



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7276

Regulation der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) nach ionisierender Strahlung

K. A. Böhme

Institut für Toxikologie und Genetik

Dezember 2006

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7276

Regulation der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) nach ionisierender Strahlung

Karen Andrea Böhme
Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2006

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072765

Regulation der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) nach ionisierender Strahlung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

**Karen Andrea Böhme
aus Lübeck**

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: PD Dr. Christine Blattner
Korreferent: Prof. Dr. Doris Wedlich
Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.06

Regulation der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) nach ionisierender Strahlung

Zusammenfassung

Die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryliert das Mdm2 Protein in der zentralen Domäne. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Degradation des p53 Proteins. Ionisierende Strahlung inaktiviert GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 und verhindert dadurch die Mdm2-vermittelte Degradation des p53 Proteins.

In meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass Akt/PKB das GSK-3 β Protein nach ionisierender Strahlung an Serin 9 phosphoryliert. Ionisierende Strahlung führt zur Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 und Serin 473. Der PI3 Kinase Inhibitor LY294002 verhinderte nach ionisierender Strahlung sowohl die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 als auch den Anstieg der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9. Zellfraktionierungen zeigten nach ionisierender Strahlung eine besonders deutliche Aktivierung von Akt/PKB im Zellkern, während Akt/PKB im Zytoplasma kaum aktiviert wurde. Durch die Verwendung spezifischer siRNA konnte ich feststellen, dass die Aktivierung von Akt1/PKB α , nicht aber die Aktivierung von Akt2/PKB β , für die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung verantwortlich ist.

Die zur PI3 Kinase Familie gehörende DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK), die durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird, phosphoryliert das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung. Sowohl in Zellen von SCID Mäusen als auch nach dem Ausschalten der katalytischen Untereinheit von DNA-PK durch siRNA in Osteosarkom Zellen wurde das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung nicht länger an Serin 473 phosphoryliert. Dadurch blieb auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 aus. In Übereinstimmung mit dem Grundsatz, dass die Phosphorylierung von GSK-3 β an Serin 9 zur Stabilisierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung beiträgt, führte der Verlust der katalytischen Untereinheit von DNA-PK zu einer wesentlich geringeren Mengenzunahme des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung.

Aus meinen Ergebnissen schließe ich, dass ionisierende Strahlung eine Signalkaskade auslöst, in der DNA-PK die Kinase Akt1/PKB α an Serin 473 phosphoryliert und aktiviert. Akt1/PKB α phosphoryliert und inhibiert wiederum GSK-3 β im Zellkern, was zur Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins führt. Durch die Hypophosphorylierung ist das Mdm2 Protein nicht mehr in der Lage die Degradation des p53 Proteins zu vermitteln, welches daraufhin im Zellkern akkumuliert.

Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) after ionizing radiation

Abstract

Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphorylates the Mdm2 protein in the central domain. This phosphorylation is absolutely required for p53 degradation. Ionizing radiation inactivates GSK-3 β by phosphorylation at serine 9 and in consequence prevents Mdm2 mediated p53 degradation.

During the work for my PhD I identified Akt/PKB as the kinase that phosphorylates GSK-3 β at serine 9 after ionizing radiation. Ionizing radiation leads to phosphorylation of Akt/PKB at threonine 308 and serine 473. The PI3 Kinase inhibitor LY294002 completely abolished Akt/PKB serine 473 phosphorylation and prevented the induction of GSK-3 β serine 9 phosphorylation after ionizing radiation. Interestingly, the most significant activation of Akt/PKB after ionizing radiation occurred in the nucleus while cytoplasmic Akt/PKB was only weakly activated after radiation. By using siRNA, I showed that Akt1/PKB α , but not Akt2/PKB β , is required for phosphorylation of GSK-3 β at serine 9 after ionizing radiation.

Phosphorylation and activation of Akt/PKB after ionizing radiation depends on the DNA dependent protein kinase (DNA-PK), a member of the PI3 Kinase family, that is activated by free DNA ends. Both, in cells from SCID mice and after knockdown of the catalytic subunit of DNA-PK by siRNA in osteosarcoma cells, phosphorylation of Akt/PKB at serine 473 and of GSK-3 β at serine 9 was completely abolished. Consistent with the principle that phosphorylation of GSK-3 at serine 9 contributes to p53 stabilization after radiation, the accumulation of p53 in response to ionizing radiation was largely prevented by downregulation of DNA-PK.

From these results I conclude, that ionizing radiation induces a signaling cascade that leads to Akt1/PKB α activation mediated by DNA-PK dependent phosphorylation of serine 473. After activation Akt1/PKB α phosphorylates and inhibits GSK-3 β in the nucleus. The resulting hypophosphorylated form of Mdm2 protein is no longer able to degrade p53 which in consequence accumulates in the nucleus.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 GSK-3	4
1.1.1 GSK-3 im Insulin-Signalweg	5
1.1.2 GSK-3 im Neurotrophin-Signalweg.....	6
1.1.3 GSK-3 im Wnt-Signalweg	7
1.1.4 GSK-3 im Mdm2-p53-Signalweg	8
1.2 Die Regulation von GSK-3.....	10
1.2.1 Regulation von GSK-3 durch intrazelluläre Lokalisation	10
1.2.2 Regulation von GSK-3 durch Bindeproteine	11
1.2.3 Regulation von GSK-3 durch Phosphorylierung.....	11
1.3 GSK-3 Kinasen	12
1.3.1 p70S6K und p90RSK.....	13
1.3.2 PKA	16
1.3.3 PKC	18
1.3.4 Akt/PKB.....	21
1.4 DNA-PK	24
1.5 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Radioaktive Chemikalien	27
2.1.3 Größenstandards, Kits und Matrices	28
2.1.4 doppelsträngige siRNA Oligonukleotide	28
2.1.5 Plasmide	28
2.1.6 Antikörper	28
2.1.7 Bakterien	29
2.1.8 Zelllinien und Kulturmedien	29
2.1.9 Membranen, Filme und Plastikwaren.....	30
2.1.10 Glaswaren.....	30

2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur- und Transfektionsmethoden	30
2.2.1.1	Zellkultur	30
2.2.1.2	Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryotischen Zellen	30
2.2.1.3	Transfektion von siRNA mit Lipofectamine TM 2000	31
2.2.1.4	Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung und Inhibitoren	31
2.2.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Bakterien	32
2.2.3	Methoden zur Arbeit mit Proteinen	32
2.2.3.1	Präparation des Gesamtzelllysats	32
2.2.3.2	Auftrennung des Zelllysats in zytoplasmatische und nukleäre Fraktion	33
2.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.3.4	Immunpräzipitation	34
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.2.3.6	Western Blot	35
2.2.3.7	Präparation von GST-Fusionsproteinen	36
2.2.3.8	Kinase-Analyse	36
2.2.4	Quantifizierung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Einfluss von p70S6K und p90RSK auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung	39
3.2	Einfluss konventioneller und neuer PKC Isoformen auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung	41
3.3	Einfluss von PKA auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung	43
3.4	Einfluss von Akt/PKB auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung	45
3.4.1	Inhibition der Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung durch den PI3 Kinase Inhibitor LY294002	45
3.4.2	Vergleich der Phosphorylierungen von Akt/PKB und GSK-3 β nach ionisierender Strahlung im Zytoplasma und Zellkern	47
3.4.3	Akt/PKB ist nach ionisierender Strahlung im Zellkern aktiviert	49
3.4.4	Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt in Abhängigkeit von Akt1/PKB α	51
3.4.5	Einfluss von Akt2/PKB β auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung	53
3.5	Die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 nach ionisierender Strahlung benötigt die katalytische Untereinheit von DNA-PK	55
4	Diskussion	59

4.1	Akt/PKB phosphoryliert und inaktiviert GSK-3 β nach ionisierender Strahlung.....	60
4.2	Einfluss anderer Signalwege auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung.....	63
4.3	DNA-PK phosphoryliert und aktiviert Akt/PKB nach ionisierender Strahlung.....	64
4.4	Modell der Regulation von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung.....	66
5	Literaturverzeichnis	69

Abkürzungen

AC	Adenylat Zykklase
AGC	PKA, PKG, PKC
AKAP	„A Kinase Anchoring Protein“
APC	„Adenomatous Poliposis Coli“
ATM	„Ataxia Telangiectasia Mutated“
ATR	„Ataxia Telangiectasia and Rad related“
cAMP	zyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“
BDNF	„Brain Derived Neurotrophic Factor“
BMDM	„Bone Marrow Derived Macrophage“
BSA	„Bovine Serum Albumine“
CaMK	„Calcium/Calmodulin“-abhängige Kinase
Cdc	„Cell division control protein“
Cdk	„Cyclin dependent kinase“
Chk	„Checkpoint“ Kinase
Ci	Curie
CRE	„Cyclic AMP Response Element“
CREB	„Cyclic AMP Response Element Binding Protein“
DAG	Diacylglyzerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-abhängige Protein Kinase
DTT	Dithiotreitol
Dvl	„Dishevelled“
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamin-N,N-Tetraacetat
ERK	„Extracellular Signal Regulated Kinase“
FRAT	„Frequently Rearranged in advanced T-Cell Lymphomas“
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GS	Glykogen Synthase
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3

GST	Glutathion S Transferase
HEPES	„2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid“
HM	Hydrophobes Motiv
HRP	„Horseradish Peroxidase“
Hsp	„Heat shock protein“
I κ B	Inhibitor von κ B
ILK	„Integrin Linked Kinase“
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IR	Ionisierende Strahlung
JNK	Jun N-terminale Kinase
LEF/TCF	„Leukemia Enhancing Factor/T-Cell Factor“
MAPK	„Mitogen Activated Protein Kinase“
MAPKAP-K1	„MAPK Activated Protein Kinase 1“ (p90RSK)
Mdm2	„Mouse double minute clone 2“
MEF	embryonale Maus Fibroblasten
MEK	MAP/ERK Kinase
mTOR	„mammalian Target of Rapamycin“
Nbs	„Nijmegen breakage syndrome“
NES	„Nuclear Export Signal“
NLS	„Nuclear Localisation Signal“
NHEJ	„Non Homologous End Joining“
p70S6K	p70 Ribosomale S6 Kinase (S6K1)
p90RSK	p90 Ribosomale S6 Kinase (RSK)
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCNA	„Proliferating Cell Nuclear Antigen“
PDK	„Phosphoinositide Dependent Kinase“
PH	Pleckstrin Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B (Akt)
PKC	Protein Kinase C
PKI	Protein Kinase Inhibitor

PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonyl Fluorid
PP	Protein Phosphatase
prkdc	Gen für die katalytische Untereinheit von DNA-PK
PS	Phosphatidylserin
PTP	Protein-Tyrosin Phosphatase
Puma	„p53-upregulated modulator of apoptosis“
RACK	Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen
Rad	„Radiation“
RICK	Rezeptoren für inaktive C-Kinasen
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SCID	„Severe Combined Immuno Deficiency“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulphate“
siRNA	„small interfering RNA“
Sos	„Son of sevenless“
STICK	Substrate die mit C-Kinasen interagieren
Tcl1	„T-cell leukemia 1“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	„12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate“
Trk	Tropomyosin Rezeptor Kinase
WT	Wildtyp
XRCC4	„X-Ray Cross Complementation group 4 Protein“

1 Einleitung

Ionisierende Strahlung induziert in der Zelle ein breites Spektrum an DNA-Schäden. Die Bestrahlung mit 1 Gray γ -Strahlung löst in der DNA eines Zellkerns etwa 2000 Ionisierungen, 1000 Einzelstrangbrüche sowie 40 Doppelstrangbrüche aus (Übersicht in: Goodhead, 1994). Bei der Reaktion der Zelle auf ionisierende Strahlung unterscheidet man mehrere Schritte. Zunächst werden die DNA-Schäden durch direkt mit der DNA interagierende Proteinkomplexe erkannt. Wichtig hierbei ist der 9-1-1 Komplex aus Rad9, Rad1 und Hus1 (Übersicht in: Niida und Nakanishi, 2006). Daneben können auch der DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK) Komplex sowie die „Ataxia Telangiectasia Mutated“ (ATM) Kinase in Gegenwart des Mre11-Rad50-Nbs1 Komplexes DNA-Doppelstrangbrüche direkt erkennen (Martensson et al., 2003; Dupre et al., 2006; siehe Kapitel 1.4). Die Weiterleitung der Signale erfolgt durch zahlreiche Kinasen, zu denen DNA-PK, ATM und „Ataxia Telangiectasia and Rad related“ (ATR) gehören. ATR phosphoryliert und aktiviert die „Checkpoint“ Kinase 1 (Chk1), ATM die „Checkpoint“ Kinase 2 (Chk2). Sowohl Chk1 als auch Chk2 phosphorylieren die Phosphatase Cdc25A und veranlassen dadurch deren Degradation. Infolgedessen bleiben die „Cyclin dependent kinase“ 2 und 4 (Cdk2 und Cdk4) an Threonin 14 und Tyrosin 15 phosphoryliert, wodurch ihre Aktivierung und somit der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses verhindert wird (Übersicht in: Iliakis et al., 2003; Donjerkovic und Scott, 2000; Abb. 1.1).

Neben der schnellen Antwort über die Degradation von Cdc25A, wird der G1 Kontrollpunkt außerdem durch die Proteine p53 und „Mouse double minute clone 2“ (Mdm2) kontrolliert. Sowohl das Mdm2 Protein als auch das p53 Protein werden durch zahlreiche Phosphorylierungen reguliert (Übersicht in: Meek und Knippschild, 2003; Bode und Dong, 2004). Nach ionisierender Strahlung phosphorylieren DNA-PK, ATM und ATR das p53 Protein an Serin 15. Durch Chk1 und Chk2 wird das p53 Protein darüber hinaus an Serin 20 phosphoryliert (Abb. 1.1). Diese und weitere Phosphorylierungen am N-Terminus werden *in vitro* mit der Stabilisierung und Aktivierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung in Verbindung gebracht (Übersicht in: Lakin und Jackson, 1999). Interessanterweise wurden diese N-terminalen Phosphorylierungen des p53 Proteins in anderen Arbeiten nicht für die Stabilisierung des p53 Proteins nach einer Schädigung der DNA benötigt (Blattner et al., 1999; Hengstermann et al., 1998).

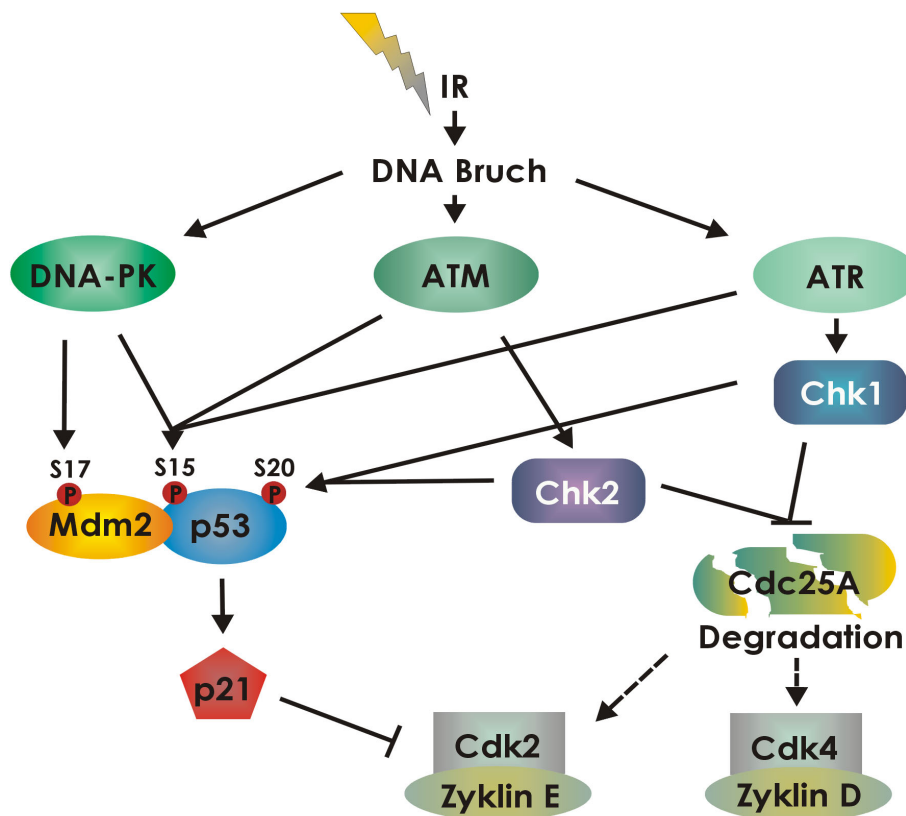


Abb. 1.1: Der G1 Kontrollpunkt.

Durch ionisierende Strahlung (IR) verursachte DNA-Brüche werden durch Proteinkomplexe erkannt, welche die Aktivierung der Kinasen DNA-PK, ATM und ATR induzieren. Chk1 wird durch ATR, Chk2 durch ATM phosphoryliert und aktiviert. Beide „Checkpoint“ Kinasen phosphorylieren daraufhin die Phosphatase Cdc25A und veranlassen so deren Degradation durch Proteasomen. Das p53 Protein wird durch DNA-PK, ATM und ATR an Serin 15 sowie durch Chk1 und Chk2 an Serin 20 phosphoryliert. DNA-PK phosphoryliert außerdem das Mdm2 Protein an Serin 17. Das p53 Protein akkumuliert in der Zelle und induziert daraufhin die Transkription des Cdk Inhibitors p21. Sowohl p21 als auch das Ausbleiben der Dephosphorylierung durch Cdc25A halten die Cdk2/Zyklusin E und Cdk4/Zyklusin D Komplexe in einem inaktiven Zustand, wodurch der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses verhindert wird.

DNA-PK phosphoryliert außerdem das Mdm2 Protein an Serin 17, wodurch *in vitro* seine Interaktion mit dem p53 Protein inhibiert werden kann (Übersicht in: Meek und Knippschild, 2003; Abb. 1.1). *In vivo* verhindert eine durch ionisierende Strahlung induzierte Hypophosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins die Degradation des p53 Proteins, wobei eine Interaktion beider Proteine jedoch erhalten bleibt (Blattner et al., 2002; siehe Kapitel 1.1.4). Infolge dieser post-translationellen Modifikationen von p53 und Mdm2 nimmt die Menge des p53 Proteins stark zu, woraufhin das p53 Protein die Transkription des Cdk Inhibitors p21 stimuliert. Zusammen mit dem Ausbleiben der Dephosphorylierung durch Cdc25A hält p21 die Cdk2/Zyklusin E und Cdk4/Zyklusin D Komplexe in ihrem inaktiven Zustand (Übersicht in:

Donjerkovic und Scott, 2000; Abb. 1.1), was letztendlich zum Arrest des Zellzyklusses in der G1 Phase führt.

