(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 255 T2** 2005.07.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 749 442 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 255.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/00247**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 906 793.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/018824**
(86) PCT-Anmeldetag: **09.01.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **13.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.07.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C12N 15/86, C12N 5/10, C12N 1/21, C07K 14/47, G01N 33/50, A61K 38/17, A61K 48/00, C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:

179045	**07.01.1994**	**US**
275983	**15.07.1994**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, N.Y., US; Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Wash., US

(72) Erfinder:
MASSAGUE, Joah, New York, US; ROBERTS, James M., Seattle, US; KOFF, Andrew, New York, US; POLYAK, Kornelia, New York, US

(74) Vertreter:
Diehl, Glaeser, Hiltl & Partner, 80333 München

(54) Bezeichnung: **ISOLIERTES p27 PROTEIN UND NUKLEINSÄURE DAFÜR KODIEREND**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung wurde vom NIH (National Institutes of Health) durch Grant No. CA48718 unterstützt. Demzufolge hat die US-Regierung bestimmte Rechte an der Erfindung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] In der Beschreibung werden verschiedene Veröffentlichungen zitiert. Die vollständigen Zitate dieser Druckschriften finden sich am Ende der Beschreibung unmittelbar vor den Ansprüchen.

[0003] Das Durchlaufen des Zellzyklus ist durch eine Reihe von irreversiblen Übergängen gekennzeichnet, die diskrete Aufgaben, die für eine genaue Zellduplikation erforderlich sind, trennen. Diese Übergänge werden negativ durch Signale reguliert, die den Zellzyklus einschränken, bis spezifische Bedingungen erfüllt sind. Beispielsweise wird der Eintritt in die Mitose durch unvollständig replizierte DNA oder eine DNA-Schädigung gehemmt (Weinert und Hartwell, 1988). Ein weiterer Feedback-Weg verzögert den Übergang von M zu G1, wenn die mitotische Spindel defekt ist (Hoyt et al., 1991; Li & Murray, 1991). Diese Einschränkungen beim Durchlaufen des Zellzyklus sind für die getreue Wiedergabe der genetischen Information während der Zellteilung wesentlich (Hartwell & Weinert, 1989). Auf der anderen Seite koordiniert der Übergang von der G1- zur S-Phase die Zellproliferation mit Umgebungsgesichtspunkten, wonach die Prüfungen des Durchlaufens des Zellzyklus tendenziell autonom werden (Hartwell et al., 1974; Pardee, 1974, 1989). Unter den extrazellulären Einflüssen, die das Durchlaufen des Zellzyklus während G1 einschränken, befinden sich Proteine, die die Zellproliferation, die Wachstumsfaktor- oder Aminosäure-Verarmung und den Kontakt von Zelle zu Zelle hemmen. Eine Unterbrechung dieser Signalwege entkoppelt zelluläre Reaktionen von der Umgebungskontrolle und kann zu einer uneingeschränkten Zellproliferation führen.

[0004] Übergänge zwischen Phasen des Zellzyklus werden durch eine Familie von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) katalysiert (Nurse, 1990; Hartwell, 1991). In einigen Organismen zielen die physiologischen Signale, die den Übergang von G2 zu M steuern, auf eine Reihe von Stufen ab, die mitotische Cdk, nämlich Cdc2, aktivieren. Die Cdc2-Aktivierung wird positiv durch die Phosphorylierung an Threonin-161 reguliert (Booher & Beach, 1986; Krek & Nigg, 1991; Gould et al., 1991; Solomon et al., 1990; 1992) und negativ durch Phosphorylierung an Tyrosin-15 (Gould & Nurse, 1989). Eine unvollständige DNA-Replikation verzögert die Dephosphorylierung von tyr-15 (Dasso & Newport, 1990; Smythe & Newport, 1992), und Mutationen in Cdc2, die tyr-15 in einen nicht-phosphorylierbaren Rest umwandeln, sind letal und verursachen eine vorzeitige Mitose (Gould & Nurse, 1989). Gleichermaßen umgehen entweder eine Überexpression der tyr-15-Phosphatase Cdc25 (Enoch & Nurse, 1990; Kumagai & Dunphy, 1991) oder der Verlust der tyr-15-Kinasen (Ludgren et al., 1991) das Erfordernis, dass die DNA-Replikation vor Beginn der Mitose beendet ist. Weitere Niveaus der Steuerung sind vermutlich erforderlich, um die Blockierung der Mitose, die durch eine fortschreitende DNA-Replikation verursacht wird, vollständig zu erklären (Sorger & Murray, 1992; Heald et al., 1993; Stueland et al., 1993). Es gibt auch Anzeichen dafür, dass der durch DNA-Schädigung induzierte Zellzyklus-Stillstand mit einer Inaktivierung von Cdc2 in Zusammenhang steht (Rowley et al., 1992; Walworth et al., 1993), jedoch ist die Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung in diesem Zusammenhang fraglich (Barbet & Carr, 1993).

[0005] Es gibt einige Hinweise darauf, insbesondere in Hefe, dass Signale, die den Übergang von der G1- zur S-Phase hemmen, die Cdk-Aktivierung blockieren. Der Paarungspheromon-alpha-Faktor bringt den S. cerevisiae-Zellzyklus in G1 zum Stillstand (Reid & Hartwell, 1977); dies korreliert mit einer Abnahme der CDC28-Kinaseaktivität und einem Abfall des reichlichen Vorkommens der aktiven Komplexe mit einem Gehalt an G1-Cyklinen und CDC28 (Wittenberg et al., 1990). Das FAR1-Protein bindet an G1-Cyclin-CDC28-Komplexe in Zellen, die mit alpha-Faktor behandelt worden sind; dies ist vermutlich für den Zellzyklus-Stillstand erforderlich (Chang & Herskowitz, 1990; Peter et al., 1993). Weitere Inhibitoren der CDC28-Kinaseaktivität wurden identifiziert, wobei aber ihre Beziehung zu physiologischen Signalen, die das Fortschreiten des Zellzyklus steuern, nicht bekannt ist (Mendenhall, 1993; Dunphy & Newport, 1989).

[0006] Säugetierzellen, wie Hefe, benötigen Cyclin-abhängige Kinasen für das Durchlaufen von G1 und den Eintritt in die S-Phase (D'Urso et al., 1990; Blow & Nurse, 1990; Furukawa et al., 1990; Fang & Newport, 1991; Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993). Sowohl D- als auch E-Typ-Cycline sind geschwindigkeitsbegrenzend für die Umwandlung von G1 zu S und beide bewirken eine Verringerung (wenn nicht Beseitigung) des Bedarfs der Zelle an mitogenen Wachstumsfaktoren (Ohtsubo & Roberts, 1993; Quelle et al., 1993). Es gibt jedoch wenig Informationen über die Art und Weise, wie diese Cycline und Cdks negativ durch extrazelluläre Signale, die die Zellproliferation hemmen, reguliert werden.

[0007] Es wurde untersucht, wie zwei Signale, die den Zellzyklus in G1, den Kontakt von Zelle zu Zelle und TGF-β blockieren, die Aktivität einer G1-Cyclin-abhängigen Kinase, Cdk2, beeinträchtigen (Paris et al., 1990; Elledge & Spotswood, 1991; Koff et al., 1991; Tsai et al., 1991; Elledge et al., 1992; Rosenblatt et al., 1992). Der Zellzyklus von Mv1Lu-Nerz-Epithelzellen kann in G1 durch Wachstum zu hoher Dichte zum Stillstand gebracht werden. Diese kontaktinhibitierten Zellen hemmen sowohl Cyclin E als auch Cdk2, jedoch ist eine mit Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität nicht vorhanden (Koff et al., 1993). Der Eintritt in die S-Phase kann auch verhindert werden, wenn Mv1Lu-Zellen aus der Kontakthemmung in Gegenwart von TGF-β freigesetzt werden; dies korreliert mit einer Blockierung der Phosphorylierung des Retinoblastom (Rb)-Proteins (Laiho et al. 1990). Sowohl Cdk2 als auch Cdk4 werden als Rb-Kinasen angesehen (Matsushime et al., 1992; Hinds et al., 1993; Kato et al., 1993; Ewen et al., 1993a; Dowdy et al., 1993), was darauf schließen lässt, dass der durch TGF-β induzierte Zellzyklus-Stillstand eine Hemmung von Cdks während G1 beinhalten kann (Howe et al., 1991). Im Einklang damit steht, dass in der späten G1-Phase durch TGF-β zum Stillstand gebrachte Zellen ebenso wie kontaktgehemmte Zellen sowohl Cyclin E als auch Cdk2 exprimieren, jedoch keine katalytisch aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexe enthalten (Koff et al., 1993). Die Cdk4-Synthese wird auch durch TGF-β unterdrückt (Ewen et al., 1993b). Die Inaktivität von Cdk2 zusammen mit dem Fehlen von Cdk4 kann die Blockierung der Rb-Phosphorylierung in diesen Zellen erklären.

[0008] Hier wird dargelegt, dass kontaktgehemmte und TGF-β-behandelte Zellen, jedoch nicht proliferierende Zellen, einen titrierbaren Überschuss eines 27 kD-Proteins enthalten, das an den Cyclin E-Cdk2-Komplex bindet und dessen Aktivierung verhindert. Die Hemmwirkung von p27 kann kompetitiv durch den Cyclin D2-Cdk4-Komplex beeinflusst werden, was darauf schließen lässt, dass p27 und Cyclin D2-Cdk4 innerhalb eines Wegs wirken, der Wachstumshemmsignale auf Cdk2 überträgt.

[0009] Erfindungsgemäß wird ein isoliertes 27 kD-Protein bereitgestellt, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist. Die Erfindung stellt ferner damit in Zusammenhang stehende rekombinante Nucleinsäuremoleküle, Wirtsvektorsysteme und Verfahren zu ihrer Herstellung bereit. Schließlich stellt die Erfindung Verfahren zum Identifizieren von Mitteln und zur Verwendung von Mitteln, die auf die p27-Funktion einwirken oder diese nachahmen, bereit, um die regulatorische Rolle von p27 bei der Zellproliferation auszunützen.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0010] Erfindungsgemäß wird ein isoliertes Protein mit einem durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gemessenen scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD bereitgestellt, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist.

[0011] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül, das für das erfindungsgemäße Protein kodiert.

[0012] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Vektor, der das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül umfasst.

[0013] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Wirt-Vektor-System zur Herstellung eines Proteins mit einem durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gemessenen scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist, wobei das System den erfindungsgemäßen Vektor in einem geeigneten Wirt umfasst.

[0014] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit einem durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gemessenen scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist, wobei das Verfahren das Züchten des erfindungsgemäßen Wirt-Vektor-Systems unter Bedingungen, die die Erzeugung des Proteins ermöglichen, und das Gewinnen des dadurch erzeugten Proteins umfasst.

[0015] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung der Tatsache, ob ein Mittel zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes befähigt ist, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (a) geeignete Mengen an p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht; (b) p27, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit von p27-Protein ermöglichen würden; (c) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und (d) die Menge des auf diese Weise gebildeten

aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes größer als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivität des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist.

[0016] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) geeignete Mengen an p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht; (b) p27, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit von p27-Protein ermöglichen würden; (c) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und (d) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes kleiner als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivität des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist.

[0017] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts mit einer hypoproliferativen Störung, wobei das Verfahren die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels, das zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hyperproliferativen Zellen des Subjekts zu hemmen, befähigt ist, an das Subjekt umfasst, um dadurch das Subjekt zu behandeln.

[0018] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts mit einer hypoproliferativen Störung, wobei das Verfahren das Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels, das zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hypoproliferativen Zellen des Subjekts zu hemmen, an das Subjekt umfasst, um dadurch das Subjekt zu behandeln.

[0019] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Diagnose einer hyperproliferativen Störung bei einem Subjekt, wobei die Störung mit dem Vorliegen einer p27-Proteinmutation in den Zellen des Subjekts in Zusammenhang steht, wobei bei dem Verfahren das Vorliegen einer p27-Proteinmutation in den Zellen des Subjekts umfasst, wobei die Mutation mit einer hyperproliferativen Störung in Zusammenhang steht, so dass dadurch eine hyperproliferative Störung im Subjekt diagnostiziert wird.

[0020] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge eines rekombinanten Virus, der zur Infektion einer geeigneten Wirtszelle befähigt ist, wobei das rekombinante Virus das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül umfasst, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0021] Gegenstand der Erfindung ist schließlich ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts, das an einer hyperproliferativen Störung, die mit dem Vorliegen einer p27-Proteinmutation in den Zellen des Subjekts in Zusammenhang steht, leidet, wobei das Verfahren die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung an das Subjekt in einer Menge, die eine Behandlung des Subjekts bewirkt, umfasst.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1A

Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E in Extrakten von proliferierenden und in Bezug auf das Wachstum zum Stillstand gekommenen Zellen

[0022] Cyclin E wurde zu Extrakten von kontaktgehemmten Zellen (0) und zu Zellen, die 15 Stunden in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-B von der Kontakthemmung befreit worden waren, gegeben. Die Zellen nach 15 Stunden werden im Text als "proliferierende Zellen" bezeichnet, um darauf hinzuweisen, dass sie den Zellzyklus durchlaufen und in die S-Phase eingetreten sind. 0,05 µl Cyclin E entspricht physiologischen Konzentrationen von Cyclin E in diesen Extrakten. Der Eckeinsatz zeigt die Titration von Konzentrationen bis zum 3-fachen der physiologischen Konzentration von Cyclin E. Cyclin E-Immunopräzipitate wurden

auf Histon H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden quantitativ unter Verwendung eines Phosphorimagers bestimmt. Hintergrundkonzentrationen der Phosphorylierung, die in Abwesenheit von exogenem Cyclin E beobachtet wurden, wurden von jeder Probe abgezogen.

Fig. 1B

Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E in Extrakten aus proliferierenden und in Bezug auf das Zellwachstum zum Stillstand gekommenen Zellen

[0023] Extrakte wurden von kontaktgehemmten Zellen (0) und von Zellen, die 15 Stunden in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β von der Kontakthemmung freigesetzt worden waren, hergestellt. Physiologische Mengen an Cyclin E wurden zu verschiedenen Mengen dieser Extrakte und zu Gemischen von Extrakten gegeben. Extrakte von proliferierenden und zum Stillstand gekommenen Zellen wurden in den angegebenen Verhältnissen vermischt. Die Gesamtmenge an Protein in jedem Gemisch betrug 75 µg. Die Menge des jeweils verwendeten Extrakts (µg) ist angegeben. Nach der Inkubation wurde Cyclin E immunopräzipitiert und auf H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden quantitativ unter Verwendung eines Phosphorimagers bestimmt. Hintergrundkonzentrationen der Phosphorylierung, die in Abwesenheit von exogenem Cyclin E beobachtet wurden, wurden von jeder Probe abgezogen.

Fig. 2A

Ein Cdk2-Inhibitor bindet an Cyclin E-Cdk2-Komplexe

[0024] Die angegebenen Extrakte wurden mit Cdk2-Sepharose-Kügelchen (K), Cyclin E-Cdk2-Sepharose-Kügelchen (EK) oder Leerwert-Sepharose-Kügelchen (0) inkubiert. Die Cdk2-Kügelchen enthielten im Vergleich zum Zellextrakt die 2-fache Cdk2-Menge. Die Cyclin E-Cdk2-Kügelchen enthielten im Vergleich zum Zellextrakt etwa die 60-fache Menge Cyclin E. Nach Inkubation wurde ein Teil eines jeden Überstands durch Western Blotting analysiert, um zu bestätigen, dass weder Cyclin E noch Cdk2 aus den Matrices ausgelaugt worden waren. Der Rest des Überstands wurde auf Cdk2-Aktivierung durch Zugabe von 2-physiologischen Mengen an Cyclin E getestet. Cyclin E-Immunopräzipitate wurden auf H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden mit einem Phosphorimager quantitativ bestimmt. Eine partielle Verarmung des Inhibitors durch die Cdk2-Kügelchen kann der Bildung von Cyclin-Cdk2-Komplexen während der Inkubation mit dem Zellextrakt zuzuschreiben sein.

Fig. 2B

Ein Cdk2-Inhibitor bindet an Cyclin E-Cdk2-Komplexe.

[0025] Cdk2 wurde aus Extrakten von kontaktgehemmten Zellen (0) und Zellen, die 15 Stunden in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β von der Kontakthemmung freigesetzt worden waren, immunopräzipitiert. Die Hälfte eines jeden Immunopräzipitats wurde mit Cyclin E plus CAK inkubiert. Die andere Hälfte wurde einer Scheininkubation unterzogen. Jedes Immunopräzipitat wurde sodann auf Histon H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden quantitativ mit einem Phosphorimager bestimmt. Bei fehlender CAK-Zugabe zeigte Cyclin E nur eine sehr geringe Aktivierungswirkung auf immunopräzipitiertes Cdk2 (Daten nicht aufgeführt).

Fig. 2C

Ein Cdk2-Inhibitor bindet an Cyclin E-Cdk2-Komplexe

[0026] Einfluss von Kinase-inaktiver Cdk2 auf die Cyclin E-Aktivität in Extrakten aus Zellen im Wachstumsstillstand. Jeder Extrakt wurde mit einem 5-fachen Überschuss an Cyclin E (unmittelbar an der Cyclin E-Schwelle für dieses Lysat), mit einem 0,5-fachen Überschuss an Kinase-inaktiver Cdk2 (Cdk2K) oder mit beidem inkubiert. Diese Verhältnisse wurden auf der Grundlage empirischer Bestimmungen der maximalen Menge an Cdk2K, die ohne Maskierung des Großteils des zugesetzten Cyclin E zugesetzt werden konnte, gewählt. Cyclin E-Immunopräzipitate wurden auf H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden quantitativ mit einem Phosphorimager bestimmt.

Fig. 3A

Aktivierung von Cdc2 durch Cyclin B

[0027] Cyclin B und Cyclin E wurden zu Extrakten von Zellen, die nach 15-stündiger Kontakthemmung in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β freigesetzt worden waren, gegeben. Nach Zugabe der Cycline wurden die Extrakte aufgeteilt und einer Immunopräzipitation mit Antiseren, die entweder gegen den C-Terminus von Cdc2 oder den C-Terminus von Cdk2 gerichtet waren, unterzogen. Die Immunopräzipitate wurden auf H1-Kinaseaktivität getestet. Die Produkte wurden an einem 12%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die als "endogen" bezeichneten Reaktionen enthalten kein zugesetztes Cyclin.

Fig. 3B

Aktivierung von Cdc2 durch Cyclin B

[0028] Cyclin B wurde zu Extrakten von Zellen, die nach 15-stündiger Kontakthemmung in Gegenwart von (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β freigesetzt worden waren, gegeben. Die Hälfte der einzelnen Reaktionsgemische wurde mit gereinigter CAK versetzt. Cdc2 wurde mit Antikörper gegen den C-Terminus von Cdc2 immunopräzipitiert und auf H1-Kinaseaktivität getestet. Die Ergebnisse wurden quantitativ unter Verwendung eines Phosphorimagers bestimmt.

Fig. 4A

Einfluss von Cyclin D-Cdk4-Komplexen auf die Cyclin E-Aktivität

[0029] Extrakte wurden von kontaktgehemmten Zellen (0) und von Zellen, die 15 Stunden von der Kontakthemmung in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β freigesetzt worden waren, hergestellt. 0,05 µl Sf9-Zelllysate mit einem Gehalt an Cyclin D2, Cdk4, Cyclin D2-Cdk4-Komplexen oder Komplexen mit einem Gehalt an gebundenem D2 zur katalytischen Inaktivierung von Cdk4 (Cdk4K) wurden zu diesen Extrakten zusammen mit physiologischen Mengen an Cyclin E gegeben. Diese Mengen an Cyclin D2 und Cdk4 liegen nahe an den physiologischen Mengen dieser Proteine. Cyclin E wurde immunopräzipitiert und auf damit verbundene Histon H1-Kinaseaktivität getestet.

Fig. 4B

Einfluss von Cyclin D-Cdk4-Komplexen auf die Cyclin E-Aktivität

[0030] Extrakte wurden aus Zellen hergestellt, die nach 15-stündiger Kontakthemmung in Gegenwart (0β15) oder Abwesenheit (15) von TGF-β freigesetzt worden waren. 0,05 µl Sf9-Zelllysat mit einem Gehalt an den angegebenen Cyclin D-Cdk4-Komplexen wurden zu diesen Extrakten in Gegenwart oder Abwesenheit von Cyclin E gegeben. Cyclin E wurde immunopräzipitiert und auf damit verbundene Histon H1-Kinaseaktivität getestet.

Fig. 5A

Ein 27 kD-Cyclin-E-Cdk2-Bindungsprotein

[0031] Kontaktgehemmte Mv1Lu-Zellen wurden aus dem ruhenden Zustand durch erneutes Ausstreichen in geringerer Dichte freigesetzt. Extrakte von mit 35S Methionin markierten Zellen wurden nach 0 und 15 Stunden hergestellt. Einige Kulturen wurden 15 Stunden in Gegenwart von 100 pM TGF-β (0β15) inkubiert. Diese metabolisch markierten Extrakte wurden gemäß den Angaben behandelt und gebundene Proteine wurden in Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und anschließend durch Fluorographie analysiert. Die Wanderung von Molekulargewichtsmarkern ist angegeben. Mit 35S-Methionin markierte Zellextrakte wurden mit Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2-Komplexen inkubiert und gebundene Proteine wurden in Probenpuffer eluiert. Der Pfeil gibt die Wanderung eines 27 kD-Proteins (p27), das spezifisch mit Cyclin E-Cdk2-Komplexen in Extrakten von kontaktgehemmten und mit TGF-β behandelten Zellen assoziiert ist, an.

Fig. 5B

Ein 27 kD-Cyclin E-Cdk2-Bindungsprotein

[0032] Extrakte von metabolisch markierten, kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2 im Vergleich zu Standardbedingungen inkubiert und gebundene Proteine wurden auf die vorstehend angegebene Weise analysiert. Die Anwesenheit von p27 ist angegeben (Pfeil).

Fig. 5C

Ein 27 kD-Cyclin E-Cdk2-Bindungsprotein

[0033] Cyclin D2-Cdk4-Komplexe verhindern die Bindung von p27 an Cyclin E-Cdk2. Extrakte von kontaktgehemmten Zellen wurden mit 4 µl von Baculovirus erzeugtem Cyclin D2-Cdk4-Komplex 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert, wonach die Zugabe des Cyclin E-Cdk2-Komplexes folgte.

Fig. 5D

Ein 27 kD-Cyclin E-Cdk2-Bindungsprotein

[0034] Gewinnung von p27 in Cdk4-Immunopräzipitaten. Überstände von 5C wurden mit einem anti-Cdk4-Antiserum immunopräzipitiert und die Immunopräzipitate wurden an 12% SDS-PAGE analysiert. Der offene Pfeil bei 34 kD zeigt das endogene Nerz-Cdk4-Protein, während der ausgefüllte Pfeil p27, das mit den Cyclin D2-Cdk4-Komplexen assoziiert ist, angibt.

Fig. 6A

Wärmestabilität von p27 und des Cdk2-Inhibitors

[0035] Die p27-Bindung ist wärmestabil und p27 kann aus proliferierenden Zellextrakten durch Wärmebehandlung gewonnen werden. Mv1Lu-Zellen wurden von der Kontakthemmung 15 Stunden mit (0β15) oder ohne (15) TGF-β1 freigesetzt. Zellen wurden metabolisch unter Verwendung von 35S-Methionin markiert. Vor der Inkubation mit Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2-Komplexen wurden die Zellextrakte entweder keiner Vorbehandlung unterzogen oder 3 Minuten auf 100°C erwärmt. Anzumerken ist das Auftreten von p27 (Pfeil) im wärmebehandelten 15 Stunden-Zellextrakt.

Fig. 6B

Wärmestabilität von p27 und des Cdk2-Inhibitors

[0036] Die Cdk2-Inhibitoraktivität kann aus proliferierenden Zellextrakten durch Wärmebehandlung gewonnen werden. Die mit Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität wurde in Extrakten von asynchron proliferierenden Zellen durch Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen humanes Cyclin E gemessen. Als Substrat wurde Histon H1 verwendet. Die Ergebnisse wurden quantitativ mit einem Phosphorimager bestimmt. Bahn 1: keine Zugaben; Bahn 2: der Extrakt wurde mit dem 3-fachen von physiologischen Mengen an Cyclin E ergänzt; Bahn 3: wie in Bahn 2, mit der Ausnahme, dass ferner wärmebehandelter Extrakt von proliferierenden Zellen (vergl. Methoden) zum Zellextrakt gegeben wurde.

Fig. 6C

Wärmestabilität von p27 und des Cdk2-Inhibitors

[0037] Die Cdk2-Inhibitoraktivität war wärmestabil. Extrakte wurden aus kontaktgehemmten Zellen (0), aus Zellen, die 48 Stunden in Gegenwart von TGF-β aus der Kontakthemmung freigesetzt worden waren (0β48) oder asynchron proliferierenden Zellen (Exp) hergestellt. Die mit Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität wurde mit oder ohne Zugabe von exogenem Cyclin E gemessen. In den angegebenen Bahnen wurden Extrakte von proliferierenden Zellen mit einer gleichen Menge an Extrakt von nicht-proliferierenden Zellen, die entweder unbehandelt oder 5 Minuten auf 100°C erwärmt worden waren, vermischt.

Fig. 7A

Hemmung von mit Cyclin E-assoziierter Kinaseaktivität durch gereinigtes p27

[0038] Extrakte von metabolisch markierten, kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen wurden einer Chromatographie an Cdk2- oder Cyclin E-Cdk2-Affinitätssäulen unterworfen. Gebundene Proteine wurden in Puffer von geringem pH-Wert eluiert und durch SDS-PAGE analysiert. In Cyclin E-Cdk2-Eluaten vorhandenes p27 ist angegeben (Pfeil).

