige Signalwege an der pro-apoptotischen Funktion von ERK beteiligt. Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebene degradierende Phosphorylierung des anti-apoptotischen CDK-Inhibitors p21 durch die ERK-aktivierten RSKs (s. jeweils Abschnitt 2 der Ergebnisse und der Diskussion) könnte ein Beispiel für eine p53-unabhängige pro-apoptotische ERK-Funktion sein, zumindest in HCT116-Zellen, in denen der p21-Status ausschlaggebend für das strahlungsinduzierte Zellschicksal ist.^{131,134,256} Tatsächlich lässt sich mit der pharmakologischen Inhibition der RSKs in einer p21-abhängigen und p53-unabhängigen Weise die strahlungsinduzierte Apoptose verhindern. Mit diesen Daten beschreibt die vorliegende Arbeit als eine der ersten eine pro-apoptotische Funktion für RSKs.^{213,257}

2. Identifizierung von p21 als ein neues RSK-Substrat.

Der CDK-Inhibitor p21^{WAF1/CIP1} agiert hauptsächlich als Induktor eines Zellzyklusarrestes nach DNA-Schädigung. Darüber hinaus ist er an Differenzierungsprozessen beteiligt, vermittelt zelluläre Seneszenz und besitzt außerdem ein hohes anti-apoptotisches Potential. Aber auch beim gewöhnlichen Durchlaufen des Zellzyklus spielt p21 eine Rolle, hier allerdings auf eine Proliferations-fördernde Weise.¹²⁹ Die Expression von p21 nach DNA-Schäden erfolgt hauptsächlich transkriptionell über den Tumorsuppressor p53, während seine Funktion, Lokalisation und Stabilität fast ausschließlich über Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktionen gesteuert wird. Hierbei spielen insbesondere die MAPKs JNK1, p38 α und ERK2, aber auch GSK-3 β , CDK2, AKT1 und PKC δ/ζ eine bedeutende Rolle.^{124,129,161} Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Phosphorylierung von p21 durch die Serin/Threonin-Kinasen RSK1/2/3, die sich negativ auf die Stabilität dieses CDK-Inhibitors auswirkt (s. Abschnitt 2 der Ergebnisse). RSK4 wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, da sie im Gegensatz zu den anderen humanen RSK-Isoformen weder ubiquitär noch in dem hier verwendeten HCT116-Zellsystem exprimiert wird.^{173,216}

Aktive RSKs wirken insbesondere Proliferations-fördernd, da sie einen positiven Einfluss auf Zellwachstum und Zellmotilität nehmen. Außerdem sichern sie das Überleben der Zelle, indem sie anti- bzw. pro-apoptische Substrate direkt oder indirekt aktivieren bzw. inhibieren.¹⁷³ Auch die Stabilität oder die subzelluläre Lokalisation eines Substrates kann von den RSKs durch Phosphorylierung reguliert werden. Das zur CIP/KIP-Familie zählende p27-Protein beispielsweise wird durch die RSK-vermittelte Phosphorylierung an das zytoplasmatische 14-3-3 Protein gebunden und auf diese Weise an der Ausübung seiner CDK-inhibierenden Funktion im Zellkern gehindert.²¹²

Der in der vorliegenden Arbeit als neues RSK-Substrat identifizierte CDK-Inhibitor p21 zählt ebenso wie p27 zur CIP/KIP-Familie. Die Mutation von Ser116 oder Ser146 des p21-Proteins zu Alanin zeigt jeweils eine eindrucksvolle Verringerung der RSK-vermittelten p21-Phosphorylierung, welche bei gleichzeitiger Mutation beider Positionen nahezu vollständig aufgehoben wird (s. Abb. 21). Eine gewisse *in vitro* Phosphorylierbarkeit von p21 durch RSK ist bereits von Scott *et al.*¹⁶⁹ gezeigt worden, dort allerdings ohne Durchführung näherer Untersuchungen zu dieser Thematik sowie ohne Nennung der verwendeten Isoform. Hier war RSK lediglich im Rahmen vergleichender *in vitro* Kinase-Reaktionen neben AKT/PKB, PKC ζ , PKA und S6K als weiteres Mitglied der AGC-Kinasefamilie hinsichtlich der Fähigkeit zur Phosphorylierung von p21 überprüft worden. Der Schwerpunkt dieser Publikation lag vielmehr auf der PKC ζ -vermittelten p21-Phosphorylierung an Ser146. Im direkten Vergleich zu den anderen genannten AGC-Kinasen wurde hier für RSK nur eine äußerst schwache p21-Phosphorylierung festgestellt. Allerdings setzten Scott *et al.* für ihren

Phosphorylierungsvergleich jeweils die gleiche „Unit“-Menge an Kinase ein, ohne zu berücksichtigen, dass sich die vom Hersteller angegebenen *Units* verschiedener Kinasen nicht zueinander in Relation setzen lassen, da sie in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat, welches teilweise sogar unphysiologisch ist, unterschiedlich definiert sind. Daher ist aus den Ergebnissen dieser Publikation nicht zu schließen, ob RSKs p21 besser oder schlechter phosphorylieren als die anderen untersuchten AGC-Kinasen. Interessanterweise stützen die Western-Blot Daten von Scott *et al.*, welche unter Verwendung eines Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpers gewonnen wurden, die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Phosphorylierungsposition Ser146.

Als AGC-Kinase phosphoryliert die NTKD der RSKs vorzugsweise Serine und Threonine, welche Bestandteil der Konsensus-Sequenz BXBXX(**S/T**) sind, wobei B eine basische (Arginin, Histidin oder Lysin) und X eine beliebige Aminosäure darstellt.^{173,258} Die innerhalb des p21-Proteins identifizierte *in vitro* RSK-Phosphorylierungsposition Ser146 liegt in einer diesem Konsensus entsprechenden Sequenz (KRRQT**S**₁₄₆) und wird des Weiteren auch von der AGC-Kinase PKC *in vivo* phosphoryliert.^{169,170} Die RSK-Phosphorylierungspositionen im p27-Protein dagegen liegen in Sequenzen, welche nur teilweise mit dem Konsensus übereinstimmen (RVSNG**S**₁₀ und LRRRQ**T**₁₉₈).²¹² Dennoch werden sie nicht nur von RSKs, sondern auch von der AGC-Kinase AKT1 phosphoryliert.^{259,260} Im Gegensatz hierzu wird allerdings die AKT1-Phosphorylierungsstelle Thr145 innerhalb des p21-Proteins,^{162,163} deren Umgebungssequenz sogar vollständig dem Konsensus entspricht (RKRRQ**T**₁₄₅), nicht von den RSKs *in vitro* phosphoryliert (s. Abb. 21).

Stattdessen wurde anhand massenspektrometrischer Methoden sowie Mutagenese-Studien Ser116 als weitere Phosphorylierungsstelle innerhalb von p21 identifiziert (s. Abb. 21). Diese Entdeckung erscheint zunächst überraschend, da sich Ser116 in einer Nicht-Konsensus-Sequenz für AGC-Kinasen befindet (VDLSL**S**₁₁₆). Trotzdem wurde mittels BI-D1870 als spezifischem Inhibitor der NTKD diese AGC-Kinasedomäne als für die Katalyse der Ser116-Phosphorylierung verantwortliche Kinase bestätigt (s. Abb. 21). Auch handelt es sich bei Ser116 nicht um die einzige Phosphorylierungsstelle des p21-Proteins, welche außerhalb des entsprechenden Konsensusmotivs der jeweiligen Kinase zu finden ist. So liegt die für PKC beschriebene Phosphorylierungsposition Ser153 im p21-Protein ebenfalls außerhalb der AGC-Konsensus-Sequenz (TDFYH**S**₁₅₃).¹⁶⁶ Ebenso befindet sich das von GSK-3 β phosphorylierte Thr57 des p21-Proteins (**T**₅₇PLEG) nicht in dem Konsensusmotiv für diese Kinase ((**S/T**)XXXpS/T, pS/T beschreibt hier eine üblicherweise notwendige vorangehende Phosphorylierung durch eine andere Kinase).¹⁵⁷ In der Literatur finden sich über p21 hinaus zahlreiche weitere Beispiele für Phosphorylierungen von Nicht-Konsensus-Sequenzen. Hierzu zählt u. a. die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung von CyclinD1 an Thr286.²⁶¹ Des

Weiteren erfolgt die AKT1-vermittelte Phosphorylierung des für die Regulierung des zellulären Glukose-Transportes wichtigen Faktors AS160 (*AKT substrate of 160 kDa*) an Ser666 innerhalb einer Nicht-Konsensus-Sequenz für AGC-Kinasen.²⁶² Diese Daten verdeutlichen, dass die Phosphorylierung von Ser116 durch RSK auch ohne Übereinstimmung mit dem AGC-Konsensusmotiv möglich ist und keinen Einzelfall darstellt. Einen unmittelbaren Beweis, dass Ser116 tatsächlich eine natürliche RSK-Phosphorylierungsposition darstellt, kann erst unter Verwendung Ser116-spezifischer Phospho-Antikörper erbracht werden. Die in unserem Auftrag durchgeführte Generierung eines diesbezüglichen Antikörpers bei der Firma Coring System Diagnostix GmbH ist jedoch leider fehlgeschlagen.

Das von RSKs phosphorylierte Ser146 befindet sich unmittelbar neben der AKT1-Phosphorylierungsstelle Thr145. Interessanterweise führte die Alanin-Substitution einer dieser beiden Positionen zur verstärkten Phosphorylierung der benachbarten Position durch die entsprechende Kinase (s. Abb. 21). Es ist denkbar, dass sich durch den Aminosäureaustausch die Konformation von p21 an dieser Stelle zu Gunsten einer besseren Zugänglichkeit für die jeweils andere Kinase ändert. Umgekehrt lässt sich anhand dieser Beobachtung die Hypothese formulieren, dass sich eine gleichzeitige Thr145- und Ser146-Phosphorylierung gegenseitig ausschließen. Die Überprüfung dieser Hypothese steht aber noch aus und könnte mittels sequenzieller Kinase-Reaktionen erfolgen. Des Weiteren ließen sich Phosphorylierungs-imitierende GST-p21-Mutanten generieren, um ihre *in vitro* Phosphorylierbarkeit durch AKT1 und RSKs zu untersuchen. Sollten sich die Phosphorylierungen dieser beiden Positionen tatsächlich gegenseitig ausschließen, so würde anschließend der interessanten Fragestellung nachgegangen werden, welche Konsequenzen sich daraus für *in vivo* Signalwege ergeben. Hierfür ist eine induzierbare Expression verschiedener p21-Mutanten wünschenswert. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten lentiviralen Flag-p21-Expressionsplasmide (s. Abb. 23) stellen für Untersuchungen dieser Art eine gute Grundlage dar. Bisher ist bekannt, dass die AKT1-vermittelte p21-Phosphorylierung an Thr145 zur Aufhebung der p21-PCNA-Interaktion sowie zur zytoplasmatischen Lokalisation des p21-Proteins führt.^{163,164} Für die Phosphorylierung von p21 an Ser146 durch PKC sind in Abhängigkeit von der jeweiligen PKC-Isoform die gegensätzlichen Auswirkungen einer Stabilisierung bzw. einer Destabilisierung beschrieben worden.^{169,170} Im Mittelpunkt zukünftiger *in vivo* Untersuchungen zur gegenseitigen Beeinflussung der Thr145- und Ser146-Phosphorylierung des p21-Proteins soll die RSK-vermittelte Ser146-Phosphorylierung stehen, doch könnten sie auch zur weiteren Aufklärung der oben genannten Aspekte beitragen.