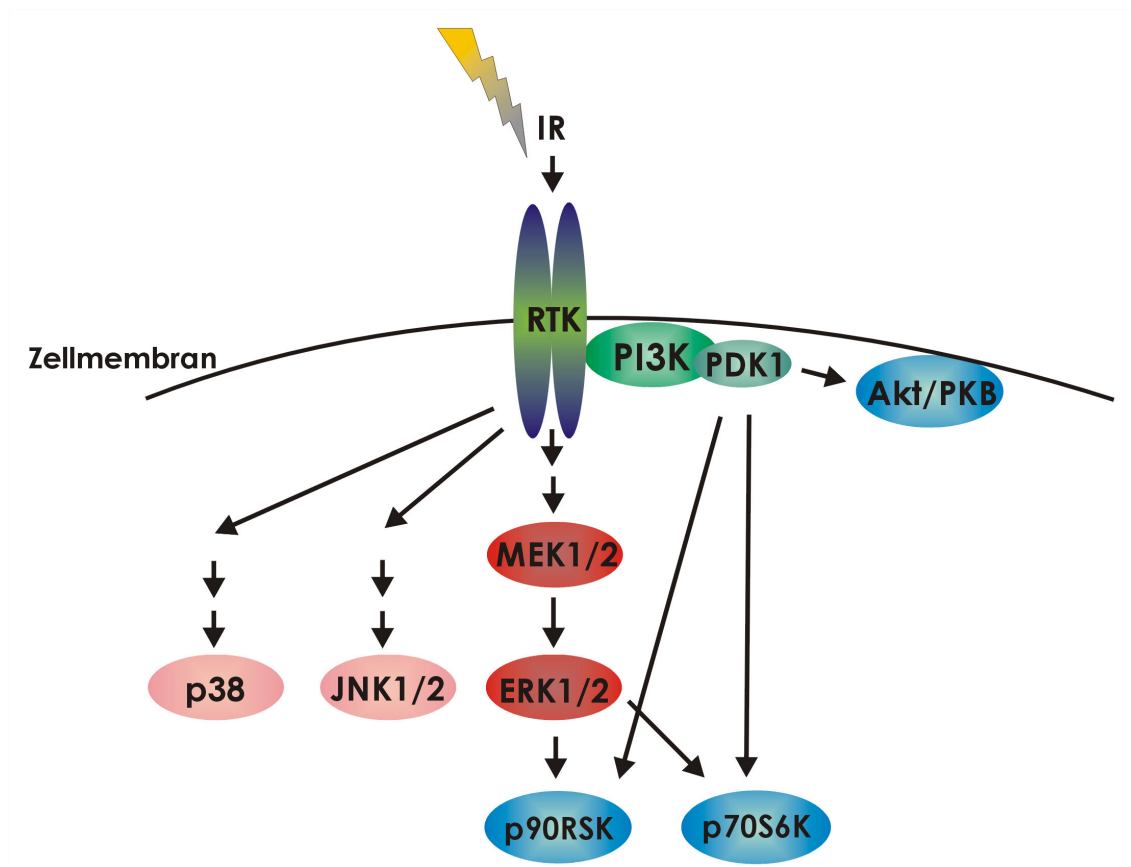


Abb. 1.2: RTK aktivierte Signalwege nach ionisierender Strahlung. Ionisierende Strahlung (IR) führt zu einer Zunahme der Tyrosin Phosphorylierungen in der zytosolischen Domäne der RTKs und aktiviert dadurch zahlreiche Signalkaskaden, wozu die p38, JNK1/2 und ERK1/2 MAP Kinase Kaskaden, aber auch die PI3 Kinase Kaskade gehören. Akt/PKB, p90RSK und p70S6K können über diese Signalwege aktiviert werden.

Außer der Regulation von Proteinen infolge einer Strahlen-abhängigen Schädigung der DNA, werden nach ionisierender Strahlung zudem Proteine wie die Protein-Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) durch entstehendes Wasserstoffperoxid oxidiert und vorübergehend inaktiviert. Die Inaktivierung von PTP1B erhöht die Tyrosin Phosphorylierung der zytosolischen Domäne von Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) der ErbB Familie, wodurch diese dimerisieren und aktiviert werden (Übersicht in: Schmidt-Ullrich et al., 2000). Infolge der Aktivierung der RTKs werden zahlreiche Signalkaskaden, wie die p38, die Jun N-terminale Kinase 1 und 2 (JNK1/2) und die „Extracellular Signal Regulated Kinase“ 1 und 2 (ERK1/2) MAP Kinase Kaskaden sowie die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Kaskade angeschaltet (Übersicht in: Dent et al., 2003). Durch die PI3 Kinase Kaskade wird die Kinase Akt, welche auch als Protein Kinase B (PKB) bekannt ist, aktiviert (siehe Kapitel 1.3.4). ERK1/2 und die „Phosphoinositide Dependent Kinase“ 1 (PDK1) tragen entscheidend zur Aktivierung

der p70 ribosomalen S6 Kinase (p70S6K) und p90 ribosomalen S6 Kinase (p90RSK) bei (siehe Kapitel 1.3.1; Abb. 1.2).

1.1 GSK-3

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Serin/Threonin Kinase Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) als eine der Kinasen identifiziert, welche das Mdm2 Protein in der zentralen Domäne phosphorylieren. Nach ionisierender Strahlung wird GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 inhibiert und trägt damit zur Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins bei (Kulikov et al., 2005).

GSK-3 ist nach ihrem ersten bekannten Substrat, der Glykogen Synthase, benannt (Embi et al., 1980). Zwei eng verwandte Isoformen von GSK-3, GSK-3 α und GSK-3 β , werden ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert (Woodgett, 1990; Woodgett, 1991). Die beiden Isoformen werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert, sind jedoch in ihrer Kinasedomäne zu 97% homolog. Außerhalb der Kinasedomäne weisen beide Isoformen hingegen deutliche Unterschiede auf. So besitzt das GSK-3 α Protein am N-Terminus eine Glyzin-reiche Domäne, die dem GSK-3 β Protein fehlt (Abb. 1.3).

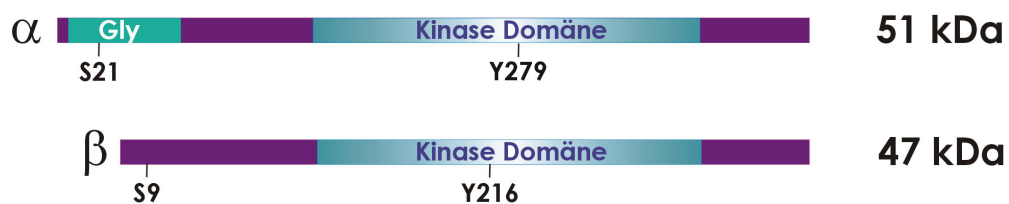


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der GSK-3 α und GSK-3 β Proteine.

Die Kinasedomäne ist bei beiden Isoformen von GSK-3 konserviert. Das größere GSK-3 α Protein enthält eine N-terminale Glyzin-reiche Domäne, die dem GSK-3 β Protein fehlt. Durch Phosphorylierung an Serin 21 (GSK-3 α) bzw. Serin 9 (GSK-3 β) wird der N-Terminus zu einem Pseudosubstrat, welches das aktive Zentrum blockiert. Die Phosphorylierung an Tyrosin 279 (GSK-3 α) bzw. Tyrosin 216 (GSK-3 β) ist in ruhenden Zellen konstitutiv vorhanden und für die Aktivität der GSK-3 Proteine essentiell (Abbildung aus: Doble und Woodgett, 2003 - modifiziert).

Von GSK-3 β wird außerdem eine Spleißvariante, GSK-3 β 2, mit einer Insertion von dreizehn Aminosäuren in der Kinasedomäne exprimiert. Diese alternative Spleißform hat *in vitro* eine geringere Kinaseaktivität als das GSK-3 β Protein und wird meist im Zellkörper (Soma) von Nervenzellen gefunden, während das GSK-3 β Protein auch in den Nervenfasern (Dendriten) lokalisiert ist (Mukai et al., 2002).

Über Isoform-spezifische Funktionen von GSK-3 ist bislang nur wenig bekannt. In Mäusen ist die homozygote Deletion des *gsk-3 β* Gens allerdings embryonal letal.

Daraus ist abzuleiten, dass GSK-3 α nicht grundsätzlich die Funktion von GSK-3 β ersetzen kann (Hoeflich et al., 2000).

Neben dem Glykogen Stoffwechsel reguliert GSK-3 auch Protein Synthese, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Vesikel-Transport und Zellmotilität (Übersicht in: Jope und Johnson, 2004). Dazu phosphoryliert GSK-3 Substrate mit der Konsensus-Sequenz Ser/Thr-X-X-X-Ser(P)/Thr(P). X kann dabei eine beliebige Aminosäure sein, wobei Prolin jedoch bevorzugt wird. GSK-3 ist konstitutiv aktiv. Die konstitutive Aktivität setzt allerdings eine Initiator-Phosphorylierung durch eine andere Kinase am C-Terminus der Konsensus-Sequenz voraus. Ohne Initiator-Phosphorylierung werden die meisten Substrate nicht oder nur wenig von GSK-3 phosphoryliert. Ausnahmen sind hierbei Substrate, welche eine geladene Aminosäure an der entsprechenden Position tragen (Fiol et al., 1987; ter Haar et al., 2001; Übersicht in: Doble und Woodgett, 2003). Die Inaktivierung von GSK-3 erfolgt durch Phosphorylierung des N-Terminus, woraufhin dieser als Pseudosubstrat das aktive Zentrum blockiert (Abb. 1.3). Außerdem kann die Umbildung von Komplexen und eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation die Phosphorylierung von GSK-3 Substraten regulieren (siehe Kapitel 1.2).

Bis heute wurden etwa fünfzig potentielle Protein-Substrate für GSK-3 identifiziert. Obwohl nicht für alle diese Substrate auch eine definierte physiologische Rolle der Phosphorylierung durch GSK-3 nachgewiesen werden konnte, macht allein ihre Anzahl deutlich, dass GSK-3 eine multifunktionelle Kinase ist, die in viele Signalwege involviert ist (Übersicht in: Frame und Cohen, 2001).

1.1.1 GSK-3 im Insulin-Signalweg

In ruhenden Zellen wird die Glykogen Synthase dauerhaft durch Phosphorylierung an C-terminalen Serinen inaktiviert. Mehrere dieser regulatorischen Serine werden durch GSK-3 phosphoryliert (Skurat und Roach, 1996). Steigt der Blutzuckerspiegel an, so wird das Peptid-Hormon Insulin in das Blut freigesetzt. Die Bindung von Insulin an den Insulin Rezeptor führt zur Aktivierung der PI3 Kinase. Diese initiiert daraufhin eine Signalkaskade, an deren Ende GSK-3 von Akt/PKB phosphoryliert und inaktiviert wird. Dadurch bleiben die inhibitorischen Phosphorylierungen der Glykogen Synthase aus und aus Glukose kann der Speicherstoff Glykogen synthetisiert werden. Gleichzeitig wird die Glukose-Aufnahme der Zelle stimuliert (Abb. 1.4; Übersicht in: Patel et al., 2004).

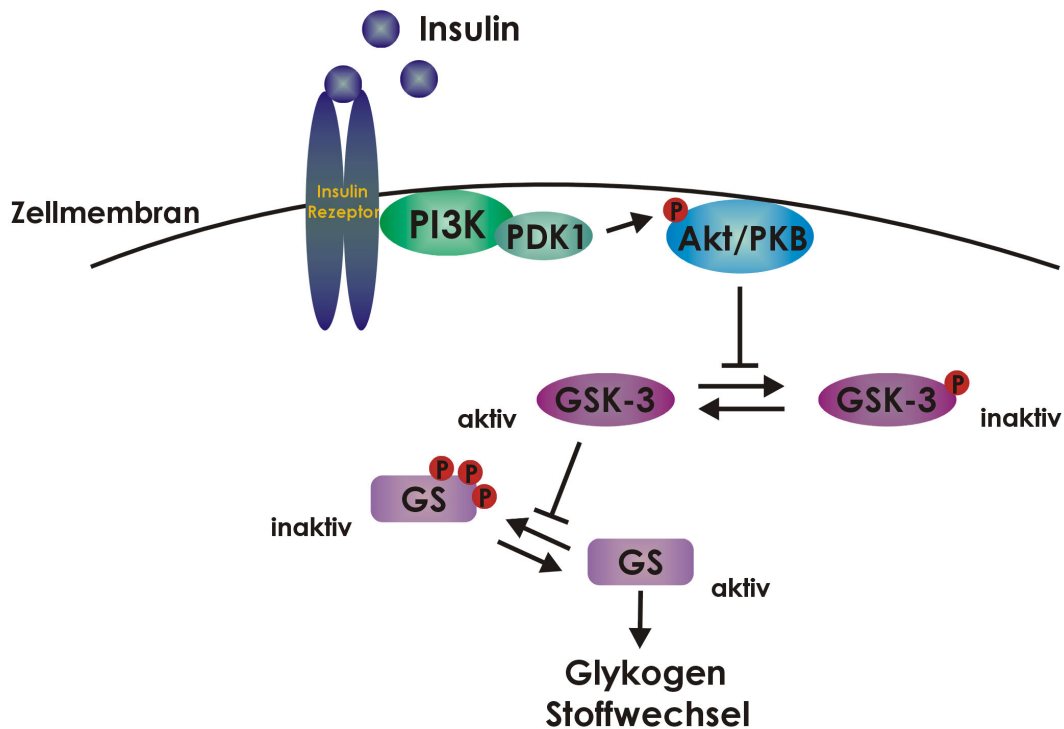


Abb. 1.4: Regulation von GSK-3 im Insulin-Signalweg.

In ruhenden Zellen phosphoryliert GSK-3 die Glykogen Synthase (GS) an mehreren Aminosäuren und trägt so zu deren Inaktivierung bei. Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor wird die PI3 Kinase aktiviert. Diese initiiert eine Signalkaskade, bei der die Kinase Akt/PKB durch PDK1 phosphoryliert und aktiviert wird. Akt/PKB inaktiviert wiederum GSK-3 durch Phosphorylierung, was zur Dephosphorylierung und Aktivierung der Glykogen Synthase führt.

1.1.2 GSK-3 im Neurotrophin-Signalweg

Neuronen brauchen für ihr Überleben die ständige Anwesenheit neurotrophischer Faktoren, welche die Apoptose hemmen (Übersicht in: Bibel und Barde, 2000). GSK-3 phosphoryliert neben der Glykogen Synthase auch pro-apoptische Proteine wie c-Jun, p53 und Bax, wodurch diese aktiviert werden. Die Bindung von Neurotrophinen an die Tropomyosin Rezeptor Kinase (Trk) initiiert eine Signalkaskade, die zur Aktivierung der Kinase Akt/PKB führt, welche GSK-3 phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Infolgedessen wird die Phosphorylierung der Proteine c-Jun, p53 und Bax verhindert, die daraufhin ihre pro-apoptische Funktion nicht länger ausüben können (Abb. 1.5; Pap und Cooper, 1998; Hongisto et al., 2003; Watcharasit et al., 2003; Linseman et al., 2004). Gleichzeitig wird die inhibitorische Phosphorylierung des „Cyclic AMP Response Element Binding“ (CREB) Proteins durch GSK-3 verhindert, so dass CREB die Transkription des anti-apoptischen *bcl-2* Gens induzieren kann (Abb. 1.5; Grimes und Jope, 2001).

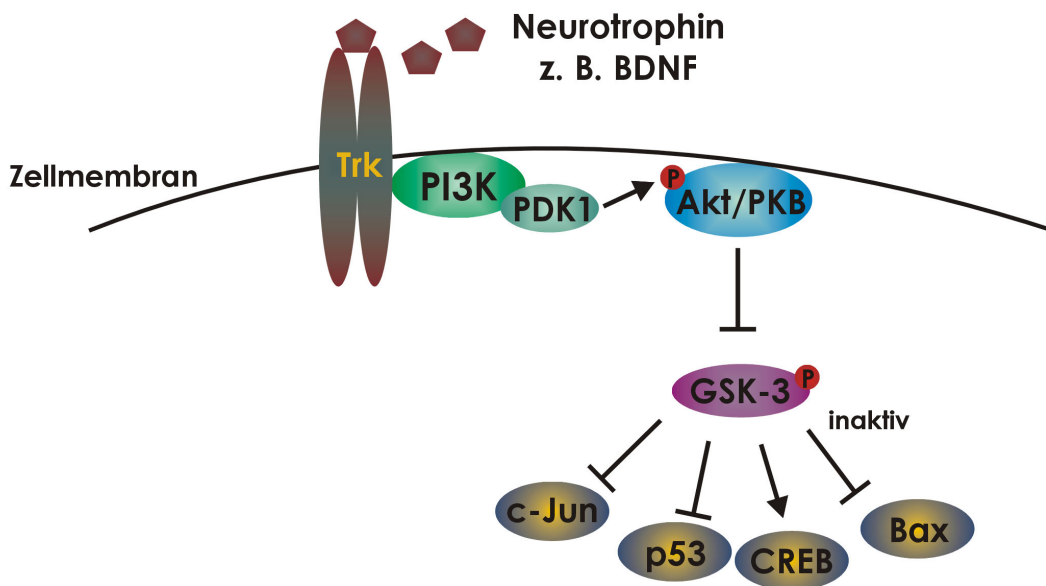


Abb. 1.5: Regulation von GSK-3 im Neurotrophin-Signalweg.

Nach Bindung des „Brain Derived Neurotrophic Factor“ (BDNF) an den Trk Rezeptor wird die PI3 Kinase aktiviert, welche daraufhin Akt/PKB aktiviert. Akt/PKB phosphoryliert und inaktiviert GSK-3, woraufhin pro-apoptotische Substrate wie die Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53 sowie das Bax Protein nicht mehr phosphoryliert und aktiviert werden. Zusätzlich wird der Transkriptionsfaktor CREB durch die Aufhebung der inhibitorischen Phosphorylierung durch GSK-3 aktiviert.

1.1.3 GSK-3 im Wnt-Signalweg

Auch in der Embryonalentwicklung spielt GSK-3 eine wichtige Rolle. Bei *Drosophila melanogaster* wurde das GSK-3 Homolog Shaggy/Zeste-white3 als wichtige Komponente des Wnt- (*Drosophila*: Wingless-) Signalweges identifiziert. Der Wnt-Signalweg ist an der Segmentpolaritätsbildung beteiligt und evolutionär hoch konserviert (Übersicht in: Plyte et al., 1992). Bei Säugetieren werden über diesen Signalweg Proliferation und Differenzierung embryonaler und adulter Gewebe reguliert.