Fig. 7B

Eluate von Cdk2- oder Cyclin E-Cdk2-Säulen wurden mit Aceton gefällt und renaturiert (vergl. Methoden)

[0039] Eine Portion eines jeden Eluats wurde zu einem Extrakt von proliferierenden Zellen gegeben. Cyclin E wurde zugegeben und die mit Cyclin E assoziierte Histon H1-Kinaseaktivität wurde gemessen. Die mit Cyclin E assoziierte H1-Kinaseaktivität wurde quantitativ bestimmt und als prozentuale Hemmung im Vergleich zu Extrakten, die keine Zugaben erhalten hatten, aufgetragen.

Fig. 7C

[0040] Renaturierte Eluate wurden mit Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2-Komplexen inkubiert. p27 (Pfeil) ging nach Renaturierung eine Bindung mit Cyclin E-Cdk2 ein.

Fig. 7D

[0041] Eluate von Cyclin E-cdk2-Säulen wurden an 12%-Acrylamidgelen fraktioniert. Die Gele wurden gemäß den Angaben geschnitten und die Proteine wurden eluiert und renaturiert. Eine Portion des aus jedem Gelschnitt gewonnenen Proteins wurde zusammen mit Cyclin E zu Extrakten, die aus proliferierenden Mv1Lu-Zellen hergestellt worden waren, gegeben. Cyclin E-Immunopräzipitate wurden auf Histon H1-Kinaseaktivität getestet.

Fig. 8A, Fig. 8B, Fig. 8C und Fig. 8D

Reinigung, Cyclin E-Cdk2-Wechselwirkung und in vitro-Translation von Kip1

[0042] A: Wärmebehandelte Extrakte von im Ruhezustand befindlichen Mv1Lu-Zellen wurden einer Cyclin E-Cdk2-Affinitätschromatographie unterworfen. Das Eluat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. $p27^{Kip1}$ ist mit einem Pfeil bezeichnet. Bei der breiten Bande handelt es sich um Cdk2-HA und bei der 69 kd-Bande um eine Verunreinigung, die auch in Leerwertbahnen vorhanden ist. B: Extrakte von metabolisch markierten, im Ruhezustand befindlichen Mv1Lu-Zellen wurden mit Präimmun-Kaninchenserum (Kontrolle) oder anti-Cdk2-Antikörper präzipitiert. C: metabolisch markiertes p27, das durch Copräzipitation mit anti-Cdk2-Antikörpern wie im Feld B (in vivo-p27) oder durch Cyclin E-Cdk2-Affinitätschromatographie wie in Feld A (in vitro-p27) erhalten worden war, wurde mit V8-Protease verdaut und durch SDS-PAGE und Fluorographie dargestellt. D: in vitro-Translationen mit einem Gehalt an leerem Vektor (Vektor) oder Vektor, der für mit Histidin markiertes Mäuse-Kip1 (Kip1) kodiert, wurden an Ni^{++}-NTA-Agarose gebunden, einer Siedebehandlung im gleichen Puffer unterworfen und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Fig. 9A und Fig. 9B

Säugetier-Kip1-Sequenzen und Vergleich mit Cip1/WAF1

[0043] A: Aminosäuresequenzen, abgeleitet von Kip1-cDNAs vom Nerz (mk), der Maus (m) und dem Menschen (h). Identische Aminosäuren sind durch Punkte angegeben. Die verfügbare Nerz-Sequenz ist am C-Terminus unvollständig. Peptidsequenzen von gereinigtem Kip1 sind unterstrichen. Eine dicke Unterstreichung gibt die beiden Sequenzen an, die zur Konstruktion von degenerierten Oligonucleotiden für die PCR dienten. B: Sequenzausrichtung zwischen humanem Kip1 und Cip1/WAF1. Das mutmaßliche zweiteilige nukleare Lokalisierungssignal in beiden Proteinen ist unterstrichen. Eine Cdc2-Kinase-Konsensusstelle, die in Kip1 vorhanden ist, ist durch einen dicken Balken gekennzeichnet.

Fig. 10A, Fig. 10B, Fig. 10C, Fig. 10D und Fig. 10E

In vitro-Cdk-Hemmung durch Kip1 und Identifizierung einer Cdk-Inhibitordomäne von Kip1

[0044] Zelllysate mit einem Gehalt an baculoviralem Cyclin E und Cdk2 (A, C) oder die angegebenen Cyclin/Cdk-Kombinationen wurden auf Histon H1-Kinaseaktivität (A, B) und Rb-Kinaseaktivität (C, D) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an Kip1 getestet. Repräsentative Gele mit einem Gehalt an den phosphorylierten Substraten sind angegeben (A, C). Relative Phosphorylierungsgrade wurden quantitativ bestimmt und sind als prozentualer Anteil der Phosphorylierung, die bei Reaktionen ohne Kip1 beobachtet wurde, aufgetragen. E: Schematische Darstellung des Kip1-Proteins unter Angabe der Regionen von höchster Homologie mit Cip1/WAF1 (dunkle Kästchen; vergl. Auch Fig. 9B). Balken und Ziffern geben die Größe und Position der verschiedenen Fragmente wieder, die mit einer C-terminalen Hexahistidin-Markierung erzeugt wurden und in Cdk-Hemmtests verwendet wurden. Die Aktivität dieser Fragmente ist als prozentualer Anteil der Aktivität von Kip1 von voller Länge angegeben.

Fig. 11A und Fig. 11B

Kip1 hemmt in vitro die Aktivierung von Cdk2

[0045] Extrakte von exponentiell wachsenden A549-Zellen wurden mit baculoviral exprimiertem, mit Histidin markiertem Cyclin E allein oder zusammen mit Kip1 inkubiert. Cyclin E-Komplexe wurden sodann mit Ni^{++}-NTA-Agarose aufgespürt und auf Histon H1-Kinaseaktivität (A) und durch Western-Immunoblotting unter Verwendung von anti-Cdk2-Antikörper (B) getestet. Die Kinaseaktivität wurde quantitativ durch ein Phosphorimager bestimmt und in Form von willkürlichen Einheiten angegeben. Bei B zeigt Cdk2* die rascher wandernde Form von Cdk2 an, die Cdk2 entspricht, das an Thr^{160} phosphoryliert ist (Gu et al., 1992).

Fig. 12A und Fig. 12B

Expressionsmuster von Kip1 in verschiedenen Geweben und Zellproliferationszuständen

[0046] Kip1-Northern-Blots unter Verwendung von gleichen Mengen an poly$(A)^+$-RNA aus den angegebenen humanen Geweben (A) oder von Mv1Lu-Zellen in verschiedenen Proliferationszuständen (B). Der letztgenannte Blot wurde mit einer Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase-Sonde rehybridisiert.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0047] Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, gemessen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist.

[0048] Erfindungsgemäß wird die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die zur Ermittlung des Molekulargewichts von 27 kD verwendet wird, unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

[0049] Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich beim erfindungsgemäßen isolierten Protein um ein Säugetierprotein. Beim Säugetierprotein kann es sich um ein murines Protein handeln. Beim Säugetierprotein kann es sich auch um ein humanes Protein handeln. Ferner kann es sich beim Säugetierprotein um ein Nerzprotein handeln. Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich beim Nerzprotein um das Nerzprotein, das sich von Mv1Lu-Zellen ableitet und die in Tabelle I angegebenen partiellen internen Aminosäuresequenzen aufweist.

Tabelle I
Partielle interne Aminosäuresequenzen des von Mv1Lu-Zellen abgeleiteten p27-Proteins

Thr-Asp-Thr-Ala-Asp-Asn-Gln-Ala-Gly-Leu-Ala-Glu-Gln
Gln-Ala-Val-Pro-Leu-Met-Gly-Pro-Gln-Glu
Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Tyr-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro
Tyr-Glu-Trp-Gln-Glu-Val

[0050] Erfindungsgemäß wird das Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, gemessen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist, in synonymer Weise als "p27", "p27-Protein", "Inhibitor", "$p27^{Kip1}$" und "Kip1" bezeichnet.

[0051] Der hier verwendete Ausdruck "isoliert" bedeutet einen Zustand, der frei von etwaigen anderen Proteinen ist. Beispielsweise kann das isolierte Protein Nitrocellulose-Membranfragmente und einen Puffer umfassen.

[0052] Der hier verwendete Ausdruck "zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex befähigt" bedeutet die Fähigkeit zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex, jedoch die Unfähigkeit zur Bindung an Cdk2 allein.

[0053] Die Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes kann beispielsweise unter Anwendung von Tests auf (a) die positionsspezifische Phosphorylierung des Cdk2-Restes des Cyclin E-Cdk2-Komplexes und (b) auf Histon-Kinaseaktivität gemessen werden. Derartige Tests werden nachstehend ausführlicher erläutert. Diese Tests können in kinetischer Weise (d. h. durch Messung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit) oder in Form von qualitativen oder quantitativen statischen Tests (d. h. Messungen, die zu ausgewählten Zeitpunkten vorgenommen werden) durchgeführt werden. Der Fachmann kennt eine Reihe von Enzymen und Zuständen, die bei derartigen Tests herangezogen werden können. Erfindungsgemäß hemmt bei einem kinetischen Test unter Verwendung äquimolarer Mengen an p27 und Cyclin E-Cdk2-Komplex das p27 die Geschwindigkeit der positionsspezifischen Phosphorylierung des Cdk2-Restes des Komplexes (angegeben in Mol Cdk2-Reste, die pro Minute phosphoryliert werden), wenn die Geschwindigkeit um mindestens 50% gehemmt wird.

[0054] Das erfindungsgemäße, isolierte 27 kD-Protein kann beispielsweise durch das Wärmebehandlungsverfahren und durch das Cyclin E-Cdk2-Komplex-Affinitätsverfahren gemäß den nachstehenden Angaben erhalten werden.

[0055] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Protein, das einen Bereich umfasst, der eine Aminosäure-Sequenzhomologie mit dem Bereich des p27-Proteins vom Aminosäurerest +28 bis zum Aminosäurerest +88 einschließlich aufweist (wie in Fig. 9B dargestellt). In einer Ausführungsform weist das Protein Sequenzidentität mit mindestens einem eingerahmten Aminosäurerest im Bereich des p27-Proteins vom Aminosäurerest +28 bis zum Aminosäurerest +88 auf (wie in Fig. 9B dargestellt). Beim Protein kann es sich um ein natürlich vorkommendes Protein oder um ein rekombinantes Protein handeln. In einer Ausführungsform beträgt der Homologiegrad 30%. In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Homologiegrad 40%. In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Homologiegrad 44%. In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Homologiegrad 50%. In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Homologiegrad 90%.

[0056] Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinante Nucleinsäuremoleküle, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren.

[0057] Der hier verwendete Ausdruck "rekombinantes Nucleinsäuremolekül" bedeutet ein Nucleinsäuremolekül, das in der Natur nicht vorkommt, und das durch die Anwendung von rekombinanter Technik erhalten worden ist.

[0058] Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich beim Nucleinsäuremolekül um ein DNA-Molekül. Beim DNA-Molekül kann es sich um ein cDNA-Molekül oder um ein geklontes genomisches DNA-Molekül handeln. Gemäß einer weiteren Ausführungsform handelt es sich beim Nucleinsäuremolekül um ein RNA-Molekül. Beim RNA-Molekül kann es sich um ein mRNA-Molekül handeln.

[0059] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Vektor, der das erfindungsgemäße, rekombinante Nucleinsäuremolekül umfasst. Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich bei dem Vektor um ein Plasmid. Gemäß einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Vektor um ein Virus.

[0060] Erfindungsgemäß können zahlreiche Vektorsysteme für die Expression des erfindungsgemäßen Proteins verwendet werden. Beispielsweise werden in einer Klasse von Vektoren DNA-Elemente verwendet, die sich von tierischen Viren ableiten, z. B. von Rinderpapillomavirus, Polyomavirus, Adenovirus, Kuhpockenvirus, Baculovirus, Retroviren (RSV, MMTV oder MoMLV), Semliki-Forest-Virus oder SV40-Virus. Ferner können Zellen, in deren Chromosomen in stabiler Weise die DNA integriert ist, gewählt werden, indem man einen oder mehrere Marker einführt, die die Wahl der transfizierten Wirtszellen ermöglichen. Der Marker kann beispielsweise für Prototrophie bei einem auxotrophen Wirt, für Biozidresistenz (z. B. gegen Antibiotika) oder für Resistenz gegen Schwermetalle, wie Kupfer oder dergl., sorgen. Das selektierbare Markergen kann direkt mit zu exprimierenden DNA-Sequenzen verknüpft sein oder durch Kotransformation in die gleiche Zelle eingeführt sein. Weitere Elemente können für eine optimale mRNA-Synthese erforderlich sein. Zu diesen Elementen können Spleißsignale sowie transkriptionale Promotoren, Enhancer und Terminationssignale gehören.

[0061] Erfindungsgemäß wird ferner ein Wirt-Vektor-System für die Erzeugung eines Proteins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, gemessen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist, bereitgestellt, wobei das System den erfindungsgemäßen Vektor in einem geeigneten Wirt umfasst.

[0062] Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich beim geeigneten Wirt um eine bakterielle Zelle. Bei einer weiteren Ausführungsform handelt es sich beim geeigneten Wirt um eine eukaryontische Zelle. Bei der eukaryontischen Zelle kann es sich um eine Insektenzelle handeln. Insektenzellen umfassen beispielsweise sf9-Zellen.

[0063] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 27 kD, gemessen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, das zur Bindung an einen Cyclin E-Cdk2-Komplex und zur Hemmung von dessen Aktivierung befähigt ist, wobei das Verfahren das Züchten des erfindungsgemäßen Wirt-Vektor-Systems unter Bedingungen, die die Erzeugung des Proteins ermöglichen, und die Gewinnung des dabei gebildeten Proteins umfasst.

[0064] Verfahren und Bedingungen zum Züchten von Wirt-Vektor-Systemen und zum Gewinnen des auf diese Weise gebildeten Proteins sind dem Fachmann geläufig und können je nach dem spezifischen Vektor und der Wirtszelle, die verwendet werden, variiert oder optimiert werden. Zu derartigen Gewinnungsverfahren gehören beispielsweise die Gelelektrophorese, die Ionenaustauschchromatographie, die Affinitätschromatographie oder Kombinationen davon.

[0065] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes befähigt ist, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (a) geeignete Mengen an p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht; (b) das p27, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit von p27-Protein ermöglichen würden; (c) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und (d) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes größer als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist.

[0066] Der hier verwendete Ausdruck "Mittel" umfasst sowohl Protein- als auch Nichtproteinreste. Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich bei dem Mittel um ein kleines Molekül. Gemäß einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Mittel um ein Protein. Das Mittel kann von einer Bibliothek mit Verbindungen von niederem Molekulargewicht oder einer Bibliothek von Extrakten aus Pflanzen oder anderen Organismen abgeleitet sein.

[0067] Erfindungsgemäß stört ein Mittel, das zu einer spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes befähigt ist, die Wechselwirkung zwischen p27-Protein und einem Cyclin E-Cdk2-Komplex, jedoch nicht die positionsspezifische Phosphorylierung des Cdk2-Restes des Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit von p27-Protein.

[0068] Cyclin E lässt sich unter Anwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren auf der Grundlage der von Koff et al. (1991) beschriebenen Nucleinsäuresequenz, die für Cyclin E kodiert, erhalten. Cdk2 lässt sich unter Anwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren auf der Grundlage der von Elledge und Spottswood (1991) beschriebenen Nucleinsäuresequenz, die für Cdk2 kodiert, erhalten.

[0069] Die Mengen an p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, lassen sich durch Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind, bestimmen. Ein Beispiel für geeignete Bedingungen (d. h. Bedingungen, die zur Messung des Einflusses auf die p27-Funktion durch ein Mittel geeignet sind), unter denen p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel miteinander in Kontakt gebracht werden, ist nachstehend aufgeführt.

[0070] Ein Beispiel für Bedingungen, die die Bildung von aktivem Cyclin E-Cdk2-Komplex in Abwesenheit von p27-Protein ermöglichen, ist ebenfalls nachstehend aufgeführt.

[0071] Der hier verwendete Ausdruck "aktiver Cyclin E-Cdk2-Komplex" bedeutet einen Cyclin E-Cdk2-Komplex, der zur spezifischen Phosphorylierung eines geeigneten Substrats (z. B. Histon H1) befähigt ist. Ein Beispiel für einen aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplex ist nachstehend aufgeführt. Die Menge des aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes korreliert mit dessen messbarer Aktivität. Somit kann eine quantitative Bestimmung der Menge des aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes erreicht werden, indem man die Geschwindigkeit misst, mit der ein Substrat des aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes phosphoryliert wird. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig. Hierzu gehört beispielsweise ein Histon H1-Kinasetest.

[0072] Im erfindungsgemäßen Verfahren können die Cyclin E- und Cdk2-Proteine in Form von getrennten Proteinen oder in Form eines Komplexes vorliegen, bevor sie mit dem Mittel in Kontakt gebracht werden.

[0073] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) geeignete Mengen an p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht; (b) das p27-Protein, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit des p27-Proteins ermöglichen würden; (c) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und (d) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes kleiner als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Verstärkung der Fähigkeit des p27-Proteins zur Hemmung der Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes befähigt ist.

[0074] Erfindungsgemäß beeinträchtigt ein Mittel, das zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, die Wechselwirkung zwischen dem p27-Protein und dem Cyclin E-Cdk2-Komplex, jedoch nicht die positionsspezifische Phosphorylierung des Cdk2-Restes des Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit von p27-Protein.

[0075] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur Nachahmung der Fähigkeit von p27-Protein, die Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: (a) geeignete Mengen an Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung von aktivem Cyclin E-Cdk2-Komplex in Abwesenheit des Mittels ermöglichen würden; (b) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und (c) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin

E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes kleiner als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel dazu befähigt ist, die Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes nachzuahmen.

[0076] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts mit einer hyperproliferativen Störung, wobei das Verfahren die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels, das zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hyperproliferativen Zellen des Subjekts befähigt ist, umfasst, so dass dadurch das Subjekt behandelt wird.

[0077] In der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich beim Subjekt um einen Menschen.

[0078] Bei einer hyperproliferativen Störung handelt es sich um eine Störung, bei der Zellen, die im Subjekt mit der Störung vorliegen, mit einer abnormal hohen Geschwindigkeit proliferieren, wobei die abnormal hohe Geschwindigkeit der Proliferation eine Ursache der Störung darstellt. Bei einer Ausführungsform ist die hyperproliferative Störung aus der Gruppe Krebs und Hyperplasie ausgewählt.

[0079] Die Verabreichung des Mittels kann unter Anwendung beliebiger verschiedener Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind, durchgeführt oder vorgenommen werden. Bei einer Ausführungsform umfasst die Verabreichung eine intravenöse Verabreichung. Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Verabreichung eine intramuskuläre Verabreichung. Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Verabreichung eine subkutane Verabreichung.

[0080] Die therapeutisch wirksame Menge des Mittels kann nach Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind, festgelegt werden.

[0081] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Mittels, das zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hyperproliferativen Zellen eines Subjekts, das an einer hyperproliferativen Störung leidet, befähigt ist, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0082] Pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann geläufig. Hierzu gehören (ohne Beschränkung hierauf) 0,01–0,1 M und vorzugsweise 0,05 M Phosphatpuffer oder 0,8% Kochsalzlösung. Ferner können derartige pharmazeutisch verträgliche Träger wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen umfassen. Zu Beispielen für nicht-wässrige Lösungsmittel gehören Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Zu wässrigen Trägern gehören Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, einschließlich Kochsalzlösung und gepufferte Medien.

[0083] Zu parenteralen Trägern gehören Natriumchloridlösung, Ringer-Dextroselösung, Dextrose- und Natriumchloridlösung, Ringer-Lactat-Lösung oder fixierte Öle. Zu intravenösen Trägern gehören flüssige Nahrungsergänzungsmittel, Elektrolyt-Ergänzungsmittel, z. B. solche auf der Basis von Ringer-Dextroselösung und dergl. Konservierungsmittel und andere Additive können ebenfalls vorhanden sein, z. B. antimikrobielle Mittel, Antioxidationsmittel, chelatbildende Mittel, inerte Gase und dergl.

[0084] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts mit einer hyperproliferativen Störung, wobei das Verfahren die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels an das Subjekt umfasst, wobei das Mittel zur Nachahmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hyperproliferativen Zellen des Subjekts umfasst, wodurch das Subjekt behandelt wird.

[0085] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts mit einer hypoproliferativen Störung, wobei das Verfahren die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Mittels an das Subjekt umfasst, wobei das Mittel zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hypoproliferativen Zellen des Subjekts umfasst, wodurch das Subjekt behandelt wird.

[0086] Bei der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Subjekt um einen Menschen.

[0087] Bei einer hypoproliferativen Störung handelt es sich um eine Störung, bei der Zellen, die im Subjekt vorliegen, mit einer abnormal langsamen Geschwindigkeit proliferieren, wobei die abnormal langsame Proliferationsgeschwindigkeit eine Ursache der Störung darstellt. Bei einer Ausführungsform handelt es sich bei der hypoproliferativen Störung um ein Ulcus. Zu Beispielen für hypoproliferative Zellen gehören terminal differenzierte Zellen in normalem Gewebe und Organen, denen mit Ausnahme von Leber und Knochenmark normalerweise die Fähigkeit zur Regeneration im Anschluss an eine traumatische Schädigung fehlt. Somit eignen sich das erfindungsgemäße Verfahren und die hier identifizierten Mittel zur Stimulation von Gewebe- und Organreparatur bei Subjekten, bei denen ein Bedarf hierfür besteht, sowie zur Bereitstellung von Gewebekulturen von Zellen aus verschiedenen unterschiedlichen Geweben.

[0088] Die therapeutisch wirksame Menge des Mittels kann nach Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind, festgelegt werden.

[0089] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Mittels, das zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit von p27-Protein zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes in den hypoproliferativen Zellen eines Subjekts, das an einer hypoproliferativen Störung leidet, befähigt ist, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0090] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Gewinnung von partiell gereinigten polyklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Bindung. an p27-Protein befähigt sind, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (a) Immunisieren eines Subjekts mit p27-Protein, (b) Gewinnen von Serum, das Antikörper, die zur spezifischen Bindung an p27-Protein befähigt sind, umfasst, vom immunisierten Subjekt, und (c) partielle Reinigung der im Serum vorhandenen Antikörper, wodurch man partiell gereinigte polyklonale Antikörper erhält, die zur spezifischen Bindung an p27-Protein befähigt sind.

[0091] Der hier verwendete Ausdruck "partiell gereinigte Antikörper" bedeutet eine Zusammensetzung, die Antikörper umfasst, die spezifisch an p27-Protein binden, und die weniger Proteinverunreinigungen als das Serum enthält, aus dem die Antikörper stammen. Unter einer Proteinverunreinigung ist ein Protein zu verstehen, das sich von den für p27-Protein spezifischen Antikörpern unterscheidet. Beispielsweise kann es sich bei den partiell gereinigten Antikörpern um ein IgG-Präparat handeln.

[0092] Verfahren zur Gewinnung von Serum aus einem Subjekt sind dem Fachmann geläufig. Verfahren zur partiellen Reinigung von Antikörpern sind dem Fachmann ebenfalls geläufig. Hierzu gehören beispielsweise eine Filtration, eine Ionenaustauschchromatographie und eine Präzipitation.

[0093] Gegenstand der Erfindung sind ferner partiell gereinigte Antikörper, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt worden sind.

[0094] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten monoklonalen Antikörpers, der zur spezifischen Bindung an p27-Protein befähigt ist, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (a) Immunisieren eines Subjekts mit p27-Protein; (b) Gewinnen einer B-Zellen enthaltenden Zellprobe aus dem immunisierten Subjekt; (c) Kontaktieren der auf diese Weise gewonnenen, B-Zellen enthaltenden Zellprobe mit Myelomzellen unter Bedingungen, die eine Fusionierung der Myelomzellen mit den B-Zellen ermöglichen, um Hybridomzellen zu bilden; (d) Isolieren der erhaltenen Probe einer Hybridomzelle, die zur Bildung eines monoklonalen Antikörpers befähigt ist, der zur spezifischen Bindung an p27-Protein befähigt ist; (e) Züchten der auf diese Weise isolierten Hybridomzelle unter Bedingungen, die die Erzeugung des monoklonalen Antikörpers ermöglichen; und (f) Gewinnen des auf diese Weise gebildeten monoklonalen Antikörpers, wodurch man einen gereinigten monoklonalen Antikörper erhält, der zur spezifischen Bindung an p27-Protein befähigt ist. Verfahren zur Herstellung von Hybridomen und monoklonalen Antikörpern sind dem Fachmann geläufig.

[0095] Gegenstand der Erfindung ist ferner die in Stufe (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugte Hybridomzelle.

[0096] Gegenstand der Erfindung ist ferner der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte monoklonale Antikörper.

[0097] Der hier verwendete Ausdruck "gereinigter monoklonaler Antikörper" bedeutet einen monoklonalen Antikörper, der frei von anderen Antikörpern ist.

[0098] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Antikörper, der zur spezifischen Bindung an p27-Protein be-

fähigt ist, wobei der Antikörper mit einem nachweisbaren Marker markiert ist.

[0099] Beim markierten Antikörper kann es sich um einen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper handeln. Bei einer Ausführungsform handelt es sich beim markierten Antikörper um einen gereinigten markierten Antikörper. Der Ausdruck "Antikörper" umfasst beispielsweise sowohl natürlich vorkommende als auch in der Natur nicht vorkommende Antikörper. Speziell umfasst der Ausdruck "Antikörper" polyklonale und monoklonale Antikörper und Fragmente davon. Ferner umfasst der Ausdruck "Antikörper" Chimäre Antikörper und vollständig synthetische Antikörper sowie Fragmente davon. Beim nachweisbaren Marker kann es sich beispielsweise um einen radioaktiven oder fluoreszierenden Marker handeln. Verfahren zum Markieren von Antikörpern sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0100] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Menge an p27-Protein in einer Probe, wobei das Verfahren folgendes umfasst: Kontaktieren der Probe mit dem erfindungsgemäßen Antikörper des Subjekts unter Bedingungen, die dem Antikörper die Bildung eines Komplexes mit in der Probe vorhandenem p27-Protein ermöglichen, quantitatives Bestimmen der Menge des auf diese Weise gebildeten Komplexes und Vergleichen der auf diese Weise bestimmten Menge mit einem bekannten Standard, um dadurch quantitativ die Menge an p27-Protein in der Probe zu bestimmen.