Nachdem es in der vorliegenden Arbeit gelang, im p21-Protein zwei *in vitro* RSK-Phosphorylierungspositionen zu identifizieren, stellt sich die Frage nach den *in vivo* Auswirkungen dieser Phosphorylierung. Für Ser146 kann zunächst ein Vergleich zur PKC-vermittelten Phosphorylierung aufgestellt werden, welche allerdings wie oben erwähnt sowohl eine Stabilisierung (Phosphorylierung durch PKC δ)¹⁷⁰ als auch eine Destabilisierung (Phosphorylierung durch PKC ζ)¹⁶⁹ des p21-Proteins hervorrufen kann. Folglich müssen hier noch andere Determinanten eine Rolle spielen. Mit Ser116 hingegen wird hier eine vollkommen neue Phosphorylierungsstelle innerhalb des p21-Proteins beschrieben. Die Phosphorylierung der in der Nähe liegenden Ser114-Position erfolgt durch GSK-3 β und führt zur Degradation von p21.¹⁵⁸

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition der zellulären RSK-Aktivität Seneszenz induziert und auf diese Weise strahlungsinduzierter Apoptose entgegenwirkt (s. Abb. 17). Die hierbei auftretende Akkumulation von p21, welche p53-unabhängig ist und entsprechend den durchgeführten *Real-Time* PCR-Analysen nicht durch transkriptionelle Stimulation erfolgt (s. Abb. 18), spielt in diesem Zusammenhang vermutlich die entscheidende anti-apoptotische und Seneszenz-induzierende Rolle. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich mittels RSK-Inhibition nur in Anwesenheit von p21, jedoch nicht in p21-defizienten Zellen der apoptotische Zelltod vermeiden und Seneszenz induzieren lässt. Eine transkriptionell unabhängige p21-Akkumulation ist am wahrscheinlichsten mit einer Stabilisierung des p21-Proteins zu erklären. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass aktive RSKs vermutlich durch Phosphorylierung eine Destabilisierung von p21 bewirken und dadurch dessen proteasomale Degradation einleiten. Tatsächlich lässt sich die Proteinmenge an ektopisch exprimiertem Flag-p21 bei inhibierter Protein-Neusynthese durch die Zugabe von RSK-stimulierendem PMA in Abhängigkeit von den beiden RSK-Phosphorylierungsstellen herabsetzen (s. Abb. 22). Dies spricht für eine direkte Beteiligung der RSK-vermittelten Phosphorylierung. Allerdings handelt es sich bei PMA um einen PKC-Aktivator, welcher folglich die RSKs nicht direkt und spezifisch aktiviert, sondern sowohl ERK- und JNK-Signalwege stimuliert als auch die p21-phosphorylierende PKC aktiviert.²⁴⁵ Die gezielte Inhibition der RSKs mittels BI-D1870 vermag jedoch dem reduzierenden Effekt von PMA auf die p21-Menge zum Teil entgegenzuwirken (s. Abb. 22). Da dieser Inhibitor die Kinase-Aktivität von ERK1/2, JNK1/2/3 und PKC α/ζ nicht beeinflusst,²⁴² kann die p21-Degradation zumindest in dem Ausmaß, in dem sie mittels BI-D1870 zu verhindern ist, auf den Einfluss der RSKs zurückgeführt werden. Dieser Annahme entsprechend ist der geringe PMA-induzierte Abbau der Phosphorylierungs-defizienten Flag-p21-Mutante nicht durch BI-D1870 aufzuheben und stellt somit den Degradationsgrad dar, welcher RSK-unabhängig durch PMA herbeigeführt wird.

Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Hypothese einer destabilisierenden RSK-vermittelten p21-Phosphorylierung an Ser116 und/oder Ser146. Ebenso konnte gezeigt werden, dass diese RSK-vermittelte p21-Degradation über das Proteasom erfolgt, da es nicht möglich ist, in Anwesenheit eines Proteasom-Inhibitors die p21-Proteinmenge durch die Zugabe von PMA zu verringern (s. Abb. 22). Welche Bedeutung den beiden Phosphorylierungspositionen bei der RSK-vermittelten p21-Degradation im Einzelnen zukommt, muss allerdings noch aufgeklärt werden. Hierfür ist die Generierung entsprechender Plasmide zur ektopischen Expression der p21-Einzelmutanten (S116A bzw. S146A) und die anschließende Überprüfung ihrer Proteinstabilität zwingend erforderlich. Mittels densitometrischer Auswertung diesbezüglicher Western-Blot Analysen können Halbwertszeiten der einzelnen p21-Protein-Varianten (Wildtyp und Mutanten) in An- oder Abwesenheit aktiver RSKs ermittelt und miteinander verglichen werden.

Für weiterführende Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der *in vivo* Beziehung zwischen RSKs und p21 sollen in naher Zukunft Zellen generiert werden, welche sich durch eine stabile induzierbare Expression von Wildtyp-Flag-p21 und Phosphorylierungsdefizienten Einzel- bzw. Doppel-Mutanten auszeichnen. Durch die stabile Expression des Flag-markierten p21-Proteins können die Analysen unabhängig von Transfektionseffizienzen und zeitlich limitierter Expression, wie sie bei Anwendung transienter Transfektionen zu berücksichtigen sind, durchgeführt werden. Die zu diesem Zweck generierten Expressionsplasmide (s. Abb. 23) ermöglichen dabei die p53-vermittelte Induktion von p21. Auf diese Weise wird die p21-Menge in unstimulierten Zellen niedrig gehalten, um eine mit natürlichen Bedingungen vergleichbare Ausgangssituation zu schaffen. Mit Hilfe dieser Zellen soll die Auswirkung des teilweisen bzw. vollständigen Verlustes der RSK-vermittelten p21-Phosphorylierung auf zelluläre Stressantworten wie Apoptose und Seneszenz analysiert werden. Wie für transient exprimiertes Flag-p21 bereits durchgeführt, soll außerdem stabil exprimiertes Flag-p21 in Abhängigkeit von seiner Phosphorylierbarkeit unter dem Einfluss aktivierter RSKs hinsichtlich seiner Proteinstabilität bei inhibierter Protein-Neusynthese überprüft werden.

Es zeigt sich also, dass die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckte Phosphorylierung des CDK-Inhibitors p21 durch die RSKs ein breites Spektrum an nachfolgend durchzuführenden Untersuchungen bereitstellt. Da mit Ser116 und Ser146 zwei RSK-Phosphorylierungspositionen im p21-Protein identifiziert wurden, kann von einem spezifischen Prozess ausgegangen werden, ein *in vitro* Artefakt ist damit unwahrscheinlich. Die hier gewonnenen Erkenntnisse aus *in vivo* Experimenten liefern zudem Anhaltspunkte für die physiologische Bedeutung dieser neu beschriebenen Interaktion. Sowohl die Aktivierung der RSKs als auch

ihre gezielte Inhibition lässt jeweils erkennen, dass RSKs mittels ihrer Phosphorylierung den proteasomalen Abbau des p21-Proteins fördern und somit dessen Stabilität beeinträchtigen. Damit eröffnen sich neue Sichtweisen auf die durch RSKs beeinflussten zellulären Signalwege, zu denen nun auch jene gerechnet werden müssen, an denen p21 beteiligt ist. Es ist bekannt, dass RSKs in einigen Tumoren überexprimiert werden, eine wenig überraschende Tatsache, da sich diese Kinasen insbesondere durch ihre Proliferationsfördernden und Überlebens-sichernden Funktionen auszeichnen.¹⁷³ Aus diesem Grund sind die RSKs in den Fokus neuer Therapieansätze gegen Krebserkrankungen gerückt.²⁴¹ Die Entwicklung spezifischer RSK-Inhibitoren als potentielle Therapeutika klingt in der Tat zunächst naheliegend. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen jedoch, dass eine Inhibition der RSKs eine Stabilisierung des p21-Proteins zur Folge hat. Daraus ergibt sich für Tumorzellen, in denen der p21-Status entscheidend für die Auswirkung ionisierender Strahlung ist, die zu berücksichtigende Problematik, dass die Hochregulierung von p21 infolge einer RSK-Inhibition zu einer unerwünschten Strahlungsresistenz dieser Zellen führen kann. Dieses Phänomen des p21-vermittelten Schutzes vor strahlungsinduzierter Apoptose in Anwesenheit eines RSK-Inhibitors konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel p53-defizienter HCT116 Kolon-Karzinom-Zellen gezeigt werden. Die in dieser Dissertation erstmalig beschriebene physiologische Beziehung zwischen RSKs und p21 bedarf also weiterer gründlicher Studien und sollte fortan Berücksichtigung finden bei der Entwicklung neuer Medikamente im Kampf gegen Krankheiten, die mit einer Fehlregulierung der RSK-Aktivität in Zusammenhang stehen.

V Zusammenfassung / Abstract

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor p53 spielt als Tumorsuppressor-Protein eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress. Bis heute ist jedoch ungeklärt, wie p53 bei verschiedenen Stimuli über das Zellschicksal entscheidet. Da seine Aktivität und Promotor-Spezifität im Wesentlichen durch post-translationale Modifikationen reguliert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit die Acetylierungs- und Phosphorylierungsmuster von p53 in apoptotischen und seneszenten HCT116 Kolon-Karzinom-Zellen verglichen. Hierbei trat ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand von p53 und der An- bzw. Abwesenheit des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1} hervor, was auf eine entscheidende Funktion von p21 in p53-phosphorylierenden Prozessen hindeutete. Tatsächlich bestätigten *in vitro* Kinase-Reaktionen, dass p21 die Aktivität verschiedener p53-phosphorylierender Kinasen wie der MAP Kinasen JNK1/2, p38 α und ERK1/2 sowie GSK-3 β unterschiedlich modulierte. Insbesondere aber konnte in dieser Dissertation erstmals gezeigt werden, dass p21 hierbei in einer bemerkenswerten Substrat-Abhängigkeit nicht nur einen inhibierenden, sondern auch einen aktivierenden Einfluss auf diese Kinasen ausübte.

Untersuchungen zur Beteiligung der MAPKs an der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress zeigten, dass die pharmakologische Inhibition der ERK-aktivierenden MEKs, jedoch nicht die Inhibition der JNKs oder der p38 MAPK, HCT116-Zellen effektiv vor strahlungsinduzierter Apoptose schützte. Dieser Effekt war allerdings unabhängig von p21. Demgegenüber vermochte die pharmakologische Inhibition der RSKs, welche von ERK1/2 aktiviert werden, nur p53-defiziente HCT116-Zellen vor strahlungsinduzierter Apoptose zu schützen, nicht aber p21-defiziente Zellen. Auch führte sie, ebenfalls in Abhängigkeit von p21, nicht nur bestrahlte Zellen in die zelluläre Seneszenz, sondern auch unbestrahlte, was eine enge funktionelle Verknüpfung zwischen RSKs und p21 vermuten ließ. Interessanterweise verursachte die pharmakologische wie auch die spezifische RSK-Inhibition mittels BI-D1870 bzw. durch siRNA eine rasche Akkumulation des p21-Proteins, die weder p53-vermittelt noch transkriptionell reguliert war. Basierend auf diesen Beobachtungen sowie auf massenspektrometrischen Untersuchungen und Mutationsanalysen demonstriert die vorliegende Dissertation zum ersten Mal, dass die RSK-Isoformen 1, 2 und 3 das p21-Protein *in vitro* an Ser116, einer neuen und bisher unbekanntenen Phosphorylierungsstelle innerhalb des p21-Proteins, sowie an Ser146 im Konsensusmotiv für AGC-Kinasen phosphorylieren. Weitere Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung dieser RSK-p21-Interaktion zeigten, dass eine schnelle Degradation des p21 Wildtyp-Proteins in einer RSK- und Proteasom-abhängigen Weise induzierbar war, wohingegen die Expression einer RSK-unphosphorylierbaren p21-Doppelmutante (S116/146A) in der Anwesenheit aktiver RSKs unbeeinflusst blieb.

Damit beschreibt diese Dissertation einen neuen und wichtigen Regulationsmechanismus für p21, indem sie eine direkte Verbindung zwischen RSKs und p21 aufzeigt und dadurch die von diesen Kinasen kontrollierten Signalwege erweitert.

Abstract

As a tumoursuppressor protein, the transcription factor p53 plays a central role in cellular responses to genotoxic stress. However, it is still very much unclear how p53 decides the fate of a cell upon exposure to different stimuli. As its activity and promoter specificity is essentially regulated by post-translational modifications, the acetylation and phosphorylation patterns of p53 in apoptotic and senescent HCT116 colon carcinoma cells were compared in the present work. Thereby it was found that the absence or presence of the CDK inhibitor p21 greatly influenced the phosphorylation pattern of p53 indicating that p21 plays a pivotal role in this process. Indeed, *in vitro* kinase assays revealed that p21 differentially modulates various p53-phosphorylating kinases such as MAP kinases JNK1/2, p38 α and ERK1/2 as well as GSK-3 β . Even more important was the finding that p21 not only inhibits these kinases, but is also able to activate them in a remarkable substrate-dependent manner, a finding that was not described before.

Investigations concerning the participation of MAPKs in cellular responses to genotoxic stress demonstrated that pharmacological inhibition of the ERK-activating MEKs, but not inhibition of JNKs or p38 MAPK, effectively protected HCT116 cells from irradiation-induced apoptosis. However, this event was mediated in a p21-independent manner. In contrast, pharmacological inhibition of RSKs, that are downstream effectors of ERK1/2, protected only p53-deficient HCT116 cells from irradiation-induced apoptosis, but not p21-deficient cells. In addition, depending on the presence of p21, RSK inhibition drove not only irradiated cells into cellular senescence, but also unstressed cells, suggesting a close functional relationship between RSKs and p21. Interestingly, pharmacological and specific inhibition of RSKs by BI-D1870 and siRNAs, respectively, caused a rapid accumulation of p21 that was not mediated by p53 and that was independent of transcriptional events. Based on these findings as well as on massspectrometric analyses and mutagenesis studies, this PhD thesis demonstrates for the first time that the RSK isoforms 1, 2 and 3 phosphorylate p21 at Ser116, which is a novel and unknown phosphorylation site within the p21 protein, and Ser146, lying within the consensus site for AGC kinases. Further investigations concerning the physiological relevance of this RSK-p21 interaction revealed that rapid degradation of the p21 wild-type protein is inducible in a RSK- and proteasome-dependent manner, whereas expression of a RSK-unphosphorylatable p21 double mutant (S116/146A) remained unaffected in the presence of active RSKs. Thus, this PhD thesis uncovers a novel and important mechanism of p21 regulation providing a direct link between RSKs and p21 that further extends the pathways controlled by these kinases.