Im Wnt-Signalweg liegt GSK-3 in einem Multiprotein-Komplex vor und phosphoryliert das β -Catenin Protein, das anschließend ubiquitiniert und degradiert wird (Aberle et al., 1997). Axin, welches in diesem Komplex als Gerüstprotein dient, bringt das β -Catenin Protein und das GSK-3 Protein in räumliche Nähe. Außerdem enthält der Komplex das Tumor Suppressor Protein „Adenomatous Poliposis Coli“ (APC), das an das β -Catenin Protein und das Axin Protein bindet. Sowohl das Axin Protein als auch das APC Protein werden ebenfalls von GSK-3 phosphoryliert und der Komplex dadurch stabilisiert (Abb. 1.6; Übersicht in: Patel et al., 2004).

Nach Bindung von Wnt-Glykoproteinen an ein Mitglied der „Frizzled“-Rezeptorfamilie dissoziiert das GSK-3 Protein mit Hilfe des „Dishevelled“ (Dvl) Proteins und des GSK-

3 Bindeproteins „Frequently Rearranged in advanced T-Cell Lymphomas“ (FRAT) vom restlichen Komplex, woraufhin der gesamte Komplex zerfällt. Das β -Catenin Protein wird daraufhin nicht länger degradiert und akkumuliert in der Zelle. Im Zellkern bildet das β -Catenin Protein Komplexe mit Transkriptionsfaktoren der „Leukemia Enhancing Faktor/T-Cell Factor“ (LEF/TCF) Familie, welche dadurch die Transkription von Zielgenen aktivieren können (Abb. 1.6; Übersicht in: Dale, 1998; Patel et al., 2004).

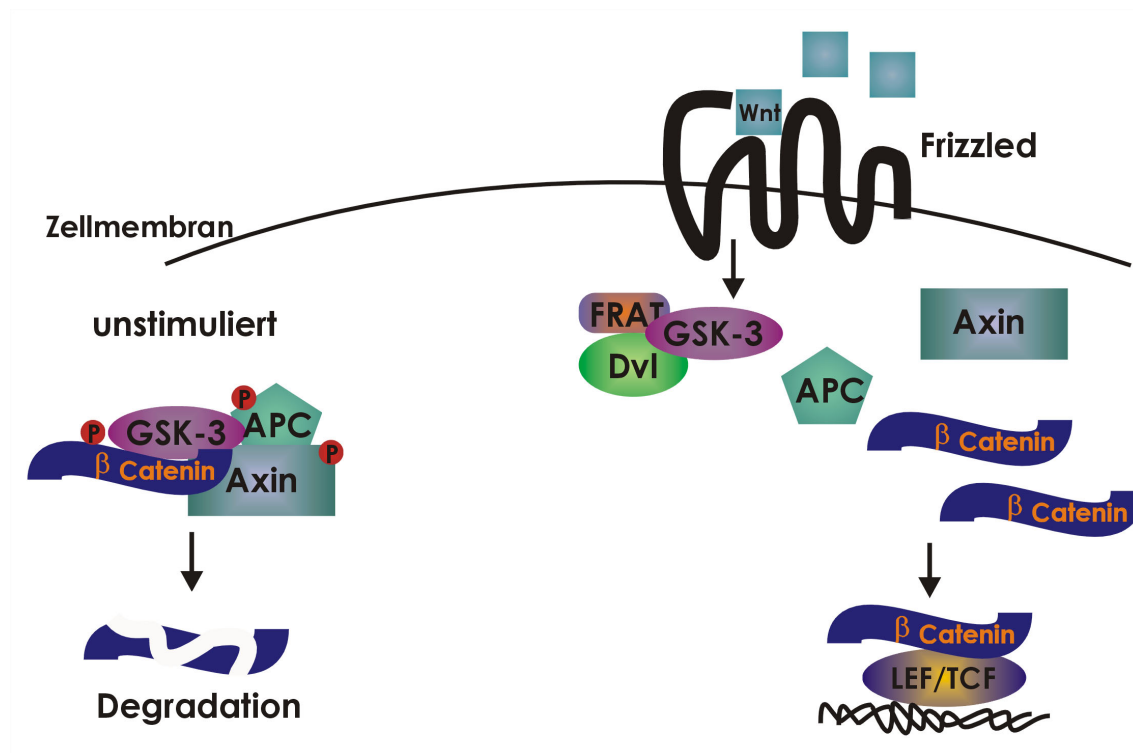


Abb. 1.6: Regulation von GSK-3 im Wnt-Signalweg.

In unstimulierten Zellen liegt GSK-3 in einem Komplex mit den Proteinen Axin, APC und β -Catenin vor und phosphoryliert diese drei Proteine. Das β -Catenin Protein wird daraufhin durch Proteasomen degradiert. Nach Bindung von Wnt-Glykoproteinen an ein Mitglied der „Frizzled“-Rezeptorfamilie zerfällt der Komplex, vermittelt durch die Proteine FRAT und Dvl. Das β -Catenin Protein akkumuliert in der Zelle und induziert die LEF/TCF-abhängige Transkription von Zielgenen.

1.1.4 GSK-3 im Mdm2-p53-Signalweg

Das p53 Protein, eines der bekanntesten Tumor Suppressor Proteine, erhielt seinen Namen auf Grund seines Molekulargewichts von 53 kDa. Nach DNA-Schäden induziert es die Transkription Zellzyklus-inhibitorischer und pro-apoptotischer Gene und leitet dadurch Zellzyklus-Arrest und Apoptose ein (Übersicht in: Vousden und Lu, 2002). Bei der Entstehung vieler Tumoren treten Mutationen oder Deletionen des *p53* Gens auf, wodurch ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglicht wird (Nigro et al., 1989). In Abwesenheit von DNA-Schäden liegt das p53 Protein auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit nur in sehr geringer Menge vor (Hengstermann et al., 1998).

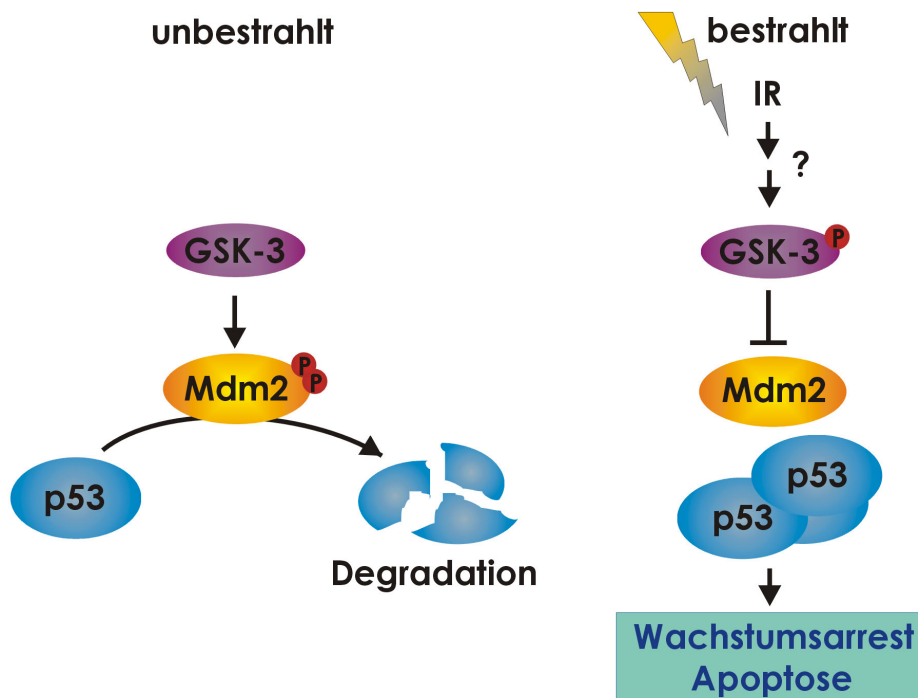


Abb. 1.7: Regulation von GSK-3 im Mdm2-p53-Signalweg.

In unbestrahlten Zellen vermittelt das Mdm2 Protein die Degradation des p53 Proteins durch Proteasomen. Für die Aktivität des Mdm2 Proteins sind mehrere Phosphorylierungen in der zentralen Domäne erforderlich. Die konstitutiv aktive GSK-3 trägt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivität des Mdm2 Proteins bei. Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (IR) wird GSK-3 durch Phosphorylierung des N-terminalen Bereichs inhibiert. In der Folge ist das Mdm2 Protein hypophosphoryliert und inaktiviert. Das p53 Protein akkumuliert in der Zelle und leitet Wachstumsarrest und Apoptose ein.

Das Onkoprotein Mdm2 ist der wichtigste negative Regulator des p53 Proteins. Es verhindert die Interaktion des p53 Proteins mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und vermittelt seine Ubiquitinierung und anschließende Degradation (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Honda et al., 1997). In einem negativen Regelkreis induziert das p53 Protein die Transkription des *mdm2* Gens und sorgt so für seine eigene Degradation (Barak et al., 1993). Das *mdm2* Gen ist in vielen Tumoren amplifiziert und verhindert dadurch einen p53-abhängigen Wachstumsarrest (Momand et al., 1998).

Das Mdm2 Protein ist an mehreren Aminosäuren in der zentralen Domäne konstitutiv phosphoryliert. Eine durch ionisierende Strahlung induzierte Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins verhindert die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins (Blattner et al., 2002). Zwei der Phosphorylierungsstellen in der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins entsprechen GSK-3 Konsensus-Sequenzen (siehe Kapitel 1.1). Kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe GSK-3 β als *in vitro* und *in vivo* Kinase des Mdm2 Proteins identifiziert. Nach ionisierender Strahlung wird GSK-3 β durch Phosphorylierung an

Serin 9 inhibiert. Das Fehlen der GSK-3 β -abhängigen Phosphorylierungen reicht aus, um die Degradation des p53 Proteins zu blockieren und so seine Mengenzunahme im Zellkern auszulösen (Abb. 1.7). Eine Ubiquitinierung des p53 Proteins durch die Ubiquitin-Ligasefunktion des Mdm2 Proteins bleibt aber auch im hypophosphorylierten Zustand möglich (Kulikov et al., 2005).

Entscheidend für die negative Regulation des p53 Proteins durch das Mdm2 Protein ist ihre Kolokalisation in der Zelle. Sowohl das p53 Protein als auch das Mdm2 Protein tragen ein „Nuclear Localisation Signal“ (NLS) und ein „Nuclear Export Signal“ (NES), die ein Pendeln zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglichen. Beide Proteine sind allerdings vorwiegend im Zellkern lokalisiert, wo die Menge des p53 Proteins nach einer Schädigung der DNA zunimmt und es seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnimmt. Im Zellkern bindet und ubiquitiniert das Mdm2 Protein das p53 Protein. Die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins findet sowohl in zytoplasmatischen Proteasomen als auch direkt im Zellkern statt (Xirodimas et al., 2001).

Nach Schäden am Endoplasmatischen Retikulum verhindert GSK-3 β die p53-abhängige Apoptose, indem es im Zellkern das p53 Protein an Serin 315 und Serin 376 phosphoryliert. Beide Phosphorylierungen fördern den Mdm2-vermittelten Export des p53 Proteins ins Zytoplasma, wo es in Proteasomen degradiert wird (Pluquet et al., 2005). Zumindest an Serin 376 scheint das p53 Protein unter normalen Bedingungen dauerhaft phosphoryliert zu sein. Diese Phosphorylierung wird nach ionisierender Strahlung ATM-abhängig inhibiert (Waterman et al., 1998).

1.2 Die Regulation von GSK-3

Um eine wahllose Phosphorylierung ihrer zahlreichen Substrate zu vermeiden, muss GSK-3 als konstitutiv aktive Kinase sorgfältig reguliert werden. Am wichtigsten sind dabei, wie bereits in den Kapiteln 1.1 bis 1.1.4 beschrieben, die inhibitorischen Phosphorylierungen an den N-terminalen Serinen 9 (GSK-3 β) und 21 (GSK-3 α), aber auch die Umbildung von Komplexen, in denen das GSK-3 Protein vorliegt. Außerdem kann eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation des GSK-3 Proteins die GSK-3-abhängige Phosphorylierung von Substraten beeinflussen.

1.2.1 Regulation von GSK-3 durch intrazelluläre Lokalisation

Das GSK-3 Protein ist zwar vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, ein Teil ist aber auch im Zellkern und in den Mitochondrien vorhanden. Unter normalen Bedingungen ist das GSK-3 β Protein im Zellkern und in den Mitochondrien im Vergleich zu zytoplasmatischem GSK-3 β Protein nur wenig an Serin 9 phosphoryliert und folglich aktiv (Bijur und Jope, 2003 a). Die Menge an nukleärem GSK-3 β Protein verändert sich

in Abhängigkeit von der jeweiligen Phase des Zellzyklusses. Die größte Menge an nukleärem GSK-3 β Protein ist während der S-Phase vorhanden, wenn GSK-3 β das nukleäre Zyklin D Protein phosphoryliert, welches anschließend degradiert wird (Diehl et al., 1998). Zu Beginn der Apoptose steigt die Menge an nukleärem GSK-3 β Protein ebenfalls an, woraufhin pro-apoptotische Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden (Bijur und Jope, 2001; siehe Kapitel 1.1.2). Auch Schäden am Endoplasmatischen Retikulum induzieren eine Translokation des GSK-3 β Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern (Qu et al., 2004) und verhindern so die Akkumulation des p53 Proteins (siehe Kapitel 1.1.4). In menschlichen Fibroblasten nimmt die Menge des GSK-3 β Proteins im Zellkern mit zunehmendem Alter zu und trägt damit zur Seneszenz-induzierten Akkumulation des p53 Proteins bei (Zmijewski und Jope, 2004). Je nach Signalweg und Zelltyp kann nukleäres GSK-3 β Protein daher offensichtlich die Akkumulation und Aktivierung des p53 Proteins fördern oder verhindern.

1.2.2 Regulation von GSK-3 durch Bindeproteine

Das beste Beispiel für die Regulation der GSK-3-Aktivität durch Protein-Protein Interaktionen ist der klassische Wnt-Signalweg (siehe Kapitel 1.1.3), in dem GSK-3 Bindeproteine den Zugang von GSK-3 zu seinem Substrat, dem β -Catenin Protein, kontrollieren. Das GSK-3 Bindeprotein FRAT, das im Wnt-Signalweg zum Zerfall des Multiprotein Komplexes beiträgt, fördert außerdem auch den Kernexport des GSK-3 Proteins (Franca-Koh et al., 2002).

1.2.3 Regulation von GSK-3 durch Phosphorylierung

Das GSK-3 Protein ist in ruhenden Zellen an Tyrosin 216 (GSK-3 β) bzw. Tyrosin 279 (GSK-3 α) konstitutiv phosphoryliert, wodurch die Substrat-Bindung erleichtert wird (Abb. 1.3; Hughes et al., 1993). Über die Regulation dieser Phosphorylierungen ist allerdings wenig bekannt (Übersicht in: Frame und Cohen, 2001).

Eine Phosphorylierung an Serin 9 (GSK-3 β) oder Serin 21 (GSK-3 α) (Abb. 1.3) inhibiert GSK-3, indem sie den N-Terminus des GSK-3 Proteins zu einem Pseudosubstrat umbildet, welches an das aktive Zentrum bindet und eine Interaktion mit echten Substraten kompetitiv verhindert. Eine hohe Substrat-Konzentration kann diese Inhibition folglich aufheben (Frame et al., 2001).

Die inhibitorische Phosphorylierung am N-Terminus des GSK-3 Proteins wird durch verschiedene Signalkaskaden induziert (Übersicht in: Doble und Woodgett, 2003) und kann durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A), die Protein Phosphatase 2B (PP2B) oder die Protein Phosphatase 1 (PP1) wieder entfernt werden (Sutherland et al., 1993; Lee et al., 2005; Tanji et al., 2002).

Durch die Besonderheit, dass GSK-3 vor allem Substrate phosphoryliert, die bereits eine Initiator-Phosphorylierung in ihrer Konsensus-Sequenz aufweisen, kann die GSK-3-abhängige Phosphorylierung von Substraten auch indirekt, durch Inaktivierung der Initiator-Kinase, inhibiert werden (siehe Kapitel 1.1).

1.3 GSK-3 Kinasen

Bis heute wurden sechs Kinasen identifiziert, die GSK-3 durch Phosphorylierung an Serin 9 bzw. Serin 21 inhibieren können (Abb. 1.8). Fünf dieser Kinasen, die p70 Ribosomale S6 Kinase (p70S6K), die p90 Ribosomale S6 Kinase (p90RSK), die Protein Kinase A (PKA), die Protein Kinase C (PKC) sowie die Protein Kinase B (Akt/PKB) gehören zur AGC Kinasefamilie, die nach ihren Gründungsmitgliedern PKA, PKG und PKC benannt wurde.

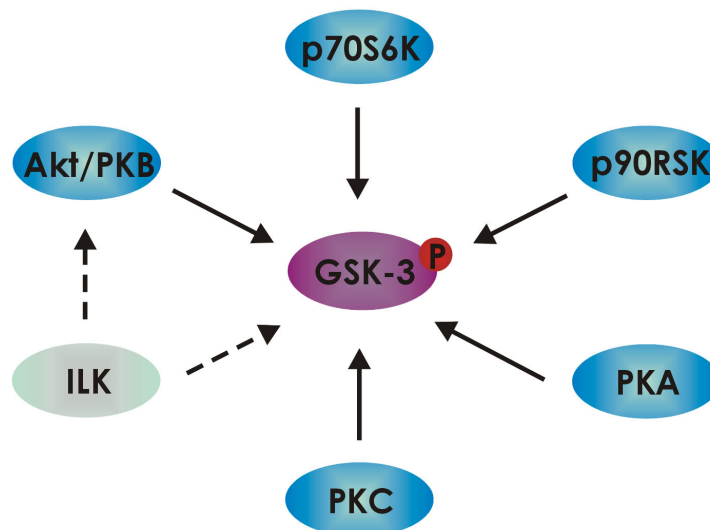


Abb. 1.8: GSK-3 Kinasen.

P70S6K, p90RSK, PKA, PKC sowie die Kinase Akt/PKB inaktivieren GSK-3 durch Phosphorylierung an Serin 9 bzw. Serin 21. ILK phosphoryliert GSK-3 und Akt/PKB *in vitro*. *In vivo* ist ihre Funktion als Kinase bisher nicht erwiesen.

AGC Kinasen werden durch Phosphorylierung einer Aminosäure in der Aktivierungs- oder T-Schleife sowie durch eine Phosphorylierung im hydrophoben Motiv aktiviert. Die Aktivierungsschleife wird in der Regel durch PDK1 phosphoryliert. Da PDK1 konstitutiv aktiv ist, wird die Phosphorylierung der AGC Kinasen meist über eine induzierte Kolokalisation mit PDK1 oder durch eine Konformationsänderung, welche zur Exposition der PDK1 Phosphorylierungsstelle führt, reguliert (Übersicht in: Mora et al., 2004).