[0101] Bei der Probe kann es sich beispielsweise um eine Zellprobe, eine Gewebeprobe oder eine Protein enthaltende flüssige Probe handeln. Bedingungen, die einem Antikörper die Bildung eines Komplexes mit dessen Antigen ermöglichen, und Verfahren zum Nachweisen der Anwesenheit des auf diese Weise gebildeten Komplexes sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0102] Bei der Menge des vorhandenen p27-Proteins in einer Probe muss es sich bei der Bestimmung nicht um eine absolute Zahl handeln, und zwar in dem Sinn, dass es sich nicht um die tatsächliche Anzahl an p27-Proteinmolekülen oder um die Molzahl des p27-Proteins in der Probe handeln muss. Vielmehr kann die bestimmte Menge lediglich mit dieser Zahl korrelieren.

[0103] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Expressionsgrads von p27 in einer Zellpopulation und ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur Erhöhung oder Verringerung des Expressionsgrads von p27 in einer Zellpopulation befähigt ist. Das Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur Erhöhung oder Verringerung des Expressionsgrads von p27 in einer Zellpopulation befähigt ist, umfasst folgende Stufen: (a) Herstellen von Zellextrakten aus Kontrollzellpopulationen und mit dem Mittel behandelten Zellpopulationen; (b) Isolieren von p27 aus den Zellextrakten (z. B. durch Affinitätschromatographie an einem Cyclin E-Cdk2-Komplex-Festphasen-Affinitätsadsorptionsmittel und Elution davon); (c) quantitative Bestimmung (z. B. in paralleler Weise) des Betrags der p27-Inhibitoraktivität in den Kontrollextrakten und in den mit dem Mittel behandelten Zellextrakten unter Anwendung eines Cyclin E-Cdk2-Kinasetests (z. B. mit dem nachstehend beschriebenen Histon H1-Test). Mittel, die eine erhöhte p27-Expression induzieren, können aufgrund ihrer Fähigkeit zur Erhöhung des Betrags der p27-Inhibitoraktivität im behandelten Zellextrakt in einer Weise identifiziert werden, die von der Transkription abhängig ist, d. h. die Zunahme der p27-Inhibitoraktivität wird verhindert, wenn Zellen ferner mit einem Transkriptionsinhibitor (z. B. Actinomycin D) behandelt werden. Auf ähnliche Weise lassen sich Mittel, die die Expression von p27 verringern, aufgrund ihrer Fähigkeit zur Verringerung des Betrags der p27-Inhibitoraktivität im behandelten Zellextrakt in einer Weise identifizieren, die von der Transkription abhängig ist.

[0104] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine von einem Subjekt erhaltene Zellprobe eine abnormale Menge an p27-Protein aufweist, wobei das Verfahren folgendes umfasst: (a) Gewinnen einer Zellprobe von dem Subjekt; (b) quantitative Bestimmung der Menge an p27-Protein in der auf diese Weise erhaltenen Probe; und (c) Vergleichen der auf diese Weise bestimmten Menge an p27-Protein mit einem bekannten Standard, um dadurch zu bestimmen, ob die vom Subjekt erhaltene Zellprobe eine abnormale Menge an p27-Protein aufweist.

[0105] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung, ob die Menge an p27-Protein in einer Zellprobe, die von einem Subjekt mit einer Krankheit erhalten worden ist, mit der Krankheit korreliert, wobei das Verfahren die Bestimmung umfasst, ob eine vom Subjekt erhaltene Zellprobe eine abnormale Menge an p27-Protein aufweist, wobei eine abnormale Menge an p27-Protein in der Probe darauf hinweist, dass die Menge an p27-Protein in der vom Subjekt mit der Krankheit erhaltenen Zellprobe mit der Krankheit korreliert.

[0106] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Aktivität von p27-Protein in einer Probe, wobei das Verfahren die quantitative Bestimmung von (i) zu der Fähigkeit

des p27-Proteins in der Probe zur Hemmung der Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes und (ii) der Gesamtmenge an p27-Protein in der Probe sowie die Division der Aktivität des auf diese Weise bestimmten p27-Proteins durch die Gesamtmenge des auf diese Weise bestimmten p27-Proteins umfasst, um dadurch quantitativ die spezifische Aktivität von p27-Protein in der Probe zu bestimmen.

[0107] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Testpackung zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren. Gemäß einer Ausführungsform umfasst die Testpackung geeignete Mengen an p27-Protein, Cyclin E und Cdk2. Die Testpackung kann ferner geeignete Puffer und eine Packungsbeilage, in der p27 als Inhibitor der Cyclin E-Cdk2-Komplex-Aktivität beschrieben wird, enthalten.

[0108] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Diagnose einer hyperproliferativen Störung in einem Subjekt, wobei die Störung mit dem Vorliegen einer p27-Protein-Mutation in den Zellen des Subjekts verbunden ist, wobei das Verfahren die Bestimmung des Vorliegens einer p27-Protein-Mutation in den Zellen des Subjekts umfasst, wobei die Mutation mit einer hyperproliferativen Störung verbunden ist, um dadurch eine Diagnose für eine hyperproliferative Störung im Subjekt zu stellen.

[0109] Der hier verwendete Ausdruck "Diagnose" bedeutet die Bestimmung des Vorliegens einer hyperproliferativen Störung in einem Subjekt. Gemäß einer Ausführungsform bedeutet der Ausdruck "Diagnose" zusätzlich Mittel zur Bestimmung des Typs der hyperproliferativen Störung in einem Subjekt.

[0110] Unter dem hier verwendeten Ausdruck "p27-Protein-Mutation" kann eine beliebige Abnormalität in der Primärsequenz von p27-Protein zu verstehen sein, die sich aus einer Abnormalität in der genomischen DNA-Sequenz ergibt, die für das Protein kodiert oder dessen Expression steuert. Beispielsweise kann es sich bei der p27-Protein-Mutation um eine Punktmutation, eine Deletionsmutation eines Teils des p27-Proteins oder um das Fehlen des gesamten p27-Proteins handeln, die sich aus einer Abnormalität im Strukturgen, die für das Protein kodiert, oder in der regulatorischen DNA-Sequenz, die die Expression des Proteins steuert, ergibt.

[0111] Die Bestimmung des Vorliegens einer p27-Protein-Mutation kann nach Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind, erreicht werden. Derartige Verfahren umfassen die Sondenbehandlung einer DNA oder RNA des Subjekts mit einer p27-Nucleinsäuresonde. Derartige Verfahren umfassen ferner die Analyse einer Proteinprobe von dem Subjekt auf p27-Protein-Strukturabnormalitäten oder funktionelle Abnormalitäten, die sich hieraus ergeben.

[0112] In der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Subjekt um einen Menschen und bei der hyperproliferativen Störung um Krebs.

[0113] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge eines rekombinanten Virus, der zur Infektion einer geeigneten Wirtszelle befähigt ist, wobei das rekombinante Virus das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül umfasst, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0114] Bei der "geeigneten Wirtszelle" kann es sich um eine beliebige Zelle handeln, in der das p27-Protein normalerweise in einem gesunden Subjekt erzeugt würde.

[0115] Pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann geläufig. Hierzu gehören (ohne Beschränkung hierauf) 0,01–0,1 M und vorzugsweise 0,05 M Phosphatpuffer oder 0,8% Kochsalzlösung. Ferner kann es sich bei derartigen pharmazeutisch verträglichen Trägern um wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen handeln. Beispiele für nicht-wässrige Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Wässrige Träger umfassen Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, einschließlich Kochsalzlösung und gepufferte Medien. Parenterale Träger umfassen Natriumchloridlösung, Ringer-Dextroselösung, Dextrose- und Natriumchloridlösung, Ringer-Lactat-Lösung oder fixierte Öle. Intravenöse Träger umfassen flüssige Nahrungsergänzungsmittel, Elektrolyt-Ergänzungsmittel, wie solche auf der Basis von Ringer-Dextroselösung und dergl. Es können auch Konservierungsmittel und andere Additive vorhanden sein, z. B, antimikrobielle Mittel, Antioxidationsmittel, chelatbildende Mittel, inerte Gase und dergl.

[0116] Gegenstand der Erfindung ist schließlich ein Verfahren zur Behandlung eins Subjekts, das an einer hyperproliferativen Störung in Verbindung mit dem Vorliegen einer p27-Protein-Mutation in den Zellen des Subjekts leidet, wobei das Verfahren die Verabreichung einer Menge der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine Behandlung des Subjekts bewirkt, an das Subjekt umfasst.

[0117] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Subjekt um einen Menschen und bei der hyperproliferativen Störung um Krebs.

[0118] Um ein Verständnis der Einzelheiten des nachstehenden experimentellen Abschnitts zu erleichtern, wird auf bestimmte, häufig vorkommende Verfahren und/oder Ausdrücke verwiesen, die am besten bei Sambrook et al. (1989) beschrieben sind.

[0119] Ein besseres Verständnis der Erfindung ergibt sich unter Bezugnahme auf den nachstehenden experimentellen Teil, wobei aber für den Fachmann ersichtlich ist, dass die speziellen Experimente, die dort dargelegt sind, nur der Erläuterung der Erfindung dienen, die in vollständigerer Weise in den beigefügten Ansprüchen beschrieben ist.

Experimenteller Teil

I

Zusammenfassung

[0120] Ein Zell-Zell-Kontakt und TGF-β können den Zellzyklus in G1 zum Stillstand bringen. Mv1Lu-Nerz-Epithelzellen, die durch einen der beiden Mechanismen zum Stillstand gebracht worden sind, sind nicht in der Lage, aktive Komplexe mit einem Gehalt an G1-Cyclin, Cyclin E und deren katalytische Untereinheit Cdk2 aufzubauen. Diese Wachstumshemmsignale blockieren die Cdk2-Aktivierung durch Erhöhung der Schwellenkonzentration an Cyclin E, die zur Aktivierung von Cdk2 erforderlich ist. In zum Stillstand gebrachten Zellen liegt die Schwelle über physiologischen Cyclin E-Konzentrationen und wird durch einen Inhibitor bestimmt, der an Cyclin E-Cdk2-Komplexe bindet. Ein 27 kD-Protein, das an Cyclin E-Cdk2-Komplexe bindet und deren Aktivierung verhindert, kann aus zum Stillstand gebrachten Zellen, jedoch nicht aus proliferierenden Zellen unter Anwendung einer Cyclin E-Cdk2-Affinitätschromatographie gereinigt werden. p27 ist in proliferierenden Zellen vorhanden, wird aber maskiert und steht nicht zur Wechselwirkung mit Cyclin E-Cdk2-Komplexen zur Verfügung. Cyclin D2-Cdk4-Komplexe binden kompetitiv an p27 und regulieren dessen Aktivität herunter und können daher in einem Stoffwechselweg eingreifen, der die Cdk2-Hemmung umkehrt und die G1-Fortsetzung ermöglicht.

Verfahren

Zellkultur

[0121] Exponentiell wachsende Mv1Lu-Zellen wurden zum Wachstumsstillstand gebracht, indem man sie bis zur Konfluenz in Gegenwart von 10% fötalem Kälberserum züchtete. Die Zellen wurden aus der Kontakthemmung durch Trypsinierung und Überimpfen unter verdünnten Bedingungen freigesetzt. TGF-β (100 pM) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten den Zellen zugesetzt. Der Eintritt der Zellen in die S-Phase wurde routinemäßig durch Messung des Einbaus von ^{125}I-Desoxyuridin in die DNA bestätigt (Laiho et al., 1990).

Herstellung von rekombinanten Proteinen

[0122] Cyclin E, Cdk2, Cdk2-HA und Cdk2K wurden gemäß dem Verfahren von Desai et al. (1992) hergestellt. Kurz zusammengefasst, 100 mm-Platten von konfluenten Sf9-Zellen wurden mit dem entsprechenden Baculovirus bei einem Wert der Infektionsmultiplizität (m. o. i.-Wert) von 5–20 pfu pro Zelle infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen gesammelt und durch Dounce-Homogenisierung oder Becher-Ultraschallbehandlung in hypotonem Puffer lysiert. Der Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation geklärt und bei –70°C aufbewahrt. Die baculoviralen Vektoren mit einem Gehalt an den Cyclinen D1, D2, D3, Cdk4 und katalytisch inaktivem Cdk4 sind in der Literatur beschrieben (Matsushime et al., 1992; Kato et al., 1993).

Reinigung und Mikrosequenzierung von $p27^{Kip-1}$

[0123] Um p27 in für die Mikrosequenzanalyse ausreichenden Mengen zu reinigen, wurden beim Reinigungsverfahren als Ausgangsmaterial 200 15 cm-Schalen mit einem Gehalt an konfluenten Kulturen von kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen (~2×10^{10} Zellen) verwendet. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung in 33 ml hypotonischem Extraktionspuffer lysiert. Zellbruchstücke wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 200000 × g entfernt. Das Lysat wurde 5 Minuten auf 100°C erwärmt. Das ausgefällte Material wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 100000 × g entfernt. Der Überstand wurde mit 4 × NP-40-Lysispuffer auf NP-40-Lysispuffer-

bedingungen eingestellt (Polyak et al., 1994) und durch zwei aufeinanderfolgende, 30-minütige Inkubationen mit 5 ml Agarose bei 4°C und eine einmalige Inkubation mit 5 ml Nickel-NTA-Agarose unter den gleichen Bedingungen vorgeklärt.

[0124] Das vorgeklärte Lysat ließ man 2 Stunden bei 4°C an eine Affinitätssäule binden. Diese Affinitätssäule bestand aus Nickel-NTA-Agarose mit einem Gehalt an baculoviralem Cdk2 im Komplex mit baculoviralem Cyclin E, das am N-Terminus mit einer Hexahistidinsequenz markiert war, die die Bindung am Nickel-NTA-Agarose ermöglicht. Die Säule wurde 1-mal mit 50 ml NP-40-Lysispuffer und 5-mal mit 50 ml SDS/RIPA-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 5 ml einer mit HEPES gepufferten Lösung (pH-Wert 7,0) mit einem Gehalt an 6 M Guanidiniumhydrochlorid eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen mit HEPES gepufferte Lösung dialysiert. Proteine wurden mit dem 4-fachen Volumen an Aceton durch 30-minütige Behandlung bei –20°C gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 20000 × g gewonnen, in SDS-Elektrophorese-Probenpuffer mit einem Gehalt an Dithiothreit in Lösung gebracht und der Elektrophorese an einem 12%igen Polyacrylamidgel unterworfen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht bei 35 V in Tris/Glycin/Methanol-Übertragungspuffer einem Blotting auf Nitrocellulose unterworfen.

[0125] Die Nitrocellulosemembran wurde zum Nachweis von Proteinen mit Ponceau-Färbemittel gefärbt. Gemäß diesem Test enthielten die Filter nur zwei Proteine, die gut voneinander getrennt waren und 27 kd bzw. 34 kd aufwiesen. Diese Proteine wurden als p27 und $p34^{cdk2}$ identifiziert. Zwei getrennte Präparationen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Die Ausbeute an p27 bei diesen beiden Präparationen betrug etwa 0,3 µg bzw. 1 µg, ermittelt durch Ponceau-Färbung und Mikrosequenzierung.

[0126] Bei der Vorbereitung für die Mikrosequenzanalyse wurde das Protein auf der Nitrocellulose, das das gereinigte p27 enthielt, ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterworfen. Nach HPLC der tryptischen Verdauungsprodukte wurden die folgenden Peptide sequenziert:

1. Asn-Leu-Tyr-Pro-Leu-Thr-Asn-Tyr-Thr-Phe
2. Thr-Asp-Thr-Ala-Asp-Asn-Gln-Ala-Gly-Leu-Ala-Glu-Gln
3. Gln-Ala-Val-Pro-Leu-Met-Gly-Pro-Gln-Glu
4. Leu-Pro-Glu-Phe-Tyr-Tyr-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro
5. Tyr-Glu-Trp-Gln-Glu-Val

[0127] Zwischen diesen beiden Sequenzen und Proteinsequenzen, die bei den Datenbanken Genbak, EMBL Data Library, Brookhaven Protein Databank, Swiss Prot oder PIR gemäß den am 31. Dezember 1993 verfügbaren Updates hinterlegt worden waren, wurden keine Ähnlichkeiten festgestellt.

Oligonucleotide zur Gewinnung von p27-cDNA

[0128] Oligonucleotide zur Verwendung bei der Ermittlung der cDNA-Sequenz von p27 in voller Länge sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II

Peptid #1:	keines
Peptid #2:	
Sense	5'-AC(N)-GA(T/C)-AC(N)-GA(T/C)-AA(T/C)-CA(A/G)-GC-3'
Antisense	5'-(N)GC-(T/C)TG-(A/G)TT-(A/G)TC-(N)GC-(N) GT-(A/G)TC-(N)GT-3'
Peptid #3:	
Sense	5'-CA(A/G)-GC(N)-GT(N)-CC(N)-CT(N)-ATG-GG-3'
und	5'-CA(A/G)-GC(N)-GT(N)-CC(N)-TT(A/G)-ATG-GG-3'
Antisense	5'-(N)CC-CAT-(N)AG-(N)GG-(N)AC-(N)GC-(T/C) TG-3'
und	5'-(N)CC-CAT-(T/C)AA-(N)GG-(N)AC-(N)GC-(T/C)T G-3'
Peptid #4:	
Sense	5'-CC(N)-GA(A/G)-TT(T/C)-TA(T/C)-TA(T/C)-(C/A)G-3'
Antisense	5'-C(T/G)-(A/G)TA-(A/G)TA-(A/G)AA-(T/C)TC-(N)GG-3'
Peptid #5:	
Sense	5'-TA(T/C)-GA(A/G)-TGG-CA(A/G)-GA(A/G)-GT-3'
Antisense	5'-(N)AC-(T/C)TC-(T/C)TG-CCA-(T/C)TC-(A/G) TA-3'

CAK

[0129] CAK wurde aus Xenopus-Eierextrakten durch die Mono Q-Stufe genau nach den Angaben von Solomon et al., 1993, gereinigt und in einer Endkonzentration von 1–2 Einheiten pro ml verwendet.

Metabolische Markierung

[0130] Mv1Lu-Kulturen in 150 mm-Schalen wurden 30 Minuten in methioninfreiem Medium, das mit 10% dialysiertem fötalem Kälberserum ergänzt war, inkubiert und anschließend 2 Stunden im gleichen Medium mit 200 µCi/ml 35S-Methionin (Trans 35S label, ICN) inkubiert. Zellen wurden durch Trypsinierung gewonnen und 5 Minuten mit 2000 g zentrifugiert. Zellpellets wurden durch 30-minütiges mäßiges Schütteln bei 4°C in 10 Volumenteilen NP40-Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7, 4, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,3 mM Na-orthovanadat, 50 mM NaF, 80 µM β-Glycerophosphat, 20 mM Na-pyrophosphat, 0,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren) lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation (10000 g 15 Minuten bei 4°C) geklärt. Vor den Bindungsreaktionen wurden die Überstände 2-mal mit Sepharose und 1-mal mit Protein A-Sepharose vorgeklärt.

Cdk-Aktivierungstest

[0131] Die angegebenen Mengen an von Baculovirus exprimiertem rekombinantem Cyclin, Cdk oder Cyclin-Cdk-Komplex wurden zu 50 µg-Extrakten gegeben, die durch Ultraschallbehandlung in einem hypotonischem Puffer gemäß Literaturangaben (Koff et al., 1993) hergestellt worden waren. In sämtlichen Fällen wurden die exogenen Cyclin- und Cdk-Produkte in Form eines unfraktionierten Sf9-Zelllysats zugegeben. Cycline und Cdks enthalten typischerweise mindestens 1–3% gesamtes Zellprotein. Uninfizierte Sf9-Zelllysate wurden in sämtlichen Tests getestet und wiesen keine Aktivität auf. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch auf 0,5% NP40, 250 mM NaCl eingestellt und mit dem angegebenen Antikörper immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden anschließend auf Histon H1-Kinaseaktivität gemäß Literaturangaben (Koff et al., 1993) getestet. Für Experimente, bei denen der Einfluss der D- Cycline und von Cdk4 auf die Cyclin E-Aktivität getestet wurde, wurden sämtliche Cycline und Cdks zusammen zum Zellextrakt gegeben. Eine Wärmebehandlung der Extrakte wurde durch 5-minütige Inkubation der Extrakte bei 100°C durchgeführt. Koaguliertes Protein wurde sodann durch Mikrozentrifugation pelletisiert. Für Experimente, bei denen Cdk2-Immunopräzipitate auf Aktivierung durch Cyclin E getestet wurden, wurden 20 µl Antiserum gegen den C-Terminus von CDK2 (Koff et al, 1993) an Protein A-Sepharose adsorbiert und mit NP40-RIPA-Puffer ausgewaschen. 300 µg

Extrakt wurden sodann 90 Minuten bei 4°C mit anti-CDK2-Sepharose inkubiert. Das Präzipitat wurde 2-mal mit NP40-RIPA-Puffer und 4-mal mit Puffer A mit einem Gehalt an 10 mM ATP gewaschen. Cyclin E und CAK wurden gemäß den nachstehenden Angaben zugesetzt. Die Reaktionsgemische wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf H1-Kinaseaktivität getestet.

Inhibitorverarmung

[0132] Cyclin E-Cdk2-Sepharose wurde durch Vermischen von 1,2 µl Sf9-Zelllysat, das Hämagglutinin-markiertes Cdk2 (Cdk2-HA) enthielt, mit 12 µl Lysat, das Cyclin E in Puffer A (30 mM HEPES-KOH, pH-Wert 7,5, 7,5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) mit einem Gehalt an 10 mM ATP enthielt, hergestellt und 30 Minuten bis zur vollständigen Bildung inkubiert. Das Zusammenbau-Reaktionsgemisch wurde sodann auf 250 mM NaCl und 0,5% NP40 eingestellt. Die Cdk2-HA enthaltenden Komplexe wurden mit dem monoklonalen 12CA5-Antikörper (BABCO) immunopräzipitiert und an Protein A-Sepharose gewonnen. Cdk2-Sepharose wurde auf identische Weise hergestellt, mit der Ausnahme, dass Cyclin E weggelassen wurde. Immunopräzipitate wurden 2-mal mit NP40 RIPA-Puffer (0,5% NP40, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4) und 4-mal mit Puffer A gewaschen. Die Matrix wurde in vier Aliquotanteile unterteilt und mit 100 µg Zellextrakt in Puffer A mit einem Gehalt an 3 mM ATP, 20 µg/ml Creatin-phosphokinase, 40 mM Phosphocreatin 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand gewonnen und durch Zugabe von rekombinantem Cyclin E gemäß den vorstehenden Angaben auf Cdk2-Aktivierung getestet. Ein kritischer Parameter bei der Durchführung dieses Experiments besteht darin, zu gewährleisten, dass kein Cyclin, Cdk oder Komplex aus den Kügelchen in den Zellextrakt austritt. Dies lässt sich nicht vorhersagen und muss jedes Mal bei der Durchführung des Experiments durch Immunoblotting geprüft werden.

Cyclin E-Cdk2-Bindungstests

[0133] Komplexe von baculoviralem Cyclin E mit baculoviralem Cdk2 mit einem Gehalt an dem Influenzavirus-Hämagglutinin-Epitop HA1 wurden auf die nachstehend beschriebene Weise gebildet. Die Komplexe wurden in NP40-RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 250 mM NaCl, 0,5% NP-40, 50 mM NaF, 0,3 mM Na-orthovanadat, 5 mM EDTA und Proteaseinhibitoren) mit monoklonalen anti-HA-Antikörpern (12CA5, BABCO) immunopräzipitiert und an Protein A-Sepharose gebunden. Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2, die an Protein A-Sepharose adsorbiert waren, wurden mit metabolisch markierten Zelllysaten von 10^7 Zellen 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Kügelchen mehrmals mit SDS-RIPA-Puffer gewaschen. Die Proteine wurden durch Erwärmen in SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und an 12%-Polyacrylamidgelen unter anschließender Fluorographie analysiert. Die der Wärmebehandlung unterzogenen, metabolisch markierten Zelllysate wurden 3 Minuten auf 100°C erwärmt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Mikrozentrifugation entfernt. Die geklärten Lysate wurden mit an Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2-Komplexen, die an Protein A-Sepharose gebunden waren, inkubiert. Bei den Bindungstests unter Verwendung von Cyclin D2-Cdk4-Komplexen wurden metabolisch markierte Zellextrakte mit 4 µl Cyclin D2-Cdk4-Komplex 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert, bevor an Protein A-Sepharose gebundenes Cdk2 oder Cyclin E-Cdk2 zugesetzt wurden. Nach Entfernung der Sepharosekügelchen wurden die Zellextrakte mit Cdk4-Antiserum immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden an 12%-SDS-PAGE analysiert.