VI Referenzen

1. Bode, A.M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 793-805 (2004).
2. Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-23 (2006).
3. Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromental, C., Hainaut, P. & Harris, C.C. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*, 247-70 (2004).
4. Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A. & Villunger, A. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* **14**, 1561-75 (2007).
5. Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. & Prives, C. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3319-23 (1993).
6. Davison, T.S., Yin, P., Nie, E., Kay, C. & Arrowsmith, C.H. Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene* **17**, 651-6 (1998).
7. Chen, J., Lin, J. & Levine, A.J. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med* **1**, 142-52 (1995).
8. Stommel, J.M. et al. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* **18**, 1660-72 (1999).
9. el-Deiry, W.S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25 (1993).
10. Hermeking, H. et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**, 3-11 (1997).
11. Kastan, M.B. et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-97 (1992).
12. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16 (1993).
13. Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. & Reed, S.I. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* **18**, 546-57 (1998).
14. Bunz, F. et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-501 (1998).
15. Brugarolas, J. et al. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**, 552-7 (1995).
16. Chan, T.A., Hwang, P.M., Hermeking, H., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1584-8 (2000).
17. Wang, X.W. et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3706-11 (1999).
18. Schafer, K.A. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* **35**, 461-78 (1998).
19. Mitnacht, S. Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 21-7 (1998).
20. Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-20 (1999).
21. Jin, S. et al. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene* **21**, 8696-704 (2002).
22. Zhan, Q. et al. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892-900 (1999).
23. Offer, H. et al. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* **450**, 197-204 (1999).

24. Okorokov, A.L., Warnock, L. & Milner, J. Effect of wild-type, S15D and R175H p53 proteins on DNA end joining in vitro: potential mechanism of DNA double-strand break repair modulation. *Carcinogenesis* **23**, 549-57 (2002).
25. Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U. & Buchhop, S. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* **15**, 1992-2002 (1996).
26. Gatz, S.A. & Wiesmuller, L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13**, 1003-16 (2006).
27. Kortlever, R.M., Higgins, P.J. & Bernards, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 877-84 (2006).
28. Leal, J.F. et al. Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene* **27**, 1961-70 (2008).
29. Brown, J.P., Wei, W. & Sedivy, J.M. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**, 831-4 (1997).
30. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
31. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8 (1998).
32. Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911 (1999).
33. Alnemri, E.S. et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171 (1996).
34. Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306 (1997).
35. Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6 (1998).
36. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-33 (2001).
37. Acehan, D. et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-32 (2002).
38. Li, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89 (1997).
39. Schafer, Z.T. & Kornbluth, S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* **10**, 549-61 (2006).
40. Cory, S. & Adams, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-56 (2002).
41. Adams, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-95 (2003).
42. Willis, S.N. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856-9 (2007).
43. Kuwana, T. et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**, 525-35 (2005).
44. Letai, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-92 (2002).
45. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 189-200 (2005).
46. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
47. Wei, M.C. et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**, 2060-71 (2000).
48. Michalak, E., Villunger, A., Erlacher, M. & Strasser, A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 786-98 (2005).
49. Fortin, A. et al. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* **155**, 207-16 (2001).

50. Moroni, M.C. et al. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**, 552-8 (2001).
51. Nakano, K. & Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-94 (2001).
52. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**, 673-82 (2001).
53. Oda, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-8 (2000).
54. Jeffers, J.R. et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**, 321-8 (2003).
55. Shibue, T. et al. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**, 2233-8 (2003).
56. Villunger, A. et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036-8 (2003).
57. Miyashita, T. & Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-9 (1995).
58. Sax, J.K. et al. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* **4**, 842-9 (2002).
59. Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B. & Murphy, M.E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**, 6507-21 (2008).
60. Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D. & Deppert, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 631-6 (2005).
61. Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E. & George, D.L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**, 443-50 (2004).
62. Mihara, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**, 577-90 (2003).
63. Tomita, Y. et al. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* **281**, 8600-6 (2006).
64. Chipuk, J.E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-4 (2004).
65. Petros, A.M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E.T. & Fesik, S.W. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett* **559**, 171-4 (2004).
66. Pietsch, E.C. et al. Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J Biol Chem* **283**, 21294-304 (2008).
67. Vousden, K.H. & Lane, D.P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275-83 (2007).
68. Essmann, F. et al. Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 37169-77 (2005).
69. Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G. & Kastan, M.B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**, 49-63 (2005).
70. Phan, R.T. & Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635-9 (2004).
71. Attardi, L.D. & Donehower, L.A. Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res* **576**, 4-21 (2005).
72. Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A. & Lu, X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 702-12 (2008).
73. Li, M. et al. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972-5 (2003).
74. Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T. & Lane, D.P. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118**, 83-97 (2004).

75. Gostissa, M. et al. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**, 6462-71 (1999).
76. Rodriguez, M.S. et al. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**, 6455-61 (1999).
77. Brooks, C.L. & Gu, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 164-71 (2003).
78. Krummel, K.A., Lee, C.J., Toledo, F. & Wahl, G.M. The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10188-93 (2005).
79. Gu, W. & Roeder, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606 (1997).
80. Liu, L. et al. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**, 1202-9 (1999).
81. Sakaguchi, K. et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**, 2831-41 (1998).
82. Wang, Y.H., Tsay, Y.G., Tan, B.C., Lo, W.Y. & Lee, S.C. Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J Biol Chem* **278**, 25568-76 (2003).
83. Barlev, N.A. et al. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**, 1243-54 (2001).
84. Espinosa, J.M. & Emerson, B.M. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**, 57-69 (2001).
85. Knights, C.D. et al. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* **173**, 533-44 (2006).
86. Di Stefano, V., Soddu, S., Sacchi, A. & D'Orazi, G. HIPK2 contributes to PCAF-mediated p53 acetylation and selective transactivation of p21Waf1 after nonapoptotic DNA damage. *Oncogene* **24**, 5431-42 (2005).
87. Sykes, S.M. et al. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **24**, 841-51 (2006).
88. Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. & Gu, W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* **24**, 827-39 (2006).
89. Luo, J. et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-48 (2001).
90. Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A. & Gu, W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377-81 (2000).
91. Vaziri, H. et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-59 (2001).
92. Gatti, A., Li, H.H., Traugh, J.A. & Liu, X. Phosphorylation of human p53 on Thr-55. *Biochemistry* **39**, 9837-42 (2000).
93. Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. & Halazonetis, T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**, 175-8 (1998).
94. Fuchs, B., O'Connor, D., Fallis, L., Scheidtmann, K.H. & Lu, X. p53 phosphorylation mutants retain transcription activity. *Oncogene* **10**, 789-93 (1995).
95. Yamauchi, M., Suzuki, K., Kodama, S. & Watanabe, M. Stabilization of alanine substituted p53 protein at Ser15, Thr18, and Ser20 in response to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 906-11 (2004).
96. Appella, E. & Anderson, C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**, 2764-72 (2001).
97. Banin, S. et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-7 (1998).
98. Dumaz, N. & Meek, D.W. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* **18**, 7002-10 (1999).

99. Fiscella, M. et al. Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* **8**, 1519-28 (1993).
100. Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-34 (1997).
101. Sluss, H.K., Armata, H., Gallant, J. & Jones, S.N. Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol Cell Biol* **24**, 976-84 (2004).
102. Sluss, H.K. & Jones, S.N. Analysing p53 tumour suppressor functions in mice. *Expert Opin Ther Targets* **7**, 89-99 (2003).
103. Hirao, A. et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-7 (2000).
104. Wu, Z. et al. Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**, 2441-9 (2002).
105. Hofmann, T.G. et al. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* **4**, 1-10 (2002).
106. D'Orazi, G. et al. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* **4**, 11-9 (2002).
107. Takekawa, M. et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *Embo J* **19**, 6517-26 (2000).
108. Oda, K. et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**, 849-62 (2000).
109. Blaydes, J.P. et al. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem* **276**, 4699-708 (2001).
110. Katayama, H. et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36**, 55-62 (2004).
111. Qu, L. et al. Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta. *Genes Dev* **18**, 261-77 (2004).
112. Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. & Smith, J.R. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**, 90-8 (1994).
113. Polyak, K. et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**, 9-22 (1994).
114. Polyak, K. et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66 (1994).
115. Toyoshima, H. & Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994).
116. Lee, M.H., Reynisdottir, I. & Massague, J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* **9**, 639-49 (1995).
117. Matsuoka, S. et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* **9**, 650-62 (1995).
118. Besson, A., Dowdy, S.F. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**, 159-69 (2008).
119. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12 (1999).
120. Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I. & Wright, P.E. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11504-9 (1996).
121. Adkins, J.N. & Lumb, K.J. Intrinsic structural disorder and sequence features of the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Proteins* **46**, 1-7 (2002).
122. Esteve, V. et al. The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition. *ChemBiochem* **4**, 863-9 (2003).
123. Lacy, E.R. et al. p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 358-64 (2004).

124. Child, E.S. & Mann, D.J. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* **5**, 1313-9 (2006).
125. Rodriguez-Vilarrupla, A. et al. Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett* **531**, 319-23 (2002).
126. Flores-Rozas, H. et al. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8655-9 (1994).
127. Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. & Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8 (1994).
128. Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. & Pavletich, N.P. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-31 (1996).
129. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**, 400-14 (2009).
130. Luo, Y., Hurwitz, J. & Massague, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**, 159-61 (1995).
131. Janicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F. & Schulze-Osthoff, K. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* **6**, 407-13 (2007).
132. Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H. & Ichijo, H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* **28**, 23-9 (2003).
133. Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H. & Choi, E.J. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* **381**, 804-6 (1996).
134. Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. & Janicke, R.U. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* **66**, 11254-62 (2006).
135. Cheng, M. et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* **18**, 1571-83 (1999).
136. LaBaer, J. et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-62 (1997).
137. Alt, J.R., Gladden, A.B. & Diehl, J.A. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* **277**, 8517-23 (2002).
138. Chang, B.D. et al. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4291-6 (2000).
139. Zhu, H., Chang, B.D., Uchiumi, T. & Roninson, I.B. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* **1**, 59-66 (2002).
140. Delavaine, L. & La Thangue, N.B. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* **18**, 5381-92 (1999).
141. Dimri, G.P., Nakanishi, M., Desprez, P.Y., Smith, J.R. & Campisi, J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **16**, 2987-97 (1996).
142. Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E. & Coqueret, O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* **281**, 34742-50 (2006).
143. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**, 65-70 (2003).
144. Perkins, N.D. Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* **1**, 39-41 (2002).
145. Gartel, A.L. & Tyner, A.L. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* **246**, 280-9 (1999).
146. Jascur, T. et al. Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell* **17**, 237-49 (2005).

147. Joseph, B., Orlian, M. & Furneaux, H. p21(waf1) mRNA contains a conserved element in its 3'-untranslated region that is bound by the Elav-like mRNA-stabilizing proteins. *J Biol Chem* **273**, 20511-6 (1998).
148. Shu, L., Yan, W. & Chen, X. RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript. *Genes Dev* **20**, 2961-72 (2006).
149. Wang, W. et al. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* **20**, 760-9 (2000).
150. Borgdorff, V. et al. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene* **29**, 2262-71 (2011).
151. Ivanovska, I. et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **28**, 2167-74 (2008).
152. Tuitou, R. et al. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* **20**, 2367-75 (2001).
153. Asada, M. et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* **18**, 1223-34 (1999).
154. Oh, H. et al. Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21(Cip1/WAF1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5430-5 (2002).
155. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. & Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-8 (1994).
156. Dash, B.C. & El-Deiry, W.S. Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol Cell Biol* **25**, 3364-87 (2005).
157. Rossig, L., Badorff, C., Holzmann, Y., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation. *J Biol Chem* **277**, 9684-9 (2002).
158. Lee, J.Y., Yu, S.J., Park, Y.G., Kim, J. & Sohn, J. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol* **27**, 3187-98 (2007).
159. Kim, G.Y. et al. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 29792-802 (2002).
160. Zhu, H., Nie, L. & Maki, C.G. Cdk2-dependent Inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *J Biol Chem* **280**, 29282-8 (2005).
161. Hwang, C.Y., Lee, C. & Kwon, K.S. Extracellular signal-regulated kinase 2-dependent phosphorylation induces cytoplasmic localization and degradation of p21Cip1. *Mol Cell Biol* **29**, 3379-89 (2009).
162. Li, Y., Dowbenko, D. & Lasky, L.A. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* **277**, 11352-61 (2002).
163. Rossig, L. et al. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* **21**, 5644-57 (2001).
164. Harreman, M.T. et al. Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *J Biol Chem* **279**, 20613-21 (2004).
165. Segrelles, C. et al. Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation. *Oncogene* **25**, 1174-85 (2006).
166. Rodriguez-Vilarrupla, A. et al. Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol Cell Biol* **25**, 7364-74 (2005).
167. Taules, M. et al. Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol Chem* **274**, 24445-8 (1999).
168. Warbrick, E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22**, 997-1006 (2000).
169. Scott, M.T., Ingram, A. & Ball, K.L. PDK1-dependent activation of atypical PKC leads to degradation of the p21 tumour modifier protein. *Embo J* **21**, 6771-80 (2002).
170. Oh, Y.T., Chun, K.H., Park, B.D., Choi, J.S. & Lee, S.K. Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *Apoptosis* **12**, 1339-47 (2007).