Die Integrin Linked Kinase (ILK) phosphoryliert *in vitro* neben dem GSK-3 Protein auch das Akt/PKB Protein an Serin 473. *In vivo* vermittelt ILK als Gerüstprotein in einem Multiprotein-Komplex Signale von der extrazellulären Matrix über Integrine an das Zytoskelett und andere zelluläre Signalwege. Die physiologische Rolle der Kinase-Funktion von ILK konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Abb. 1.8; Übersicht in: Hannigan et al., 2005).

1.3.1 p70S6K und p90RSK

p70S6K, auch S6K1 genannt, kontrolliert vor allem die Biosynthese von Proteinen und spielt dadurch eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellwachstums (Übersicht in: Dufner und Thomas, 1999). Sowohl GSK-3 α als auch GSK-3 β werden *in vitro* durch p70S6K an Serin 21 bzw. Serin 9 phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Sutherland et al., 1993; Sutherland und Cohen, 1994). Ob p70S6K das GSK-3 Protein auch *in vivo* phosphoryliert, ist bislang umstritten. p70S6K wird in Gegenwart von Aminosäuren durch „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) aktiviert, woraufhin GSK-3 inhibiert und die Glykogen Synthese induziert wird (Armstrong et al., 2001). Physiologische Konzentrationen von Aminosäuren aktivieren allerdings nur p70S6K ohne die Phosphorylierung des GSK-3 Proteins zu beeinflussen (Liu et al., 2004).

Durch einen alternativen Translationsstart wird vom Transkript, das für p70S6K kodiert, die Isoform p85S6K exprimiert. Allerdings ist die Menge des p85S6K Proteins in der Zelle deutlich geringer, als die des p70S6K Proteins. Durch ein zusätzliches NLS am N-Terminus ist das p85S6K Protein hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, während das p70S6K Protein im wesentlichen zytoplasmatisch ist (Reinhard et al., 1992; Reinhard et al., 1994).

Die Deletion des *p70S6K/p85S6K* Gens in Mäusen führte zur Entdeckung einer weiteren S6 Kinase, die von einem anderen Gen kodiert wird und S6K2 genannt wird. S6K2 ist in der katalytischen Domäne zu 82 % identisch mit dem p70S6K Protein und kann zumindest teilweise die Funktion von p70S6K übernehmen (Shima et al., 1998; Phin et al., 2003).

Die Aktivierung von p70S6K und p85S6K erfolgt durch mindestens acht hierarchisch aufeinander folgende Phosphorylierungen. Am wichtigsten sind dabei die ERK1/2-vermittelten Phosphorylierungen an Threonin 421 und Serin 424 in der autoinhibitorischen Domäne (Iijima et al., 2002). In der Folge kann Threonin 389 durch mTOR phosphoryliert werden, was zur Dissoziation von C- und N-Terminus führt (Isotani et al., 1999) und so die finale aktivierende Phosphorylierung an Threonin 229 durch PDK1 ermöglicht (Abb. 1.9 und Abb. 1.10; Alessi et al., 1997 b; Weng et al., 1998). Sechs der Phosphorylierungsstellen von p70S6K sind auch bei S6K2 konserviert

und werden in derselben Reihenfolge durch ERK1/2, mTOR und PDK1 phosphoryliert (Phin et al., 2003).

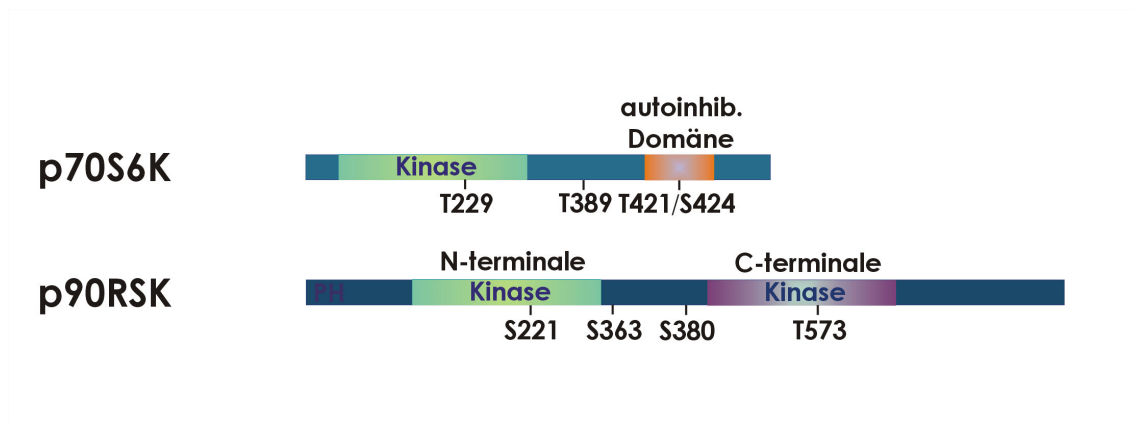


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der p70S6K und p90RSK Proteine.

Das p70S6K Protein enthält eine N-terminale Kinasedomäne, sowie eine C-terminale autoinhibitorische Domäne. Die Phosphorylierung von Threonin 421 und Serin 424 in der autoinhibitorischen Domäne ermöglicht die Phosphorylierung von Threonin 389, wodurch die Kinasedomäne freigelegt wird. Anschließend kann die finale aktivierende Phosphorylierung an Threonin 229 erfolgen. Das p90RSK Protein enthält zwei funktionelle Kinasedomänen. Serin 221 in der N-terminalen Kinasedomäne wird konstitutiv phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Threonin 573 in der C-terminalen Kinasedomäne ermöglicht die Phosphorylierung von Serin 363 und Serin 380, wodurch die N-terminale Kinase aktiviert wird.

p90RSK ist auch unter den Namen RSK oder „MAPK Activated Protein Kinase 1“ (MAPKAP-K1) bekannt (Übersicht in: Frödin und Gammeltoft, 1999). Im Zellkern phosphoryliert und aktiviert p90RSK Transkriptionsfaktoren wie c-Fos oder CREB (Chen et al., 1993; De Cesare et al., 1998), während im Zytoplasma z.B. das I κ B α Protein durch p90RSK phosphoryliert und daraufhin degradiert wird (Schouten et al., 1997). Über die Phosphorylierung und Inaktivierung der Kinase Myt1 ist p90RSK in *Xenopus laevis* Oozyten außerdem an der Regulation des Zellzyklusses beteiligt (Palmer et al., 1998). Weiterhin phosphoryliert p90RSK den Ras GDP/GTP Austauschfaktor Sos. Dies führt in einer negativen Rückkopplung zur Inhibition der MAP Kinase Kaskade und damit auch zur Inhibition von p90RSK (Douville und Downward, 1997).

Insgesamt gibt es drei Isoformen von p90RSK: RSK1, RSK2 und RSK3, die zu 75-80% identisch sind, aber von verschiedenen Genen kodiert werden. Alle Isoformen von p90RSK stimmen in ihrer Struktur und Regulation weitgehend überein. Sie enthalten ein NLS und sind sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. In den meisten Geweben werden alle Isoformen von p90RSK exprimiert, allerdings unterschiedlich stark, was die Vermutung nahe legt, dass einzelne Isoformen spezifische Funktionen ausüben können (Moller et al., 1994). Mutationen im *rsk2* Gen führen zu einer „Coffin-Lowry Syndrom“ genannten Erbkrankheit, bei der sowohl die geistige Entwicklung als auch die Knochenbildung beeinträchtigt ist (Trivier et al., 1996).

Dieser Befund spricht dafür, dass die Funktion von RSK2 zumindest in Nerven- und Knochenzellen nicht von anderen Isoformen übernommen werden kann.

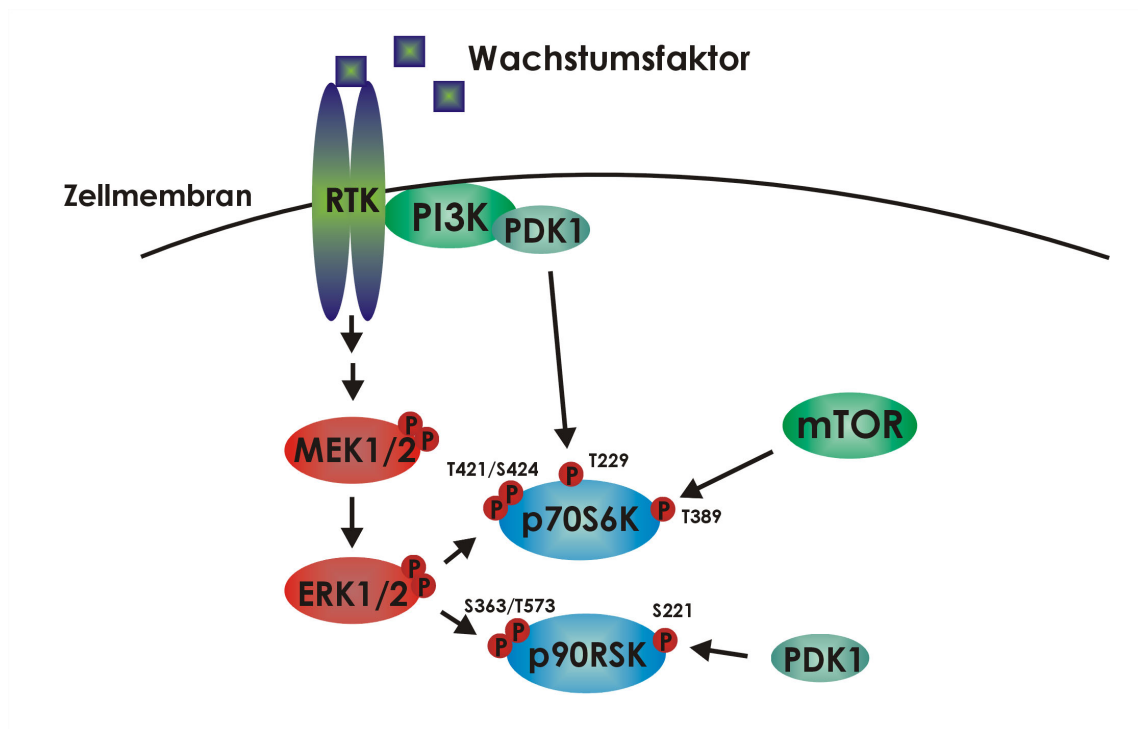


Abb. 1.10: Regulation von p70S6K und p90RSK.

Die Aktivierung von p70S6K erfolgt durch drei Kinasen. Nach Aktivierung der MAP Kinase Kaskade phosphorylieren ERK1/2 das p70S6K Protein an Threonin 421 und Serin 424. Anschließend wird Threonin 389 durch mTOR phosphoryliert, wodurch die finale aktivierende Phosphorylierung durch PDK1 an Threonin 229 ermöglicht wird. Das p90RSK Protein wird durch ERK1/2 an Serin 363 und Threonin 573 phosphoryliert. Serin 221 wird auch in ruhenden Zellen konstitutiv durch eine zyttoplasmatische PDK1 phosphoryliert.

p90RSK phosphoryliert und inaktiviert sowohl GSK-3 α als auch GSK-3 β *in vitro* (Sutherland et al., 1993; Sutherland und Cohen, 1994). Zumindest das GSK-3 β Protein wird auch *in vivo* durch p90RSK phosphoryliert (Eldar-Finkelman et al., 1995). Die Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 durch p90RSK fördert die Proteinsynthese, indem die Phosphorylierung des Translations-Initiations-Faktors eIF2B verhindert und damit die Translation gesteigert wird (Angenstein et al., 1998).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen besitzt p90RSK zwei funktionelle Kinasedomänen. Die N-terminale Kinase gehört der AGC Kinasefamilie an und wird durch die C-terminale Kinase reguliert, die der Familie der „Calcium/Calmodulin“-abhängigen Kinasen (CaMK) angehört (Jones et al., 1988; Übersicht in: Frödin und Gammeltoft, 1999). Die Aktivierung von p90RSK wird durch sechs Phosphorylierungen gesteuert, wobei vier Phosphorylierungen essentiell sind (Abb. 1.9). Bereits in unstimulierten Zellen ist das p90RSK Protein konstitutiv an Serin 221 in der Aktivierungs-Schleife der N-terminalen Kinasedomäne phosphoryliert. Ein Verlust dieser Phosphorylierung verhindert die Aktivierung von p90RSK (Williams et al.,

2000). Nach Aktivierung der MAP Kinase Kaskade wird das p90RSK Protein zusätzlich durch ERK1/2 an Threonin 573 in der C-terminalen Kinasedomäne phosphoryliert (Richards et al., 1999). Dies ermöglicht die Phosphorylierung der Region zwischen beiden Kinasedomänen durch die C-terminale Kinase an Serin 380, sowie durch ERK1/2 an Serin 363 (Abb. 1.10; Dalby et al., 1998), woraufhin die N-terminale Kinase aktiviert ist. Es gibt Hinweise, dass p90RSK nach ihrer Aktivierung in den Zellkern transloziert (Chen et al., 1992).

Nach ionisierender Strahlung werden sowohl p70S6K als auch p90RSK über die MAP Kinase Kaskade transient aktiviert (Contessa et al., 2002; Amorino et al., 2002).

1.3.2 PKA

PKA wurde bereits 1968 aus dem Skelettmuskel von Kaninchen aufgereinigt und als Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP)-abhängige Kinase beschrieben (Walsh et al., 1968). Heute ist PKA die am besten charakterisierte Proteinkinase (Übersicht in: Taylor et al., 2004). Sie ist an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie z.B. Stoffwechsel, Proliferation, Differenzierung, intrazellulärem Transport, Zellmotilität und der Regulation von Ionenkanälen beteiligt (Übersicht in: Skålhegg und Tasken, 2000; Tasken und Aandahl, 2004). Im Zellkern phosphoryliert und aktiviert PKA zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie CREB, das daraufhin die Transkription von Genen stimuliert, die in ihrem Promotor ein „cAMP Response Element“ (CRE) tragen (Übersicht in: Andrisani, 1999). Daneben phosphoryliert und inaktiviert PKA sowohl GSK-3 α als auch GSK-3 β (Fang et al., 2000), wobei die Bindung von PKA an GSK-3 durch das Adapterprotein „A Kinase Anchoring Protein 220“ (AKAP220) vermittelt wird (Tanji et al., 2002). Durch die Inhibition von GSK-3 fördert PKA, unabhängig von neurotrophen Faktoren, das Überleben von Neuronen (siehe Kapitel 1.1.2; Li et al., 2000).

Im unstimulierten Zustand liegt PKA als Heterotetramer aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten vor. Bis heute wurden vier regulatorische Untereinheiten RI α , RI β , RII α und RII β beschrieben. Die katalytischen Untereinheiten C α und C β werden außerdem in zahlreichen Spleißvarianten exprimiert (Übersicht in: Skålhegg und Tasken, 2000). Die verschiedenen regulatorischen und katalytischen Untereinheiten von PKA werden Gewebe-spezifisch exprimiert und können Tetramere in unterschiedlicher Zusammensetzung bilden (Übersicht in: Skålhegg und Tasken, 2000).

Aktiviert wird PKA über die Bindung von Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Dies führt zur Dissoziation heterotrimerer G-Proteine in G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Besonders die G α -Untereinheiten regulieren membrangebundene Adenylat Zyklasten (AC), die aus ATP cAMP synthetisieren (Übersicht in: Sunahara

und Taussig, 2002). Nach der Bindung von insgesamt vier cAMP Molekülen an ein PKA Holoenzym dissoziieren die regulatorischen Untereinheiten und setzen zwei aktive katalytische Untereinheiten frei (Abb. 1.11; Übersicht in: Skålhegg und Tasken, 2000).

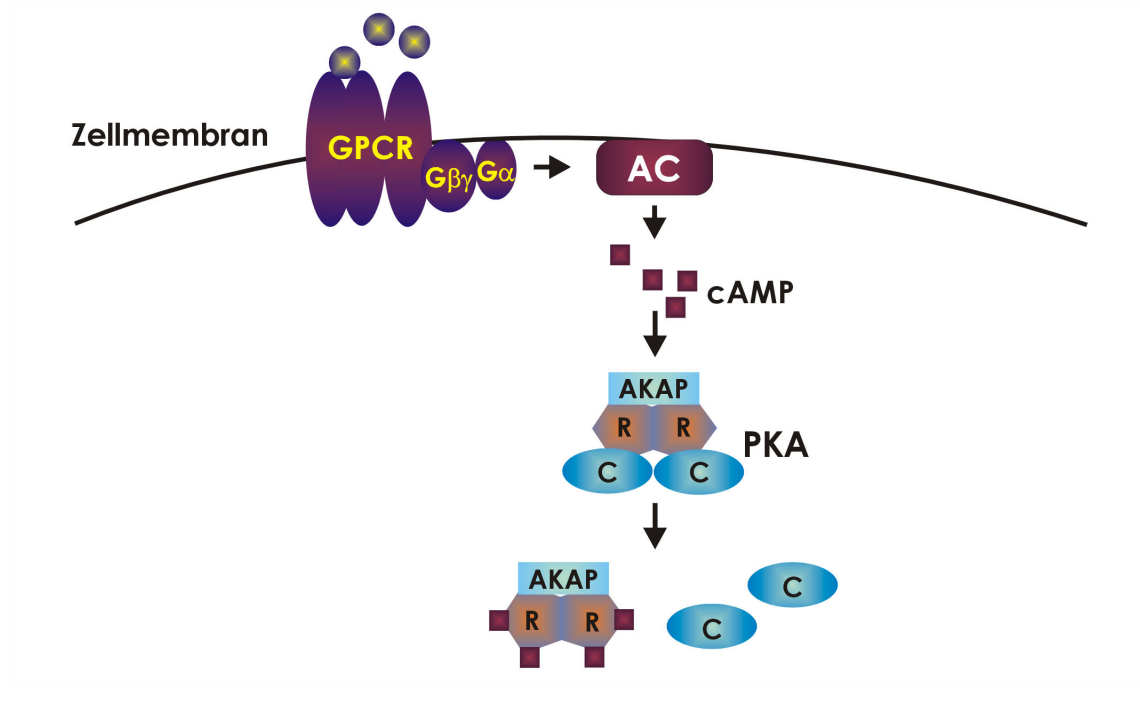


Abb. 1.11: Regulation von PKA.

Die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) führt zur Dissoziation heterotrimerer G-Proteine. Die $G\alpha$ -Untereinheiten regulieren daraufhin membrangebundene Adenylat Zyklasen (AC), welche aus ATP cAMP synthetisieren. Nach Bindung von vier cAMP Molekülen an die regulatorischen (R) Untereinheiten zerfällt das PKA Holoenzym in ein Dimer aus R-Untereinheiten sowie zwei freie aktive katalytische (C) Untereinheiten, die PKA Substrate phosphorylieren können. Über die Bindung von AKAPs an die R-Untereinheiten transloziert PKA in verschiedene zelluläre Kompartimente.