Affinitätsreiniguag von p27 und Denaturierungs-Renaturierungsexperimente

[0134] HA-markiertes Cdk2, allein oder im Komplex mit Cyclin E, wurde an HA-Antikörper, der an Protein A-Sepharosekügelchen (ImmunoPure Orientation Kit, Pierce) immobilisiert war, gebunden und zum Isolieren von Proteinen aus metabolisch markierten Zelllysaten verwendet. Gebundene Proteine wurden von der Säule in 0,1 M Glycin, pH-Wert 2,8, eluiert und mit 4 Volumenteilen eiskaltem Aceton gefällt und 20 Minuten bei –20°C belassen. Die durch 30-minütige Mikrozentrifugation gewonnenen Niederschläge wurden mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen und in 6 M Guanidiniumchlorid in 1 × HBB-Puffer (25 mM HEPES-KOH, pH-Wert 7,7, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,05% NP-40, 1 mM DTT) gelöst. Zur Renaturierung (Kaelin et al., 1992) wurden Proben über Nacht gegen 1 × HBB-Puffer dialysiert und entweder bei Kinase-Hemmtests oder zur Bindung an Cyclin E-Cdk2-Sepharose verwendet. Für mit Cyclin E assoziierte H1-Kinase-Hemmtests wurden Aliquotanteile (37,511 g Protein) von 100000 × g-Überständen von Lysaten, die aus exponentiell wachsenden Mv1Lu-Zellen hergestellt worden waren, 30 Minuten bei 37°C mit physiologischen Mengen an baculoviralem Cyclin E entweder allein oder in Gegenwart der angegebenen Volumina an renaturierten Eluaten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit Cyclin E-Antiserum gefällt und auf Histon H1-Kinaseaktivität getestet. Die relative, mit Cyclin E-assoziierte H1-Kinaseaktivität wurde unter Verwendung der Molecular Dynamics Phosphorimager ImageQuant-Software quantitativ bestimmt.

[0135] Zum Testen der Aktivität des aus den Gelscheiben eluierten Proteins ließ man Cyclin E-Cdk2-HA-Affinitätssäuleneluate an 12%-Polyacrylamidgelen zusammen mit Molekulargewichtsmarkern (Amersham) laufen. Ein Teil der Probe wurde über das gleiche Gel gegeben, mit Commassie gefärbt, entfärbt und durch Fluorographie nachgewiesen. Das Gel wurde gemäß den Angaben geschnitten (0,5 bis 1 cm/Scheibe). Die Proteine wurden aus dem Gel gemäß Literaturangaben (Boyle et al., 1991) isoliert. Die isolierten Proteine wurden renaturiert und gemäß den nachstehenden Angaben für Kinase-Hemmtests verwendet.

Ergebnisse

Nicht-proliferierende Zellen enthalten einen Inhibitor der Cdk2-Aktivierung

[0136] Zellfreie Extrakte von kontaktgehemmten, durch TGF-β zum Stillstand gekommene und proliferierende Zellen wurden zur Untersuchung des Mechanismus, der die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes blockiert, verwendet. Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von physiologischen Mengen Cyclin E zu diesen Zellextrakten zu einer Erhöhung der Menge an immunopräzipitierbaren Cyclin E-Cdk2-Komplexen führt. Jedoch waren nur die in Extrakten aus proliferierenden Zellen zusammengebauten Cyclin E-Cdk2-Komplexe bei Verwendung von Histon H1 als Substrat enzymatisch aktiv (Koff et al., 1993; vergl. auch **Fig. 1A**). Daher wiederholen Zellextrakte die in intakten Zellen beobachtete Blockierung der Cdk2-Aktivierung.

[0137] Die Blockierung der Cdk2-Aktivierung in Extrakten aus nicht-proliferierenden Zellen konnte durch Zugabe von Cyclin E-Protein in überphysiologischen Konzentrationen überwunden werden (**Fig. 1A**). Cyclin E wurde in Sf9-Zellen unter Verwendung eines baculoviralen Expressionsvektors exprimiert. Die Menge an Cyclin E in Sf9-Extrakten wurde mit der Menge in Mv1Lu-Zellextrakten durch Immunoblotting verglichen (nicht dargestellt). In dem in **Fig. 1A** dargestellten Experiment enthielten 0,05 µl Sf9-Lysat ebensoviel Cyclin E wie 50 µg des gesamten Zellproteins aus Mv1Lu-Zelllysaten. Die Zugabe von Cyclin E (in Form von Sf9-Lysat) zu einem Extrakt aus proliferierenden Zellen ergab eine lineare Zunahme der mit Cyclin E assoziierten Histon H1-Kinaseaktivität (proliferierende Zellen wurden 15 Stunden nach Lösung der Kontakthemmung geerntet, wobei sie sich zu diesem Zeitpunkt in der frühen S-Phase befanden). Im Gegensatz dazu führte eine Titration von Extrakten aus kontaktgehemmten oder mit TGF-β behandelten Zellen mit bis zu 3-fachen physiologischen Konzentrationen an Cyclin E zu keiner Zunahme der immunopräzipitierbaren, mit Cyclin E assoziierten Kinaseaktivität. Bei Zugabe von mehr Cyclin E wurde die mit Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität nachweisbar und nahm proportional zu. Somit zeigten Extrakte aus nicht-proliferierenden Zellen eine erhöhte Schwellenkonzentration an Cyclin E, die zur Aktivierung von Cdk2 erforderlich war. Kontaktgehemmte Zellen wiesen offensichtlich einen höheren Schwellenwert auf als Zellen, die durch Einwirkung von TGF-β in G1 zum Stillstand gekommen waren. Jedoch war in beiden Fällen der Cyclin E-Bedarf erheblich höher als die in proliferierenden Zellen erreichten physiologischen Cyclin E-Konzentrationen.

[0138] Überphysiologische Mengen an Cyclin E waren zur Aktivierung von Cdk2 in Extrakten aus nicht-proliferierenden Zellen erforderlich. Dies konnte weder durch die geringeren Konzentrationen an Cdk2 oder Cyclin E erklärt werden, noch fehlten diesen Zellen offensichtlich andere Faktoren, die für die Cdk2-Aktivierung erforderlich waren (Koff et al., 1993; vergl. die nachstehenden Ausführungen). Eine Erklärung bestand darin, dass die nicht-proliferierenden Zellen einen titrierbaren Inhibitor der Cdk2-Aktivierung enthielten. Mischexperimente stützten diesen Schluss. Extrakte aus proliferierenden Zellen wurden mit Extrakten entweder von kontaktgehemmten Zellen oder von mit TGF-β behandelten Zellen vermischt. Physiologische Konzentrationen an Cyclin E wurden zu den Extraktgemischen gegeben und anschließend wurden Cyclin E und etwaige assoziierte Kinasen unter Verwendung von Antikörpern gegen das Cyclin immunopräzipitiert. Identische Ergebnisse wurden unter Verwendung eines anti-Cdk2-Antiserums erhalten (nicht dargestellt). In den gemischten Extrakten war die mit Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität unter die Aktivität verringert, die aus Extrakten von proliferierenden Zellen allein gewonnen wurde (**Fig. 1B**). Somit enthielten Extrakte aus nicht-proliferierenden Zellen einen Überschuss eines Inhibitors der Cdk2-Aktivierung. Es ist darauf hinzuweisen, dass Extrakte aus kontaktgehemmten Zellen sowohl eine höhere Cyclin E-Aktivierungsschwelle als auch eine stärkere Hemmwirkung bei Mischexperimenten aufwiesen, verglichen mit Extrakten von mit TGF-β behandelten Zellen. Jedoch hing das reichliche Vorliegen der Cdk2-Hemmaktivität von der Dauer der Einwirkung von TGF-β ab. Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein Extrakt von Zellen, die 6 Stunden (beginnend in der späten G1-Phase) mit TGF-β behandelt worden waren, keine ausreichende Hemmaktivität zur Blockierung der Cdk2-Aktivierung aufwiesen, wenn sie mit einem Extrakt aus proliferierenden Zellen vermischt wurden (Koff et al., 1993). Zellen, die 48 Stunden mit TGF-β behandelt worden waren, wiesen eine stärkere Hemmaktivität auf als Zellen, die nur 15 Stunden behandelt worden waren (nicht dargestellt).

Ein Cdk2-Inhibitor bindet an Cyclin E-Cdk2-Komplexe

[0139] Der in Extrakten aus nicht-proliferierenden Zellen vorhandene Inhibitor der Cdk2-Aktivierung konnte unter Verwendung einer Cyclin E-Cdk2-Affinitätsmatrix einer Verarmung unterzogen werden. Cyclin E-Cdk2-Komplexe wurden durch Mischen von Extrakten aus Sf9-Zellen, die mit baculoviralen Vektoren infiziert waren, die entweder Cdk2, das mit einem Influenzavirus-Hämagglutinin (HA)-Epitop markiert war, oder Cyclin E exprimierten, gebildet. Obgleich kein Extrakt allein eine signifikante H1-Kinaseaktivität enthält, führt ein Mischen der Extrakte zu hohen Konzentrationen an aktivem Enzym (Kato et al., 1993). Die Cyclin E-Cdk2 (HA)-Komplexe wurden mit an Sepharose gebundenem, monoklonalem Antikörper gegen die HA-Markierung an Cdk2 immunopräzipitiert. Kontroll-Immunopräzipitationsvorgänge wurden unter Verwendung der monoklonalen Antikörperkügelchen allein durchgeführt. Zellextrakte wurden entweder mit den Cyclin E-Cdk2-Kügelchen oder den Kontrollkügelchen inkubiert. Nach Pelletisierung wurden die Überstände auf die Fähigkeit von exogen zugesetztem Cyclin E zur Aktivierung von endogenem Cdk2 getestet. Nach Verarmung an Cyclin E-Cdk2-Bindungsproteinen war Cyclin E zur Aktivierung von Cdk2 fast in gleichem Maße in Extrakten aus proliferierenden Zellen und aus nicht-proliferierenden Zellen befähigt (**Fig. 2A**). Ein Immunoblotting zeigte, dass diese Vorgehensweise keinen Einfluss auf die Konzentrationen an Cyclin E oder Cdk2 in Zellextrakten ausübte (nicht dargestellt). Bei diesem Experiment wurde auch eine gewisse stimulatorische Wirkung der Verarmung an Cyclin E-Cdk2-Bindungsproteinen in Extrakten aus proliferierenden Zellen in der späten G1-Phase beobachtet, was darauf schließen lässt, dass sie nicht vollständig frei von Inhibitor sind (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Komplexe mit einem Gehalt an Cyclin E und einer katalytisch inaktiven Mutante von Cdk2 waren ferner zur Maskierung der Hemmaktivität befähigt, wenn sie direkt zu Zellextrakten gegeben wurden (vergl. **Fig. 2C**). Diese Umkehr der Hemmaktivität erforderte keine Phosphorylierung durch die zugesetzten Cyclin E-Cdk2-Komplexe. Diese Experimente zeigten, dass der Inhibitor der Cdk2-Aktivierung eine Bindung mit Cyclin E-Cdk2-Komplexen einging.

[0140] Parallel wurde festgestellt, dass Kügelchen, die nur Cdk2 allein enthielten, nicht zur Verarmung der Hemmaktivität aus Zellextrakten befähigt waren (**Fig. 2A**). Dieses Experiment ließ darauf schließen, dass der Inhibitor eine Bindung mit Cyclin E-Cdk2-Komplexen, jedoch nicht mit Cdk2 allein einging. Um diese Vorstellung direkt zu testen, wurde Cdk2 aus Extrakten von proliferierenden, kontaktgehemmten und mit TGF-β behandelten Zellen immunopräzipitiert. In sämtlichen Fällen konnte das immunopräzipitierte Cdk2-Protein durch Zugabe sowohl von Cyclin E als auch von p34cdc2-aktivierender Kinase (CAK) aktiviert werden (**Fig. 2B**). Somit war Cdk2-Protein in nicht-proliferierenden Zellen weder von Natur aus zur Aktivierung unfähig, noch fest mit einem Inhibitor der Aktivierung assoziiert.

[0141] Da der Cdk2-Inhibitor nur an Cyclin E-Cdk2-Komplexe, jedoch nicht an Cdk2 binden kann, erkennt er offensichtlich entweder den Cyclin-Cdk-Komplex oder Cyclin. Cyclin E-Cdk2-Komplexe waren in Bezug auf die Beseitigung der Hemmaktivität wirksamer als Cyclin E, was darauf schließen lässt, dass der Inhibitor vorzugsweise in Wechselwirkung mit Komplexen tritt. Cyclin E wurde zu einem Extrakt aus nicht-proliferierenden Zellen in einer unterhalb der Schwellenkonzentration, die zur Aktivierung von Cdk2 erforderlich war, liegenden Konzentration gegeben (**Fig. 2C**). Der Zusammenbau der zusätzlichen Cyclin-Cdk2-Komplexe wurde sodann durch ergänzende Extrakte mit einem exogenen Cdk2-Protein, das durch Mutation seiner ATP-Bindungsstelle katalytisch inaktiv gemacht worden war (Gu et al., 1992), induziert. In Abwesenheit von zusätzlichem Cdk2 wurde in Cyclin E-Immunopräzipitaten keine Kinaseaktivität nachgewiesen. Wenn Extrakte mit katalytisch inaktivem Cdk2 ergänzt wurden, gewann Cyclin E wieder seine H1-Kinaseaktivität als ein Ergebnis der Aktivierung des endogenen Cdk2. Somit konnte der Cyclin E-Schwellenwert für die Cdk2-Aktivierung durch Zusammenbau zusätzlicher Cyclin-Cdk-Komplexe gesenkt werden, während die Gesamtmenge an Cyclin E konstant gehalten wurde.

Beim Inhibitor handelt es sich weder um eine anti-CAK noch um eine Tyrosin-kinase

[0142] Frühere Experimente (Koff et al., 1993) zeigten, dass in Extrakten aus nicht-proliferierenden Zellen gebildete Cyclin E-Cdk2-Komplexe an einem wesentlichen Threoninrest nicht phosphoryliert wurden (Gu et al., 1992; Solomon et al., 1992), was vermutlich für ihre Inaktivität verantwortlich ist. Dadurch kam man auf die Möglichkeit, dass CAK ein Ziel des Inhibitors darstellt. Dies schien anfänglich unwahrscheinlich, da der Inhibitor direkt eine Bindung mit dem Cyclin E-Cdk2-Komplex eingeht. Diese Idee wurde im Hinblick auf die neue Erkenntnis, dass CAK selbst ein entferntes Mitglied der Cdk-Proteinfamilie ist (Fesquet et al., 1993; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993) und somit auch an den Inhibitor binden könnte, erneut aufgegriffen. Frühere Arbeiten über ein anderes System lieferten den Hinweis, dass eine Aktivierung des Cyclin B-Cdc2-Komplexes nicht durch den Cdk2-Inhibitor blockiert wurde (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Cyclin B und Cdc2 wurden daher zur Bestimmung der CAK-Aktivität herangezogen, und zwar in Anbetracht der Tatsache, dass

CAK auch zur Aktivierung des Cyclin B-Cdc2-Komplexes erforderlich ist (Solomon et al., 1990).

[0143] Cdc2 wurde gleichermaßen aktiviert, wenn Cyclin B zu Extrakten entweder aus proliferierenden Zellen oder aus durch TGF-β zum Stillstand gekommenen Zellen gegeben wurde (Fig. 3A). Daher war in Extrakten aus mit TGF-β behandelten Zellen funktionelle CAK vorhanden. CAK war bei diesem Experiment begrenzend, da die Zugabe von gereinigter CAK zu diesen Extrakten die Aktivierung von zusätzlichen Cyclin B-Cdc2-Komplexen katalysierte (Fig. 3B). Außerdem war die Aktivität der zugesetzten CAK in Extrakten von mit TGF-β behandelten und proliferierenden Zellen ähnlich (Fig. 3B). Somit wurde exogene CAK nicht gehemmt. Kontrollexperimente zeigten, dass diese CAK zur Aktivierung von Cyclin E-Cdk2-Komplexen befähigt war, wenn diese durch Vermischen von Sf9-Zelllysaten mit einem Gehalt an Cyclin E und Cdk2, die aus baculoviralen Vektoren exprimiert worden waren, zusammengesetzt wurde (Solomon et al, 1993; Daten nicht aufgeführt). Jedoch veränderte das zugesetzte CAK nicht die Schwellenkonzentration für Cyclin E, die zur Aktivierung von Cdk2 erforderlich war (nicht dargestellt). Somit bewirkte der Inhibitor weder eine Blockierung von CAK, noch konnten seine Einflüsse durch übermäßige Mengen an CAK überwunden werden. Eine Hemmung von CAK reichte nicht aus, um die Blockierung der Cdk2-Aktivierung zu erklären.

[0144] Um festzustellen, ob die Tyrosin-Phosphorylierung einen Beitrag zur Hemmung der Cdk2-Aktivität leistete, wurde Cyclin E zu Extrakten von nicht-proliferierenden Zellen in Konzentrationen unterhalb des Schwellenwerts gegeben und die Cyclin E-Cdk2-Komplexe wurden unter Verwendung von anti-Cyclin E- Antikörpern immunopräzipitiert. Es wurde keine Tyrosin-Phosphorylierung von Cdk2 in den inaktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexen durch Immunoblotting mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern nachgewiesen (nicht dargestellt). Als positive Kontrolle wurde Phosphotyrosin ohne weiteres in Cdc2, das aus humanen Zellen immunopräzipitiert worden war, nachgewiesen.

Cyclin D2-Cdk4-Komplexe erleichtern die Cdk2-Aktivierung

[0145] Während Zellen die G1-Phase durchlaufen, treten Komplexe zwischen Cdk4 und den D-Typ-Cyclinen vor der Bildung von aktiven Komplexen mit einem Gehalt an Cyclin E und Cdk2 auf (Übersichtsartikel von Sherr, 1993). Kontaktgehemmte Mv1Lu-Zellen exprimierten keine signifikanten Konzentrationen an Cyclin D1 oder D2 (nicht dargestellt) und die Cdk4-Synthese wird in Zellen, die in der Phase G1 zum Stillstand gekommen sind, durch Einwirkung von TGF-β unterdrückt (Ewen et al., 1993; K. P und J. M., unveröffentlichte Beobachtungen; vergl. auch Fig. 5D). Somit ist die Anreicherung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in Zellen mit Stillstand in der G1-Phase begrenzend. Diese Beobachtungen lieben darauf schließen, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe möglicherweise eine Rolle bei der Entfernung des Cdk2-Inhibitors während der Zellzyklus-Progression spielen. Tatsächlich zeigten Ewen et al. (1993b) kürzlich, dass eine konstitutive ektopische Expression von Cdk4 die TGF-β-Blockierung der Cdk2-Aktivierung und der Zellzyklus-Progression umstoßen kann. Diese Erscheinung wurde getestet, indem man prüfte, ob die Wiederherstellung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen in Extrakten von nicht-proliferierenden Zellen die Blockierung der Cdk2-Aktivierung überwinden kann.

[0146] Cdk4 ist ein Partner der Cycline vom D-Typ und bildet keine aktiven Komplexe mit den Cyclinen E, A oder B. Es tritt gleichermaßen gut in Wechselwirkung mit den einzelnen Cyclinen vom D-Typ, wenn sie in Insektenzellen koexprimiert werden. Cyclin D-Cdk4-Komplexe sind schwach aktiv gegenüber Histon H1, zeigen aber eine starke Aktivität bei Verwendung des Rb-Proteins als Substrat (Matsushime et al., 1992; Kato et al., 1993). Komplexe zwischen Cdk4 und entweder Cyclin D1, D2 oder D3 wurden durch Koinfektion von Sf9-Zellen mit baculoviralen Vektoren zusammengebaut und Sf9-Lysate wurden zu Extrakten von proliferierenden und nicht-proliferierenden Mv1Lu-Zellen gegeben. Cyclin E-Mengen unterhalb der Schwellenwerte wurden sodann zugesetzt. Die Aktivierung von Cdk2 wurde nach Immunopräzipitation von Cyclin E-Cdk2-Komplexen mit Antikörpern gegen Cyclin E getestet. Die Zugabe von Cyclin D2-Cdk4-Komplexen (jedoch nicht die Zugabe der beiden Untereinheiten allein) zu Extrakten von kontaktgehemmten und mit TGF-β zum Stillstand gebrachten Zellen ermöglichte es dem Cyclin E, Cdk2 in einem Maße zu aktivieren, das gleichwertig mit dem in Extrakten von proliferierenden Zellen beobachteten Aktivierungsmaß war (Fig. 4A). Titrationen belegten, dass die Menge an Cyclin D2-Cdk4, die zum Blockieren des Cdk2-Inhibitors erforderlich ist, geringer war als die Menge, die in einer gleichwertigen Menge von Extrakt aus proliferierenden Zellen vorhanden ist (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität von Cyclin E nicht erhöht, wenn Cyclin D2-Cdk4-Komplexe zu Extrakten aus proliferierenden Zellen gegeben wurden. Außerdem wies der Cyclin D2-Cdk4-Komplex eine CAK-Aktivität auf, da er nicht befähigt war, CAK bei der Förderung der Aktivierung von Cyclin E-Cdk2-Komplexen zu ersetzen, die aus in Sf9-Zellen exprimierten Proteinen zusammengesetzt waren (nicht dargestellt). Somit kehrte der Cyclin D2-Cdk4-Komplex die Hemmung der Cdk2-Aktivierung um. Gleiche Mengen an Cyclin D1-Cdk4- und Cyclin D3-Cdk4-Komplexen (bestimmt durch Immunoblotting von Sf9-Lysaten) waren in Bezug auf eine Senkung des Cyclin E-Schwellenwerts für die Cdk2-Aktivierung weniger wirksam (Fig. 4B). Die Unfähigkeit von Cyclin

D1 oder Cyclin D3-Cdk4-Komplexen zur Maskierung des Cdk2-Inhibitors war nicht auf die Tatsache zurückzuführen, dass diese Komplexe in Zelllysaten instabil waren (nicht dargestellt).

[0147] Sehr überraschend war, dass die Fähigkeit von Cyclin D2-Cdk4, die Cdk2-Hemmung umzukehren, keine katalytische Cdk4-Aktivität erforderte. Komplexe zwischen Cyclin D2 und einer katalytisch inaktiven, mutanten Cdk4-Untereinheit waren ebenso wirksam wie enzymatisch aktive Cyclin D2-Cdk4-Komplexe in Bezug auf die Entfernung des Cdk2-Inhibitors (Fig. 4A). Titrationen mit verschiedenen Mengen an Cyclin D2-Komplexen, die entweder katalytisch aktives oder inaktives Cdk4 enthielten, ergaben, dass ihre spezifischen Aktivitäten in Bezug auf die Umkehr der Cdk2-Hemmung sehr ähnlich waren (nicht dargestellt). Dadurch war die Möglichkeit ausgeschlossen, dass Cyclin D2-Cdk4 den Inhibitor zu dessen Inaktivierung phosphorylieren muss. Ferner waren alle Modelle ausgeschlossen, bei denen Cyclin D2-Cdk4 den Inhibitor umging, indem es als eine CAK diente. Daher war es wahrscheinlich, dass Cyclin D2-Cdk4 den Cdk2-Inhibitor entfernte, indem es eine direkte Bindung mit diesem einging und diesen von Cdk2 sequestrierte (vergl. die nachstehenden Ausführungen).

Beim Cdk2-Inhibitor handelt es sich um ein 27 kd-Protein

[0148] Die vorstehenden Beobachtungen zeigten folgendes: (i) ein funktioneller Cyclin E-Cdk2-Inhibitor war in Extrakten aus kontaktgehemmten Zellen oder aus Zellen, die aus der Kontakthemmung in Gegenwart von TGF-β freigesetzt worden waren, jedoch nicht in Extrakten aus proliferierenden Zellen vorhanden; (ii) dieses Molekül assoziierte bevorzugt mit Cyclin E-Cdk2-Komplexen, im Gegensatz zu den einzelnen Untereinheiten; und (iii) es konnte durch Vorinkubation von Zellextrakten mit katalytisch aktivem oder inaktivem Cyclin D2-Cdk4-Komplexen einer Verarmung unterzogen werden. Um einen Faktor zu identifizieren, der möglicherweise diese Eigenschaften aufweist, wurden Mv1Lu-Zellen metabolisch mit 35S-Methionin markiert und Lysate wurden mit Sepharose-Kügelchen, die immunoadsorbiertes, rekombinantes Cdk2 entweder allein oder in Komplexen mit rekombinantem Cyclin E enthielten, inkubiert. Denaturierte, 35S-markierte Proteine, die durch Erwärmen der Kügelchen mit Puffer mit einem Gehalt an 1% SDS eluiert worden waren, wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie (Fig. 5A) sichtbar gemacht. Sämtliche Zelllysate ergaben ein ähnliches Muster von Cyclin E-Cdk2-Bindungsproteinen mit der Ausnahme eines 27 kd-Proteins, das aus Extrakten von kontaktgehemmten oder TGF-β-gehemmten Zellen, jedoch nicht aus Zellen in der späten G1-Phase gewonnen worden war (Fig. 5A). Dieses Protein mit der Bezeichnung p27 wurde unter Verwendung von Cyclin E-Cdk2-Komplexen, jedoch nicht unter Verwendung von Cdk2 allein isoliert (Fig. 5A). Die Ausbeute an p27 nahm proportional zur Menge des verwendeten Cyclin E-Cdk2-Komplexes bis zum Erreichen eines Maximums zu (Fig. 5B), was belegt, dass die Bindung von p27 an Cyclin E-Cdk2-Komplexe gesättigt werden kann. Dies stand im Einklang mit der Beobachtung, dass die Cdk2-Inhibitoraktivität durch Cyclin E-Cdk2-Komplexe einer Verarmung unterzogen werden konnte. Erwartungsgemäß wurden ferner stöchiometrische Mengen an p27 in Cyclin E-Immunopräzipitaten aus Zellen im Wachstumsstillstand beobachtet (nicht dargestellt).