171. Scott, M.T., Morrice, N. & Ball, K.L. Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21(Waf1/Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem* **275**, 11529-37 (2000).
172. Kitaura, H. et al. Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* **275**, 10477-83 (2000).
173. Anjum, R. & Blenis, J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 747-58 (2008).
174. Chen, R.H., Sarnecki, C. & Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**, 915-27 (1992).
175. Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M. & Alessi, D.R. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* **17**, 4426-41 (1998).
176. Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M. & Lesslauer, W. RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem* **273**, 29661-71 (1998).
177. Carriere, A., Ray, H., Blenis, J. & Roux, P.P. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* **13**, 4258-75 (2008).
178. Zeniou, M., Ding, T., Trivier, E. & Hanauer, A. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet* **11**, 2929-40 (2002).
179. Dummler, B.A. et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J Biol Chem* **280**, 13304-14 (2005).
180. Trivier, E. et al. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* **384**, 567-70 (1996).
181. Zhao, Y., Bjorbaek, C., Weremowicz, S., Morton, C.C. & Moller, D.E. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. *Mol Cell Biol* **15**, 4353-63 (1995).
182. Richards, S.A., Dreisbach, V.C., Murphy, L.O. & Blenis, J. Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Mol Cell Biol* **21**, 7470-80 (2001).
183. Cargnello, M. & Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 50-83 (2011).
184. Dalby, K.N., Morrice, N., Caudwell, F.B., Avruch, J. & Cohen, P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/pp90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* **273**, 1496-505 (1998).
185. Newton, A.C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **370**, 361-71 (2003).
186. Williams, M.R. et al. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* **10**, 439-48 (2000).
187. Roux, P.P., Richards, S.A. & Blenis, J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol* **23**, 4796-804 (2003).
188. Doehn, U., Gammeltoft, S., Shen, S.H. & Jensen, C.J. p90 ribosomal S6 kinase 2 is associated with and dephosphorylated by protein phosphatase 2Cdelta. *Biochem J* **382**, 425-31 (2004).
189. Hauge, C. et al. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *Embo J* **26**, 2251-61 (2007).
190. Frodin, M., Jensen, C.J., Merienne, K. & Gammeltoft, S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *Embo J* **19**, 2924-34 (2000).

191. Leighton, I.A., Dalby, K.N., Caudwell, F.B., Cohen, P.T. & Cohen, P. Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation. *FEBS Lett* **375**, 289-93 (1995).
192. Kim, M. et al. Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during Drosophila development. *Embo J* **25**, 3056-67 (2006).
193. Cohen, P. & Frame, S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 769-76 (2001).
194. Wang, X., Janmaat, M., Beugnet, A., Paulin, F.E. & Proud, C.G. Evidence that the dephosphorylation of Ser(535) in the epsilon-subunit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B is insufficient for the activation of eIF2B by insulin. *Biochem J* **367**, 475-81 (2002).
195. Anjum, R., Roux, P.P., Ballif, B.A., Gygi, S.P. & Blenis, J. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr Biol* **15**, 1762-7 (2005).
196. Dehan, E. et al. betaTrCP- and Rsk1/2-mediated degradation of BimEL inhibits apoptosis. *Mol Cell* **33**, 109-16 (2009).
197. Peng, C. et al. Phosphorylation of caspase-8 (Thr-263) by ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) mediates caspase-8 ubiquitination and stability. *J Biol Chem* **286**, 6946-54 (2011).
198. Xing, J., Ginty, D.D. & Greenberg, M.E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**, 959-63 (1996).
199. Bonni, A. et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-62 (1999).
200. Rivera, V.M. et al. A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* **13**, 6260-73 (1993).
201. Ginty, D.D., Bonni, A. & Greenberg, M.E. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77**, 713-25 (1994).
202. Joel, P.B. et al. pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* **18**, 1978-84 (1998).
203. Yang, X. et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117**, 387-98 (2004).
204. Bruning, J.C. et al. Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2462-7 (2000).
205. De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A. & Sassone-Corsi, P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12202-7 (1998).
206. Nakajima, T. et al. The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* **86**, 465-74 (1996).
207. Wang, Z., Zhang, B., Wang, M. & Carr, B.I. Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J Biol Chem* **278**, 11138-44 (2003).
208. Smith, J.A. et al. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res* **65**, 1027-34 (2005).
209. Clark, D.E. et al. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* **65**, 3108-16 (2005).
210. Cho, Y.Y. et al. Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. *Cancer Res* **67**, 8104-12 (2007).
211. David, J.P. et al. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest* **115**, 664-72 (2005).

212. Fujita, N., Sato, S. & Tsuruo, T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* **278**, 49254-60 (2003).
213. Bignone, P.A. et al. RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. *Oncogene* **26**, 683-700 (2007).
214. Myers, A.P., Corson, L.B., Rossant, J. & Baker, J.C. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 4255-66 (2004).
215. Berns, K. et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**, 431-7 (2004).
216. Lopez-Vicente, L. et al. Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 4546-53 (2009).
217. Lopez-Vicente, L. et al. RSK4 inhibition results in bypass of stress-induced and oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis* **32**, 470-6 (2011).
218. Thakur, A. et al. Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer. *Mol Cancer Res* **5**, 171-81 (2007).
219. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**, 271-9 (1991).
220. Lavin, M.F. & Gueven, N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* **13**, 941-50 (2006).
221. Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T. & Blagosklonny, M.V. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* **20**, 3806-13 (2001).
222. Javelaud, D. & Besancon, F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* **277**, 37949-54 (2002).
223. Hill, R. et al. Hypersensitivity to chromium-induced DNA damage correlates with constitutive deregulation of upstream p53 kinases in p21^{-/-} HCT116 colon cancer cells. *DNA Repair (Amst)* **7**, 239-52 (2008).
224. Gotz, C., Wagner, P., Issinger, O.G. & Montenarh, M. p21WAF1/CIP1 interacts with protein kinase CK2. *Oncogene* **13**, 391-8 (1996).
225. She, Q.B., Ma, W.Y. & Dong, Z. Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene* **21**, 1580-9 (2002).
226. Buschmann, T. et al. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* **21**, 2743-54 (2001).
227. She, Q.B., Chen, N. & Dong, Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* **275**, 20444-9 (2000).
228. Yeh, P.Y., Chuang, S.E., Yeh, K.H., Song, Y.C. & Cheng, A.L. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylates p53 at Thr55 in response to doxorubicin. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 880-6 (2001).
229. Bulavin, D.V. et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* **18**, 6845-54 (1999).
230. Huang, C., Ma, W.Y., Maxiner, A., Sun, Y. & Dong, Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* **274**, 12229-35 (1999).
231. Knippschild, U. et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* **17**, 675-89 (2005).
232. Cuadrado, A. & Nebreda, A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**, 403-17 (2010).
233. Holmes, T. et al. The role of glycogen synthase kinase-3beta in normal haematopoiesis, angiogenesis and leukaemia. *Curr Med Chem* **15**, 1493-9 (2008).

234. Watcharasit, P. et al. Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem* **278**, 48872-9 (2003).
235. Mebratu, Y. & Tesfaiqi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* **8**, 1168-75 (2009).
236. Neise, D., Sohn, D., Budach, W. & Janicke, R.U. Evidence for a differential modulation of p53-phosphorylating kinases by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Cell Cycle* **9**, 3575-83 (2010).
237. Kumar, S., Jiang, M.S., Adams, J.L. & Lee, J.C. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **263**, 825-31 (1999).
238. Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-72 (1999).
239. Favata, M.F. et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**, 18623-32 (1998).
240. Sapkota, G.P. et al. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* **401**, 29-38 (2007).
241. Nguyen, T.L. Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* **8**, 710-6 (2008).
242. Bain, J. et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297-315 (2007).
243. Cogswell, J.P., Brown, C.E., Bisi, J.E. & Neill, S.D. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ* **11**, 615-23 (2000).
244. Cho, Y.Y. et al. The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer Res* **65**, 3596-603 (2005).
245. Sriraman, V., Modi, S.R., Bodenbun, Y., Denner, L.A. & Urban, R.J. Identification of ERK and JNK as signaling mediators on protein kinase C activation in cultured granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* **294**, 52-60 (2008).
246. el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-9 (1992).
247. Graupner, V., Schulze-Osthoff, K., Essmann, F. & Janicke, R.U. Functional characterization of p53beta and p53gamma, two isoforms of the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* **8**, 1238-48 (2009).
248. Vousden, K.H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413-31 (2009).
249. Kim, M.J., Lee, K.H. & Lee, S.J. Ionizing radiation utilizes c-Jun N-terminal kinase for amplification of mitochondrial apoptotic cell death in human cervical cancer cells. *Febs J* **275**, 2096-108 (2008).
250. Kim, M.J. et al. Opposing roles of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the cellular response to ionizing radiation in human cervical cancer cells. *Mol Cancer Res* **6**, 1718-31 (2008).
251. Kim, E.K. & Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 396-405.
252. Abbott, D.W. & Holt, J.T. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J Biol Chem* **274**, 2732-42 (1999).
253. Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N. & Calderwood, S.K. X-irradiation, phorbol esters, and H2O2 stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* **54**, 12-5 (1994).
254. Cagnol, S. & Chambard, J.C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *Febs J* **277**, 2-21 (2010).
255. Lee, Y.J. et al. PKC epsilon -mediated ERK1/2 activation involved in radiation-induced cell death in NIH3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* **1593**, 219-29 (2003).

256. Sohn, D., Budach, W. & Janicke, R.U. Caspase-2 is required for DNA damage-induced expression of the CDK inhibitor p21(WAF1/CIP1). *Cell Death Differ* (2011).
257. Zhou, B.P. et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**, 245-52 (2001).
258. Proud, C.G. A sharper instrument for dissecting signalling events: a specific AGC kinase inhibitor. *Biochem J* **401**, e1-3 (2007).
259. Boehm, M. et al. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* **21**, 3390-401 (2002).
260. Fujita, N., Sato, S., Katayama, K. & Tsuruo, T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem* **277**, 28706-13 (2002).
261. Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**, 3499-511 (1998).
262. Geraghty, K.M. et al. Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR. *Biochem J* **407**, 231-41 (2007).

VII Anhang

1. Lebenslauf

Denise Neise	geboren am 26.11.1982 in Wuppertal
1989 - 1993	Besuch der Städt. Grundschule Yorckstraße in Wuppertal
1993 - 2002	Besuch des Städt. Gymnasium Bayreuther Straße in Wuppertal, Abschluss: Abitur
2002 - 2007	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
2004	Vordiplom der Biologie
2006 - 2007	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Medizin (Prof. Klaus Schulze-Osthoff) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, Thema: „Komparative Analyse der proapoptotischen Bcl-2 Familienproteine Bak und Bax“
2007	Diplom der Biologie
2007 - 2011	Doktorarbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie (Prof. Reiner U. Jänicke) der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Prof. W. Budach) an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, Thema: „Identifizierung und Charakterisierung neuer Funktions- und Regulationsmechanismen des CDK-Inhibitors p21 ^{WAF1/CIP1} “

2. Veröffentlichte Ergebnisse

Evidence for a differential modulation of p53-phosphorylating kinases by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}

Denise Neise, Dennis Sohn, Wilfried Budach, Reiner U. Jänicke

Cell Cycle **9**, 3575-83 (2010).

Evidence for a differential modulation of p53-phosphorylating kinases by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}

Denise Neise, Dennis Sohn, Wilfried Budach and Reiner U. Jänicke*

Laboratory of Molecular Radiooncology; Clinic and Policlinic for Radiation Therapy and Radiooncology; University of Düsseldorf; Düsseldorf, Germany

Key words: p53, phosphorylation, MAP kinases, GSK-3beta, p21

Although initially described as a regulator of cell cycle progression, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is now known to also modulate various other biological processes including transcription, differentiation and apoptosis. These versatile activities of p21 are mainly mediated via direct binding to various transcription factors, pro-apoptotic proteins and kinases that are usually inhibited by this interaction. Here we provide in vitro evidence that p21 not only inhibits, but also activates certain kinases in a remarkable substrate-dependent manner. Whereas phosphorylation of the tumor suppressor p53 by several isoforms of the cJun N-terminal kinases (JNKs) was greatly attenuated in the presence of p21, phosphorylation of cJun remained either unaffected or was even enhanced. Furthermore, p21 strongly increased phosphorylation of cFos and MBP by ERK1 and ERK2, while p53 phosphorylation was increased and inhibited, respectively. Also p38 α and glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) were found differentially regulated by p21 in a substrate-dependent manner, while casein kinase-1 epsilon (CK1 ϵ) was not affected. Together with our finding that the stress-induced p53 phosphorylation pattern differs greatly between p21-proficient and -deficient HCT116 colon carcinoma cells, our results suggest that p21 is able to influence kinase activities both in a negative and positive manner.

Introduction

p21^{WAF1/CIP1}, a DNA damage-inducible cell cycle inhibitor present mainly in the nucleus, is part of a family of structurally related proteins (comprising also p27 and p57) that was originally identified by its ability to interact and inhibit cyclin-dependent kinases (CDKs).¹ Paradoxically, when localized in the cytosol, p21 can also facilitate the assembly of D-type cyclins with CDK4 and CDK6, thereby promoting progression through the G₁ phase of the cell cycle.² Furthermore, p21 also modulates cell cycle progression independently of cyclins and CDKs via inhibition of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an accessory protein required by DNA polymerases for DNA replication.^{3,4} The activities of p21 are, however, not only restricted to the control of the cell cycle, as it was shown to also regulate a variety of transcriptional responses, both in a positive and negative manner.^{5,6} In addition, over the past few years it became evident that p21 constitutes a powerful anti-apoptotic protein that is able to counteract cell death signaling at multiple frontiers.⁷ Together, these features make p21 an extremely versatile protein crucial for the regulation of diverse and partially opposing processes such as proliferation, differentiation, replicative senescence and apoptosis.