Die subzelluläre Lokalisation und Substratspezifität von PKA wird vor allem durch die Bindung an AKAPs erreicht (Abb. 1.11; Übersicht in: Feliciello et al., 2001). AKAPs sind strukturell sehr divers und werden Gewebe-spezifisch exprimiert. Inklusive Spleißvarianten sind bis heute etwa 50 verschiedene AKAPs bekannt (Übersicht in: Tasken und Aandahl, 2004). Außerdem können die katalytischen Untereinheiten von PKA durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen (Harootunian et al., 1993), wo sie an einen Inhibitor (PKI) binden, der sie inaktiviert und anschließend aus dem Zellkern exportiert (Wen et al., 1994).

Eine Aktivierung von PKA durch ionisierende Strahlung ist bislang nicht bekannt.

1.3.3 PKC

PKC wurde erstmals 1977 beschrieben (Inoue et al., 1977). In Säugetieren wurden bis heute elf Isoformen von PKC nachgewiesen (Übersicht in: Mellor und Parker, 1998). Entsprechend der Vielzahl von Isoformen ist PKC in viele unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Apoptose, Zellmotilität, Immunantwort und Sekretion involviert (Übersicht in: Keenan und Kelleher, 1998; Dempsey et al., 2000).

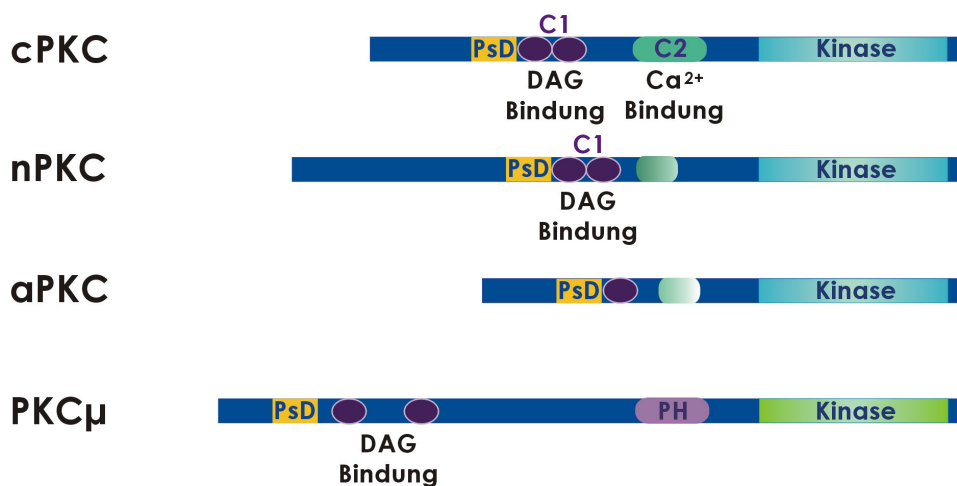


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Isoformen von PKC.

Alle Isoformen von PKC enthalten eine N-terminale regulatorische sowie eine C-terminale katalytische Region. Konventionelle Isoformen von PKC (cPKC) werden durch die Bindung von DAG an die C1-Domäne sowie Phosphatidylserin (PS) und Ca^{2+} Ionen an die C2-Domäne aktiviert. Neuen Isoformen von PKC (nPKC) fehlt die Ca^{2+} Bindestelle in der C2-Domäne. Sie werden durch DAG und PS aktiviert. Atypische Isoformen von PKC (aPKC) können weder DAG noch Ca^{2+} binden. Ihre Aktivierung erfolgt durch PS und PIP3. PKC μ unterscheidet sich sowohl in der Kinasedomäne als auch in der regulatorischen Region stark von den anderen Isoformen. Die Aktivierung dieser Isoform erfordert die Anwesenheit von PS und DAG sowie die Bindung von PIP3 an die PH-Domäne. Die autoinhibitorische Pseudosubstrat-Domäne (PsD) wird bei einer Aktivierung der Isoformen von PKC DAG- und PS-abhängig aus dem aktiven Zentrum gelöst.

Alle Isoformen von PKC enthalten eine N-terminale regulatorische sowie eine C-terminale katalytische Region und lassen sich entsprechend ihrer Domänen-Struktur und Regulation in vier Unterfamilien einteilen (Abb. 1.12). Zu den konventionellen PKCs zählen die Isoformen PKC α , die PKC β Spleißvarianten PKC β I und PKC β II sowie PKC γ . Die Isoformen PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ bilden die Unterfamilie der neuen PKCs. Die atypischen PKCs, zu denen PKC ι/λ und PKC ζ gehören, bilden die dritte Untergruppe (Übersicht in: Mellor und Parker, 1998). PKC μ /PKD ist nur entfernt mit den anderen Isoformen von PKC verwandt und bildet daher eine eigene Untergruppe (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994; Übersicht in: Toker, 1998).

Die konventionellen PKCs enthalten zwei zweigeteilte NLS, die atypischen PKCs ein NLS. Nur bei den neuen PKCs wurde bisher kein NLS nachgewiesen. Dennoch sind auch sie, offensichtlich durch Interaktion mit anderen Proteinen, in der Lage in den Zellkern zu translozieren. Im Zellkern wurden bisher die Isoformen PKC β II, PKC δ , PKC ϵ , PKC ι/λ und PKC ζ nachgewiesen (Wooten et al., 1997; Übersicht in: Mochly-Rosen und Gordon, 1998).

Die Isoformen von PKC werden in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Mengen und Kombinationen exprimiert (Übersicht in: Dempsey et al., 2000). Außerdem können einzelne Isoformen die Expression und Aktivierung von anderen beeinflussen. In hämatopoetischen Zellen aus Mäusen steigert beispielsweise die Überexpression des PKC α Proteins die Menge an PKC δ mRNA und Protein (Romanova et al., 1998).

GSK-3 β wird durch die Isoformen PKC α , PKC β , PKC γ , PKC η und PKC δ phosphoryliert, nicht jedoch durch PKC ϵ und PKC ζ (Goode et al., 1992; Fang et al., 2002). In hämatopoetischen Zellen induzieren Zytokine die PKC-vermittelte Phosphorylierung und Inhibition von GSK-3 und sichern so deren Überleben und Differenzierung (Vilimek und Duronio, 2006).

Konventionelle PKCs werden durch Diacylglycerin (DAG), Phosphatidylserin sowie Ca²⁺ Ionen aktiviert, durch deren Bindung sie vom Zytoplasma an die Zellmembran translozieren. DAG, das durch Mitglieder der Phospholipase C (PLC) Familie aus Phosphoinositiden synthetisiert wird, wird über zwei Zinkfinger-Motive in der regulatorischen C1-Domäne gebunden (Übersicht in: Nishizuka, 1995). Die C2-Domäne enthält das Erkennungsmotiv für Phosphatidylserin und die Ca²⁺ Bindestelle. Unmittelbar N-terminal der C1-Domäne liegt die autoinhibitorische Pseudosubstrat-Domäne, die bei einer Aktivierung der Kinase in Abhängigkeit von DAG und Phosphatidylserin aus dem aktiven Zentrum gelöst wird (Orr et al., 1992). Gemeinsam mit DAG fördern Ca²⁺ Ionen die Affinität der konventionellen PKCs für Phosphatidylserin. Die Aktivierung der neuen PKCs erfolgt ebenfalls durch DAG und Phosphatidylserin, jedoch unabhängig von Ca²⁺ Ionen, da der C2-Domäne die Ca²⁺ Bindestelle fehlt. Atypischen PKCs fehlt das zweite Zinkfinger-Motiv in der C1-Domäne sowie entscheidende Aminosäuren in der C2-Domäne. Entsprechend können sie weder durch Ca²⁺ Ionen noch durch DAG aktiviert werden. Ihre Aktivierung beruht daher ausschließlich auf der Bindung von Phosphatidylserin und PIP₃, einem Produkt der PI3 Kinase (Abb. 1.12 und Abb. 1.13; Chou et al., 1998; Übersicht in: Newton, 1995; Mellor und Parker, 1998).

Bevor PKC durch DAG und Phosphatidylserin aktiviert werden kann, muss die inaktive Vorläufer-Form durch drei Phosphorylierungen in eine katalytisch kompetente Form überführt werden (Übersicht in: Parekh et al., 2000). Limitierend ist hier vor allem die

PDK1-vermittelte Phosphorylierung in der Aktivierungs-Schleife, die eine nachfolgende Autophosphorylierung der beiden anderen C-terminalen Phosphorylierungsstellen erlaubt (Le Good et al., 1998). Atypische PKCs tragen in ihrem hydrophoben Motiv eine saure Aminosäure und sind dadurch ohne Phosphorylierung aktivierbar (Balendran et al., 2000). Nach ihrer Aktivierung werden die konventionellen und neuen Isoformen von PKC sowie die atypische Isoform PKC λ ubiquitiniert und in Proteasomen degradiert (Abb. 1.13; Lu et al., 1998; Junoy et al., 2002; Okuda et al., 2001).

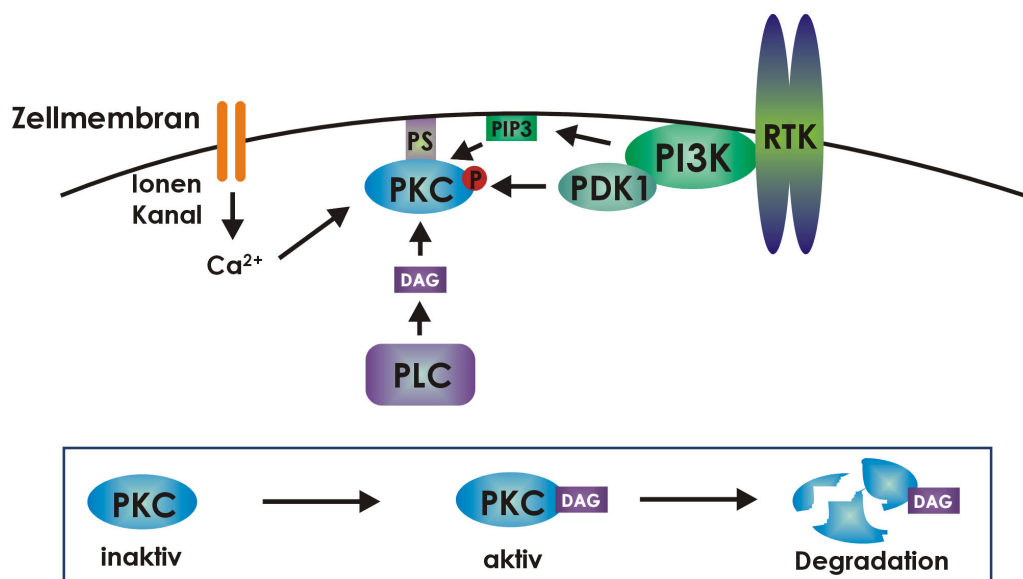


Abb. 1.13: Regulation von PKC.

Konventionelle PKCs werden durch Phosphatidylserin (PS), Ca^{2+} Ionen sowie DAG aktiviert, welches von Mitgliedern der PLC Familie synthetisiert wird. Die Aktivierung neuer PKCs erfolgt durch PS und DAG. Atypische PKCs werden durch PS und PIP3 aktiviert. Alle Isoformen von PKC benötigen für ihre Aktivität außerdem eine PDK1-abhängige Phosphorylierung ihrer Aktivierungs-Schleife. Konventionelle und neue PKCs werden nach ihrer Aktivierung ubiquitiniert und degradiert.

Die subzelluläre Lokalisation verschiedener Isoformen von PKC wird durch unterschiedliche Bindungspartner wie den Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen (RACKs), Substraten, die mit C-Kinasen interagieren (STICKs), und den Rezeptoren für inaktive C-Kinasen (RICKs) erreicht (Übersicht in: Mochly-Rosen und Gordon, 1998; Jaken und Parker, 2000). Auch eine Bindung einzelner Isoformen an AKAPs wurde berichtet (Faux und Scott, 1997). Die Bindungspartner tragen außerdem entscheidend zur Regulation und Substratspezifität von PKC bei.

Ionisierende Strahlung aktiviert PKC δ , woraufhin sie in den Zellkern transloziert und ihre pro-apoptotische Funktion durch die Phosphorylierung von Substraten wie Lamin oder DNA-PK ausübt (Übersicht in: Brodie und Blumberg, 2003). Außerdem induziert ionisierende Strahlung die Expression des PKC β Proteins (Woloschak et al., 1990). In

Maus-Lymphozyten steigert ionisierende Strahlung zudem die Expression der PKC α , PKC δ und PKC ζ Proteine (Varadkar et al., 2003).

1.3.4 Akt/PKB

Akt/PKB ist auch unter dem Namen „Related to PKA and PKC Protein Kinase“ (RAC-PK) bekannt. Benannt wurde Akt ursprünglich nach dem transformierenden Retrovirus AKT8, das 1977 aus AKR Mäusen isoliert wurde und in dessen Genom ein zellverwandtes Gen, *v-akt*, entdeckt wurde (Staal et al., 1977; Bellacosa et al., 1991). Akt/PKB ist in diverse zelluläre Prozesse wie Stoffwechsel, Proliferation und Überleben involviert und gilt als Proto-Onkogen (Übersicht in: Hanada et al., 2004). Die anti-apoptotische Funktion von Akt/PKB beruht auf der Phosphorylierung und Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren wie CREB sowie auf der Inhibition von Mitgliedern der „Forkhead“-Familie und pro-apoptotischer Proteine wie Bad oder Caspase 9 (Übersicht in: Song et al., 2005).

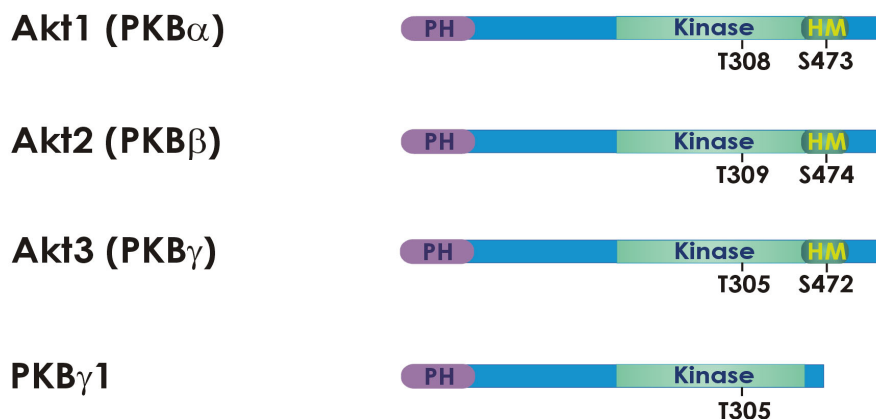


Abb. 1.14: Schematische Darstellung der Isoformen von Akt/PKB.

Alle Isoformen von Akt/PKB enthalten eine N-terminale PH-Domäne und eine zentrale Kinasedomäne. Auch die C-terminale regulatorische Domäne ist konserviert. Lediglich der Akt3/PKB γ Spleißvariante PKB γ 1 fehlt das hydrophobe Motiv (HM) mit der zugehörigen Phosphorylierungsstelle.

Die drei Isoformen von Akt/PKB: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ werden von drei verschiedenen Genen kodiert. Alle drei Isoformen enthalten eine N-terminale PH-Domäne, eine zentrale Kinasedomäne sowie eine C-terminale regulatorische Domäne (Abb. 1.14; Übersicht in: Hanada et al., 2004). Beim Menschen gibt es von Akt3/PKB γ außerdem zwei Spleißvarianten (Brodbeck et al., 2001). Das Akt1/PKB α Protein und das Akt2/PKB β Protein werden ubiquitär exprimiert, wobei das Akt2/PKB β Protein besonders in Insulin-Zielgeweben wie Fettgewebe, Leber und Skelettmuskel stark exprimiert wird (Yang et al., 2003). Mäuse mit genetischer Deletion von

Akt1/PKB α und Akt2/PKB β sind lebensfähig, weisen aber unterschiedliche Defizite auf. Während Akt2/PKB β für die Insulin-abhängige Glukose-Aufnahme essentiell ist (Cho et al., 2001 a), wird Akt1/PKB α für ein normales Wachstum benötigt (Cho et al., 2001 b). Das Akt3/PKB γ Protein wird nicht in allen Geweben exprimiert. Besonders in Gehirn und Hoden wird das Akt3/PKB γ Protein allerdings in großer Menge exprimiert (Yang et al., 2003).

Eines der wichtigsten Substrate von Akt/PKB ist das GSK-3 Protein. Sowohl im Insulin-Signalweg, als auch im Neurotrophin-Signalweg phosphoryliert und inhibiert Akt/PKB GSK-3 und induziert so die Glykogen Synthese bzw. das Überleben von Neuronen (siehe Kapitel 1.1.1 und 1.1.2; Pap und Cooper, 1998; van Weeren et al., 1998).

Das Akt/PKB Protein ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Das Akt1/PKB α Protein und das Akt2/PKB β Protein können aber auch in den Zellkern translozieren (Andjelković et al., 1997; Meier et al., 1997). Da das Akt/PKB Protein kein NLS enthält wird angenommen, dass der Transport in den Zellkern durch die Interaktion mit andern Proteinen, wie z.B. „T-cell leukemia 1“ (Tcl1), erfolgt, das spezifisch mit dem Akt1/PKB α Protein interagiert und sowohl die Kinaseaktivität steigert als auch den Transport in den Zellkern fördert (Pekarsky et al., 2000). Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus kann das Akt/PKB Protein außerdem in die Mitochondrien gelangen (Bijur und Jope, 2003 b).

Von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von Akt/PKB sind die Phosphorylierungen an Threonin 308 in der Aktivierungs-Schleife und Serin 473 im hydrophoben Motiv. Beide Aminosäuren sind, mit Ausnahme der C-terminal verkürzten Akt3/PKB γ Spleißvariante, bei allen Isoformen von Akt/PKB konserviert (Abb. 1.14; Übersicht in: Hanada et al., 2004). Voraussetzung für die Aktivierbarkeit von Akt/PKB sind außerdem die konstitutiven Phosphorylierungen an Serin 124 und Threonin 450 (Bellacosa et al., 1998). Eine Phosphorylierung an Threonin 308 oder Serin 473 führt zumindest *in vitro* zu einer teilweisen Aktivierung von Akt/PKB, für eine volle Aktivierung sind allerdings beide Phosphorylierungen erforderlich (Alessi et al., 1996). Die Phosphorylierung an Threonin 308 erfolgt durch PDK1. Sowohl das Akt/PKB Protein als auch das PDK1 Protein besitzen eine PH-Domäne, welche eine PIP3-abhängige Verankerung an der Zellmembran ermöglicht. Durch die Bindung von PIP3 an die PH-Domäne des Akt/PKB Proteins wird außerdem ein Konformationswandel induziert, der die Phosphorylierung von Threonin 308 durch PDK1 erlaubt (Abb. 1.15; Alessi et al., 1997 a). Die Kinase, welche Serin 473 phosphoryliert ist bisher unbekannt, wird aber entsprechend als PDK2 bezeichnet. Etwa 10 Kinasen kommen als PDK2 in Frage. Darunter sind unter anderem PKC α , PKC β II, p38, ILK, mTOR, ATM und DNA-PK. Auch eine Autophosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 wird diskutiert.