[0149] Zellextrakte, die mit rekombinantem Cyclin D2-Cdk4-Komplex versetzt worden waren, ergaben nicht mehr p27, wenn das Gemisch an Cyclin E-Cdk2-Sepharose adsorbiert war (Fig. 5C). Nach Entfernen der Cyclin E-Cdk2-Sepharose-Kügelchen aus Proben, die mit Cyclin D2-Cdk4 versetzt worden waren, wurden die vorgeklärten Überstände mit Cdk4-Antikörper inkubiert, um Cdk4 und dessen assoziierte Proteine zu gewinnen. Dadurch erhielt man p34Cdk4 selbst, dessen Konzentrationen in Extrakten aus Zellen in der späten G1-Phase am höchsten und mit TGF-β behandelten Zellen am geringsten waren (Fig. 5D) (Matsushime et al., 1992; Ewen et al., 1993b). Unter Einsatz des gleichen Antiserums bediente sich Ewen et al. (1993b) eines partiellen proteolytischen Verdaus, um zu bestätigen, dass es sich dabei um authentisches Mv1Lu-Cdk4 handelte. Ferner enthielten diese Immunopräzipitate ein 27 kD-Protein in Proben aus kontaktgehemmten und mit TGF-β behandelten Zellen (Fig. 5D). Geringere Mengen an p27 wurden auch in Cdk4-Immunopräzipitaten aus Zellproben der späten G1-Phase gewonnen, obgleich p27 nicht aus diesen gleichen Extrakten durch Cyclin E-Cdk2-Affinitätschromatographie gewonnen werden konnte. Dies ließ darauf schließen, dass p27 in proliferierenden Zellen vorhanden war, jedoch in einer Form, die zur Wechselwirkung mit exogen zugesetzten Cyclin E-Cdk2-Komplexen nicht zugänglich war (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Ein direkter Vergleich ergab, dass p27, das an Cyclin E-Cdk2-Kügelchen oder durch Copräzipitation mit Cdk4 gereinigt worden war, das gleiche scheinbare Molekulargewicht aufwies (nicht dargestellt).

[0150] Experimente, die zur Charakterisierung der Stabilität dieses Faktors durchgeführt wurden, zeigten, dass bei einer kurzzeitigen Erwärmung von Zellextrakten auf 100°C sowohl die Fähigkeit von p27 zur Bindung an Cyclin E-Cdk2 (Fig. 6A) als auch die Hemmaktivität (Fig. 6C) erhalten blieben. Ferner induzierte eine Wärmebehandlung bei Anwendung auf Extrakte aus Zellen in der späten G1-Phase in überraschender Weise das Auftreten sowohl von p27 (Fig. 6A) als auch gleichzeitig eine Zunahme des Grades der Cdk2-Hemmaktivität

(Fig. 6B). Diese Ergebnisse belegten, dass p27 und die Hemmaktivität beide wärmestabil waren und sie in Extrakten der späten G1-Phase durch einen wärmeempfindlichen Mechanismus reaktiviert werden konnten. Erwartungsgemäß waren Cyclin D2-Cdk4-Komplexe ebenfalls zur Maskierung von p27 aus wärmebehandelten Lysaten befähigt (nicht dargestellt).

[0151] Extrakte aus metabolisch markierten, mit TGF-β behandelten Zellen wurden einer Chromatographie über Cyclin E-Cdk2-Sepharose oder als Kontrolle über Cdk2-Sepharose unterzogen. Nach Waschen wurden die Kügelchen mit einem sauren Puffer eluiert und ein Teil des Eluats wurde durch SDS-PAGE analysiert. Dabei ergab sich, dass p27 die vorwiegend gewonnene markierte Spezies darstellte und nur im Eluat aus Cyclin E-Cdk2-Kügelchen vorhanden war (Fig. 7A). Proben aus den gleichen Eluaten wurden auf das Vorliegen des Cdk2-Inhibitors getestet. Diese Aktivität war im Eluat aus Cyclin E-Cdk2-Kügelchen, jedoch nicht aus Cdk2-Kügelchen vorhanden (Fig. 7B). Der Rest des Eluats wurde durch Acetonfällung eingeengt, in 6 M Guanidinium-hydrochlorid denaturiert, durch Dialyse gegen isotonischen Puffer renaturiert und einer zweiten Runde der Bindung an Cyclin E-Cdk2-Sepharose unterworfen. Eine Elution aus diesen Kügelchen durch Siedebehandlung in Puffer mit einem Gehalt an 1% SDS ergab p27 als die einzige markierte Bande (Fig. 7C). Diese Ergebnisse stützen stark die Möglichkeit, dass p27 und die Hemmaktivität ein und das gleiche sind. Diese Schlussfolgerung wurde direkt durch Fraktionieren des Cyclin E-Cdk2-Eluats durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und durch Extrahieren der fraktionierten Proteine aus Gelscheiben bestätigt. Renaturierte Proteine wurden auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E getestet (Fig. 7D). Das aus der Gelscheibe mit einem Gehalt an p27 gewonnene Protein hemmte vollständig die Cdk2-Aktivierung. Keine weitere Hemmaktivität wurde aus irgendwelchen anderen Gelscheiben gewonnen.

Diskussion

[0152] Ein Inhibitor in nicht proliferierenden Zellen wurde identifiziert, der die Aktivierung von Komplexen mit einem Gehalt an G1-Cyclin, Cyclin E (Koff et al., 1991; Lew et al., 1991; Ohtsubo & Roberts, 1993) und dessen katalytische Untereinheit Cdk2 (Koff et al., 1992; Dulic et al., 1992) verhindert. Diese Hemmaktivität ist zumindest teilweise einem 27 kDa-Polypeptid zuzuschreiben, das auch als $p27^{Kip1}$ bezeichnet wird (Cdk-Hemmprotein 1). Der Inhibitor und $p27^{Kip1}$ haben die folgenden Eigenschaften gemeinsam: sie binden an Cyclin E-Cdk2-Komplexe, jedoch nicht an Cdk2 allein; sie werden nur in Extrakten aus Zellen im Wachstumsstillstand nachgewiesen; sie können durch Cyclin D2-Cdk4-Komplexe, jedoch nicht durch die Einzelkomponenten maskiert werden; sie sind wärmestabil; sie liegen latent in Extrakten von proliferierenden Zellen vor, können aber durch eine kurze Wärmebehandlung demaskiert werden. Ferner hemmt gereinigtes $p27^{Kip1}$ die Cdk2-Aktivierung durch Cyclin E, wenn es zu einem Extrakt aus proliferierenden Zellen gegeben wird. Während diese Daten stark darauf schließen lassen, dass $p27^{Kip1}$ zumindest eine Komponente des Cdk2-Inhibitors darstellt, wurde nicht festgestellt, ob die Hemmung auf $p27^{Kip1}$ allein zurückzuführen ist oder ob $p27^{Kip1}$ zusätzliche Proteine für den Cyclin E-Cdk2-Komplex rekrutiert. Es wurde ferner festgestellt, dass p27 sowie Cyclin E und Cdk2 in anderen Organismen, z. B. in Mäusen und Menschen, vorhanden sind (Daten nicht aufgeführt).

[0153] Der Mechanismus der $p27^{Kip1}$-Hemmung weist Merkmale auf, die ihn von den Wegen unterscheiden, die die Aktivierung der mitotischen Cyclin-Cdc2-Komplexe steuern. Erstens scheint $p27^{Kip1}$ eher stöchiometrisch als katalytisch zu wirken. Zweitens wurde eine Tyrosin-Phosphorylierung von Cdk2 in inaktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexen mit einem Gehalt an $p27^{Kip1}$ nicht festgestellt, was darauf schließen lässt, dass $p27^{Kip1}$ keine Tyrosin-kinase-Aktivität besitzt oder eine Tyrosin-phosphatase hemmt. Komplexe mit einem Gehalt an $p27^{Kip1}$ wurden nicht in wirksamer Weise durch die p34Cdc2-aktivierende Kinase CAK phosphoryliert, was in ausreichender Weise ihre Inaktivität erklären könnte. Es ist möglich, dass $p27^{Kip1}$ eine Dephosphorylierung von Thr160 bewirkt, obgleich es überraschend wäre, wenn die enzymatische Aktivität einer Phosphatase gegenüber einer Erwärmung auf 100°C stabil wäre. Es erscheint wahrscheinlicher, dass die Bindung von $p27^{Kip1}$ an den Cyclin E-Cdk2-Komplex die Thr160-Phosphorylierung durch Veränderung der Konformation der T160-Domäne oder durch sterische Hinderung von CAK verhindert. Es wäre nicht überraschend, wenn $p27^{Kip1}$ in ähnlicher Weise wie die negativen regulatorischen Untereinheiten oder Domänen von anderen Protein-kinasen funktionieren würde, möglicherweise auch durch Wechselwirkung mit der Kinase-aktiven Stelle als Pseudosubstrat.

[0154] Es ist verblüffend, dass neben $p27^{Kip1}$ andere potentielle Regulatoren der Cdk-Aktivität während der G1-Phase ebenfalls direkt an Cyclin-Cdk-Komplexe binden, einschließlich FAR1 (Peter et al., 1993), p40 (Mendenhall, 1993), p16 und p21 (Xiong et al., 1992; 1993) und Rb (Kato et al., 1993; Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993a). Obgleich von keinem dieser weiteren Proteine bisher gezeigt worden ist, dass es direkt die Cdk-Aktivität hemmt, erscheint es wahrscheinlich, dass mindestens einige davon diese Funktion ausüben. Direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen können ein weg zur Fokussierung von Hemmsignalen auf spezifische Cy-

clin-Cdk-Komplexe in einer zellulären Umgebung sein, die weitere, stärker unterschiedliche trans-wirkende Regulatoren der Cdk-Aktivität enthalten.

p27^{Kip1} verknüpft Wachstumshemmsignale mit dem Stillstand des Zellzyklus

[0155] p27^{Kip1} wurde in Zellen festgestellt, die entweder durch Kontakthemmung oder durch TGF-β sich im Stillstand in der G1-Phase befanden. Eine ähnliche Aktivität wurde auch bezüglich der Blockierung der Cdk2-Aktivierung in verschiedenen Zelltypen, die frei von spezifischen Wachstumsfaktoren waren, einschließlich Fibroblasten mit Serummangel und von IL-2 befreite Lymphozyten, beobachtet (unveröffentlichte Beobachtungen). Eine Hemmung der Cdk2-Aktivierung durch p27^{Kip1} oder funktionell ähnliche Proteine kann einen allgemeinen Mechanismus darstellen, über den verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Signale die Zellproliferation steuern.

[0156] p27^{Kip1} schränkt die Zellproliferation ein, indem es die Schwellenkonzentration von Cyclin E, die zur Aktivierung von Cdk2 erforderlich ist, festlegt. Wenn p27^{Kip1} stöchiometrisch wirkt, wie es diese Daten nahelegen, dann wird die Cdk2-Aktivierungsschwelle bald erreicht, nachdem die Menge an Cyclin E in der Zelle die Menge an aktivem p27^{Kip1} übersteigt. In zum Stillstand gekommenen Zellen liegt diese Schwelle über physiologischen Cyclin E-Konzentrationen, so dass nur inaktive Cyclin E-Cdk2-Komplexe zusammengebaut werden. Der Cyclin A-Cdk2-Komplex kann einer ähnlichen Steuerung unterliegen (Koff et al., 1993; Firpo et al., in Vorbereitung) und eine Unfähigkeit zur Aktivierung dieses Komplexes sollte ebenfalls zum Zellzyklus-Stillstand beitragen (Girard et al., 1991; PacJano et al., 1992, 1993; Tsai et al., 1993).

[0157] In welcher Weise können die Wachstumshemmsignale mit der Aktivität von p27^{Kip1} verknüpft sein?. Die einfachste Vorstellung bestünde darin, dass wachsende Zellen nicht viel p27^{Kip1} enthalten und dass Signale, die die Zellproliferation hemmen, die p27^{Kip1}-Synthese oder -Stabilisierung induzieren und dadurch dessen Menge über das kritische Grundniveau heben. Dieses Modell kann nicht völlig korrekt sein, da stark gestiegene Mengen an p27^{Kip1} aus einem latenten Pool gewonnen werden können, wenn Extrakte aus proliferierenden Zellen einer Wärmebehandlung unterzogen werden. Ein erheblicher Pool von p27^{Kip1} muss in diesen Extrakten vorliegen und muss durch andere Moleküle maskiert werden. Dies bedeutet, dass p27^{Kip1} eine normale Rolle während des proliferativen Zellzyklus spielt und nicht einfach ein Reaktionselement auf Signale, die den Wachstumsstillstand induzieren, darstellt. Das reichliche Vorhandensein von "freiem" p27^{Kip1}, das zur Wechselwirkung mit dem Cyclin E-Cdk2-Komplex befähigt ist, könnte daher durch einen stromaufwärtigen Regulator, z. B. durch den Cyclin D2-Cdk4-Komplex, moduliert werden, der ebenfalls direkt an p27^{Kip1} bindet. Dies verhindert die Assoziation mit Cyclin E-Cdk2 und ermöglicht dessen funktionelle Aktivierung, zumindest in vitro. Die Vorstellung, dass die p27-Aktivität durch einen stromaufwärtigen Regulator gesteuert wird, schließt nicht die Möglichkeit aus, dass die gesamte zelluläre Konzentration an p27 in zum Stillstand gekommenen Zellen steigen kann. Bei diesen Experimenten wurden nicht direkt die gesamten Mengen an p27 in proliferierenden und zum Stillstand gekommenen Zellen verglichen.

[0158] Cycline vom D-Typ sind selbst Ziele von Wachstumshemmsignalen (Übersichtsartikel von Sherr, 1993). Ihre Synthese wird in von Wachstumsfaktor befreiten Zellen (Matsushime et al., 1991; Won et al., 1992; Kato et al., in Druck) und in kontaktgehemmten Zellen (unveröffentlichte Beobachtungen) rasch verringert, was zu einer Verringerung der Cyclin D-Cdk4-Konzentrationen führt (Matsushime et al., 1992). Während Konzentrationen von Cyclin vom D-Typ nicht stark durch TGF-β-Blockade beeinflusst werden, verringert TGF-β die Synthese von Cdk4, so dass eine Nettoreduktion an Cyclin D-Cdk4-Komplexen dennoch erreicht wird (Ewen et al., 1993b). In TGF-β-gehemmten Zellen, bei denen Cdk4 limitierend ist, sollte die Expression von überschüssigem Cdk4 zur Bildung von zusätzlichen Cyclin D-Cdk4-Komplexen und zur Maskierung von p27^{Kip1} führen. Tatsächlich kehrt eine verstärkte Expression von Cdk4 in vivo die Blockade der Cdk2-Aktivierung in Zellen, die TGF-β ausgesetzt sind, um (Ewen et al., 1993b). Jedoch kehrt die Zugabe von Cdk4 allein zu Extrakten aus mit TGF-β behandelten Zellen in vitro die Wechselwirkung von p27^{Kip1} mit Cyclin E-Cdk2 nicht um. Im Gegensatz zu Komplexen mit Cyclin E und Cdk2, die in vitro durch Vermischen der in Insektenzellen auf rekombinante Weise erzeugten Proteine gebildet werden können, werden Cycline vom D-Typ und Cdk4 nicht in wirksamer Weise zusammengebaut, es sei denn, Sf9-Zellen werden mit Baculoviren, die für beide Komponenten kodieren, koinfiziert (Kato et al., 1993). Obgleich die Gründe, die diesen Unterschieden in der Komplexbildung zugrunde liegen, nicht definiert worden sind, stehen alle Ergebnisse intern im Einklang und stützen die Vorstellung, dass Cyclin D-Cdk4-Komplexe stromaufwärts von Cyclin E-Cdk2 durch Wechselwirkung mit p27^{Kip1} wirken. Obgleich diese Vorstellungen auf zahlreichen Beobachtungen, die in intakten Zellen gemacht worden sind, beruhen, wurde der vorgeschlagene Weg, der Cyclin D-Cdk4, p27^{Kip1} und Cyclin E-Cdk2 beinhaltet, nur in vitro direkt getestet. Man könnte erwarten, dass Cdk2 durch zusätzliche Mechanismen reguliert wird und dass weitere neuartige Cdk-Komplexe zusätzlich zu Cyclin D2-Cdk4 zur Titration von p27^{Kip1} beitragen könn-

ten.

[0159] Es ist unwahrscheinlich, dass die einzige Rolle von Cyclin D2-Cdk4 in der Titration von $p27^{Kip1}$ besteht, vielmehr ist es wahrscheinlich, dass eine Komplexanreicherung die Cdk4-vermittelte Phosphorylierung von bestimmten Substraten, die für die G1-Progression erforderlich sind, auslöst. Somit reicht Cyclin D, das mit katalytisch inaktivem Cdk4 komplexiert ist, zur Maskierung von $p27^{Kip1}$ aus, es ist jedoch unwahrscheinlich, dass es in vivo vollständig sämtliche wesentlichen Cdk4-Funktionen ersetzt.

[0160] Ein Merkmal des durch $p27^{Kip1}$ induzierten Zellzyklus-Stillstands besteht darin, dass Zellen inaktive Cyclin E-Cdk2-Komplexe anreichern können. Eine Erholung vom Zellzyklus-Stillstand erfordert daher möglicherweise nicht die Synthese von neuem Cyclin E und den Zusammenbau von neuen Cyclin E-Cdk2-Komplexen. Vielmehr kann sich die Zelle dieses latenten Pools von inaktiven Komplexen bedienen, wenn die Zellproliferation wieder aufgenommen wird. Dies kann unter solchen Umständen wesentlich sein, bei denen die Signale, die die Synthese von Cyclin fördern, vorübergehend sind und fehlen, wenn die Wachstums-Hemmsignale nachlassen. Bisher wurden jedoch keine Bedingungen definiert, die eine Reaktivierung von inaktiven Cyclin E-Cdk2-$p27^{Kip1}$-Komplexen ermöglichen. In vitro sind nur Cyclin E-Cdk2-Komplexe, die nach Titration von $p27^{Kip1}$ zusammengebaut werden, aktiv, wobei dies auch für in vivo-Verhältnisse gelten kann.

[0161] Die Anwesenheit von $p27^{Kip1}$ in proliferierenden Zellen lässt darauf schließen, dass dessen Rolle nicht auf die Induktion des Zellzyklus-Stillstands in Reaktion auf extrazelluläre Signale beschränkt ist. Es kann auch den Cyclin E-Schwellenwert für die Ausführung des Übergangs von G1 nach S während eines jeden mitotischen Zyklus festlegen. Zellfusionsexperimente haben gezeigt, dass der Eintritt in die S-Phase bei Säugetier-Fibroblasten durch einen Aktivator gesteuert wird, der sich kontinuierlich während der G1-Phase anreichert (Foumier und Pardee, 1975; Rao et al., 1977). Durch Vergleich der Geschwindigkeit des Eintritts in die S-Phase bei ein-, zwei- und dreikernigen Zellen wurde der Schluss gezogen, dass die Menge dieses Aktivators und nicht dessen Konzentration bei der Festlegung des Beginns der S-Phase kritisch ist. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einem Modell, bei dem der limitierende Schritt bei der Cdk2-Aktivierung nicht im Zusammenbau des Cyclin-Cdk2-Komplexes besteht, der konzentrationsabhängig sein sollte, sondern vielmehr den Zusammenbau einer ausreichenden Anzahl an Komplexen beinhaltet, um den Schwellenwert eines stöchiometrischen Inhibitors, wie $p27^{Kip1}$, zu überwinden. Es ist ferner darauf hinzuweisen, dass ein spontaner Zerfall von durch $p27^{Kip1}$ gehemmten Komplexen zu freiem $p27^{Kip1}$ und aktivem Cyclin-Cdk2 mit einer Kinetik erster Ordnung (exponentiell) erfolgen kann und den Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung, über die häufig für den Eintritt in die S-Phase bei Säugetierzellen berichtet wird (Smith & Martin, 1973; Brooks et al., 1980) zugrunde liegen könnte.

$p27^{Kip1}$ kann die Reihenfolge während der G1-Progression verstärken

[0162] Cyclin-Cdk-Komplexe erscheinen in einer speziellen Reihenfolge, während Zellen in die G1-Phase eintreten (Sherr, 1993). Es wird angenommen, dass diese zeitweilige Reihenfolge für die normale G1-Progression wesentlich ist und anschließend die Zellen das Problem der Wiederherstellung der Reihenfolge während der Erholung vom Zellzyklus-Stillstand lösen müssen. Beispielsweise stören eine Kontakthemmung und TGF-β die Anreicherung von Cyclin D-Cdk4-Komplexen, beeinträchtigen aber nicht die Synthese von Cyclin E- und Cyclin A-Cdk2-Komplexen, die später im Zellzyklus einwirken. Wenn die Cyclin E-Cdk2- und Cyclin A-Cdk2-Komplexe während des Zellzyklus-Stillstands aktiv wären, ginge die normale Reihenfolge der Cdk-Wirkung verloren. $p27^{Kip1}$ gewährleistet möglicherweise, dass dies nicht eintritt, indem es die Aktivierung dieser vorher existierenden Komplexe während des Zellzyklus-Stillstands verhindert. Wenn zusätzlich die Aktivität von $p27^{Kip1}$ selbst durch Cyclin D2-Cdk4 gesteuert wird, würde dies einen wirksamen Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Cdk2 in inaktivem Zustand ergeben, bis Cyclin D-Cdk4-Komplexe zusammengebaut werden und deren Funktionen ausüben.

II

Experimentelle Verfahren

Metabolische Markierung, Immunopräzipitationen und Peptidkartierung

[0163] Mv1Lu-Zellen wurden durch Kontakthemmung synchronisiert, mit TGF-β behandelt, metabolisch markiert, lysiert, mit anti-Cdk2-Antikörper immunopräzipitiert oder an Cyclin E-Cdk2-Affinitätssäulen chromatographiert. Für die Peptidkartierung wurde die 27 kd-Bande, die in Cdk2-Immunopräzipitaten und in den Cyclin E-Cdk2-Affinitätssäuleneluaten vorhanden ist, aus den Gelen ausgeschnitten, mit 0,1 µg V8-Protease verdaut

und an 15–22,5%-Gradientengelen aufgetrennt.

Baculovirale Proteine

[0164] Die humane Cyclin E-cDNA (Koff et al., 1991) wurde am N-Terminus mit einer Hexahistidinsequenz markiert. Diese cDNA wurde in den Baculovirus-Transfervektor pVL1392 kloniert und in Sf9-Zellen gemäß den Angaben im BaculoGold Transfection Kit (Pharmingen) exprimiert. Baculovirale Proteine wurden gemäß dem Verfahren von Desai et al., 1992, hergestellt.

Kip1-Reinigung

[0165] Zweihundert 150 mm-Schalen von kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen (~2 × 10^{10} Zellen) wurden durch Trypsinierung gewonnen und in hypotonischem Puffer durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Extrakte wurden durch Zentrifugation geklärt, 5 Minuten auf 100°C erwärmt und durch Zentrifugation geklärt. Mit Agarose vorgeklärte Extrakte ließ man an His-Cyclin E-Cdk2-Komplexe, die an Ni^{++}-NTA-Agarose immobilisiert waren, binden. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit einer 6 M Lösung von Guanidinium-hydrochlorid eluiert, über Nacht gegen 1 × HBB-Puffer (25 mM HEPES-KOH, pH-Wert 7,7, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,05% NP-40 und 1 mM DTT) dialysiert (Kaelin Jr. et al., 1992) und mit Aceton gefällt.

Proteinsequenzanalyse

[0166] Protein wurde durch SDS-PAGE fraktioniert und einem Elektroblotting auf Nitrocellulose unterworfen. Die mit Ponceau S gefärbte 27 kDa-Bande wurde ausgeschnitten und für die interne Aminosäuresequenzanalyse verarbeitet (Tempst et al., 1990). HPLC-Peakfraktionen (über einem Trypsin-Hintergrund) wurden durch eine Kombination aus einem automatisierten Edman-Abbau und einer matrixgestützten Laserdesorptions (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie analysiert. Die Massenanalyse (an 2%-Aliquotanteilen) wurde unter Verwendung eines LaserTec Research MALDI-TOF-Instruments (Vestec) und von α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure als Matrix durchgeführt. Eine chemische Sequenzierung (an 95% der Probe) wurde unter Verwendung eines Applied Biosystems 477A-Sequenzierungsgeräts, das auf eine Analyse im Femtomol-Maßstab optimiert war, durchgeführt.

Kip1-cDNA-Klonierung und Northern-Blot-Analyse

[0167] RT-PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von degenerierten Oligonucleotiden als Primern und von gesamter RNA aus kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen als Matrize durchgeführt. Die Kombination von einem Paar von Primern (vergl. **Fig. 9A**) ergab ein 135 bp-Fragment, das zum Absuchen einer 1ZAPII-cDNA-Bibliothek, die aus Mv1Lu-Zellen hergestellt worden war, verwendet wurde. Die Mäuse-Kip1-cDNA wurde aus einer 1EX1ox-Mäuseembryo-cDNA-Bibliothek (Novagen) erhalten. Humane Kip1-cDNA wurde aus einer λgt11-Nieren-cDNA-Bibliothek (Clontech) erhalten. Poly(A)$^+$-RNA-Blots wurden mit einem durch PCR abgeleiteten Fragment der Mäuse-Kip1-cDNA, die durch willkürliches Priming markiert war, hybridisiert.

In vitro-Translation

[0168] Ein NdeI-XhoI-Fragment, das die kodierende Region der Mäuse-Kip1-cDNA (Nucleotide 1–591) enthielt, wurde in pCITE2a (Novagen) subkloniert. Dieses Konstrukt kodiert für ein Fusionsprotein, das eine C-terminale Hexahistidinsequenz und 6 Aminosäuren aus dem Vektor am N-Terminus von Kip1 enthält. Eine in vitro-Transkription und -Translation wurden unter Verwendung von Red Nova-Lysat (Novagen) durchgeführt.