It therefore appears that p21, similar to the transcription factor and tumor suppressor p53, possesses both tumorsuppressive

and oncogenic capabilities.^{5,8} Thus, control mechanisms are necessary that tightly regulate expression and stability of p21. Upon DNA damage, this is mainly achieved via p53 that transcriptionally induces expression of p21, although multiple other pathways exist that independently of p53 lead to the induction of p21 in response to a plethora of stimuli.^{5,9} Once expressed, p21 is a very unstable protein with a half-life of about 20–60 minutes as it is constantly proteolysed by ubiquitin-dependent and -independent mechanisms.^{10,11} Furthermore, p21's activities that are mainly mediated via direct protein-protein interactions are controlled by post-translational phosphorylation events that critically interfere with its stabilization.¹² Probably the best characterized is the phosphorylation at T145 by the survival kinase AKT (also known as protein kinase B, PKB) that not only abrogates binding of p21 to PCNA, but also results in its relocalization from the nucleus to the cytosol.^{12,13} This in turn renders p21 unable to exert its nuclear cell cycle regulatory role, but provides a potent anti-apoptotic function. Cytosolic p21 strongly binds to and inhibits the activity of several kinases directly involved in the induction of apoptosis, such as apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and distinct members of the mitogen-activated protein (MAP) kinase family including the stress-activated protein kinases (SAPKs, also known as cJun N-terminal kinases, JNKs) and p38.^{14,15} In addition, p21 was proposed to bind and

*Correspondence to: Reiner U. Jänicke; Email: janicke@uni-duesseldorf.de

Submitted: 06/17/10; Accepted: 06/25/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/12799

DOI: 10.4161/cc.9.17.12799

inhibit pro-caspase-3,¹⁶ although this was not observed in another experimental system, in which we localized the CDK-dependent anti-apoptotic activity of p21 downstream of mitochondria, but upstream of caspase-9.¹⁷

In agreement with other studies,^{18,19} we also noticed in our previous work that the increased sensitivity of p21-deficient HCT116 colon carcinoma cells to ionizing radiation (γ IR)-induced apoptosis correlated well with significantly elevated p53 levels compared to their apoptosis-resistant wild-type counterparts.¹⁷ Hence, we hypothesized that p21 may influence p53 stability by inhibition of kinases that are known to phosphorylate this tumor suppressor such as JNKs, p38 α , GSK-3 β , casein kinase 1/2 (CK1/2) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). However, inhibition of these kinases by p21 was so far preferentially demonstrated using either their natural substrates or an artificial substrate such as the myelin basic protein (MBP),^{3,12,15} but, with the exception of CK2,²⁰ was never investigated with regard to a possible impact on p53 phosphorylation. Intriguingly, performing *in vitro* kinase assays, we found that p21 not only inhibits, but also activates some of these kinases in a remarkable substrate-dependent manner.

Results

Different p53 phosphorylation patterns in p21-proficient and -deficient HCT116 cells. It was repeatedly reported that non-stressed p21-deficient HCT116 cells express elevated p53 levels compared to their wild-type counterparts even in the absence of a stress stimulus (Fig. 1C).¹⁷⁻¹⁹ Using the chromium-induced model of DNA damage, Hill and colleagues recently postulated that these were not caused by increased transcription or translation of p53, but rather by elevated kinase activities that phosphorylate and stabilize p53.²¹ This finding implies a constitutive inhibition of p53-phosphorylating kinases by p21. However, as also p53 in untreated cells is partially phosphorylated, the increased p53 phosphorylation in non-stressed p21-deficient cells could be merely due to their increased p53 pool. To compare the p53 phosphorylation pattern in HCT116 wild-type and HCT116/p21^{-/-} cells in response to DNA damage, we immunoprecipitated p53 from untreated and irradiated (20 Gy) cells and analyzed the samples by Western blot using a wide range of phospho-specific p53 antibodies. Taking into account the increased p53 expression level in untreated p21-deficient cells and the likelihood that this p53 is also phosphorylated, at least to some extent, we aimed to precipitate comparable quantities of p53 protein from each cell line by using only a limited amount of p53 antibody (12 ng/mg of cell extract) that is not sufficient to pull down the entire pool of p53 (data not shown). Together with the subsequent densitometric analysis of the obtained immunoblot signals, this approach avoids misinterpretation of a possible increased phosphorylation merely due to increased p53 protein levels.

In agreement with this earlier study,²¹ the Western blot results obtained suggest indeed that both cell lines exhibit already under control conditions differences in their p53 phosphorylation patterns (Fig. 1A; left part, compare lanes 1 and 3 for serines 6, 9, 20, 46, 392 and Thr18). However, normalization of the

phosphorylation signals in relation to the respective total amount of p53 precipitated confirmed only Thr18 and Ser392 as being more intensively phosphorylated in the absence of p21, whereas no differences were observed with regard to serines 6, 9, 20 and 46 (Fig. 1A; right part, compare lanes 1 and 3). In addition, this procedure revealed that also serines 33, 37 and 315 were differentially phosphorylated in these two cell lines (Fig. 1A; right part, compare lanes 1 and 3), indicating that the loss of p21 might indeed influence phosphorylation of p53 even in unstressed cells. However, these differences were never as much pronounced as those observed following exposure of the two cell lines to γ IR. Particularly Ser46 and even more so Ser15 were found to be extremely hyperphosphorylated in irradiated p21-deficient cells (Fig. 1B), implying that at least one, or perhaps several of the kinases responsible for these phosphorylation events are indeed inhibited in the presence of p21. Moreover, Ser9 and Ser20 were reproducibly found to be less phosphorylated in irradiated p21-deficient HCT116 cells compared to their wild-type counterparts (Fig. 1B). Although Ser6 was also more phosphorylated in irradiated p21-deficient cells (Fig. 1A), this was not observed consistently (Fig. 1B). Together, these data suggest that p21 not only inhibits certain p53-phosphorylating kinases, but may surprisingly be also required for some kinases to unfold their proper potential.

Influence of p21 on the activity of JNK1/2 isoforms. To analyse whether p21 is indeed able to modulate phosphorylation of p53, we first focused our research on JNK1/2 kinases, because these pro-apoptotic enzymes phosphorylate both p53 and p21.^{22,23} In addition, they were proposed to be inhibitable by p21, at least with regard to the phosphorylation of their natural substrate cJun.¹⁵ From the four different isoforms that exist each for JNK1 and JNK2,²⁴ we employed two each in *in vitro* kinase assays using a GST-p53 fusion protein as the substrate. Verification of the GST proteins used (GST, GST-p21 and GST-p53) by Western blot analyses revealed predominant bands at the expected sizes for GST (-27 kDa) and GST-p21 (-48 kDa) (Fig. 2A). In contrast, several smaller C-terminal truncated fragments (ranging from approximately 27 kDa to 60 kDa) were observed for GST-p53 in addition to the full-length protein (-80 kDa) (Fig. 2A), as verified by the use of different monoclonal p53 antibodies (Fig. 2B and C).

The GST-p21 used here is functionally active as a CDK inhibitor, as it potently prevented CDK2/cyclinE-mediated phosphorylation of full-length GST-p53 (Fig. 3A, left part) and histone H1 (data not shown) in a dose-dependent manner. Similarly, GST-p21 blocked also the JNK1 α 1-mediated phosphorylation of both the GST-p53 full-length protein as well as the C-terminal truncated GST-p53 fragments in a dose-dependent manner, a finding that was not reported before (Fig. 3A, right part). GST alone had no effect on the activity of either kinase (Fig. 3B and data not shown) confirming that the observed inhibition was specific for p21. For optimal results, we routinely used a 4 to 1 molar ratio of p21 to kinase for our subsequent studies although lower ratios were also effective in kinase modulation (e.g., ERK; see below).

GST-p21 blocked also phosphorylation of GST-p53 by both JNK2 isoforms although the inhibition was less pronounced with

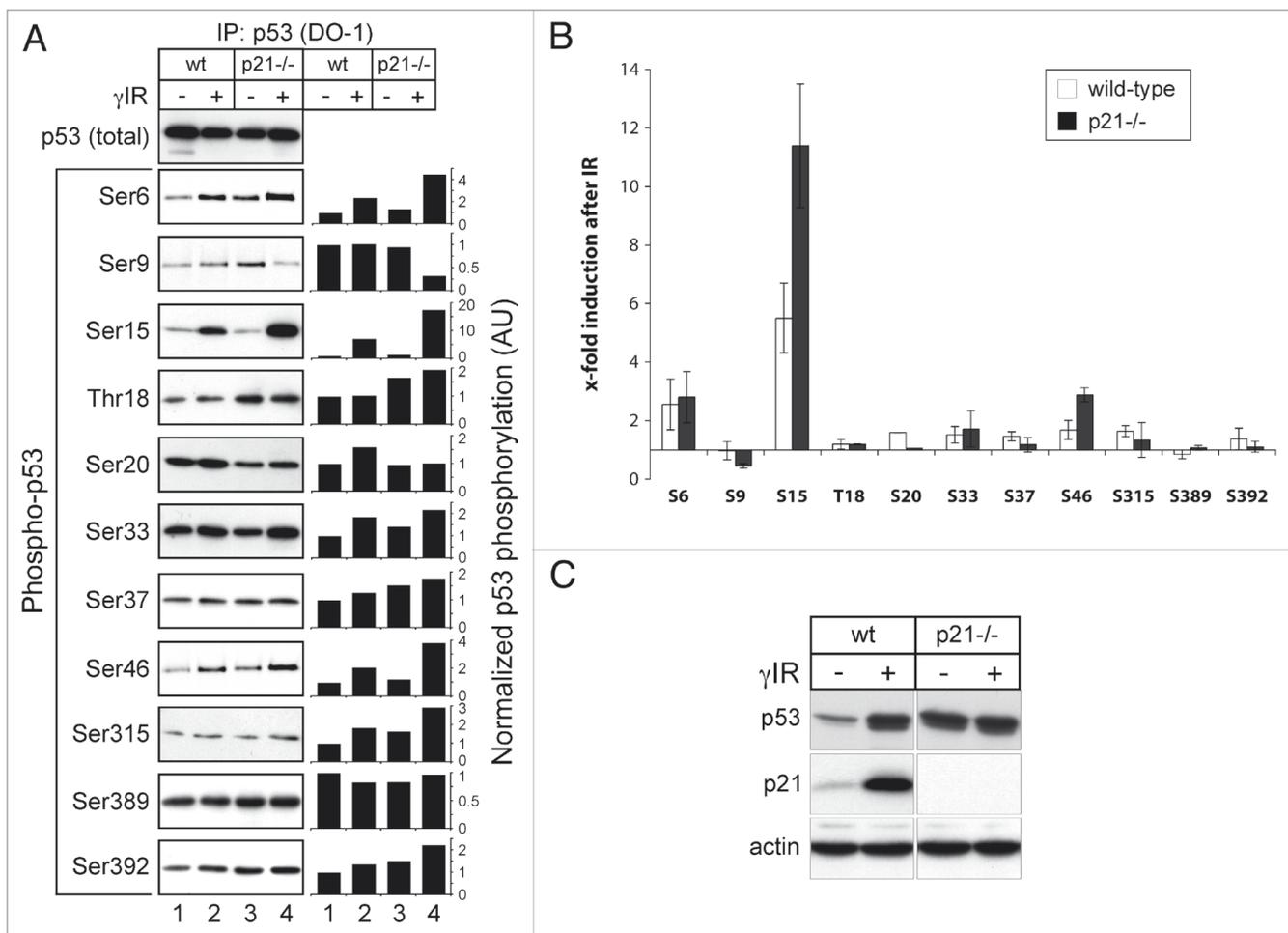


Figure 1. Differential p53 phosphorylation patterns in p21-proficient and -deficient HCT116 cells. (A) Western blot analyses determining the phosphorylation status of immunoprecipitated p53. In order to avoid a complete pull-down of the entire p53 pool, p53 was immunoprecipitated from HCT116 wild-type (wt) and p21-deficient cells (p21^{-/-}) using only a suboptimal antibody concentration (12 ng/mg protein extract) 24 hours after the cells were either left untreated or exposed to γ IR. The samples were then analyzed by Western blotting for the status of total p53 with the PAb1801 antibody and for phosphorylated p53 using the indicated phospho-specific antibodies. Please note that the IP in p53-deficient HCT116 cells did not yield any detectable signal (data not shown) demonstrating the specificity of the IP procedure. The densitometric values for the columns shown in the right part were obtained following normalization of the p53 phosphorylation signals against the amount of total p53 precipitated in the respective experiment. Hereby please note that the total p53 blot shown was only used for normalization of the phospho signals obtained with the Ser15, Ser20, Ser33 and Ser315 antibodies. For the remaining p53 phospho blots, different total p53 blots were used for normalization (not shown). (B) Densitometric analysis of the results obtained in (A). Shown are the values for the specific γ IR-induced p53 phosphorylation normalized to the total amount of p53 precipitated. Data shown represent the mean of three to five independent Western blot experiments \pm SD. (C) Western blot analysis of the status of total p53 and p21 in lysates of unstimulated and irradiated (20 Gy at 200 kV using a Gulmay Medical RS225; IsodoseControl, Bochum, Germany) wild-type and p21-deficient HCT116 cells. As a loading control, blots were reprobbed with an actin antibody.