Möglicherweise erfolgt die Phosphorylierung im hydrophoben Motiv Zelltyp- und Signalweg-abhängig durch verschiedene Kinasen (Übersicht in: Dong und Liu, 2005).

Darüber hinaus kann Akt/PKB unabhängig von einer Phosphorylierung an Serin 473 durch PKA aktiviert werden. Zwar ist das Akt/PKB Protein kein direktes Substrat von PKA, dennoch kann PKA indirekt die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins vermitteln (Filippa et al., 1999).

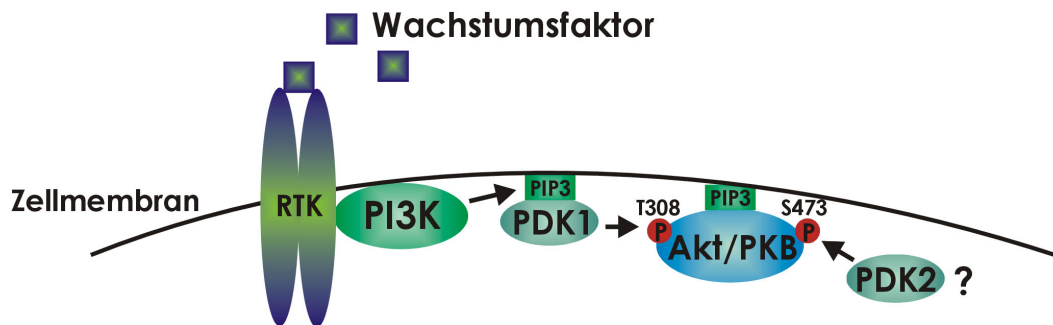


Abb. 1.15: Regulation von Akt/PKB.

Die Aktivierung von Akt/PKB erfolgt durch zwei Phosphorylierungen. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren an RTKs wird die PI3 Kinase aktiviert, welche daraufhin PIP3 synthetisiert. Über ihre PH-Domäne binden sowohl das PDK1 Protein als auch das Akt/PKB Protein PIP3 und werden dadurch an der Zellmembran kolokalisiert. PDK1 phosphoryliert das Akt/PKB Protein an Threonin 308. Die zweite Phosphorylierung an Serin 473 erfolgt durch eine bislang unbekannte Kinase, die den Namen PDK2 erhielt.

Alle drei Isoformen von Akt/PKB können einen Komplex mit dem „Heat shock protein 90“ (Hsp90) und seinem Ko-Chaperon Cdc37 bilden. Im Hsp90-Komplex ist Akt/PKB phosphoryliert und aktiv, da der Komplex Akt/PKB vor der Dephosphorylierung und Inaktivierung durch PP2A sowie vor der Ubiquitinierung und Degradation in Proteasomen schützt (Sato et al., 2000; Basso et al., 2002).

Das Akt/PKB Protein wird nach ionisierender Strahlung sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 phosphoryliert. Die Phosphorylierung an Threonin 308 ist transient und erfolgt in Abhängigkeit von RTKs (Contessa et al., 2002). Die Phosphorylierung an Serin 473 ist hingegen auch noch mehrere Stunden nach Bestrahlung deutlich erhöht (Edwards et al., 2002). Verschiedene Arten von Stress aktivieren die einzelnen Isoformen von Akt/PKB unterschiedlich stark, wobei Akt2/PKB β generell die geringste Sensitivität aufweist (Konishi et al., 1997). Besonders Mäuse mit genetischer Deletion von Akt1/PKB α sterben nach ionisierender Strahlung wesentlich schneller als WT-Mäuse, was auf eine besondere Rolle von Akt1/PKB α bei der Antwort auf ionisierende Strahlung hinweist (Chen et al., 2001).

1.4 DNA-PK

DNA-PK wurde 1990 als Serin/Threonin Kinase beschrieben, welche durch doppelsträngige DNA aktiviert wird (Lees-Miller et al., 1990). DNA-PK besteht aus einer katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) sowie den regulatorischen Untereinheiten Ku70 und Ku80 (Übersicht in: Smith und Jackson, 1999). DNA-PKcs bildet zusammen mit PI3K, mTOR, ATM und ATR die Familie der PI3 Kinasen, wobei PI3K eine Lipid Kinase ist, während die anderen Familienmitglieder Proteine phosphorylieren (Hartley et al., 1995; Übersicht in: Stein, 2001).

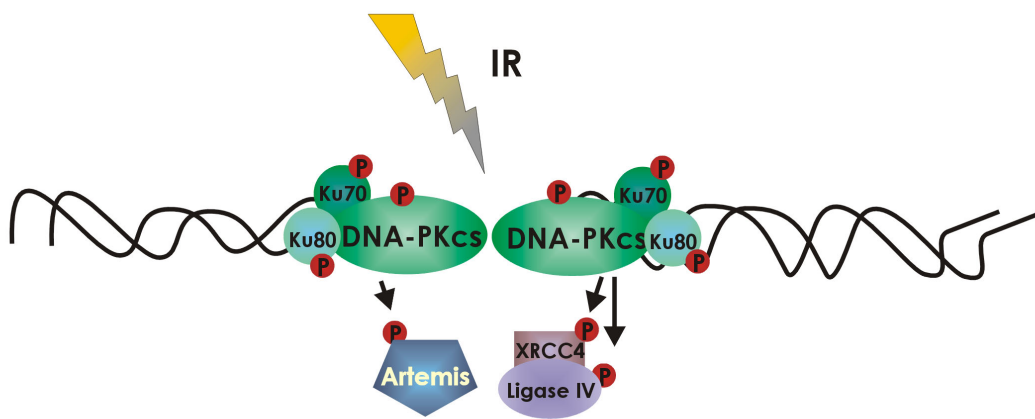


Abb. 1.16: Funktion von DNA-PK bei der NHEJ-Reparatur.

Ionisierende Strahlung (IR) induziert Doppelstrangbrüche in der DNA. Diese werden von den regulatorischen Untereinheiten Ku70 und Ku80 sowie von DNA-PKcs erkannt, wodurch die Kinase aktiviert wird. Die aktive DNA-PKcs phosphoryliert daraufhin sowohl die regulatorischen Ku Untereinheiten als auch sich selbst. Außerdem phosphoryliert und aktiviert DNA-PKcs die Nuklease Artemis sowie die Ligase IV und deren Kofaktor XRCC4, welche anschließend die DNA-Enden prozessieren und ligieren.

DNA-Doppelstrangbrüche gehören zu den schwersten DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung entstehen. Sie werden aber auch endogen z.B. bei der Reifung von Immunglobulin-Genen (V(D)J Rekombination) gebildet (Übersicht in: Bassing et al., 2002). Unrepariert gefährden Doppelstrangbrüche die Integrität des Genoms und das Überleben eines Organismus. DNA-PK spielt eine zentrale Rolle bei einem der Reparaturwege für Doppelstrangbrüche, der NHEJ-Reparatur, die vor allem in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklusses den Haupt-Reparaturweg für Doppelstrangbrüche darstellt. Man nimmt an, dass das Ku Heterodimer zunächst die freien DNA-Enden eines Doppelstrangbruchs bindet. Das DNA-PKcs Protein bindet daraufhin an die DNA gebundenen Ku Untereinheiten, wodurch die katalytische Untereinheit aktiviert wird. In der Folge phosphoryliert DNA-PK sich selbst, einzelne Komponenten des NHEJ-Komplexes sowie weitere Zielproteine. (Abb. 1.16; Übersicht in: Lees-Miller und

Meek, 2003; Collis et al., 2005). DNA-PKcs kann allerdings auch in Abwesenheit von Ku Untereinheiten durch DNA-Enden aktiviert werden (Hammarsten und Chu, 1998) sowie in Abwesenheit von DNA-Enden durch das DNA-Bindeprotein C1D (Yavuzer et al., 1998). Außerdem dient DNA-PK als Gerüstprotein für die DNA-Ligase IV, deren Kofaktor „X-Ray Cross Complementation group 4 protein“ (XRCC4) und der Nuklease Artemis. Die Nuklease Artemis prozessiert die DNA-Enden bevor sie durch den Komplex aus XRCC4 und der Ligase IV ligiert werden können (Abb. 1.16; Übersicht in: Lees-Miller und Meek, 2003).

DNA-PK ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert, eine geringe Menge wird aber auch im Zytoplasma gefunden (Nilsson et al., 1999).

Ein potientielles Substrat von DNA-PK ist das Akt/PKB Protein (siehe Kapitel 1.3.4). Das DNA-PKcs Protein assoziiert mit dem Akt/PKB Protein *in vivo* und *in vitro* und eine an der Membran lokalisierte Fraktion von DNA-PK phosphoryliert das Akt/PKB Protein an Serin 473 (Feng et al., 2004). Darüber hinaus induzieren CpG-Oligodesoxynukleotide in „Bone Marrow Derived Macrophages“ (BMDMs) von Mäusen eine transiente Translokation von aktivierten Akt/PKB und DNA-PKcs Proteinen in den Zellkern (Dragoi et al., 2005).

1.5 Zielsetzung

Ionisierende Strahlung inhibiert GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9. Dies führt zur Hypophosphorylierung und Inhibition des Mdm2 Proteins, wodurch das p53 Protein nicht länger degradiert werden kann und in der Zelle akkumuliert (Kulikov et al., 2005). Ziel dieser Arbeit war es, den Signalweg aufzuklären, der nach ionisierender Strahlung zur Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Qualität und wurden von folgenden Firmen erworben:

Ampizillin	Calbiochem, Bad Soden
Aprotinin	Fluka, Buchs
BSA, Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
DMSO	Fluka, Buchs
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden
IPTG	Peqlab, Erlangen
KT5720	Calbiochem, Bad Soden
Leupeptin	Amersham, Freiburg
LY294002	Calbiochem, Bad Soden
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Milchpulver, fettarm	Saliter, Obergünzburg
PBS	Gibco-BRL, Karlsruhe
Pepstatin	USB, Cleveland, USA
Trypsin	Difco, Detroit, USA
U0126	Calbiochem, Bad Soden

Alle anderen Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei der Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) erworben.

2.1.2 Radioaktive Chemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 5 mCi/mmol, 10 mCi/ml	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
---	--------------------------------

2.1.3 Größenstandards, Kits und Matrices

Vorgefärbter SDS 7B Molekulargewichtsstandard	Sigma, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B	Amersham, Freiburg
Protein A Sepharose	Amersham, Freiburg

2.1.4 doppelsträngige siRNA Oligonukleotide

Kontroll siRNA Zielsequenz: AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	Qiagen, Hilden
Hs_Akt2_5_HP validated siRNA	Qiagen, Hilden
HS_Akt2_6_HP validated siRNA	Qiagen, Hilden

Alle anderen doppelsträngigen siRNA Oligonukleotide wurden von Dharmacon (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) hergestellt und richteten sich gegen folgende Zielsequenzen:

Akt1 I	CGT GAG GCT CCC CTC AAC A	(Semizarov et al., 2003)
Akt1 II	GAT GAC AGC ATG GAG TGT G	(Semizarov et al., 2003)
DNA-PKcs I	GAT CGC ACC TTA CTC TGT T	(Peng et al., 2002)
DNA-PKcs II	CTT TAT GGT GGC CAT GGA G	(Peng et al., 2002)

2.1.5 Plasmide

pGEX-4T-2-WT-GSK-3 β (1-100)	(erhalten von Roman Kulikov)
------------------------------------	------------------------------

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper:

Phospho-Akt (Thr308) 244F9	Kaninchen monoklonal
Phospho-Akt (Ser473) 193H12	Kaninchen monoklonal
Akt	Kaninchen polyklonal
Akt2 5B5	Kaninchen monoklonal
Phospho-GSK3 β (Ser 9)	Kaninchen polyklonal
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal
	(Alle von Cell Signaling, Beverly, USA)
DNA-PKcs (G-4)	Maus monoklonal (Santa Cruz, Santa Cruz USA)

GSK-3 β	Maus monoklonal	(BD Biosciences, Heidelberg)
anti-GST	Ziege polyklonal	(Rockland, Gilbertsville, USA)
p53 Ab-2	Maus monoklonal	(Oncogene, Bad Soden)
anti-PARP	Kaninchen polyklonal	(Roche, Mannheim)
Paxillin	Maus monoklonal	(BD Biosciences, Heidelberg)
PCNA PC10	Maus monoklonal	(Santa Cruz, Santa Cruz USA)

Sekundäre Antikörper:

anti-Maus:	p0161, HRP-konjugiert	(DacoCytomation GmbH, Hamburg)
anti-Kaninchen	p0448, HRP-konjugiert	(DacoCytomation GmbH, Hamburg)
anti-Ziege	p0160, HRP-konjugiert	(DacoCytomation GmbH, Hamburg)

2.1.7 Bakterien

***Escherichia coli* BL21:** F⁻, *ompT*, *hsdS* (rB⁻, mB⁻), *gal*, *dcm*, Bakterienstamm zur Expression von GST-Fusionsproteinen (Amersham, Freiburg)

2.1.8 Zelllinien und Kulturmedien

GM02184: EBV-immortalisierte menschliche prä-B Lymphozyten (Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA)

MEF: embryonale Mausfibroblasten (erhalten von Bernd Kaina)

SCID: Maus Zelllinie, etabliert aus „Severe Combined Immuno Deficiency“ (SCID) Mäusen (erhalten von Bernd Kaina)

U2OS: menschliche Zelllinie, etabliert aus einem Osteosarkom, ATCC-Nummer HTB-96 (erhalten von Christoph Englert)

GM02184 Zellen wurden in Roswell Park Memorial Institut Medium (RPMI, Gibco-BRL, Karlsruhe), das mit 15% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, A) und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin (Gibco-BRL, Karlsruhe) angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

MEF, SCID und U2OS Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Karlsruhe), das mit 10% FCS und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.9 Membranen, Filme und Plastikwaren

Immobilon P (PVDF)-Membran	Amersham, Freiburg
ECL und MP Hyperfilme	Amersham, Freiburg
Plastikwaren für die Zellkultur	Greiner Labortechnik, Nürtingen

2.1.10 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren wurden von den Firmen VWR (Darmstadt), Neolab (Heidelberg) oder Omnilab (Bremen) bezogen. Die Sterilisation erfolgte 5 Stunden in einem Wärmeschrank (Modell 800, Memmert GmbH & CoKG, Schwabach).

2.2 Methoden

Routinemethoden und die Zusammensetzung gebräuchlicher Puffer wurden, soweit nicht anders vermerkt, dem Protokollbuch Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) entnommen. Medien wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 120°C in einem Autoklaven (Varioklav, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim) autoklaviert.

2.2.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden

2.2.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in einem Steri-Cult 200 Inkubator (Forma Scientific, Marietta, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

GM02184 Suspensionszellen wurden in Zellkulturmedium inkubiert bis sie eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten. Danach wurden sie 1:5 in frischem Kulturmedium verdünnt.

Adhärente Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80-90% in Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄) gewaschen. Pro 50 cm² wurde 1 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und diese etwa 2 Minuten bis zur Ablösung von der Kulturflasche bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:5 in frischem Kulturmedium verdünnt, in ein Falcon Röhrchen überführt, 2 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 Heraeus, Hanau) und in der gewünschten Dichte ausplattiert.

2.2.1.2 Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryotischen Zellen

Um GM02184 Zellen über einem längeren Zeitraum aufzubewahren, wurde eine logarithmisch wachsende Kultur 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, in Einfriermedium (RPMI, 20% hitzeinaktiviertes FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in

Kryoröhrchen (Greiner Labortechnik, Nürtingen) aliquotiert und langsam auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Adhärente Zellen wurden zur Langzeitaufbewahrung wie unter 2.2.1.1 beschrieben mit Trypsin behandelt und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium (DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und langsam auf -80°C abgekühlt. Später wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Anzucht wurden GM02184 Zellen rasch bei 37°C aufgetaut, mit 5 ml frischem Kulturmedium versetzt, 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert und in 500 μl frischem Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben weiter kultiviert.

Adhärente Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und in frisches Kulturmedium überführt. Nach der Anheftung der Zellen an die Kulturflasche wurde das Medium gewechselt und die Zellen anschließend wie in Kapitel 2.2.1.1 dargestellt kultiviert.

2.2.1.3 Transfektion von siRNA mit LipofectamineTM2000

Am Tag vor der Transfektion wurden U2OS Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 dargestellt mit Trypsin aus der Kulturflasche gelöst und in 75 cm^2 Kulturschalen ausplattiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 8 ml Transfektionsmedium (DMEM, 0,5% FCS) ausgetauscht. Pro Schale wurden 15 μl einer 20 μM (Endkonzentration: 30 nM Akt2, Kontrolle) bzw. 10 μl einer 75 μM (Endkonzentration: 75 nM Akt1, DNA-PKcs) siRNA Lösung in 1 ml DMEM verdünnt. Zugleich wurden jeweils 15 μl LipofectamineTM2000 (Invitrogen, Karlsruhe) in 1 ml DMEM gelöst. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde das verdünnte LipofectamineTM2000 mit den verdünnten Oligonukleotiden gemischt und zur Komplexbildung weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden je Schale 2 ml DMEM mit den Oligonukleotid-LipofectamineTM2000 Komplexen zugetropft und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. 8 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen daraufhin noch weitere 64 Stunden (Akt1, Akt2) bzw. 88 Stunden (DNA-PKcs) bei 37°C kultiviert.

2.2.1.4 Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung und Inhibitoren

Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung erfolgte in Kulturmedium in einer $^{60}\text{Kobalt}$ γ -Quelle (Gammacell 220, A.E.C.L. Atomic energy of Canada limited, Ottawa, CAN) bei einer Dosisrate von 1,5 Gray pro Minute.

Forskolin wurde als 10 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 10 μ M verwendet.

KT5720 wurde als 100 μ M Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 500 nM benutzt.

LY294002 wurde als 30 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Konzentration von 30 μ M verwendet.

TPA wurde in einer Konzentration von 200 μ g/ml in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 50 ng/ml genutzt.