Rekombinantes Kip1

[0169] Ein durch PCR erzeugtes 591 bp-NheI-XhoI-Fragment der Mäuse-Kip1-cDNA, das die Kodierungsregion in voller Länge enthielt, wurde in pET21a (Novagen) subkloniert, wodurch man ein Konstrukt erhielt, das für Kip1 mit einer C-terminalen Hexahistidinsequenz kodiert. Das Protein wurde in BL21(DE3)-Bakterien exprimiert und durch Ultraschallbehandlung von Zellen in einer Lösung mit einem Gehalt an 8 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,4) und 20 mM Imidazol gereinigt, durch Zentrifugation geklärt und 1 Stunde bei 4°C an Ni^{++}-NTA-Agarose gebunden. Die Säule wurde mit einem umgekehrten Gradienten von 6 M bis 0,75 M Harnstoff in 0,5 M Natriumchlorid, 50 mM Tris (pH-Wert 7,4) und 20% Glycerin gewaschen und mit 200 mM Imidazol, 20 mM HEPES, pH-Wert 7,4, 1 M KCl, 100 mM EDTA eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen 1 × HBB-Puffer dialysiert und bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

In vitro-Kinase- und Cdk2-Aktivierungstests

[0170] H5-Insektenzellenextrakte mit einem Gehalt an baculoviral exprimierten Cyclinen und Cdks wurden 30 Minuten bei 37°C mit rekombinantem Kip1 bei 37°C inkubiert, mit anti-HA-Antikörper präzipitiert und die Histon H1-Kinaseaktivität dieser Komplexe wurde getestet (Koff et al., 1993). Rb-Kinase-Reaktionen wurden gemäß Matsushime et al. (1991) durchgeführt. Die Phosphorylierung der Histon H1-Bande und der Rb-Bande wurde quantitativ mit dem Phosphorimager-Gerät (Molecular Dynamics) bestimmt.

[0171] Hypotonische Zellextrakte aus exponentiell wachsenden A549-Zellen wurden mit baculoviralem His-Cyclin E-Protein mit oder ohne Kip1 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Gemische wurden sodann 10-fach in 1 × NP40-RIPA-Puffer mit einem Gehalt an 20 mM Imidazol verdünnt und 1 Stunde bei 4°C mit Ni^{++}-NTA-Agarose inkubiert. Eine Portion der Probe wurde einer 12%-SDS-PAGE und einem Immunoblotting mit anti-Cdk2-Antikörper unterworfen (Koff et al., 1993).

Kip1-Transfektionen und Fließzytometrieanalyse

[0172] Die Mäuse-Kip1-cDNA (Nucleotide -82 bis +591) wurden in pCMV5 (Attisano et al., 1993) subkloniert. R-1B-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml pCEXV-3 mit einem Gehalt an muriner CD16-cDNA (Kurosaki und Ravetch, 1989) und 3 µg/ml pCMV5 allein oder mit 3 µg/ml pCMV5-Kip1 (Attisano et al., 1993) kotransfiziert. Mit CD16 immunogefärbte Zellen (Wirthmueller et al., 1992) wurden durch Fließzytometrie unter Verwendung von FACS-can (Becton-Dickinson) und Multicycle-Software (PHOENIX Flow Systems) analysiert.

Ergebnisse

Reinigung und Klonierung von Kip1

[0173] Lysate von kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen wurden auf 100°C erwärmt, von unlöslichem Material geklärt und einer Bindung an einer Cyclin E-Cdk2-Affinitätssäule überlassen. Eine Elution mit 6 M Guanidinium-hydrochlorid ergab von der Säule freigesetztes rekombinantes Cdk2 und das 27 kd-Protein Kip1. Dialysierte Aliquotanteile dieser Probe wiesen eine starke Hemmwirkung gegenüber Cyclin E-Cdk2 bei Histon H1-Kinasetests auf. Es wurde gezeigt, dass diese Aktivität aus SDS-PAGE-Gelscheiben zusammen mit Kip1 eluiert wird. Die Kip1-Ausbeute aus zwei getrennten Präparationen (jeweils ~2 × 10^{10} Zellen) betrug 0,3 µg bzw. 1 µg.

[0174] Um zu bestätigen, dass Kip1 in vivo in Wechselwirkung mit Cdk2 tritt, wurden metabolisch markierte Extrakte aus kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen unter Verwendung von anti-Cdk2-Antikörpern immunopräzipitiert (**Fig. 8B**). Zusätzlich zu Cdk2 enthielt das Präzipitat eine 27 kd-Bande, deren Peptidkarte nach begrenztem Verdau mit V8-Protease identisch mit der Karte von Kip1 war, das aus metabolisch markierten Zellen durch Cyclin E-Cdk2-Affinitätschromatographie gereinigt worden war (**Fig. 8C**). Diese Ergebnisse lieferten einen weiteren Beweis, dass der durch Bindung an Cyclin E-Cdk2 gereinigte Cdk-Inhibitor in vitro in ruhenden Zellen mit Cdk2 assoziiert war.

[0175] Verschiedene tryptische Kip1-Peptidsequenzen wurden durch einen automatisierten Edman-Abbau erhalten und zur Konstruktion von degenerierten Oligonucleotid-Primern für die cDNA-Amplifikation durch reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet. Ein PCR-Produkt, das aus revers transkribierter Mv1Lu-mRNA amplifiziert worden war, wurde zum Absuchen einer Mv1Lu-cDNA-Bibliothek verwendet. Dies ergab einen einzigen positiven Klon, der für die aus dem gereinigten Protein erhaltenen Sequenzen kodierte (**Fig. 9A**). Ein Absuchen von cDNA-Bibliotheken aus humaner Niere und Mäuseembryo mit der Kip1-cDNA ergab Klone mit hochgradig verwandter Sequenz. Die humanen und murinen Kip1-cDNAs wiesen offene Leseraster von 594 bzw. 591 bp auf, beginnend mit einem ATG-Codon in einem günstigen Kontext der Translationsinitiation, wobei Stoppcodons vorausgingen (Daten nicht dargestellt). Im Vergleich zu diesen offenen Leserastern war der Nerz-Klon unvollständig und endete am Nucleotid 534 (**Fig. 9A**).

[0176] Die Kip1-cDNA kodiert für ein vorhergesagtes Protein von 198 Aminosäuren (22257 Dalton) beim Menschen und für 197 Aminosäuren (22208 Dalton) bei der Maus. Diese Werte sind kleiner als der 27 kd-Wert, der mit dem durch SDS-PAGE gereinigten Nerz-Protein erhalten wurde. Um diese Diskrepanz aufzuklären, wurde eine cDNA, die für die Mäuse-Kip1-Sequenz kodiert, konstruiert und am C-Terminus mit einer Hexahistidinsequenz (Masse ~1 kd) markiert. Eine in vitro-Transkription und -Translation dieser cDNA ergab ein Produkt, das spezifisch eine Bindung mit Ni^{++}-NTA-Agarose einging und an SDS-PAGE-Gelen als 28 kD-Protein wanderte (**Fig. 8C**), was bestätigte, dass die klonierte cDNA für Kip1 von voller Länge kodiert und dass dieses Protein an SDS-PAGE im Vergleich zu seiner berechneten Molekülmasse etwas langsamer wanderte.

Kip1 ist hochgradig konserviert und mit Cip1/WAF1 verwandt

[0177] Die vorhergesagten Kipi-Aminosäuresequenzen beim Menschen, bei der Maus und beim Nerz sind hochgradig miteinander verwandt und zeigen eine Identität von etwa 90% (Fig. 9A). Eine Genbank-Recherche ergab, dass auf dem Aminosäureniveau Kip1 eine signifikante Homologie nur mit Cip1/WAF1 zeigte. Diese Ähnlichkeit war weitgehend auf ein Segment von 60 Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte des Proteins begrenzt. Diese Region war zu 44% identisch mit der entsprechenden Region in Cip1/WAF1 (Fig. 9B). Wie Cip1/WAF1 weist Kip1 ein mutmaßliches zweiteiliges nukleares Lokalisierungssignal (Dingwall und Laskey, 1991) nahe am C-Terminus auf (Fig. 9B). Jedoch weist im Gegensatz zu Cip1/WAF1 die Kip1-Sequenz kein mutmaßliches Zink-Finger-Motiv in der N-terminalen Region auf und besitzt eine C-terminale Erweiterung von 23 Aminosäuren, die eine Konsensus-Cdc2-Phosphorylierungsstelle enthalten (Fig. 9B).

Cdk-Hemmaktivität

[0178] Reines rekombinantes Kip1, das am C-Terminus mit Hexahistidin markiert war, hemmte die Histon H1-Kinaseaktivität von humanen Cyclin A-Cdk2-, Cyclin E-Cdk2- und Cyclin B1-Cdc2-Komplexen bei Test unter linearen Reaktionsbedingungen (Fig. 10A und Fig. 10B), während eine Scheinprobe aus Bakterien, die mit dem Vektor allein transformiert waren, dies nicht tat. Cyclin E-Cdk2 wurde halbmaximal mit 0,5 nM Kip1 gehemmt (Fig. 10B). Eine vollständige Hemmung von Cyclin A-Cdk2 erforderte eine 8-fach höhere Konzentration. Diese Konzentration war zur vollständigen Blockierung von Cyclin B1-Cdc2 nicht ausreichend (Fig. 10B). Eine Zugabe von Kip1 zu Cyclin E-Cdk2-, Cyclin A-Cdk2- oder Cyclin D2-Cdk4-Komplexen hemmte deren Fähigkeit zur Phosphorylierung eines GST-Rb-Fusionsprodukts (Fig. 10C und Fig. D). Die relative Empfindlichkeit von Cyclin E-Cdk2 und Cyclin A-Cdk2 gegen eine Hemmung durch Kip1 bei diesen Tests verlief parallel zu ihrer Empfindlichkeit bei den Histon H1-Kinase-Tests (vergl. die Fig. 10B und Fig. 10D). Etwa 10 nM Cyclin und 10 nM Cdk wurden bei diesen Tests verwendet, wobei aber die tatsächliche Konzentration von Cyclin : Cdk-Komplexen nicht bekannt ist.

Cdk-Hemmdomäne

[0179] Es wurde untersucht, ob die Hemmaktivität von Kip1 in der Ähnlichkeitsregion zu Cip1/WAF1 saß. Ein Peptid mit 52 Aminosäuren [Kip1(28–79)], das dieser Region in Kip1 entsprach (Fig. 10E), wurde auf rekombinante Weise hergestellt und mit einer C-terminalen Hexahistidin-Markierung gereinigt. Dieses Peptid hemmte die Rb-Phosphorylierung durch Cyclin A-Cdk2 mit einer Wirkungsstärke, die ähnlich der von Kip1 von voller Länge war (Fig. 10E), und hemmte Cyclin E-Cdk2 oder Cyclin D2 : Cdk4 in weniger wirksamer Weise. Versionen dieser Kip1-Region, denen 3 Aminosäuren am N-Terminus oder 15 Aminosäuren am C-Terminus fehlten, waren wesentlich schwächere Cdk-Inhibitoren und eine Deletion von 7 N-terminalen Aminosäuren ergab ein Produkt ohne Hemmaktivität (Fig. 10E). Das Peptid Kip1[(104–152)], das eine geringe Sequenzähnlichkeit mit Cip1/WAF1 hat, war als Cdk-Inhibitor inaktiv (Fig. 10E).

Kip1 verhindert die Cdk2-Aktivierung

[0180] Kip1 wurde ursprünglich als Faktor identifiziert, dessen Anwesenheit in Extrakten von ruhenden Zellen Cdk2 beständig gegen eine Phosphorylierung an Thr160 machte. Um festzustellen, ob Kip1 die Cdk-Aktivierung blockieren konnte, wurde dessen Einfluss auf die von Cyclin E abhängige Cdk2-Aktivierung in Extrakten aus exponentiell wachsenden Zellen getestet (Koff et al., 1993). Humane A549-Lungenkarzinom-Zellextrakte wurden mit Histidin-markiertem Cyclin E inkubiert, das sodann aufgespürt und auf die assoziierte Histon H1-Kinaseaktivität getestet wurde (Fig. 11A). Eine Zugabe von Histidin-markiertem Kip1 zu den Zellextrakten verringerte erheblich den Grad der mit Cyclin E assoziierten Kinaseaktivität (Fig. 11A). In parallelen Tests wurde das aufgespürte Cyclin E SDS-PAGE und einem Western-Blotting mit anti-Cdk2-Antikörpern unterworfen. Zellextrakte, die kein Kip1 erhielten, ergaben mit Cyclin E assoziiertes Cdk2 in einer Form, die Cdk2, das an Thr160 phosphoryliert war, entsprach (Gu et al., 1992) (Fig. 11B). Im Gegensatz dazu lag mit Cyclin E assoziiertes Cdk2 aus Extrakten, die mit Kip1 versetzt worden waren, ausschließlich in der inaktiven Form vor (Fig. 11B). Zusammen lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass eine Kip1-Bindung an präaktive Cyclin E-Cdk2-Komplexe in vitro die Thr^{160}-phosphorylierung und Aktivierung von Cdk2 verhinderte.

Die Kip1-Überexpression hemmt den Eintritt der Zellen in die S-Phase

[0181] Mäuse-Kip1, das in einen Säugetierexpressionsvektor subkloniert war, wurde in MviLu-Zellen unter Bedingungen transfiziert, bei denen bis zu 65% der Zellpopulation transfizierte Plasmide aufnehmen und vorübergehend exprimieren (Attisano et al., 1993). Die Geschwindigkeit des Einbaus von 125I-Desoxyuridin in

DNA war in mit Kip1 transfizierten Zellen um 70% verringert, verglichen mit Zellen, die mit dem Vektor allein transfiziert worden waren (Table III).

Tabelle III
Kip1 blockiert den Eintritt in die S-Phase

Zeit nach Transfektion	Vektor	Einbau von ^{125}I-Desoxyuridin[a]	Prozentualer Anteil von CD16^{+}-Zellen in der S-Phase[b]
24 h	pCMV5	27 581 ± 5 126	26 ± 5
	pCMV5-Kip1	8 386 ± 1 250	9 ± 2
43 h	pCMV5	5 126 ± 47	35 ± 2
	pCMV5-Kip1	1 510 ± 140	7 ± 1

[0182] Die in Bezug auf den TGF-β-Rezeptor defektive R1B-Zellline wurde mit einem humanen CD16-Expressionsvektor und pCMV5 oder pCMV5, das die Mäuse Kip1-cDNA enthielt, kotransfiziert. Tests wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion durchgeführt. a. ^{125}I-Desoxyuridin, eingebaut von der gesamten Zellpopulation innerhalb einer Periode von 3 Stunden. Die Daten stellen Mittelwerte ±Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar. b. Transfizierte Zellen wurden mit anti-CD16 immunogefärbt und auf ihren DNA-Gehalt analysiert. Die Daten stellen Mittelwerte von zwei getrennten Experimenten dar und zeigen den Bereich der Werte.

[0183] Zur Bestimmung des Einflusses auf die Zellzyklusverteilung wurde Kip1 mit einem CD16-Expressionsvektor kotransfiziert (Kurosaki and Ravetch, 1989), der eine fließzytometrische Trennung der transfizierten Zellen auf der Basis der CD16-Immunofluoreszenz ermöglichte. Die mit Kip1 kotransfizierte CD16^{+}-Population zeigte einen größeren Anteil an Zellen in der G1-Phase und einen kleineren Anteil in der S-Phase, verglichen mit der CD16^{+}-Population, die mit dem Vektor allein kotransfiziert worden war (Tabelle III), was darauf schließen lässt, dass eine Kip1-Überexpression den Eintritt der Zelle in die S-Phase behinderte. Die Zellzahlen nach Transfektion zeigten, dass Kip1 nicht den Zelltod hervorrufen (Daten nicht aufgeführt).

Kip1-mRNA-Verteilung und Konzentrationen in ruhenden und proliferierenden Zellen

[0184] Der Grad der endogenen Kip1-mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben wurde durch Northern-Blot-Analyse bestimmt. Die einzige nachgewiesene mRNA war eine Spezies von 2,5 kb, die in sämtlichen getesteten Geweben in ähnlichen Konzentrationen vorlag, obgleich die Konzentration im Skelettmuskel etwas höher und in Leber und Niere etwas niedriger war (**Fig. 12A**). Die Kip1-mRNA-Konzentrationen waren in exponentiell proliferierenden und kontaktgehemmten Mv1Lu-Zellen ähnlich und änderten sich nicht, wenn die Zellen aus der Kontakthemmung durch Ausstreichen in geringer Dichte in Gegenwart von Serum freigesetzt wurden (**Fig. 12B**). Die Zugabe von TGF-β zu Zellen, die von der Kontakthemmung freigesetzt worden waren, beeinflusste ferner nicht die Kip1-mRNA-Konzentrationen (**Fig. 12B**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulierung von Kip1 durch extrazelluläre antiproliferative Signale auf einem posttranskriptionalen Niveau erfolgt.

Diskussion

Eine Familie von Cdk-Inhibitoren

[0185] Humanes Kip1 kodiert für ein Protein mit 198 Aminosäuren, das bei der Maus und beim Nerz hochgradig konserviert ist (~90% Identität). Sein am stärksten unterschiedliches Merkmal ist eine Region mit 60 Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte, die eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit mit Cip1/WAF1 aufweist (El-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). Wie Cip1/WAF1 enthält Kip1 ein potentielles nukleares Lokalisierungssignal in der C-terminalen Region. In Kip1 enthält diese Region ferner eine Konsensus-Cdc2-Kinase-Stelle, die eine Rolle bei der Feed-back-Regulierung durch ihre Ziel-Kinasen spielen kann.

[0186] Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Kip1 und Cip1/WAF1 definiert eine Familie von Säugetier-Cdk-Inhibitoren mit unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften. Kip1 ist posttranskriptional an der Wirkung von

extrazellulären Signalen beteiligt (vorliegende Arbeit) und seine Ruhe in exponentiell wachsenden Zellen korreliert mit der Bindung an eine wärmelabile Komponente. Im Gegensatz dazu wird Cip1/WAF1 transkriptional durch p53 reguliert, und zwar bei der Zellalterung und bei der Zellruhe. Kip1 und Cip1/WAF1 sind wirksamer gegen G1-Cdks als gegen mitotische Cdks. Jedoch war Kip1 wirksamer gegen Cyclin E-Cdk2 als gegen Cyclin A-Cdk2 (oder Cyclin D2-Cdk4), während bei ähnlichen Tests Cip1/WAF1 wirksamer gegen Cyclin A-Cdk2 war (Harper et al., 1993). Die Kipi-Wirksamkeit wird vermutlich durch dessen Bindungsaffinität für einen gegebenen Cyclin-Cdk-Komplex definiert.

[0187] Die Kip1-Region, die ähnlich Cip1/WAF1 ist, reicht zur Hemmung der Cdk-Aktivität aus, wenn ein in vitro-Test als Peptid mit 52 Aminosäuren durchgeführt wird. Dieses Segment mit 52 Aminosäuren enthält die Sequenz LFGPVN, die der längsten, ununterbrochenen Identitätsstrecke mit Cip1/WAF1 entspricht und die interessanterweise ähnlich zu der FAR1-Sequenz LSQPVN ist, die sich in einer Region befindet, die für die Wechselwirkung mit CLN2-CDC28 erforderlich ist (Peter et al., 1993).

Cdk-Hemmung bei zwei Konzentrationen

[0188] Kip1 kann sowohl den Vorgang der Cdk-Aktivierung als auch die Kinaseaktivität von Cyclin-Cdk-Komplexen, die in intakten Zellen zusammengebaut und aktiviert sind, hemmen.

[0189] Kip1 wurde ursprünglich als ein Faktor identifiziert, dessen Vorliegen in Extrakten von ruhenden Zellen diese unfähig machte, Cdk2 durch Phosphorylierung an Thr^{160} zu aktivieren. Tatsächlich hemmt rekombinantes Kip1 in vitro die Cdk2-Thr^{160}-phosphorylierung und Aktivierung. Obgleich Kip1 als ein Inhibitor der Cdk-aktivierenden Kinase wirken sollte, sprechen frühere Ergebnisse tendenziell gegen diese Möglichkeit. Die doppelten Wirkungen von Kip1, sowohl auf die Cdk2-Aktivierung als auch auf die Cdk2-Aktivität, stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Tatsache, dass Thr^{160} sich in einer Schleife befindet, die die Substratbindungsspalte in der Cdk2-Struktur schließt (DeBondt et al., 1993). Es ist vorstellbar, dass die Bindung von Kip1 an diese Region die Thr^{160} Phosphorylierung sowie die katalytische Funktion von aktiviertem Cdk2 möglicherweise stört.

Funktion im Zellzyklus

[0190] Cyclin E-Cdk2 und Cyclin D-Cdk4 sind geschwindigkeitsbegrenzend für die G1-Progression (Jiang et al., 1993; Ohtsubo und Roberts, 1993; Quelle et al., 1993). Eine in vivo-Hemmung dieser Kinasen würde es Zellen unmöglich machen, diesen Übergang zu erreichen. Die starke Verringerung der Geschwindigkeit der DNA-Synthese und des Anteils an Zellen in der S-Phase, die durch die Kip1-Transfektion verursacht wird, stimmt mit dieser Möglichkeit und mit einer Rolle von Kip1 als Mediator von extrazellulären Wachstumshemmsignalen überein.

[0191] Da sich aus einer Kontakthemmung freigesetzte Zellen sich näher zur S-Phase hin bewegen, enthalten ihre Extrakte zunehmend geringere Konzentrationen an Kip1-Aktivität. Dieser Abfall kann durch frühe Zugabe von TGF-β in der G1-Phase verhindert werden. Jedoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass kontaktgehemmte Zellen und mit TGF-β behandelte Zellen Kip1-mRNA-Konzentrationen aufweisen, die denen von proliferierenden Zellen entsprechen. Ferner ergeben Extrakte aus proliferierenden Zellen aktives Kip1, wenn sie vorübergehend auf 100°C erwärmt werden. Eine Interpretation dieser Beobachtungen besteht darin, dass Kip1 bei Durchlaufen der Zelle der G1-Phase zunehmend durch Bindung an eine wärmelabile Komponente maskiert wird und dass dieser Vorgang durch TGF-β verhindert werden kann. Mitogene und Antimitogene könnten die Kip1-Aktivität oder dessen Verfügbarkeit regulieren, indem sie dessen Bindung an ein ruhendes Protein steuern. Alternativ könnte Kip1 einen passiven Regulator darstellen, dessen gleichmäßige Konzentrationen gewährleisten könnten, dass aktive Cdks nur dann verfügbar werden, wenn ihre Konzentrationen die durch die Bindung an Kip1 gesetzte Schwelle erreichen. In der letztgenannten Situation könnten selbst geringe Einflüsse von Mitogenen und Antimitogenen auf Cyclin- oder Cdk-Proteinkonzentrationen durch das Vorliegen dieser Schwelle amplifiziert werden.

Literaturverzeichnis

Attisano, L., Cárcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M. B., Massagué, J., and Wrana, J. L. (1993). Identification of human activin and TGF-b type I receptors that form heteromeric kinase complexes. Cell 75, 671–680.
Barbet, N. and Carr, A. (1993). Fission yeast weel protein kinase is not required for DNA damage-dependent mitotic arrest. Nature 364, 824–827.
Blow, J. J. and Nurse, P. (1990). A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts. Cell 62, 855–862.