JNK2 α 1 that almost exclusively phosphorylates the C-terminal truncated GST-p53 fragments (Fig. 3B). On the other hand, p21 clearly enhanced JNK1 β 2-mediated phosphorylation of the GST-p53 fragments (Fig. 3B). Thus, depending on the JNK isoform investigated, p21 can either inhibit or stimulate their p53 phosphorylation potential. Interestingly, whereas both JNK2 isoforms as well as the JNK1 α 1 isoform preferentially phosphorylate the C-terminal truncated p53 fragments, this is not evident with JNK1 β 2 that phosphorylates the fragments and the full-length p53 protein to a similar extent (Fig. 3B). While indicating site-specific restrictions for the individual JNK1/2 isoforms,

this observation is most likely explained by the fact that full-length p53 assembles into a tetrameric homo-oligomer in which certain phosphorylation sites might not be as easily accessible as in C-terminal truncated and therefore monomeric p53 fragments.^{25,26} In agreement with this assumption is also our observation that following γ IR exposure, ectopically expressed p53 β , a natural occurring C-terminal truncated p53 isoform lacking the entire oligomerization domain and hence is unable to tetramerize,²⁷ is more intensively phosphorylated on several residues when compared to the wild-type p53 protein in similar treated cells (data not shown).

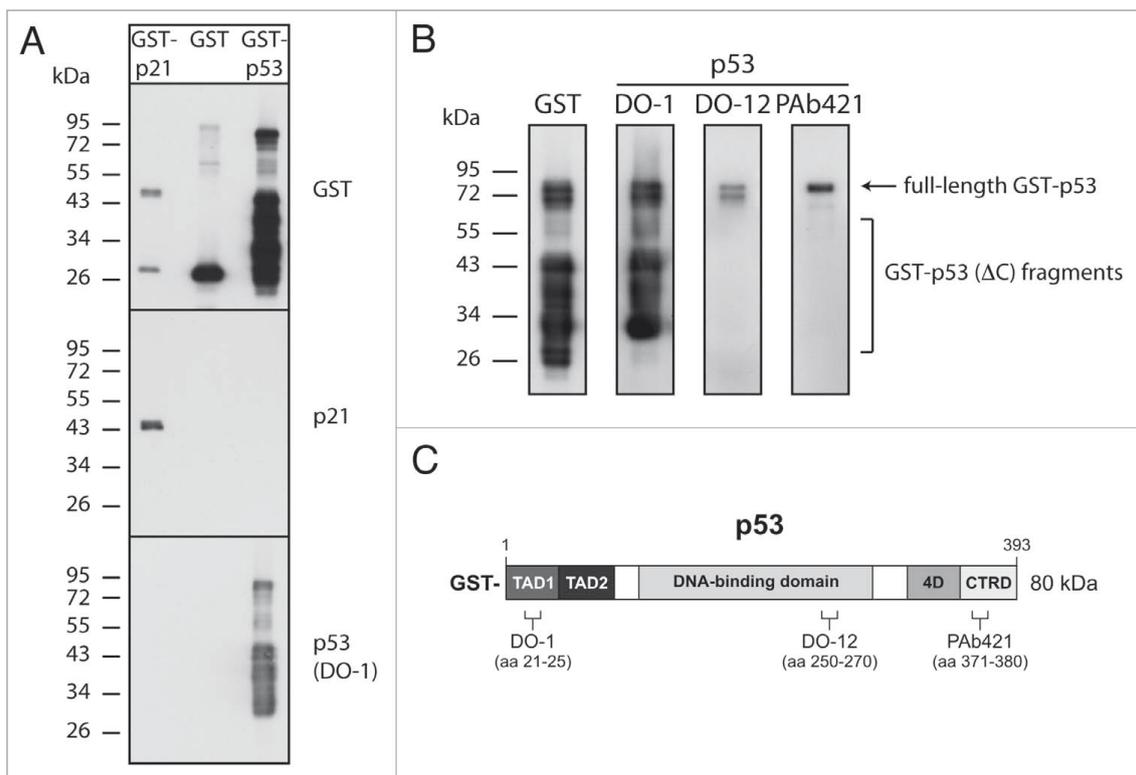


Figure 2. Verification of the GST-proteins used. (A) Recombinant GST-p21, GST-p53 and GST alone were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. (B) Recombinant GST-p53 was analyzed by Western blotting with the indicated antibodies demonstrating that the faster migrating bands are C-terminal truncated p53 fragments. (C) Schematic illustration of the N-terminal GST-tagged p53 protein in which the locations of the two transactivation domains (TAD), DNA-binding domain, tetramerization domain (4D), as well as the carboxy terminal regulatory domain (CTRD) are indicated. The epitopes recognized by the p53 antibodies DO-1, DO-12 and PAb421 are indicated by amino acid (aa) numbering.

Surprisingly, when a GST- Δ cJun fragment was used as the substrate for the various JNK1/2 enzymes, the previously reported inhibition by p21 was not observed (Fig. 3C).¹⁵ Instead, p21 reproducibly enhanced phosphorylation of this cJun fragment by JNK1 β 2 and even more so when the JNK2 α 1 isoform was used, whereas it had no effect on cJun phosphorylation by JNK1 α 1 or JNK2 α 2 (Fig. 3C). Although the substrate preferences of individual JNK isoforms remain largely enigmatic,²⁸ the apparent discrepancy may be caused by the different sources of the JNK enzymes employed. Whereas we used individual recombinant isoforms of JNK1 and JNK2 in *in vitro* kinase assays, Shim and colleagues individually overexpressed the three different JNK genes (JNK1/2/3) *in vivo* and immunoprecipitated the resulting products with an anti-Flag antibody following exposure of these cells to ultraviolet light.¹⁵ Thus, it is possible that these JNKs underwent UV-specific post-translational modifications that might be required for efficient binding and inhibition by p21. In addition, we cannot exclude that the isoforms used were different from those employed in our study. This, however, is particularly important, as our results suggest specific substrate requirements for the individual JNK isoforms that, in addition, are differentially influenced by p21.

Influence of p21 on the activity of other p53-phosphorylating kinases. Next we assessed the influence of p21 on another

MAP kinase, namely p38 α . Together with the JNKs, p38 α constitutes a major component in stress-induced pathways partially due to the phosphorylation of p53 and p21, events that greatly contribute to their stability.^{22,23} The possibility, however, that p21 in turn might affect the kinase activity of p38 α was not thoroughly investigated before. Although a previous report stated a p21-mediated inhibition of p38, no data were shown and neither the substrate nor the p38 family member used was specified.¹⁵ Nevertheless, performing *in vitro* kinase assays, we indeed found that phosphorylation of MBP by p38 α was reduced in the presence of p21 (Fig. 4B), consistent with this earlier report.¹⁵ In contrast, we observed that p21 strongly increased p38 α -mediated phosphorylation of the transcription factors p53 (both the full-length protein and the C-terminal truncated fragments) and ATF-2 (Fig. 4A and C), which resemble two natural substrates of this MAP kinase. Phosphorylation of either substrate was not influenced by the addition of the GST protein (Fig. 4A–C), implying a p21-specific regulation of p38 α kinase activity that similar to those of the JNK isoforms critically depends on the substrate employed.

We then analyzed the influence of p21 on the activity of the glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β), an ubiquitously expressed serine/threonine protein kinase involved in multiple processes including cell cycle regulation and apoptosis.²⁹

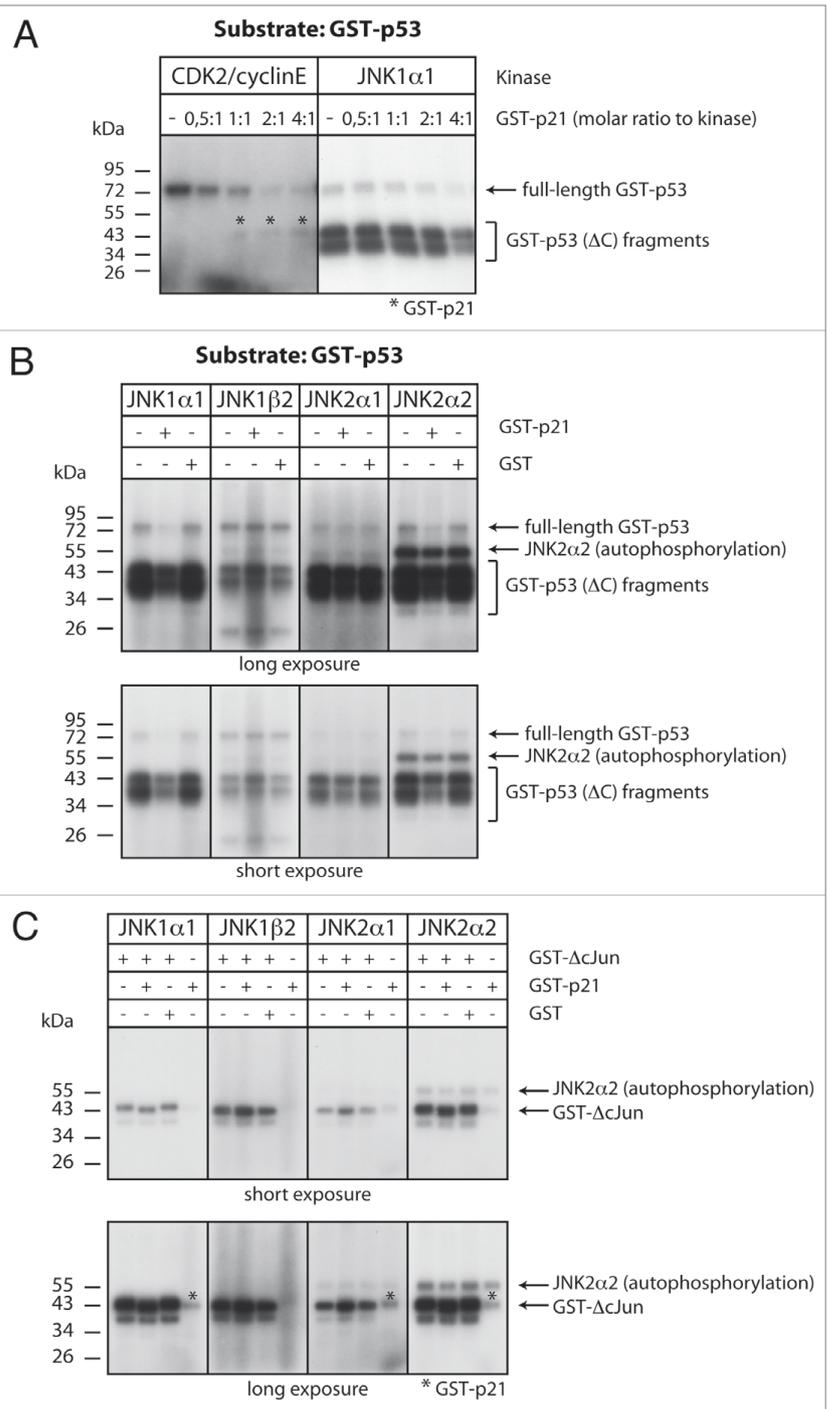
Figure 3. Determination of the influence of p21 on the activities of the CDK2/cyclinE complex and various JNK1/2 isoforms in *in vitro* kinase assays. (A) Recombinant GST-p21 was added to the indicated active kinases at the ratios given using GST-p53 as the substrate. Please note that due to the C-terminal located phosphorylation site, the CDK2/cyclinE complex phosphorylates only full-length GST-p53. Note also that the bands marked with an asterisk represent phosphorylated GST-p21. (B and C) Recombinant GST-p21 or GST alone were added to the indicated active JNK isoforms at a 4:1 molar ratio using GST-p53 (B) and GST- Δ Jun (C) as substrates. Only the JNK2 α 2 isoform shows an autophosphorylation reaction as indicated. Please note that although the JNK-phosphorylated GST-p21 (marked with an asterisk) migrates with a similar molecular weight as the GST- Δ Jun fragment, this signal does not add considerably when judging the observed enhancement of the GST- Δ Jun phosphorylation (see the shorter exposure in C). For A to C, one representative experiment each out of three is shown.

GSK-3 β was chosen because it also phosphorylates both p21 and p53, promoting their proteasomal degradation and transcriptional activity, respectively.^{30,31} Although autophosphorylated GSK-3 β as well as GSK-3 β -phosphorylated GST-p21 migrate with a similar molecular weight as the full-length GST-p53 and some of the GST-p53(Δ C) fragments, respectively, an increase in p53 phosphorylation (particularly of the C-terminal truncated p53 fragments) is clearly visible following addition of p21 (Fig. 4D). Likewise, phosphorylation of axin, another natural GSK-3 β substrate,³² was also enhanced in the presence of p21 (Fig. 4F), whereas GSK-3 β -mediated phosphorylation of β -catenin and MBP was not affected (Fig. 4E and G). As GST alone did not affect any substrate phosphorylation, our results suggest that also the p21-mediated modulation of GSK-3 β critically depends on the substrate employed.