U0126 wurde als 10 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

2.2.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Bakterien

450 ml LB Medium mit 10 mM $MgCl_2$ wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,3-0,4$ in einem Bakterienschüttler (HA Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf acht 50 ml Falcon Röhren verteilt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden 8 Minuten bei 3000 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge (Biofuge Primo R, Heraeus, Hanau) pelletiert und jeweils in 10 ml 100 mM $MgCl_2$ resuspendiert. Dabei wurden die Bakterien in zwei Falcon Röhren vereinigt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 8 Minuten bei 3000 rpm und 4°C wurden die Bakterien in 40 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien noch einmal 8 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in 30 ml 100 mM $CaCl_2$ mit 20% Glycerin aufgenommen. Aliquots von je 500 μ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

500 μ l der chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 100 μ l davon in einem Reaktionsgefäß mit 1 μ l Plasmid DNA gemischt. Die Bakterien wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden in einem Heizblock (HLC Heap Labor Consult, Bovenden) auf 42°C erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien mit 900 μ l LB Medium gemischt und 1 Stunde bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert. 50 μ l der Bakteriensuspension wurden auf einer Selektivplatte ausplattiert.

2.2.3 Methoden zur Arbeit mit Proteinen

2.2.3.1 Präparation des Gesamtzelllysats

GM02184 Zellen wurden 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in eiskaltem NP40-Lysispuffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH

8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 1% NP40; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 mM Na₄P₂O₇; 50 mM NaF; 1 µg/ml Benzamidin; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Chymostatin) 10 Minuten auf Eis lysiert.

Von adhärenen Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS von der Platte abgeschabt und 20 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten in eiskaltem NP40-Lysispuffer auf Eis lysiert.

Das Zelllysate wurde 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.3.3) bestimmt.

30-50 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden mit dem gleichen Volumen 2× SDS-Ladepuffer (4% SDS; 0,16 M Tris-HCl pH 6,8; 20% Glycerin; 4% β-Mercaptoethanol; 0,002% Bromphenolblau) versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein SDS-PAGE Gel (siehe Kapitel 2.2.3.5) geladen.

2.2.3.2 Auftrennung des Zelllysats in zytoplasmatische und nukleäre Fraktion

GM02184 Zellen wurden 1 Minute bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, einmal mit kaltem PBS gewaschen und in eiskaltem Fraktionierungs-Lysispuffer (25 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,5% NP40; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 mM Na₄P₂O₇; 50 mM NaF; 1 µg/ml Benzamidin; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Chymostatin) 2 Minuten auf Eis lysiert.

Von adhärenen Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS von der Platte abgeschabt und 1 Minute bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen 3 Minuten in eiskaltem Fraktionierungs-Lysispuffer auf Eis lysiert.

Durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 5 Minuten wurde die zytoplasmatische Fraktion von den Zellkernen getrennt und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellkerne wurden einmal mit 200 µl eiskaltem Fraktionierungs-Waschpuffer (25 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 50 mM NaCl) gewaschen und anschließend durch 6-8 Pulse mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) in Fraktionierungs-Lysispuffer aufgeschlossen. Die nukleäre Fraktion wurde 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.3.3).

Je 40-50 µg der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurden mit dem gleichen Volumen 2× SDS-Ladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein SDS-PAGE Gel (siehe Kapitel 2.2.3.5) geladen.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

(nach Bradford, 1976)

Für die Bradford-Stammlösung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Mischung wurden 100 ml 85% Phosphorsäure gegeben und der Ansatz auf 1 Liter aufgefüllt. Die Bradford-Stammlösung wurde filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurden 2 µl der Probe mit 1 ml Bradford-Stammlösung vermischt. Nach 5minütiger Inkubation wurden je 200 µl der Ansätze in eine 96-Loch Platte überführt und die Extinktion bei 595 nm in einem ELISA-Lesegerät (ELX808IU Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall) bestimmt.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben wurde zu jeder Proteinbestimmung eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurden je 2 µl des für die Zellyse eingesetzten Puffers zusammen mit 0, 2, 4 oder 6 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit 1 ml der Bradford-Stammlösung vermischt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Konzentration der Proben wurde mit der Formel $OD/2\alpha$ errechnet, wobei α die OD von 1 µl BSA (1mg/ml) in 1 ml Bradford-Stammlösung war.

2.2.3.4 Immunpräzipitation

Kopplung des Antikörpers an die Protein A Sepharose:

Pro Ansatz wurden 20 µl einer Protein A Sepharose Mischung 12 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Pipettieren wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit gekappter Spitze verwendet, um die Sepharose nicht zu beschädigen. Die Protein A Sepharose wurde einmal mit PBS gewaschen und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt. Pro Ansatz wurde 1 µl Akt Antikörper zugegeben und für 2 Stunden auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 12 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und die Sepharose-Antikörper-Komplexe einmal mit PBS gewaschen. Die Sepharose wurde in IP-Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,9% NP40; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 mM $Na_4P_2O_7$; 50 mM NaF; 1 µg/ml Benzamidin; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Chymostatin) resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl von Reaktionsgefäßen verteilt.

Immunpräzipitationsreaktion:

600 µg Zellysat wurden zu den Sepharose-Antikörper-Komplexen gegeben und auf einem Drehrad bei 4°C 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose 20 Sekunden bei 13000 rpm pelletiert und dreimal mit je 250 µl IP-Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer feinen Kanüle (100

Sterican® 26G, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, CH) vollständig abgenommen. Die immunpräzipitierte Kinase Akt/PKB wurde in der Kinase-Analyse (siehe Kapitel 2.2.3.8) verwendet.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde das „Mini-PROTEAN®3 System“ (Bio-Rad, München) verwendet. Eine Front- und eine Rückplatte mit Abstandhalter wurden in den Plattenhalter gespannt und in den Gießstand eingesetzt. Für das Trenngel wurde eine Lösung aus 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 100 µl 10% (w/v) SDS; 100 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat; 4 µl TEMED und Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) in der benötigten Konzentration hergestellt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde zwischen die beiden Platten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel (2,7 ml Wasser; 0,67 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8); 0,5 ml 1M Tris-HCl pH 6,8; 40 µl 10% (w/v) SDS; 40 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat; 4 µl TEMED) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel aus der Gießapparatur genommen und in eine Laufkammer eingesetzt. Die Laufkammer wurde mit 1× Laufpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glyzin; 0,1% (w/v) SDS) befüllt und die vorbereiteten Proteinproben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 130-150 Volt bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.3.6 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zusammen mit 2 Filterpapieren und einer mit Methanol gespülten und in Transferpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glyzin; 10% Methanol) äquilibrierten Immobilon P-Membran in die Transferapparatur des „Mini-PROTEAN®3 Systems“ eingespannt. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und die Proteine über Nacht bei 30 Volt auf die Immobilon P-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Zeichentusche (Tusche A Nr. 17, Pelikan, Hannover) angefärbt und die unspezifischen Bindungen durch eine 30minütige Inkubation in 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄; 0,2% Tween 20) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung aus 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST mit dem ersten Antikörper 1,5 Stunden bei RT auf einem rotierenden Brett (REAX2, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim) inkubiert. Antikörper von Cell Signaling wurden in 5% BSA in PBST bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für 10 Minuten auf einer rotierenden Plattform (Polymax 2040, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim) gewaschen und mit einem zweiten, HRP-konjugierten Antikörper, der in 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST 1:1000 verdünnt worden war, 1 Stunde bei RT auf dem

rotierenden Brett inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal für mindestens 10 Minuten gewaschen. Zur Entwicklung des Western Blots wurden gleiche Volumina der ECL-Lösung 1 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 400 μ M Kumarinsäure) und ECL-Lösung 2 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,02% H₂O₂) gemischt und die Membran damit vollständig bedeckt. Nach 2 Minuten Inkubation bei RT wurde die überschüssige ECL-Lösung entfernt und die Membran gegen einen ECL Hyperfilm exponiert. Der Film wurde mit einem Kodak M35 X-OMAT Prozessor (Kodak, Stuttgart) entwickelt.

Zur Entfernung der Antikörper wurde die Membran für 40 Minuten bei 50°C in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS und 50 mM DTT in einem Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für 10 Minuten gewaschen und die unspezifischen Bindungen durch eine 30minütige Inkubation in 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST abgesättigt.

2.2.3.7 Präparation von GST-Fusionsproteinen

50 ml LB Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur von transformierten *E. coli* BL21 beimpft und bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀= 0,6-0,8 bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Danach wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben um die Expression der GST-Fusionsproteine zu induzieren und die Bakterien weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C pelletiert, in 2,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und durch Sonifizieren lysiert. Zur Lösung der Proteine wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% sowie PMSF in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und das Lysat für 30 Minuten bei RT unter Rotation inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt und die Proteine anschließend weiter aufgereinigt. Dazu wurden je 10 μ l Glutathion Sepharose 4B zu 1,5 ml des Bakterienlysats gegeben und für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Glutathion Sepharose wurde dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und die Proteine dreimal mit je 20 μ l Glutathion-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM Glutathion) eluiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.3.3).

2.2.3.8 Kinase-Analyse

1,5 μ g bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-WT-GSK-3 β Fusionsprotein wurde mit der immunpräzipitierten Kinase Akt/PKB (siehe Kapitel 2.2.3.4) in Gegenwart von 7 mM MOPS pH 7,3; 20 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 μ M ATP und 250 μ Ci/ml [³²P]- γ -ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 \times SDS-Ladepuffer gestoppt, die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend für 12 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. 20 μ l des

Überstandes wurden über SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.3.5) aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen (siehe Kapitel 2.2.3.6) und die Membran bei -80°C gegen einen MP Hyperfilm exponiert.

2.2.4 Quantifizierung

Die Filme mit den Western Blot Signalen wurden gescannt und die Intensität der Signale mit dem Programm Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download>) ermittelt. Der Quotient aus Protein Phosphorylierung und Protein Menge ergab die relative Phosphorylierung eines Proteins.

3 Ergebnisse

Die konstitutiv aktive GSK-3 β phosphoryliert *in vitro* und *in vivo* das Mdm2 Protein in der zentralen Domäne. Ionisierende Strahlung inhibiert GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9. Die daraus resultierende Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins verhindert die Mdm2-vermittelte Degradation des p53 Proteins (Kulikov et al., 2005). Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Kinase zu identifizieren, die das GSK-3 β Protein nach ionisierender Strahlung an Serin 9 phosphoryliert und inaktiviert. Daher untersuchte ich, ob eine oder mehrere der bekannten GSK-3 Kinasen an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt sind.

3.1 Einfluss von p70S6K und p90RSK auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Sowohl p70S6K als auch p90RSK werden nach ionisierender Strahlung über die MAP Kinase Kaskade aktiviert (Contessa et al., 2002; Amorino et al., 2002; siehe Kapitel 1.3.1). Um den Einfluss von p70S6K und p90RSK auf die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, hemmte ich die Aktivität beider Kinasen. Da kein für diese Kinasen spezifischer Inhibitor kommerziell erhältlich war, unterdrückte ich den MAP Kinase Signalweg.

GM02184 prä-B Lymphozyten wurden 20 Minuten vor Bestrahlung mit 10 μ M U0126 behandelt, einem Inhibitor der ERK Kinasen MEK1 und MEK2. Nach der Bestrahlung mit 7,5 Gray γ -Strahlung wurden die Zellen für weitere 150 Minuten in Gegenwart des Inhibitors inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen, Zellen, die in Abwesenheit des Inhibitors bestrahlt worden waren sowie Zellen, die mit U0126 behandelt, jedoch nicht bestrahlt worden waren, mitgeführt. Die Zellysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein gerichtet ist, hybridisiert. Nach der Inkubation mit einem zweiten, HRP-konjugierten, Antikörper wurde der Western Blot entwickelt. Anschließend wurden die Antikörper von der Membran entfernt und die Membran mit einem Antikörper, der das gesamte GSK-3 β Protein erkennt, nachhybridisiert. Die Hybridisierung der Membran mit einem Antikörper gegen das „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) wurde als interner Standard genutzt, da sich die Gesamtmenge an PCNA Protein unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht änderte.

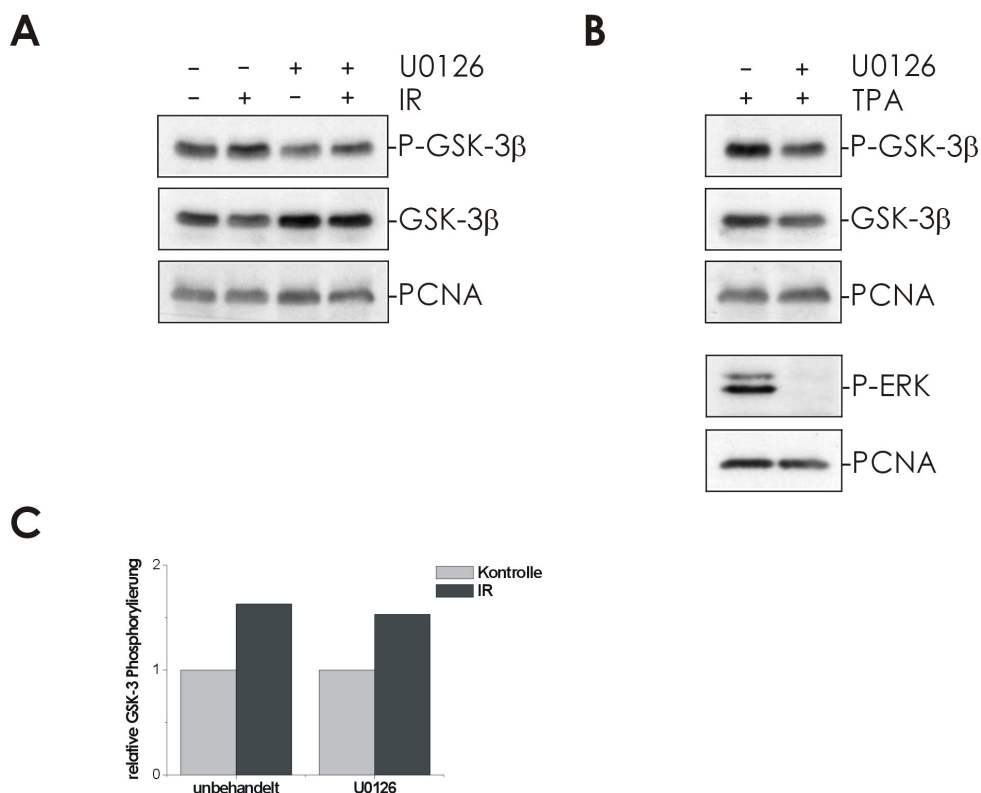


Abb. 3.1: Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt unabhängig von einer Aktivierung der MAP Kinase Kaskade.

(A): GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 10 μ M U0126 für 20 Minuten vorbehandelt, anschließend mit 7,5 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und 150 Minuten nach der Bestrahlung geerntet und lysiert. Als Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt, wurden mit 7,5 Gray γ -Strahlung in Abwesenheit des Inhibitors bestrahlt und 150 Minuten nach der Bestrahlung geerntet oder wurden 170 Minuten nach der Zugabe von 10 μ M U0126 unbestrahlt geerntet. (B): GM02184 prä-B Lymphozyten wurden für 20 Minuten mit 10 μ M U0126 vorbehandelt. Zu vorbehandelten oder unbehandelten Zellen wurde 50 ng/ml TPA gegeben und die Zellen nach 15 Minuten geerntet und lysiert. Je 30 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierten ERK1/2 Proteine sowie gegen das PCNA Protein hybridisiert. Die Western Blots wurden nach der ECL Methode entwickelt. Nach der Detektion wurden die Membranen durch eine 40minütige Inkubation in DTT-haltiger Lösung bei 50°C von den Antikörpern gereinigt und anschließend mit Antikörpern gegen das GSK-3 β Protein nachhybridisiert. (C): Die Western Blot Signale von (A) wurden quantifiziert und die Signale für phosphoryliertes GSK-3 β Protein durch die Signale für das gesamte GSK-3 β Protein dividiert und graphisch dargestellt. Die relative Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins in der unbestrahlten Probe wurde gleich 1 gesetzt.

In Übereinstimmung mit publizierten Daten, welche die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung zeigen (Kulikov et al., 2005), nahm die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung zu. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor des MAP Kinase Signalweges, U0126, senkte die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 im Vergleich zu unbehandelten Zellen zwar deutlich ab, die Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 β

Proteins nach ionisierender Strahlung wurde hingegen durch den Inhibitor nicht beeinflusst (Abb. 3.1 A und C).

Um die Wirksamkeit des MEK1/2 Inhibitors U0126 zu überprüfen, wurden GM02184 Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von U0126 für 15 Minuten mit 50 ng/ml TPA inkubiert. Die kurzzeitige Behandlung von Zellen mit TPA aktiviert die konventionellen und neuen Isoformen von PKC und führt dadurch zur Aktivierung der MAP Kinase Kaskade (Schönwasser et al., 1998), die wiederum die Phosphorylierung der ERK1/2 Proteine an Threonin 202 und Tyrosin 204 veranlasst (Übersicht in: Seger und Krebs, 1995). Diese Phosphorylierungen sollten in Gegenwart des MEK1/2 Inhibitors U0126 ausbleiben. Die Zellysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper, der gegen die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierten ERK1/2 Proteine gerichtet ist, hybridisiert. Zusätzlich wurde die Membran mit einem Antikörper gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins sowie mit einem gegen das PCNA Protein gerichteten Antikörper hybridisiert. Nach der Detektion wurden die Antikörper von der Membran entfernt und die Membran mit einem gegen das gesamte GSK-3 β Protein gerichteten Antikörper nachhybridisiert.

Wie erwartet induzierte TPA die Phosphorylierung der ERK1/2 Proteine. Nach Vorinkubation mit U0126 blieb die TPA-induzierte Phosphorylierung der ERK1/2 Proteine hingegen aus (Abb. 3.1 B). Auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 war nach Vorinkubation mit U0126 und der anschließenden Zugabe von TPA etwas geringer als in allein mit TPA behandelten Zellen. Allerdings konnte die Vorinkubation mit U0126 die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins in Gegenwart von TPA nicht wesentlich reduzieren (Abb. 3.1 B).

3.2 Einfluss konventioneller und neuer PKC Isoformen auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung induziert die Expression und Aktivierung der konventionellen Isoformen von PKC, PKC α (Varadkar et al., 2003) und PKC β (Woloschak et al., 1990) sowie der neuen Isoform PKC δ (Übersicht in: Brodie und Blumberg, 2003). Alle drei Isoformen von PKC können das GSK-3 Protein *in vivo* phosphorylieren (Fang et al., 2002; siehe Kapitel 1.3.3).

TPA aktiviert, analog zu DAG, konventionelle und neue Isoformen von PKC. Da die PKC Proteine nach ihrer Aktivierung internalisiert und degradiert werden und TPA im Gegensatz zum physiologischen Aktivator DAG nicht metabolisiert wird, führt eine dauerhafte Inkubation der Zellen mit TPA zum nahezu vollständigen Verlust der

konventionellen und neuen Isoformen von PKC (Lu et al., 1998; Junoy et al., 2002; siehe Kapitel 1.3.3).