Boyle, W. J., Van Der Geer, P., and Hunter, T. (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. Methods in Enzymology 201: 110–149.
Brooks, R., Bennett, D. and Smith J. (1980). MamMalian cell cycles need two random transitions. Cell 19, 493–504.
Chang. F. and Herskowitz, I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. Cell 63: 999–1011.
Dasso, M. and Newport. J. (1990). Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis in vitro: studies in Xenopus. Cell 61, 811–823.
DeBondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., Kim, S-H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature 363, 595–602.
Desai, D., Gu, Y. and Morgan, D. (1992) Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. Mol. Biol. Cell 3, 571–582.
Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences: a consensus? Trends. Biochem. Sci. 16, 478–481.
Dowdy, S., Hinds, P., Louie, K., Reed, S., Arnold, A. Ind Weinberg, R. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. Cell 73, 499–511.
Dunphy, W. and Newport, J. (1989). Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the Xenopus cdc2 protein kinase. Cell 58, 181–191.
D'Urso, G., MarTaccino, R. L., Marshak, D. R., and Roberts, J. M. (1990). Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34-cdc2 protein kinase. Science 250, 786–791.
El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75, 817–825.
Elledge, S. and Spottswood, M. (1991) A new human p34 protein kinase CDK2, identified by complementation of a cdc28 mutation in Saccharomyces cerevisiae, is a homolog of the Xenopus Egl gene. EMBO J. 10, 2653–2659.
Elledge, S., Richman, R. Hall, F., Williams R. Logsdon, N. and Harper. J. (1992) CDK2 encodes a 33 kd cyclic A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89. 2901–2911.
Enoch, T and Nurse, P. (1990). Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis an DNA replication. Cell 60: 665–673.
Ewen, M., Sluss, K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J. Y., and Livingston, D. M. (1993a) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. Cell 73, 487–497.
Ewen, M., Sluss, H., Whitehouse, L. and Livingston, D. (1993b). cdk4 modulation by TGF-β leads to cell cycle arrest. Cell, in press.
Fang, F. and Newport, J. (1991). Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. Cell 66: 731–742.
Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., and Cavadore, J. C. (1993). The M015 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. EMBO J. 12, 3111–3121.
Fournier, R. E. and Pardee, A. (1975). Cell cycle studies of mononucleate and cytochalasin-B-induced binucleate fibrablasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 869–873.
Furakawa, Y., Piwnica-Worms, H., Ernst, T. J., Kanakura, Y., and Griffin, J. D. (1990). cdc2 gene expression at the to S transition in human T lymphocytes. Science 250, 805–808.
Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. Cell 67: 1169–1179.
Gould, K. L and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase requlates entry into mitosis. Nature 342, 39–45.
Gould, K., Moreno, S., Owen, D., Sazer, S. and Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr 167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34CDC2 function. EMBO J. 10, 3297–3309.
Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. EMBO J. 11, 3995–4005.
Hadwiger, J., Wittenberg, C., Richardson, H., Lopes, M., and Reed. S. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 6255–6259.
Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, 805–816.
Hartwell, L. (1991). Twenty-five years of cell cycle genetics. Genetics 129: 975–980.
Hartwell, L. and Weinert, T. (1988). Checkpoints: controls that ensure the order of the cell cycle events. Science 246. 629–634.
Hartwell, L., Culotti, J., Pringle, J. and Reid, B. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science

183, 46–51.
Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. (1993). Human Weel maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. Cell 74, 463–474.
Hinds, P., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. and Weinberg, R. (1992). Regulation of retinoblascoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. Cell 70, 993–1006.
Howe, P., Draetta, G., and Loef, E. (1991). Transforming growth factor β1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. Mol, Cell. Biol. 11, 1185–1194.
Hoyt. M. Totis, L. and Roberts, B. T. (1991). S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. Cell 66, 507–517.
Jiang, W., Kahn, S. M., Zhou, P., Zhang, Y.-J., Cacace, A. M., Infante, A. S., Doi, S., Santella, R. M., and Weinstein, I. B. (1993). Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. Oncogene 8, 3447–3457.
Kaelin Jr, W. G., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanar, M. A., Livingston, D. M., and Flemington, E. K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties, Cell 70, 351–364.
Kaelin, W. G. Jr., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanar, M. A.,
Kato, J. Y. and Sherr, C. J. (1993). Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3, but not D1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, in press.
Kato, J. Y. Matsushime, H., Hiebert, S. Ewen, M. and Sherr, C. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase, cdk4. Genes and Development. 7, 331–342.
Koff, A., F. Cross. A. Fisher, J. Schumacher, K. Leguelle, M. Philippe, J. M. Roberts. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. Cell 66: 1217–1228.
Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D., Franza, R., and Roberts, J. (1992) Formation and activation of a cyclin E/CDK2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 257: 1689–1694.
Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J., and Massague, J. (1993) Negative regulation of G1 in mammalian cells: Inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-β. Science 260: 536–539.
Krek, W. and Nigg, E. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: Identification of major phosphorylation sites. EMBO J. 10, 305–316.
Kumagai, A. and Dunphy, W. (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell free system. Cell 64, 903–914.
Kurosaki, T. and Ravetch, J. V. (1989). A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachement domain determines the membrane topology of FcδRIII. Nature 342, 805–807.
Laiho, M., DeCaprio, J., Ludlow, J., Livingston, D. and Massague, J. (1990). Growth inhibition by TGF-B linked to suppression of Retinoblastoma protein phosphorylation. Cell 62, 175–185.
Lew, D. J., V. Dulic, and S. I. Reed. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. Cell: 66: 1197–1206.
Li, R. and Murray, A. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell 66, 519–531
Livingston, D. M., Flemington, E. K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a Retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. Cell 70: 351–364.
Lundgren, D., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschher, M., and Beach, D. (1991). mikl and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. Cell 64. 1111–1122.
Matsushime, H., Roussel, M., Ashmun, R. and Sherr, C. J. (1991). Colony stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell, 65, 701–713.
Matsushime, H., Ewen, M. Strom, D., Kato, J.-Y., Hanks. S., Roussel, M. and Sherr, C. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D-type G1 cyclins. Cell 71, 323–334.
Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashnun, R. A., and Sherr, C. J. (1991). Colony-Stimulation Factor 1 Regulates Novel Cyclins during the G1 Phase of the cell cycle. Cell 65, 701–713.
Mendenhall, M. (1993). An inhibitor of p34 CDC28 protein kinase activity from Saccharomyces cerevisiae. Science 259, 216–219.
Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., alld Futcher, A. B. (1988). The WHI gene of Saccharomyces cerivisiae tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. EMBO J. 7. 4335–4346.
Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature 344. 503–508.
Ohtsubo, M. and Roberts, J. (1993). Cyclin dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. Science: 259, 1908.
Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Dreaetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J., 11, 961–971.

Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, B., Ansorge, W., Bartek, J. and Draetta, G. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. J. Cell. Biol. 121. 101–111.
Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71. 1286–1290.
Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. Science 246, 603–608.
Paris, S., Le Guellec, R., Couturier, A., Le Guellec, K., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill, S., and Philippe, M. (1991). Cloning by differential screening of a Xenopus cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1029–1043.
Peter, M., Gartner, A., Horecka, J. Ammerer, G. and Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. Cell 73, 747–760.
Poon, R. Yamashita, K., Adamczewski, J., Hunt, T., and Shuttleworth, J. (1933). The cdc2-related protein p40 MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33 CDK2 and p34 CDC2. EMBO J. 12, 3123–3132.
Quelle, D., Ashmun, R., Shurtleff, S., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M., and Sherr, C. J. (1993). Over expression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. Genes and Development 7, 1559–1571.
Rao, P., Sunkara, P. and Wilson, B. (1977). Regulation of DNA synthesis: Age-dependent cooperation among G1 cells upon fusion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2869–2873.
Reid, B. and Hartwell, L. (1977). Regulation of mating in the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. 75, 355–365.
Rosenblatt, J., Gu, Y. and Morgan, D. (1992). Human cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) is activated during the S and G2 phase of the cell cycle and associates with cyclin A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 2824–2828.
Rawley, R., Hudson, J., and Young, P. (1992). The weel protein kinase is required for radiation-induced mitotic delay. Nature 356, 353–355.
Sambrook, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.
Sherr, C. (1993). Mammalian G1 cyclins. Cell 73, 1059–1065.
Smith, J., and Martin, L. (1973). Do cells cycle? Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1263–1267.
Smythe, C. and Newport, J. (1992) Coupling of mitosis to the completion of S phase in Xenopus occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates p34 CDC2. Cell 68, 787–797.
Solomon, M. J., Lee, T. and Kirschner, M. (1991). Role of phosphorylation in p34 CDC2 activation: identification of an activating kinase. Mol. Biol. Cell 3, 13–27.
Solomon, M. J., Harper, J., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34 CDC2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40 MO15. EMBO J. 12, 3133–3142.
Sorger, P. and Murray, A. (1992). S phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34-CDC28. Nature 355, 365–368.
Stueland, C. Lew, D., Cismowski, M., and Reed, S. (1993) Full activation of p34 CDC28 histone H1 kinase activity is unable to promote entry into mitosis in checkpoint-arrested cells of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 13, 3744–3755.
Tempst, P., Link, A. J., Riviere, R. L., Fleming, M., and Elicone, C. (1990). Internal sequence analysis of proteins separated on polyacrylamide gels at the sub-microgram level: improved methods, applications and gene coding strategies. Electroph. 11, 537–553.
Tsai, L., Harlow, E. and Meyerson, M. (1991) Isolation of the human Cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. Nature 33, 555–557.
Tsai, L., Lees, E., Haha, B., Harlow, E., and Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S phase transition in mammalian cells. Oncogene 8, 1593–1602.
Walworth, N. Davey, S. and Beach, D. (1993) Fission yeast cell protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. Nature 363, 368–371.
Weinert, T. and Hartwell, L. (1989). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Science 241, 317–322.
Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M. S., and Ravetch. J. V. (1992). Signal transduction by FcδRIII (CD16) is mediated through the δ chain. J. Exp. Med. 175, 1381–1390.
Wittenberg, C., Sugimoto, K., and Reed, S. I. (1990). G1-specific cyclins of S. cerevisiae: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34-CDC28 protein kinase. Cell 62, 225–237.
Won, K., Xiong, Y., Beach, D. and Gilman, M. (1992) Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 9910–9914.
Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1992) D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell 71, 505–514.
Xiong, Y., Zhang, H., and Beach (1993). Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. Genes and Dev. 7, 1572–1583.
Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor

of cyclin kinases. Nature 366, 701–704.

Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid, umfassend einen Aminosäureteil mit 90% Homologie zu den Resten +28 bis +88 der in Fig. 9B dargestellten oberen Polypeptidsequenz, wobei das Polypeptid die Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes hemmt.

2. Rekombinantes Polypeptid, umfassend einen Aminosäureteil mit 90% Homologie zu den Resten +28 bis +88 der in Fig. 9B dargestellten oberen Polypeptidsequenz, wobei das Polypeptid die Aktivierung eines Cyclin-E-Cdk2-Komplexes hemmt.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Polypeptidsequenz identisch mit einer beliebigen der drei in Fig. 9A dargestellten Polypeptidsequenzen ist.

4. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polypeptid eine Sequenz umfasst, die identisch mit den Aminosäureresten +28 bis +88 der in Fig. 9B dargestellten oberen Polypeptidsequenz ist.

5. Isoliertes oder rekombinantes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz entsprechend den Resten 28–88 der in Fig. 9B dargestellten oberen Polypeptidsequenz, wobei das Polypeptid die Aktivierung eines Cyclin
E-Cdk2-Komplexes hemmt.

6. Polypeptid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Polypeptid ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 27 kD aufweist.

7. Polypeptid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Polypeptid die Zell-Zyklus-Progression von der G1- zur S-Phase hemmt.

8. Polypeptid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Polypeptid humanen Ursprungs ist.

9. Isoliertes oder rekombinantes Nucleinsäuremolekül, umfassend eine Nucleotidsequenz, die für ein Polypeptid nach einem der vorstehenden Ansprüche kodiert.

10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9, wobei es sich bei dem Nucleinsäuremolekül um ein DNA-Molekül handelt.

11. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem DNA-Molekül um ein cDNA-Molekül handelt.

12. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9, wobei es sich bei dem Nucleinsäuremolekül um ein RNA-Molekül handelt.

13. Vektor, umfassend das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 12.

14. Vektor nach Anspruch 13, ferner umfassend eine transkriptionale regulatorische Sequenz, die funktionell mit der Nucleotidsequenz im Innern des Vektors verknüpft ist.

15. Vektor nach Anspruch 13, wobei es sich bei dem Vektor um ein Plasmid handelt.

16. Vektor nach Anspruch 13, wobei es sich bei dem Vektor um ein Virus handelt.

17. Wirt-Vektor-System zur Herstellung eines Polypeptids, umfassend den Vektor von Anspruch 13 in einem geeigneten Wirt.

18. Wirt-Vektor-System nach Anspruch 17, wobei es sich bei dem geeigneten Wirt um eine bakterielle Zelle handelt.

19. Wirt-Vektor-System nach Anspruch 17, wobei es sich bei dem geeigneten Wirt um eine eukaryontische Zelle handelt.

20. Wirt-Vektor-System nach Anspruch 19, wobei es sich bei der eukaryontischen Zelle um eine Insektenzelle handelt.

21. Isolierter Antikörper oder Fragment davon, der spezifisch immunoreaktiv mit einem Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 ist.

22. Antikörper nach Anspruch 21, wobei es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt.

23. Antikörper nach Anspruch 21, wobei der Antikörper mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist.

24. Partiell gereinigtes Präparat von polyklonalen Antikörpern oder einem Fragment davon, das spezifisch mit einem Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 immunoreaktiv ist.

25. Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, das zur spezifischen Hemmung der Fähigkeit eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, umfassend folgende Schritte:
(i) geeignete Mengen an Polypeptid, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht;
(ii) das Polypeptid, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit des Polypeptids ermöglichen würden;
(iii) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und
(iv) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes größer als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Hemmung der Fähigkeit des Polypeptids, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist.

26. Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel zur spezifischen Verstärkung der Fähigkeit eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist, umfassend die folgenden Schritte:
(i) geeignete Mengen an Polypeptid, Cyclin E, Cdk2 und dem Mittel werden unter geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht;
(ii) das Polypeptid, Cyclin E, Cdk2 und das Mittel werden unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Bildung eines aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes in Abwesenheit des Polypeptids ermöglichen würden;
(iii) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird quantitativ bestimmt; und
(iv) die Menge des auf diese Weise gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes wird mit der Menge des in Abwesenheit des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes verglichen, wobei die Tatsache, dass die Menge des in Gegenwart des Mittels gebildeten aktiven Cyclin E-Cdk2-Komplexes kleiner als die in Abwesenheit des Mittels gebildete Menge ist, darauf hinweist, dass das Mittel zu einer spezifischen Verstärkung der Fähigkeit des Polypeptids, die Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes zu hemmen, befähigt ist.

27. Verfahren zur Diagnose einer Krankheit bei einem Patienten, umfassend folgende Schritte:
(i) die Konzentration eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Probe von Zellen des Patienten wird bestimmt; und
(ii) das Vorliegen oder die Abwesenheit einer Krankheit wird unter Heranziehung der festgestellten Konzentration des Polypeptids diagnostiziert, wobei eine verminderte Konzentration des Polypeptids in der Probe relativ zu einer Konzentration eines Wildtyp-Polypeptids in einer Kontrollprobe von normalen Zellen mit dem Vorliegen einer Krankheit korreliert und wobei das Wildtyp-Polypeptid einen Aminosäureteil mit 90% Homologie zu den Resten +28 bis +88 des in **Fig. 9B** dargestellten oberen Polypeptids aufweist, wobei dieses Polypeptid die Aktivierung eines Cyclin E Cdk2-Komplexes hemmt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Konzentration des Polypeptids durch einen Immunoassay bestimmt wird.

29. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Wildtyp-Polypeptid eine Aminosäuresequenz von einem der drei in **Fig. 9A** dargestellten Polypeptidsequenzen aufweist.

30. Verfahren nach Anspruch 27, wobei es sich bei dem Patienten um einen Menschen handelt.

31. Verfahren zur Bestimmung der relativen Menge eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Zelle oder Probe von Zellen (Zellprobe), umfassend folgende Schritte:
(i) die Konzentration des Polypeptids in der Zellprobe wird durch einen Immunoassay unter Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 21 bis 24 bestimmt; und
(ii) die Konzentration des Polypeptids in der Zellprobe wird mit der für eine Kontrollzelle bestimmten Konzentration eines Wildtyp-Polypeptids verglichen, wobei das Wildtyp-Polypeptid einen Aminosäureteil mit 90% Homologie zu den Resten +28 bis +88 der in **Fig. 9B** dargestellten oberen Polypeptidsequenz umfasst, wobei das Polypeptid die Aktivierung eines Cyclin E-Cdk2-Komplexes hemmt.

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das Wildtyp-Polypeptid eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit einer beliebigen der drei in **Fig. 9A** dargestellten Polypeptidsequenzen identisch ist.

33. Verfahren zur Bestimmung der Menge eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Zelle oder Zellprobe, umfassend folgende Schritte:
(i) die Zelle oder Zellprobe wird mit einem Antikörper, der selektiv mit dem Polypeptid reaktiv ist, unter Bedingungen kontaktiert, die ausreichen, dass der Antikörper das Polypeptid bindet; und
(ii) die Menge des durch den Antikörper gebundenen Polypeptids wird bestimmt.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Antikörper mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist.

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei die Markierung unter Radioisotopen und fluoreszierenden Verbindungen ausgewählt ist.

36. Verfahren zur Bestimmung der relativen Menge eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Zelle oder Zellprobe, umfassend folgende Schritte:
(i) die Zelle oder Zellprobe wird mit einem Antikörper nach einem der Ansprüche 21 bis 24 behandelt;
(ii) die Konzentration eines zwischen dem Antikörper und dem Polypeptid in der Zelle oder Zellprobe gebildeten Immunokomplexes wird quantitativ bestimmt; und
(iii) die Konzentration des Immunokomplexes in der Zellprobe wird mit der für eine Kontrollzelle bestimmten Konzentration eines Wildtyp-Polypeptids verglichen.

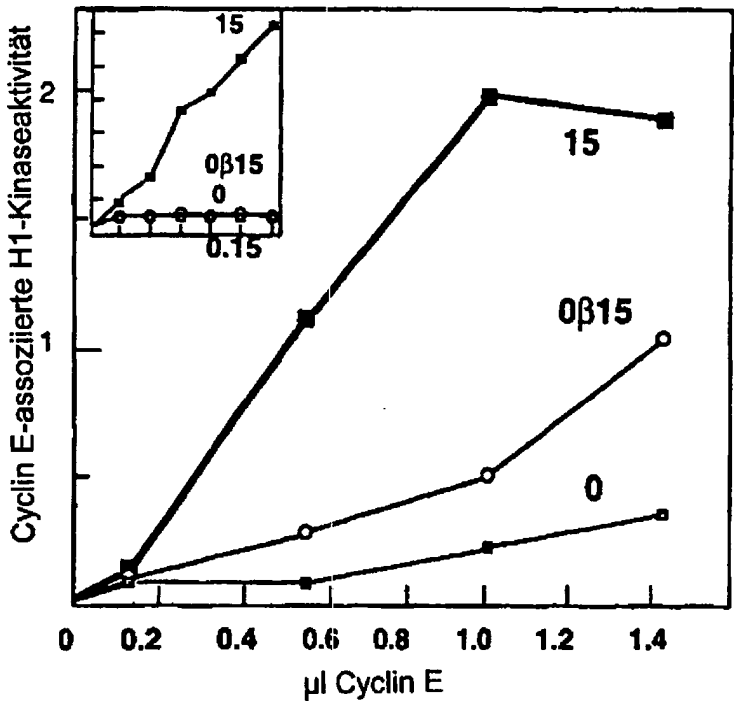
37. Verfahren zur Bestimmung der relativen Aktivität eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einer Zelle oder Zellprobe, umfassend folgende Schritte:
(i) die Aktivität des Polypeptids in der Zelle oder Zellprobe wird durch Überwachung der Hemmung der Aktivierung des Cyclin E-Cdk2-Komplexes bestimmt; und
(ii) die Aktivität des Polypeptids in der Zelle oder Zellprobe wird mit der in einer Kontrollzelle oder Kontrollzellprobe bestimmten Aktivität eines Wildtyp-p27-Polypeptids verglichen.

38. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge eines rekombinanten Virus, der zur Infektion einer geeigneten Wirtszelle befähigt ist, wobei das rekombinante Virus das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 12 umfasst, und einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

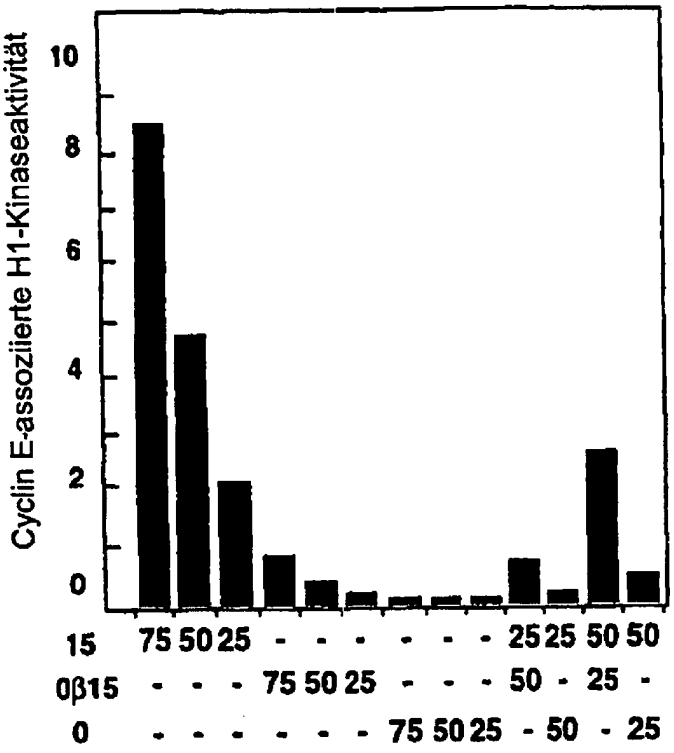
Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

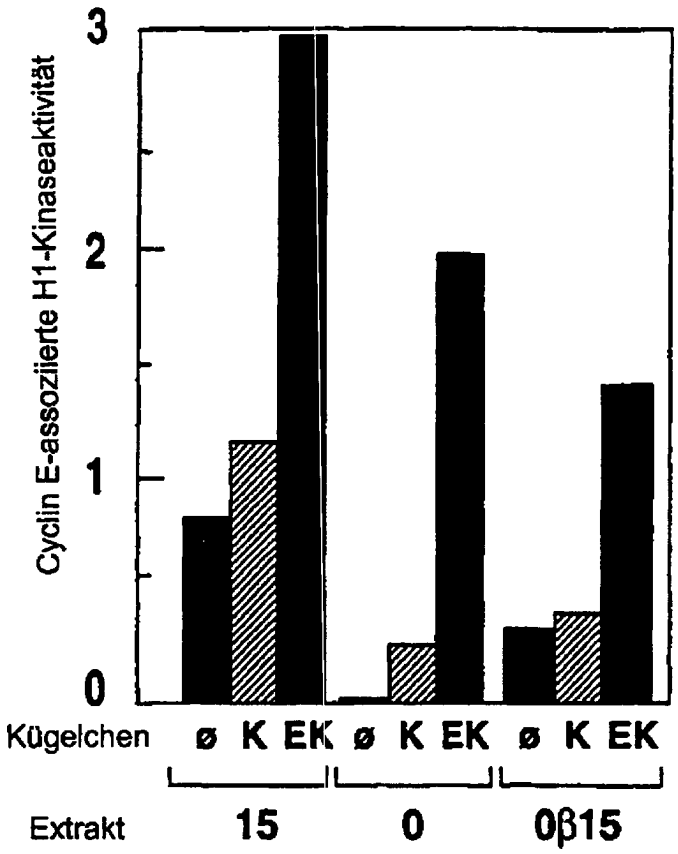
FIGUR 1A



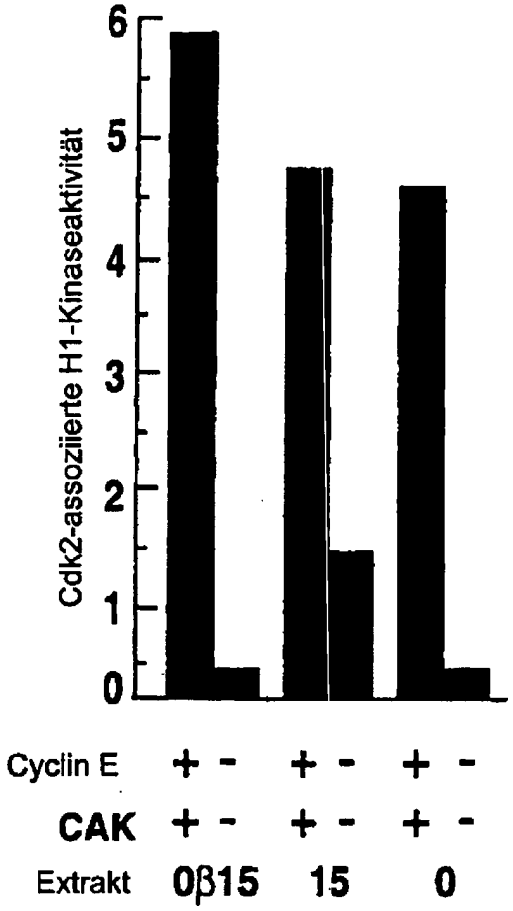
FIGUR 1B


Cyclin E-assoziierte H1-Kinaseaktivität
10
8
6
4
2
0
15 75 50 25 - - - - - - 25 25 50 50
0β15 - - - 75 50 25 - - - 50 - 25 -
0 - - - - - - 75 50 25 - 50 - 25

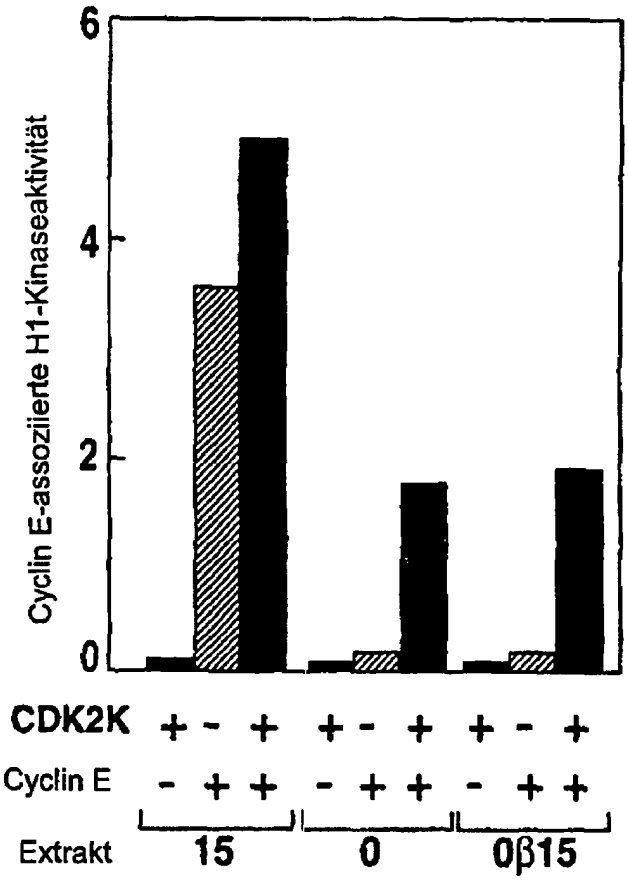
FIGUR 2A


Cyclin E-assoziierte H1-Kinaseaktivität
3
2
1
0
Kügelchen
ø K EK ø K EK ø K EK
Extrakt
15
0
0β15

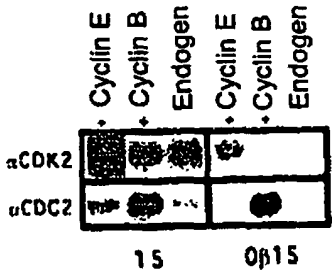
FIGUR 2B


Cdk2-assoziierte H1-Kinaseaktivität
0
1
2
3
4
5
6
Cyclin E + - + - + -
CAK + - + - + -
Extrakt 0β15 15 0