We also analyzed an isoform of the serine/threonine-specific casein kinase (CK) protein family, CK1 ϵ . Although an interaction of this isoform with p21 has not been described, CK1 ϵ was especially interesting to us as it has been strongly implicated in p53-mediated decision processes and was shown to phosphorylate p53 at several N-terminal amino acids.³³ Although CK1 ϵ was intensively autophosphorylated, with a molecular weight of approximately 55 kDa it migrates significantly faster than the full-length GST-p53 protein. The two different substrates GST-p53 (both the full-length protein and the C-terminal truncated fragments) and casein are intensively phosphorylated by CK1 ϵ , but neither p21 nor GST was able to influence these reactions (Fig. 4H and I).

Finally, we focused our efforts on the third class of the MAP kinase super family, ERK1/2. Like JNK and p38, these kinases

also phosphorylate p53 and constitute major determinants of cell proliferation and cell death pathways, but the underlying mechanisms are not fully elucidated.³⁴ Although initially an interaction of ERK with p21 was not observed,¹⁵ a very recent study demonstrated that ERK2, but not ERK1, binds to and phosphorylates p21 at Thr57 and Ser130 leading to its proteasomal degradation.³⁵ A modulation of ERK2 activity by p21, however, was not investigated in this report. Interestingly, we demonstrate here for the first time that p21 clearly enhances ERK1-mediated



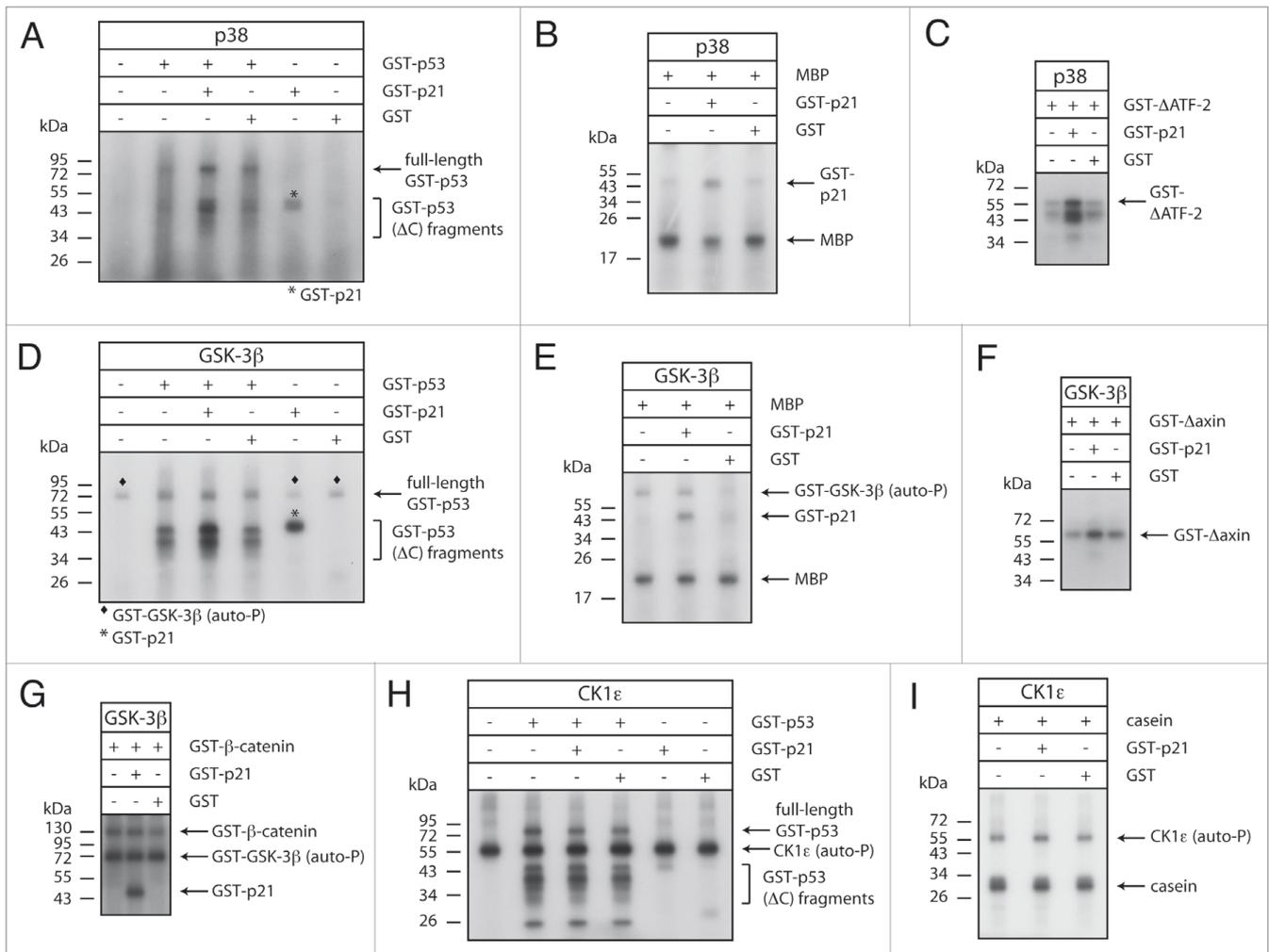


Figure 4. Determination of the influence of p21 on the activities of p38 α , GSK-3 β and CK1 ϵ in vitro kinase assays. Recombinant GST-p21 or GST alone were added to the indicated active kinases at a 4:1 molar ratio using GST-p53 (A, D and H), MBP (B and E), GST- Δ ATF-2 (C) GST- Δ axin (F), GST- β -catenin (G) or casein (I) as the substrates. The bands in (A and D) that are marked with an asterisk represent phosphorylated GST-p21. Autophosphorylated GSK-3 β and CK1 ϵ are indicated by diamonds and arrows, respectively. Due to the short exposure time that was sufficient for detection of axin phosphorylation, autophosphorylation of GSK-3 β is not visible. One representative experiment each out of three is shown.

phosphorylation of all the substrates used, GST-p53 (full-length and fragments), cFos and MBP (Fig. 5A–C). Even more remarkable, however, is our finding with regard to the influence of p21 on the activity of ERK2. Similar to the observed oppositional effect of p21 on several other kinases (JNKs, p38 α , GSK-3 β), we found that p21 is also able to positively and negatively modulate the activity of ERK2 depending on the substrate used. Whereas p21 strongly attenuated ERK2-mediated phosphorylation of the full-length GST-p53 protein, phosphorylation of cFos and MBP by ERK2 was clearly enhanced in the presence of p21 (Fig. 5D–F) even at the lowest p21 to kinase ratio used (0.5 to 1; data not shown). GST alone, on the other hand, neither influenced the activity of ERK1 nor ERK2.

Discussion

In summary, the present work may add a new facet to the complex regulatory network controlled by p21. So far, p21 was only known to interact and thereby inhibit several kinases including CDKs, JNKs, p38 and CK2, however, this was preferentially demonstrated using either their natural substrates or an artificial substrate such as the myelin basic protein (MBP).^{3,12,15} With the exception of CK2,²⁰ p21-mediated kinase inhibition was never investigated with regard to a possible impact on p53 phosphorylation. Here we show that p21 not only inhibits p53 phosphorylation by the CDK2/cyclinE complex, JNK1 α 1, JNK2 α 2 or ERK2, but is also able to positively influence phosphorylation of this tumor suppressor by JNK1 β 2, p38 α , GSK-3 β and ERK1, at least in vitro. The activity of CK1 ϵ in contrast was not affected, suggesting a specific modulation of only certain kinases by p21 rather than an unspecific in vitro artefact. Moreover, and most

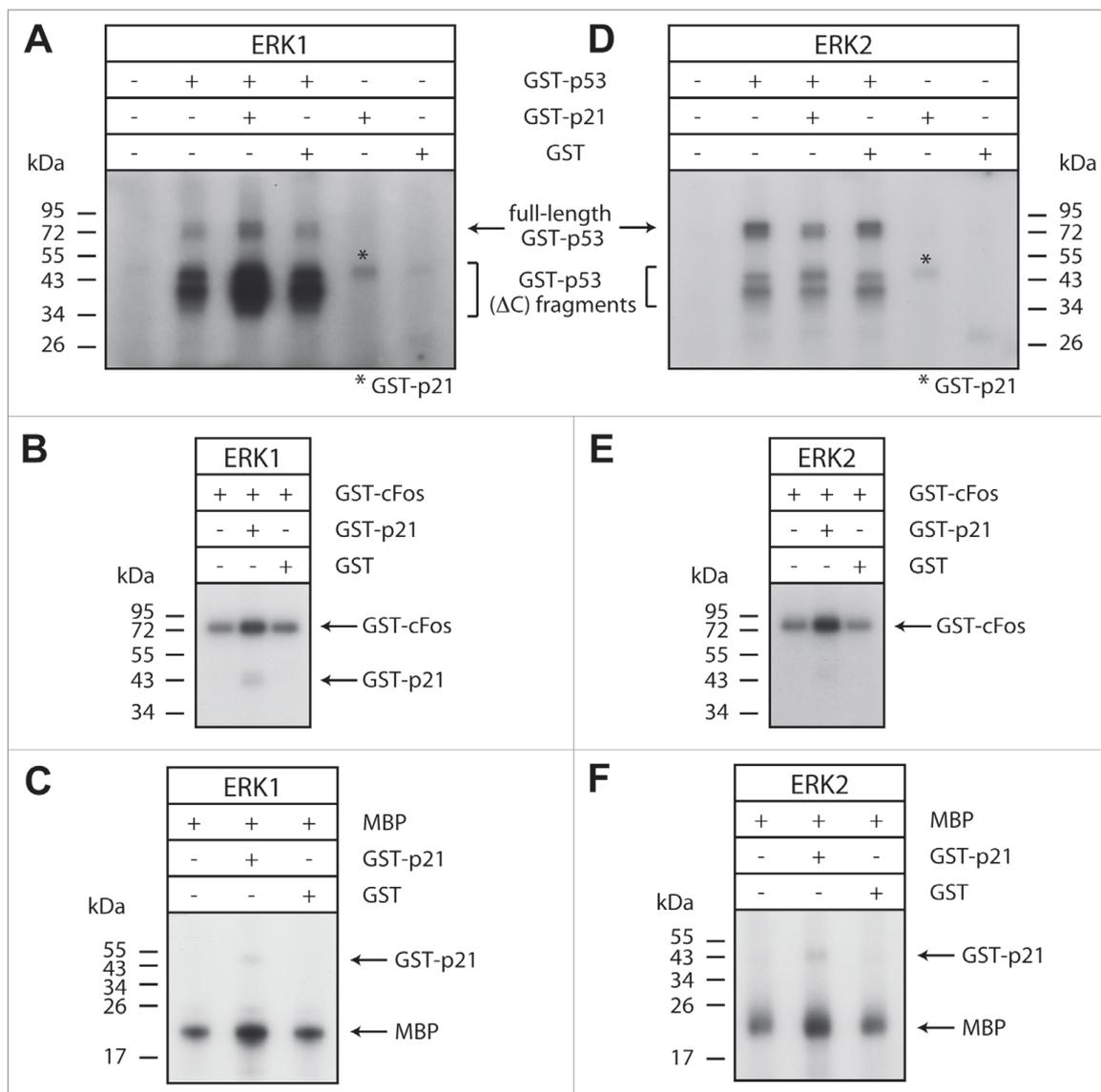


Figure 5. Determination of the influence of p21 on the activities of ERK1 and ERK2 in in vitro kinase assays. (A–F) Recombinant GST-p21 or GST alone were added to active ERK1 (A–C) and ERK2 (D–F) at a 4:1 molar ratio using GST-p53 (A and D), GST-cFos (B and E) and MBP (C and F) as the substrates. Note that the protein bands in A and D that are marked with an asterisk represent the phosphorylated GST-p21 protein that migrates with a similar molecular weight as one of the GST-p53(ΔC) fragments. One representative experiment each out of three is shown.

remarkable, p21 is even able to decrease, increase or not affect the activity of an individual kinase (JNK2α1, p38α, ERK2, GSK-3β) depending on the substrate employed. Although cytosolic p21 is also able to stimulate CDK activity, this was shown to proceed via an indirect mechanism by promoting the assembly of complexes of cyclinD with CDK4 or CDK6.² Thus, to our knowledge, this is the first report describing such a bidirectional activity for p21 on individual kinases that, if verified in vivo will surely affect the underlying pathways including those instigated by the tumor suppressor p53.

Of course, one should keep in mind that several of the here studied kinases are post-translationally modified in vivo and that these modifications probably affect both kinase activity and

substrate specificity. However, for several reasons we intentionally refrained from performing our study with naturally or ectopically expressed kinases. Firstly, because of the lack of appropriate antibodies distinguishing for instance between the different JNK isoforms. Secondly, antibodies might co-precipitate kinase-associated proteins of unknown identities falsifying the in vitro kinase reactions specifically with regard to the herein intended direct modulation of certain kinases by p21. And finally, we used active recombinant proteins, as naturally expressed kinases most likely require activation that critically depends on multiple intrinsic and extrinsic factors that surely would add further uncontrollable experimental uncertainties to our study. On the other hand, these considerations prevented us from investigating

several more “classical” p53 kinases such as Ataxia Telangiectasia (ATM), ATM-related kinase (ATR), DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), or the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2),³⁶ as these kinases are commercially unavailable as full-length recombinant proteins.