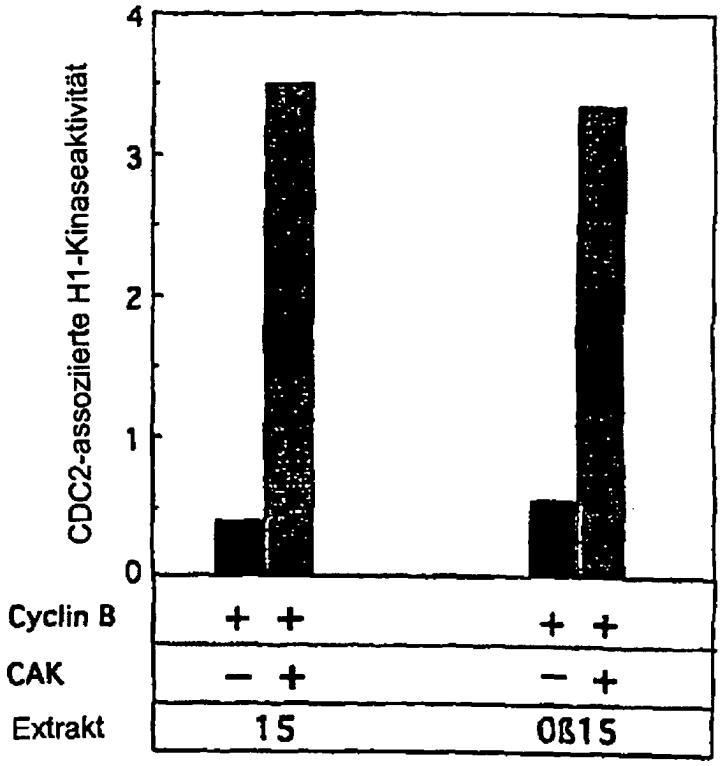
FIGUR 2C


6
4
2
0
Cyclin E-assoziierte H1-Kinaseaktivität
CDK2K + - + + - + + - +
Cyclin E - + + - + + - + +
Extrakt 15 0 0β15

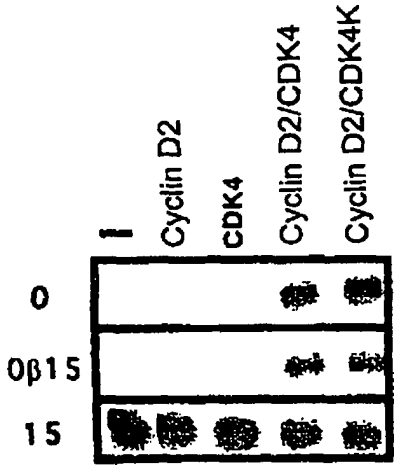
FIGUR 3A


Cyclin E
Cyclin B
Endogen
Cyclin E
Cyclin B
Endogen
αCDK2
αCDC2
15
0β15

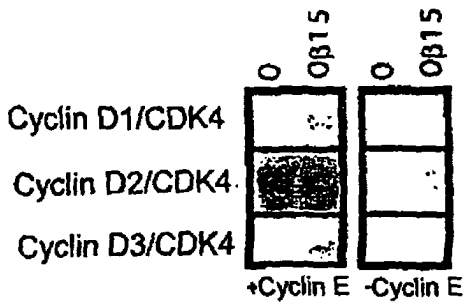
FIGUR 3B


CDC2-assoziierte H1-Kinaseaktivität
4
3
2
1
0
Cyclin B
+ +
+ +
CAK
− +
− +
Extrakt
15
0ß15

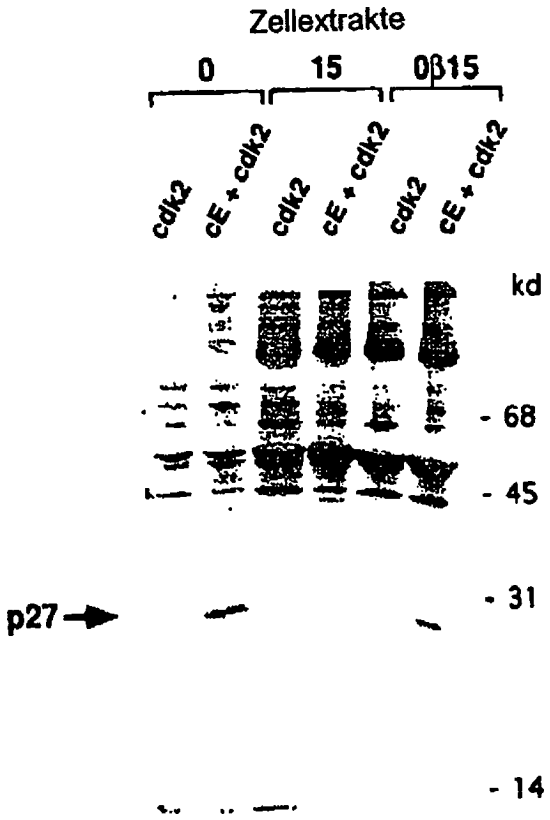
FIGUR 4A



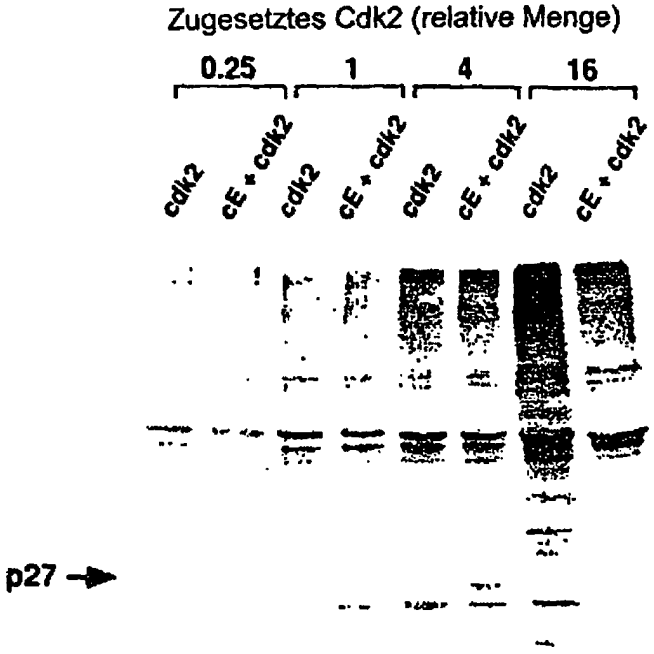
FIGUR 4B


0
0β15
0
0β15
Cyclin D1/CDK4
Cyclin D2/CDK4
Cyclin D3/CDK4
+Cyclin E
-Cyclin E

FIGUR 5A


Zellextrakte
0
15
0β15
cdk2
cE + cdk2
cdk2
cE + cdk2
cdk2
cE + cdk2
kd
- 68
- 45
p27
- 31
- 14

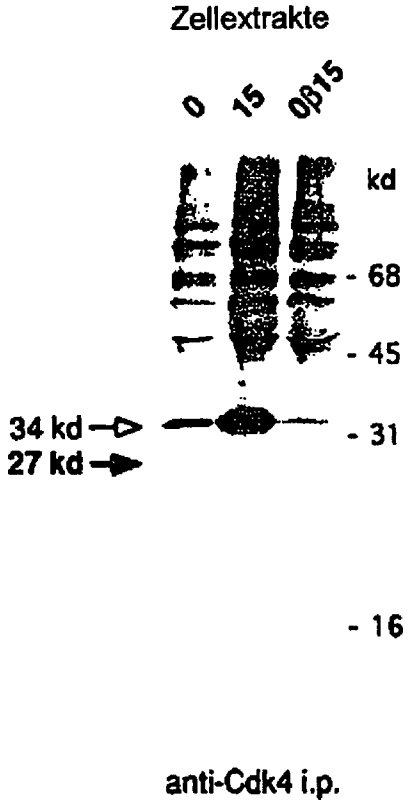
FIGUR 5B



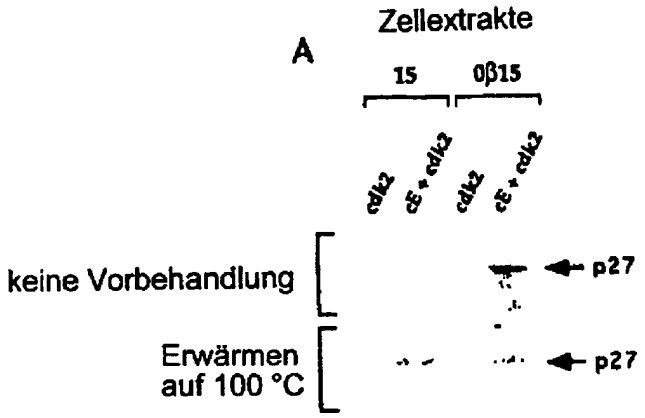
FIGUR 5C



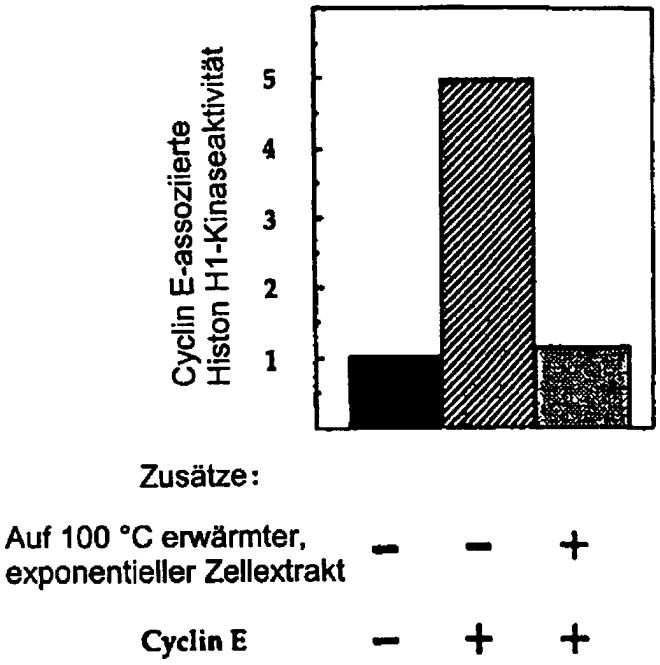
FIGUR 5D



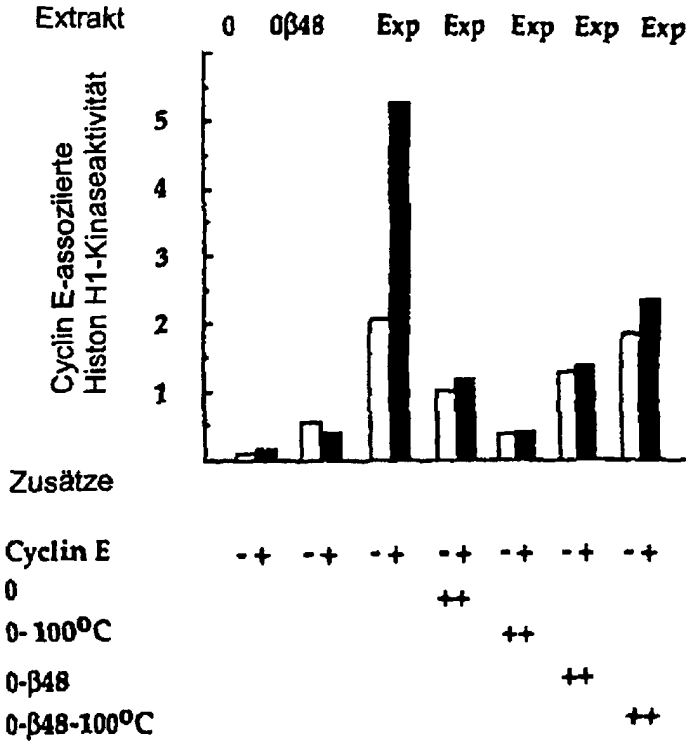
FIGUR 6A


A
Zellextrakte
15
0β15
cdk2
cE + cdk2
cdk2
cE + cdk2
keine Vorbehandlung
Erwärmen
auf 100 °C
p27
p27

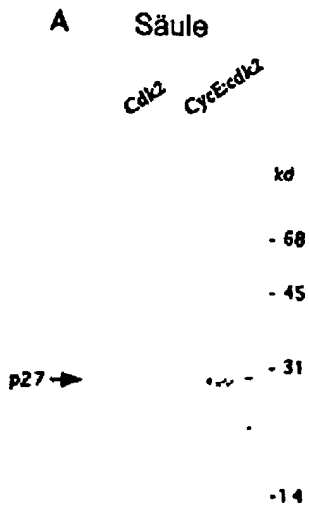
FIGUR 6B


Cyclin E-assoziierte Histon H1-Kinaseaktivität
5
4
3
2
1
Zusätze:
Auf 100 °C erwärmter, exponentieller Zellextrakt - - +
Cyclin E - + +

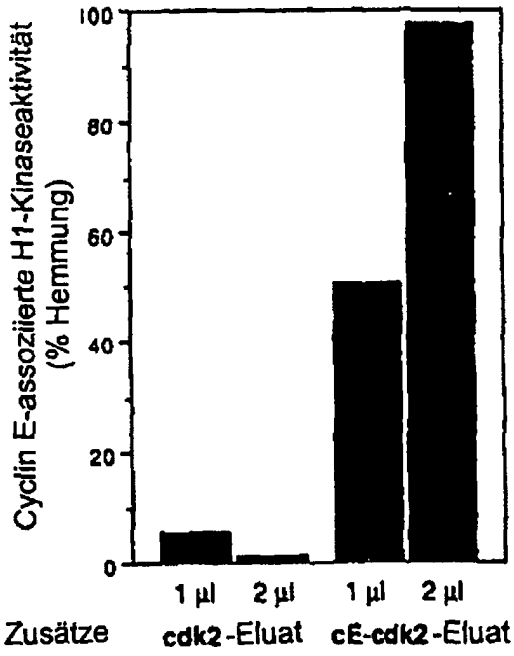
FIGUR 6C


Extrakt
0
0β48
Exp
Exp
Exp
Exp
Exp
Cyclin E-assoziierte Histon H1-Kinaseaktivität
5
4
3
2
1
Zusätze
Cyclin E
0
0-100°C
0-β48
0-β48-100°C
- +
++

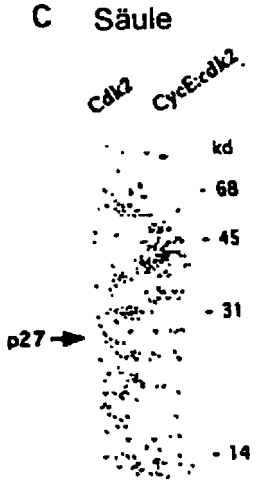
FIGUR 7A



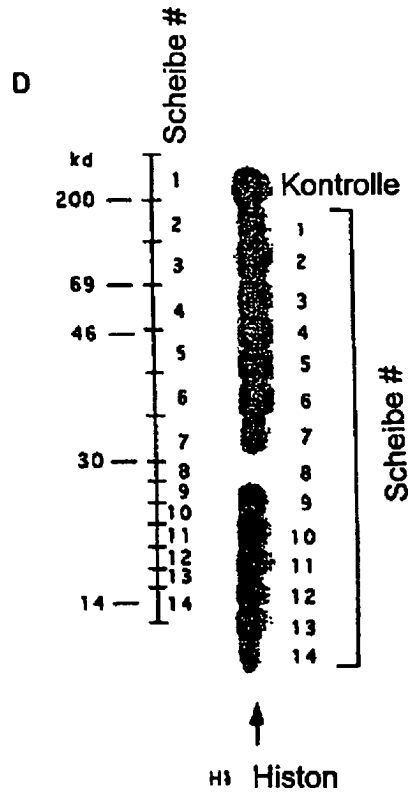
FIGUR 7B

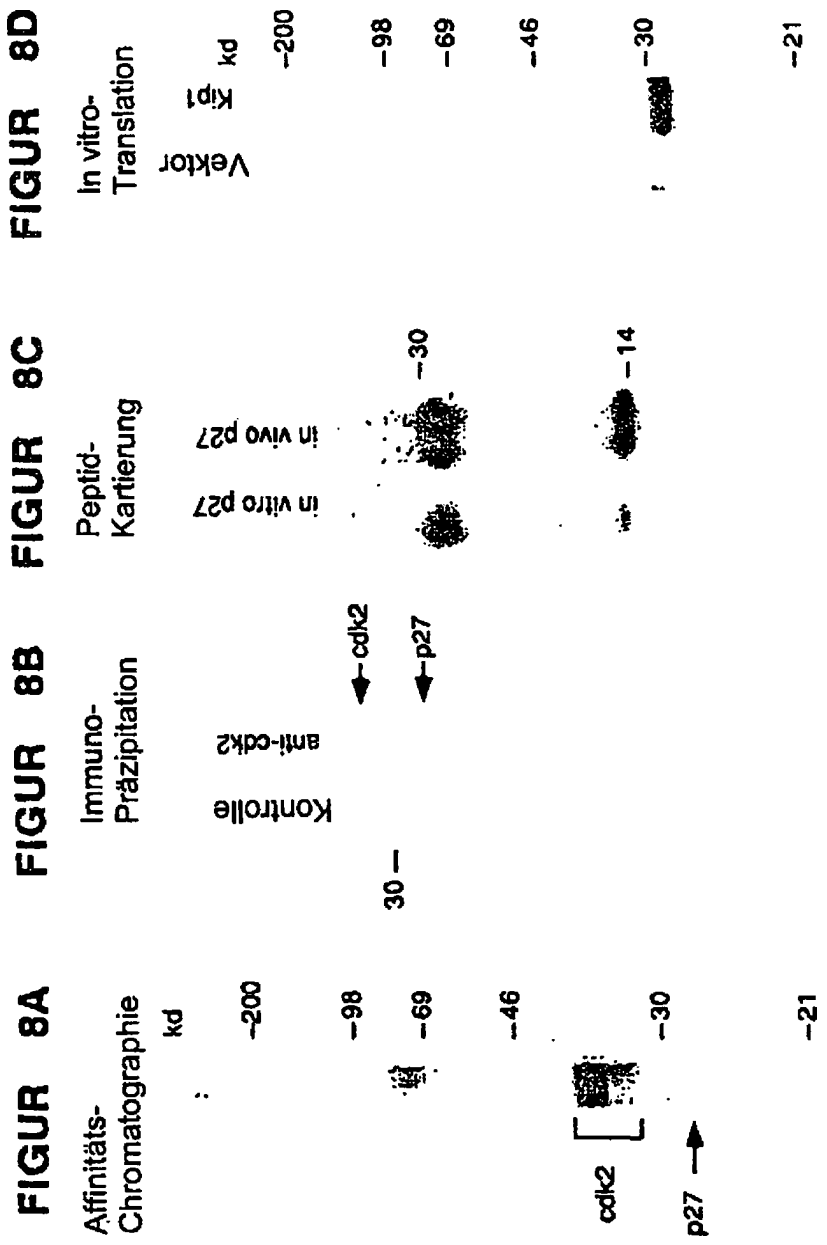

Cyclin E-assoziierte H1-Kinaseaktivität
(% Hemmung)
100
80
60
40
20
0
1 µl
2 µl
1 µl
2 µl
Zusätze
cdk2-Eluat
cE-cdk2-Eluat

FIGUR 7C

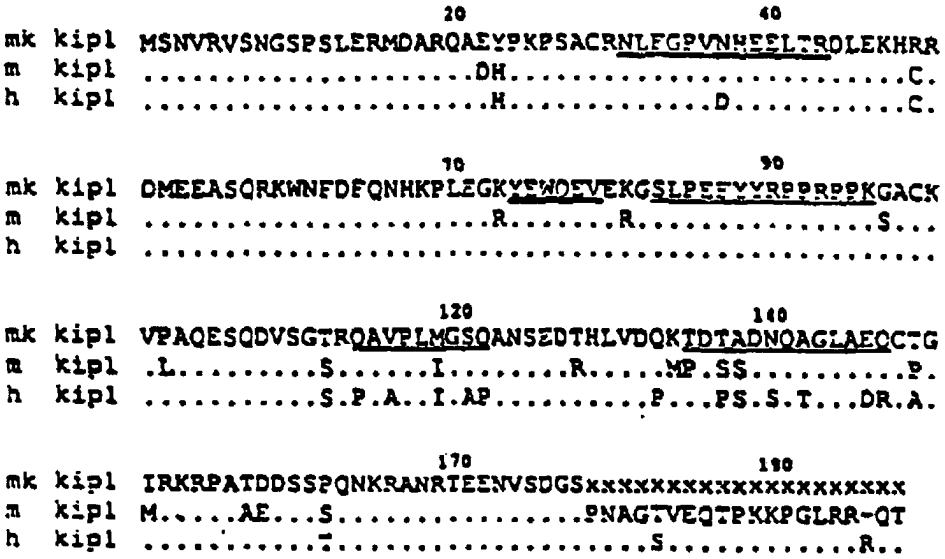


FIGUR 7D

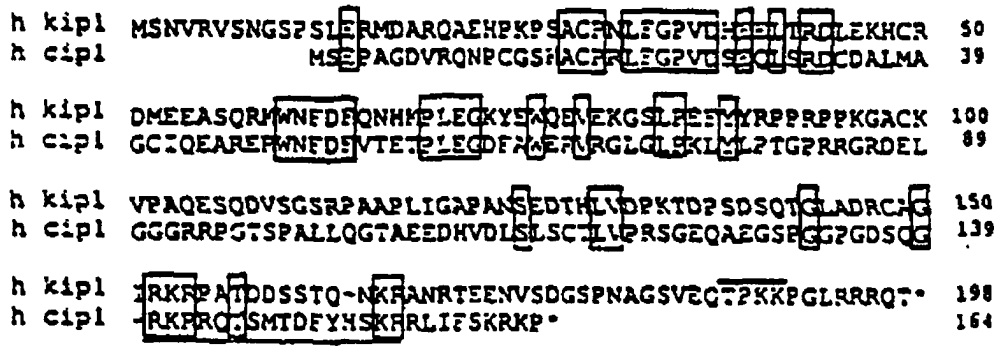

D
Scheibe #
kd
200
69
46
30
14
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Kontrolle
Scheibe #
H1 Histon


FIGUR 8A
Affinitäts-Chromatographie
kd
200
98
69
46
30
21
cdk2
p27
FIGUR 8B
Immuno-Präzipitation
Kontrolle
anti-cdk2
cdk2
p27
30
FIGUR 8C
Peptid-Kartierung
in vitro p27
in vivo p27
30
14
FIGUR 8D
In vitro-Translation
Vektor
Kip1
kd
200
98
69
46
30
21

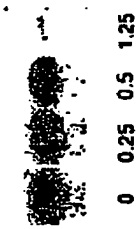
FIGUR 9A



FIGUR 9B



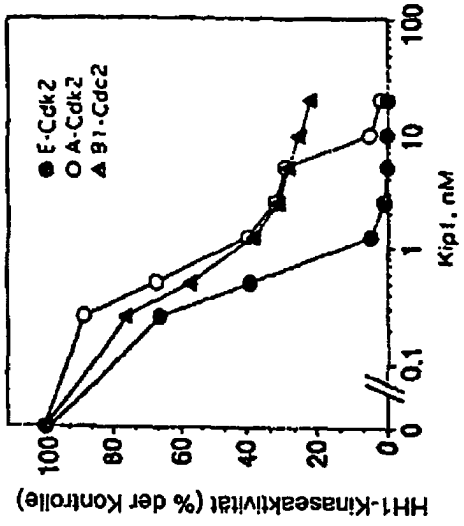
FIGUR 10A



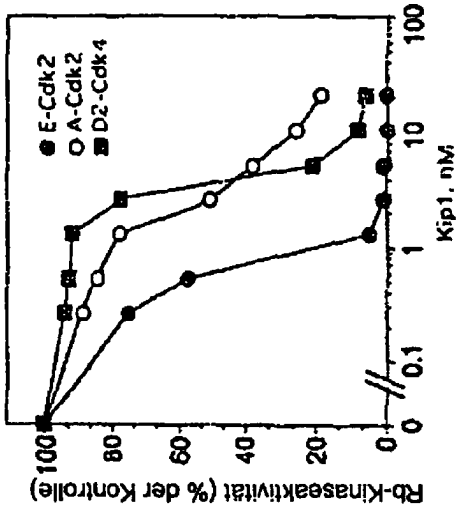
FIGUR 10C



FIGUR 10B



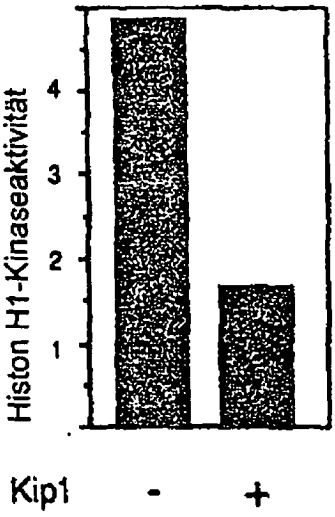
FIGUR 10D



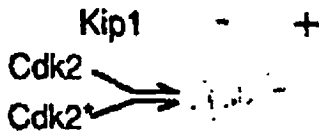
FIGUR 10E

Produkt	Relative Aktivität A:K2	E:K2	D2:K4
Kip1	100	100	100
Kip1(28-79)	25	5	1
Kip1(31-79)	0.1	0.03	0.1
Kip1(35-79)	<0.01	<0.01	<0.01
Kip1(28-64)	1.5	0.1	n.d.
Kip1(104-152)	<0.01	<0.01	<0.01

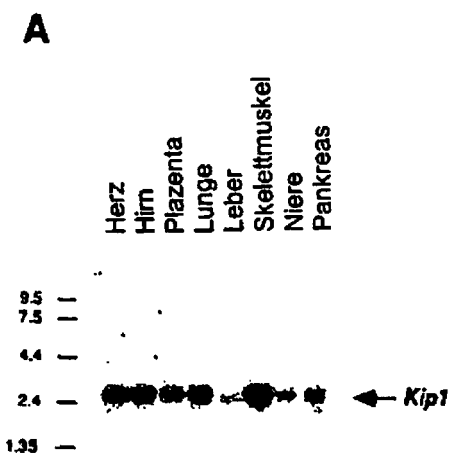
FIGUR 11A



FIGUR 11B



FIGUR 12A



FIGUR 12B