Although the results presented here were obtained from an isolated but well-defined *in vitro* system, they correlate, at least to some extent, with our *in vivo* observations. Even under non-stress conditions, several p53 residues were found differentially phosphorylated in p21-proficient and p21-deficient HCT116 cells. However, these differences were not as pronounced as those observed following irradiation of the two cell lines, which is consistent with the fact that p21 is almost undetectable in untreated HCT116 wild-type cells. Despite the fact that we do not know whether these alterations contribute to the increased p53 stability in p21-deficient HCT116 cells, these data suggest that even small p21 levels may be sufficient to alter kinase activities. Consistently, increasing p21 levels by exposing wild-type cells to γ IR revealed a more dramatic difference in their p53 phosphorylation pattern when compared to that observed in similarly treated p21-deficient cells. Particularly Ser15 and Ser46, both of which are strongly associated with p53-mediated apoptosis, were hyperphosphorylated in irradiated HCT116/p21^{-/-} cells (compared to wild-type cells) consistent with their increased apoptosis sensitivity toward this treatment.¹⁷ On the other hand, Ser9 and Ser20 were reproducibly found to be less phosphorylated in p21-deficient cells under similar conditions. Although it was reported that p53 phosphorylation depends on the cell cycle,³⁷ implying that the loss of p21 may indirectly affect these processes via an altered cell cycle distribution, our *in vitro* data support a direct influence of p21 on several p53-phosphorylating kinases.

Unfortunately, further *in vivo* verification of our results will be an extremely challenging task as it is clearly compromised by the following circumstances. It is well known that activation and function of p53 are critically influenced by multiple phosphorylation events elicited by numerous kinases. Although several groups demonstrated an observable impact on the cellular function of p53 following mutations of individual phosphorylation sites, it is presently assumed that a combination of diverse post-translational modification events dictates the outcome of a p53 activation in a barcode-like manner.³⁸ To complicate matters even more, individual residues in p53 can be phosphorylated by several kinases in a redundant and most likely stimulus-dependent manner.³⁶ Together with our present finding that p21 can influence different kinases both negatively and positively in a substrate-dependent manner at least *in vitro*, it will prove extremely difficult to further verify the impact of p21 on individual kinases in other *in vivo* settings. Indeed, we could not observe differences in the γ IR-induced p53 phosphorylation pattern between p21-proficient and -deficient HCT116 cells following a siRNA-mediated knockdown of a single kinase (data not shown). However, although these observations suggest a certain redundancy of kinase activities, we cannot exclude the possibility that other kinases may have a more important role in this setting than those investigated in our study.

Nevertheless, it is tempting to speculate that with the induction of p21, p53 may be able to generate additional, yet so far unrecognized positive and negative feedback loops³⁹ that control its functions in a more direct manner by modulating the activities of p53-phosphorylating kinases. The exact nature of the kinases involved and their contribution to p53-mediated decision processes *in vivo*, however, remain to be further elucidated.

Materials and Methods

Cell lines, reagents and antibodies. The colon carcinoma cells HCT116 and their p21-deficient counterpart HCT116/p21^{-/-} were cultured in McCoy's 5A medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (PAA Laboratories). Mouse monoclonal anti-p53 antibodies DO-1, PAb1801 and PAb421 were from Calbiochem (Darmstadt, Germany) and DO-12 was from Novocastra (Newcastle, UK). The polyclonal phospho-specific anti-p53 antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and from Dianova (Hamburg, Germany). The mono- and polyclonal p21 and GST antibodies were from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany) and GE Healthcare (Freiburg, Germany), respectively. The monoclonal actin antibody was purchased from Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany).

Recombinant proteins. The following human recombinant kinases were used: His-CDK2/GST-cyclinE, His-JNK1 α 1 and His-JNK2 α 2 were from Upstate (Millipore; Schwalbach, Germany). His-JNK1 β 2 and JNK2 α 1 were from Biomol (Plymouth, PA, USA) and Active Motif (Rixensart, Belgium), respectively. ERK1 and GST-ERK2 were both from SignalChem (Biozol; Eching, Germany) and His-CK1 ϵ was purchased from Invitrogen (Karlsruhe, Germany). GST-GSK-3 β and His-p38 α were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and from Cell Sciences (Canton, MA, USA), respectively. The following substrates were used: GST-p21 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany), casein was from Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany), cFos was purchased from SignalChem and myelin basic protein (MBP) from Enzo Life Sciences (Biozol; Eching, Germany). The GST-tagged proteins β -catenin and axin (aa 275–510) were from Millipore (Temecula, CA, USA), whereas ATF-2 (aa 1–254) fused to a N-terminal GST-tag was from SignalChem. The plasmids encoding GST and GST-p53 were kind gifts from T. Hoffmann (Heidelberg, Germany) and purified GST- Δ cJun (aa 1–135) was from S. Ludwig (Münster, Germany).

Kinase assays. The kinase reactions were performed in the following buffers: for JNK isoforms in 20 mmol/L HEPES (pH 7.4), 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L NaCl, 0.02% Tween-20, 0.2 mmol/L Na₃VO₄, 0.2 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L DTT, 50 μ mol/L ATP and 5 μ Ci [γ -³²P]ATP. For CDK2/cyclinE in 25 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 40 μ mol/L ATP and 5 μ Ci [γ -³²P]ATP. For CK1 ϵ : 12.5 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 0.01%

Triton-X-100, 5 mmol/L β -glycerophosphate, 0.5 mmol/L Na_3VO_4 , 2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L ATP and 5 μCi [γ - ^{32}P] ATP. For ERK1/2, p38 α and GSK-3 β : 5 mmol/L MOPS (pH 7.2), 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EGTA, 0.4 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L β -glycerophosphate, 50 $\mu\text{mol/L}$ DTT, 50 $\mu\text{mol/L}$ ATP and 5 μCi [γ - ^{32}P]ATP. The individual kinases were preincubated with GST-p21 or GST for 10 minutes at 30°C in the absence of the substrate, ATP, DTT and phosphatase inhibitors. Kinase reactions were carried out for 30 minutes (CDK2/cyclinE, CK1 ϵ , ERK1/2, p38 α and GSK-3 β) or 60 minutes (JNKs) at 30°C following addition of the substrate in complete kinase buffer. The reactions were stopped by adding 5x SDS sample buffer and heating (5 minutes at 95°C). Following separation on SDS polyacrylamide gels, the gels were fixed in 50% methanol and 10% acetic acid, dried and exposed to an X-ray film.

Immunoprecipitation and Western blotting. Immunoprecipitations were essentially performed as described.¹⁷ Cells were lysed in IP-buffer [150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4), as well as a cocktail of protease and phosphatase inhibitors] for 30 minutes on ice and insoluble particles were removed by a 30 minute spin at 20,000 x g. Samples

were rotated over night together with anti-p53 antibody (DO-1) followed by a short (10 min) spin at 20,000 x g and the supernatant was then rotated together with protein G-sepharose (Sigma Aldrich; Deisenhofen, Germany) for another 2 hours. Samples were pelleted at 20,000 x g for 5 minutes, washed three times and proteins were eluted from protein G-sepharose in SDS sample buffer. Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Following antibody incubation, the proteins were visualized by enhanced chemiluminescent staining using ECL reagents (GE Healthcare). Densitometric analysis of the blots was carried out with a CCD camera (LAS 3000; Fujifilm Europe GmbH) using the AIDA densitometry software.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. B. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) for the HCT116 cell lines, T. Hofmann (DKFZ, Heidelberg, Germany) for the GST-p53 cDNA and S. Ludwig (Münster, Germany) for purified GST-cJun. This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 728/B1).

References

1. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817-25.
2. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11:847-62.
3. Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, et al. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91:8655-9.
4. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369:574-8.
5. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Rev. Cancer* 2009; 9:400-14.
6. Perkins ND. Not just a CDK inhibitor: Regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 2002; 1:39-41.
7. Jänicke RU, Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* 2007; 6:407-13.
8. Jänicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ* 2008; 15:959-76.
9. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246:280-9.
10. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* 2003; 115:71-82.
11. Chen X, Chi Y, Bloecher A, Aebersold R, Clurman BE, Roberts JM. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell* 2004; 16:839-47.
12. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006; 5:1313-9.
13. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21(Cip1/WAF1) by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001; 3:245-52.
14. Huang S, Shu L, Dilling MB, Easton J, Harwood FC, Ichijo H, Houghton PJ. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1). *Mol. Cell* 2003; 11:1491-501.
15. Shim L, Lee H, Park J, Kim H, Choi EJ. A non-enzymatic p21-protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 1996; 381:804-7.
16. Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase-3 is regulated by cell cycle regulator p21(WAF1) and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998; 17:931-9.
17. Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* 2006; 66:11254-62.
18. Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G₂/M₂ arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* 2001; 20:3806-13.
19. Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21(WAF1) sensitizes cells to apoptosis via an increase in both p14^{ARF} and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* 2002; 277:37949-54.
20. Götz C, Wagner P, Issinger OG, Montenarh M. p21(WAF1/CIP1) interacts with protein kinase CK2. *Oncogene* 1996; 13:391-8.
21. Hill R, Leidal AM, Madureira PA, Gillis LD, Cochran HK, Waisman DM, et al. Hypersensitivity to chromium-induced DNA damage correlates with constitutive deregulation of upstream p53 kinases in p21^{-/-} HCT116 colon cancer cells. *DNA Repair* 2008; 7:239-52.
22. Bode AM, Dong Z. Post-translational modifications of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:793-805.
23. Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, Yan Z, Jin K, Friedman E. The stress-activated protein kinases p38 α and JNK1 stabilize p21(CIP1) by phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277:29792-802.
24. Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:554-65.
25. Harms KL, Chen X. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ* 2006; 13:890-7.
26. Jänicke RU, Graupner V, Budach W, Essmann F. The do's and don'ts of p53 isoforms. *Biol Chem* 2009; 390:951-63.
27. Graupner V, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Jänicke RU. Functional characterization of p53 β and p53 γ , two isoforms of the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 2009; 8:1238-48.
28. Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2006; 70:1061-95.
29. Holmes T, O'Brien TA, Knight R, Lindeman R, Symonds G, Dolnikov A. The role of the glycogen synthase kinase-3 β in normal haematopoiesis, angiogenesis and leukaemia. *Curr Med Chem* 2008; 15:1493-9.
30. Lee JY, Yu SJ, Park YG, Kim J, Sohn J. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates p21(WAF1/CIP1) for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol* 2007; 27:3187-98.
31. Watcharasi P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem* 2003; 278:48872-9.
32. Li H, Pamukcu R, Thompson WJ. β -catenin signaling: Therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther* 2002; 1:621-5.
33. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 2004; 17:675-89.
34. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 2009; 8:1168-75.
35. Hwang CY, Lee C, Kwon K-S. Extracellular Signal-regulated kinase 2-dependent phosphorylation induces cytoplasmic localization and degradation of p21(CIP1). *Mol Cell Biol* 2009; 29:3379-89.
36. Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumor suppression? *Cell Death Differ* 2007; 14:1561-75.
37. Buschmann T, Adler V, Matusevich E, Fuchs SY, Ronai Z. p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14^{ARF} and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 2000; 60:896-900.
38. Murray-Zmijewski E, Slee EA, Lu X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:702-12.
39. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24:2899-908.

3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reiner U. Jänicke, der mir die Gelegenheit zur Durchführung dieser Doktorarbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie geboten hat. Seiner zuverlässigen Betreuung, seinem unerschütterlichen Enthusiasmus und seinem Beistand auch in schwierigen Zeiten ist es zu verdanken, dass diese Arbeit in ihrer hier vorgelegten Form zustande kommen konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für die freundliche Übernahme des Koreferates bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Dennis und Sabine für ihr intensives Korrekturlesen, das mir sehr weitergeholfen hat.

Bei Jessica Kehl möchte ich mich für die gute technische Unterstützung bedanken.

Des Weiteren danke ich Dennis, Sabine, Christine, Jessie, Annette und Stephan für die angenehme Schreibraum-Atmosphäre und die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Radioonkologie und des Instituts für Molekulare Medizin, auf deren Hilfsbereitschaft ich immer zählen konnte.

Außerdem möchte ich mich bei Ulf, Florian, Sabine und Annette für die lustigen und abwechslungsreichen Mittagspausen bedanken, in denen ich stets neue Kraft für die Doktorarbeit sammeln konnte.

Auch allen anderen, hier nicht namentlich erwähnten Freunden und insbesondere meiner Familie und natürlich Christian möchte ich für das aufgebrachte Verständnis und die Unterstützung danken, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

Abschließend gilt mein Dank meinem ehemaligen Biologie-Lehrer, Herrn Peter Wasem, der mir auf seine unvergleichliche Weise die Faszination der Biologie nahegebracht hat.

4. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 26.08.2011

Denise Neise