Um festzustellen, ob das GSK-3 β Protein nach ionisierender Strahlung durch konventionelle oder neue Isoformen von PKC an Serin 9 phosphoryliert wird, wurden U2OS Osteosarkom Zellen für 24 Stunden mit 50 ng/ml des Phorbolesters TPA inkubiert, ehe sie mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt wurden. 90 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und lysiert.

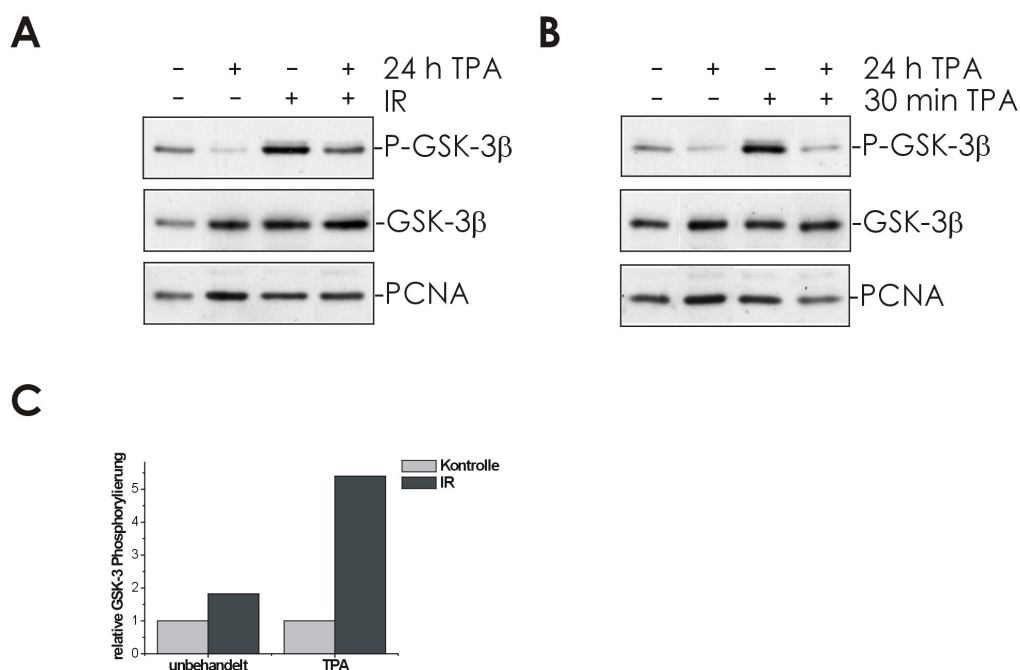


Abb. 3.2: Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt unabhängig von konventionellen und neuen PKC Isoformen.

(A): U2OS Osteosarkom Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 ng/ml TPA vorbehandelt, anschließend mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und 90 Minuten nach der Bestrahlung geerntet und lysiert. Als Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt, wurden 24 Stunden nach der Zugabe von 50 ng/ml TPA (ohne Bestrahlung) geerntet oder wurden 90 Minuten nach der Bestrahlung mit 10 Gray γ -Strahlung (ohne TPA-Vorbehandlung) geerntet. (B): Zum Nachweis der Wirksamkeit von TPA wurde zu für 24 Stunden mit TPA vorbehandelten bzw. unbehandelten Zellen 50 ng/ml TPA zugegeben und die Zellen nach 30 Minuten geerntet und lysiert. Als Kontrolle wurden auch hier unbehandelte sowie für 24 Stunden mit TPA behandelte Zellen mitgeführt. Je 30 μ g der Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.1). (C): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale von (A) erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt sowie Zellen, die entweder bestrahlt und 90 Minuten nach der Bestrahlung geerntet, oder mit TPA behandelt und bis zur Ernte für 24 Stunden in Gegenwart des Inhibitors kultiviert worden waren. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran

transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Kapitel 3.1).

Die Bestrahlung führte zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9. Wie die Vorbehandlung von Zellen mit dem MAP Kinase Inhibitor U0126 (siehe Kapitel 3.1) senkte auch die 24stündige Vorbehandlung der Zellen mit TPA die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 sehr stark ab. Die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung verhinderte die Behandlung mit TPA aber nicht. Interessanterweise war das GSK-3 β Protein in den Ansätzen, die für 24 Stunden in Gegenwart von TPA kultiviert worden waren, nach ionisierender Strahlung sogar deutlich stärker an Serin 9 phosphoryliert, als in den nicht mit TPA vorbehandelten Zellen (Abb. 3.2 A und C).

Um das Ausschalten der konventionellen und neuen Isoformen von PKC auf Grund einer anhaltenden Inkubation mit TPA zu überprüfen, wurde zu den für 24 Stunden mit TPA vorbehandelten bzw. unbehandelten Zellen 30 Minuten vor der Lyse nochmals 50 ng/ml TPA zugegeben. Als Kontrollen wurden auch hier unbehandelte sowie für 24 Stunden mit TPA behandelte Zellen mitgeführt.

Während in den nicht mit TPA vorbehandelten Zellen 30 Minuten nach Zugabe von TPA eine starke Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nachweisbar war, war diese Phosphorylierung in jenen Zellen, die für 24 Stunden in Gegenwart von TPA inkubiert worden waren, kaum feststellbar (Abb. 3.2 B).

3.3 Einfluss von PKA auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Auch wenn eine Aktivierung von PKA durch ionisierende Strahlung bislang nicht beschrieben wurde, war eine Beteiligung von PKA an der Phosphorylierung des GSK-3 Proteins nach ionisierender Strahlung dennoch nicht auszuschließen.

Daher wurden GM02184 prä-B Lymphozyten 30 Minuten vor Bestrahlung mit 500 nM KT5720, einem spezifischen Inhibitor von PKA, inkubiert. Nach der Bestrahlung mit 10 Gray γ -Strahlung wurden die Zellen für weitere 150 Minuten in Gegenwart des Inhibitors kultiviert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen, Zellen, die in Abwesenheit des Inhibitors bestrahlt worden waren sowie Zellen, die zwar mit KT5720 behandelt, aber nicht bestrahlt worden waren, mitgeführt. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Kapitel 3.1).

Auch in diesem Experiment war das GSK-3 β Protein nach ionisierender Strahlung deutlich an Serin 9 phosphoryliert. Wie die Vorbehandlung von Zellen mit TPA über mehrere Stunden oder die Zugabe von U0126, so senkte auch die Vorbehandlung der Zellen mit KT5720 die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins. Die vermehrte Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung verhinderte der Inhibitor von PKA hingegen nicht (Abb. 3.3 A, Spur 1, 2, 3, 6 und B).

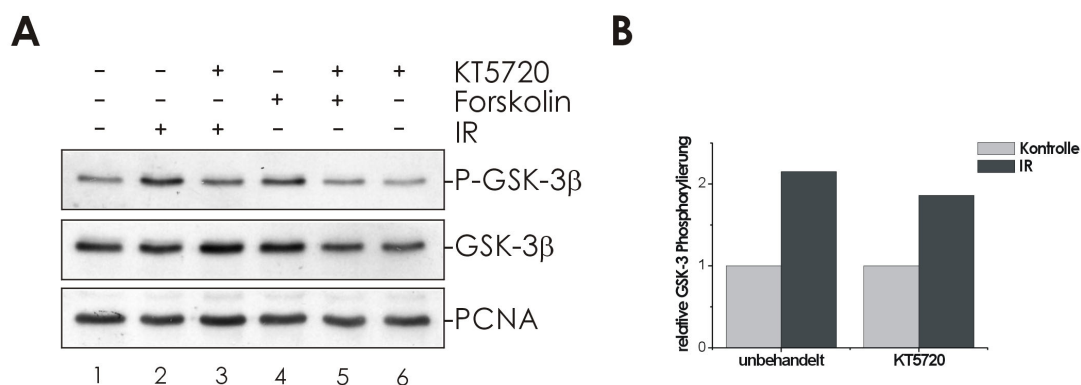


Abb. 3.3: Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt unabhängig von PKA.

(A): GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 500 nM KT5720 für 30 Minuten vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und 150 Minuten nach der Bestrahlung geerntet oder mit 10 μ M Forskolin behandelt und nach 5 Minuten geerntet. Als Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt, wurden mit 10 Gray γ -Strahlung in Abwesenheit des Inhibitors bestrahlt und 150 Minuten nach der Bestrahlung geerntet oder wurden 5 Minuten nach der Zugabe von 10 μ M Forskolin bzw. 30 Minuten nach der Zugabe von 500 nM KT5720 geerntet. Je 30 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.1). (B): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale aus den Spuren 1, 2, 3 und 6 von (A) erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Inhibitors wurden die Zellen nach der Zugabe von KT5720 zusätzlich für 5 Minuten mit 10 μ M Forskolin behandelt. Forskolin aktiviert Adenylat Zyklasten, welche daraufhin zyklisches AMP aus ATP generieren, einen spezifischen Aktivator von PKA (Übersicht in: Sunahara und Taussig, 2002).

Entsprechend der Beobachtung, dass PKA das GSK-3 β Protein unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert (Fang et al., 2000), führte die Zugabe von Forskolin zu einer vermehrten Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins. Wurden die Zellen jedoch mit KT5720 vorbehandelt, so nahm die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins durch Zugabe von Forskolin nur wenig zu (Abb. 3.3 A, Spur 1, 4, 5 und 6).

3.4 Einfluss von Akt/PKB auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Akt/PKB ist eine der wichtigsten GSK-3 Kinasen. Sowohl im Insulin-Signalweg, als auch im Neurotrophin-Signalweg phosphoryliert und inhibiert Akt/PKB GSK-3 (Pap und Cooper, 1998; Übersicht in: Patel et al., 2004). Die Aktivierung von Akt/PKB erfolgt synergistisch durch zwei Phosphorylierungen an Threonin 308 und Serin 473 (Alessi et al., 1996). Nach ionisierender Strahlung wird das Akt/PKB Protein sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 phosphoryliert (Contessa et al., 2002; Edwards et al., 2002; siehe Kapitel 1.3.4).

3.4.1 Inhibition der Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung durch den PI3 Kinase Inhibitor LY294002

Um zu untersuchen, ob Akt/PKB an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt ist, wurden GM02184 prä-B Lymphozyten für 30 Minuten mit 30 μ M LY294002, einem Inhibitor von PI3 Kinasen, inkubiert, bevor die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt wurden. Zwar inhibiert LY294002 Akt/PKB nicht direkt, durch die Inhibition von PI3 Kinasen verhindert dieser Inhibitor jedoch die aktivierende Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 und Serin 473 (Gonzalez et al., 2004). Zur Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit des Inhibitors bestrahlt. 0, 30, 120 und 240 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen übertragen. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die an Threonin 308 oder Serin 473 phosphorylierte Form des Akt/PKB Proteins, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen das gesamte GSK-3 β Protein sowie gegen das PCNA Protein hybridisiert.

In Abwesenheit von LY294002 führte die Bestrahlung wie in den vorausgegangenen Versuchen zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins. Diese Phosphorylierung war 30 Minuten nach Bestrahlung nachweisbar und nahm während des Beobachtungszeitraums weiter zu. Wie die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nahm nach Bestrahlung auch die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 und Threonin 308 zu. Die Gesamtmenge an Akt/PKB Protein änderte sich durch die Bestrahlung hingegen nicht. Durch die Behandlung mit LY294002 wurde die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins zwar erhöht, die Phosphorylierung stieg nach Bestrahlung aber nicht weiter an (Abb. 3.4 A und B).

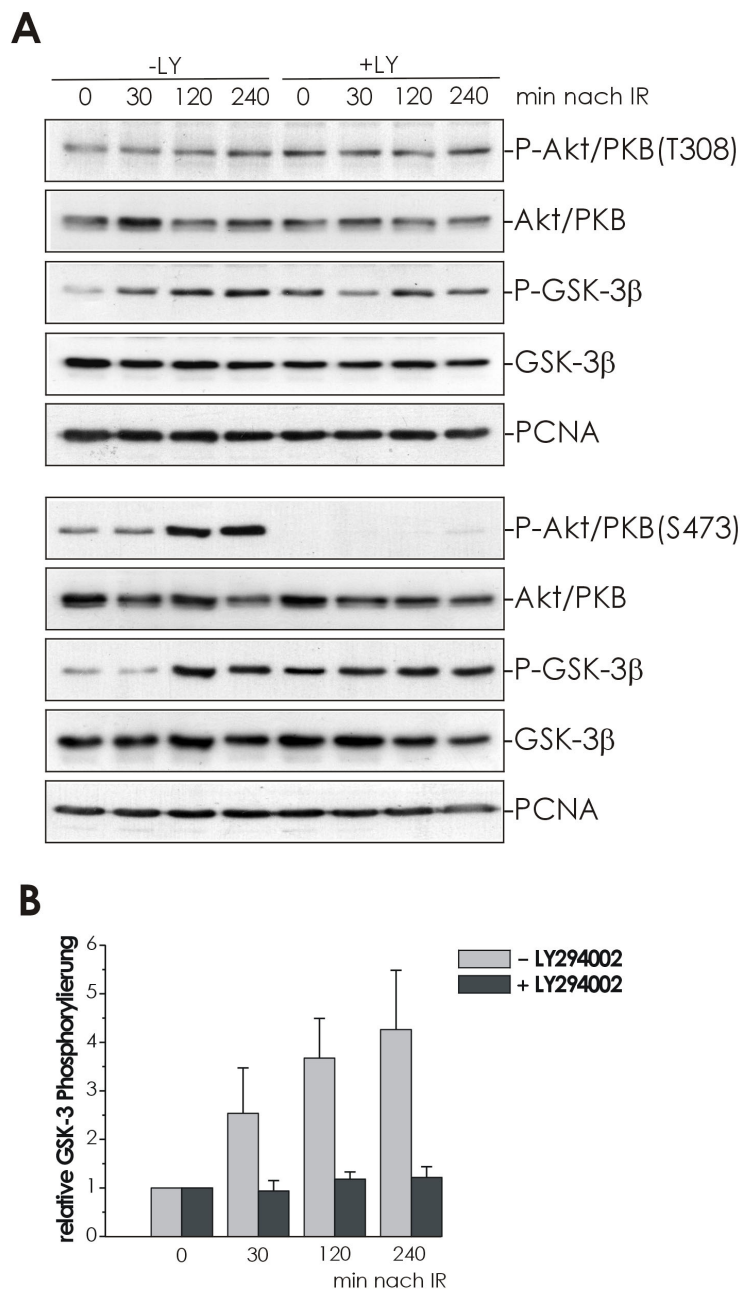


Abb. 3.4: Der PI3 Kinase Inhibitor LY294002 verhindert die Phosphorylierung von GSK-3β nach ionisierender Strahlung.

(A): GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 30 μ M LY294002 für 30 Minuten vorbehandelt oder blieben zur Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Je 50 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen an Threonin 308 oder Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert. Nach der Detektion der Phosphorylierungen wurden die Membranen von den Antikörpern gereinigt und anschließend mit Antikörpern gegen das gesamte Akt/PKB Protein und das gesamte GSK-3 β Protein nachhybridisiert. (B): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale von drei unabhängigen Experimenten erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Ivelisse Gonzalez (Gonzalez et al., 2004) war die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 nach Vorbehandlung mit LY294002 nicht länger nachweisbar. Im Gegensatz dazu war Akt/PKB an Threonin 308 nach wie vor phosphoryliert. Der Grad der Phosphorylierung veränderte sich aber nicht länger in Abhängigkeit von der Bestrahlung (Abb. 3.4 A).

3.4.2 Vergleich der Phosphorylierungen von Akt/PKB und GSK-3 β nach ionisierender Strahlung im Zytoplasma und Zellkern

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, wird die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch GSK-3 β für die Degradation des p53 Proteins in zellulären Proteasomen benötigt. Nach der Inhibition von GSK-3 β akkumuliert ubiquitiniertes p53 Protein in Gegenwart von Mdm2 im Zellkern (siehe Kapitel 1.1.4; Kulikov et al., 2005). Da auch ein Teil des GSK-3 β Proteins im Zellkern lokalisiert ist, ist anzunehmen, dass GSK-3 β das Mdm2 Protein im Zellkern phosphoryliert. Entsprechend kann man davon ausgehen, dass auch die inhibitorische Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung im Zellkern erfolgt. Folglich müsste die für die Strahlen-vermittelte Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins verantwortliche Kinase gleichfalls im Zellkern nachweisbar sein. Die Verwendung von LY294002 weist auf eine Beteiligung von Akt/PKB an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung hin. Nach vorherrschender Meinung ist das Akt/PKB Protein jedoch vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo es durch PDK1 an der Zellmembran aktiviert wird. Es gibt allerdings Hinweise, dass Akt/PKB nach ihrer Aktivierung in den Zellkern translozieren kann (Andjelković et al., 1997; Meier et al., 1997; siehe Kapitel 1.3.4). Es war deshalb denkbar, dass Akt/PKB nach ionisierender Strahlung im Zellkern phosphoryliert und aktiviert ist und daraufhin, gleichfalls im Zellkern, das GSK-3 β Protein phosphorylieren kann.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde von GM02184 prä-B Lymphozyten ein zytoplasmatisches und ein nukleäres Zelllysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt und 0, 10, 30, 45, 120, 180 sowie 240 Minuten nach der Bestrahlung geerntet. Bei der Lyse wurde zunächst die äußere Zellmembran aufgebrochen. Die noch intakten Kerne wurden von der zytoplasmatischen Proteinfraktion abgetrennt und ebenfalls lysiert. Die zytoplasmatischen und nukleären Zelllysate wurden jeweils über SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen an Threonin 308 oder Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein inkubiert.

Im Zytoplasma nahm bereits 10 Minuten nach Bestrahlung die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 zu und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erhöht. Im Gegensatz dazu war im Zellkern die basale Phosphorylierung von Threonin 308 zwar höher als im Zytoplasma, nach ionisierender Strahlung war aber kein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von Threonin 308 festzustellen (Abb. 3.5). Die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 stieg im Zytoplasma erst 120 Minuten nach Bestrahlung an und nahm daraufhin bis zum Ende des Beobachtungszeitraums weiter zu. Im Zellkern konnte hingegen bereits 30 Minuten nach Bestrahlung eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 beobachtet werden, die sich bis zum Versuchsende noch weiter verstärkte. Auffällig war dabei, dass der Anstieg der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 im Zellkern sehr viel stärker ausfiel als im Zytoplasma. Die Proteinmenge von Akt/PKB änderte sich nach Bestrahlung weder im Zellkern noch im Zytoplasma (Abb. 3.5).

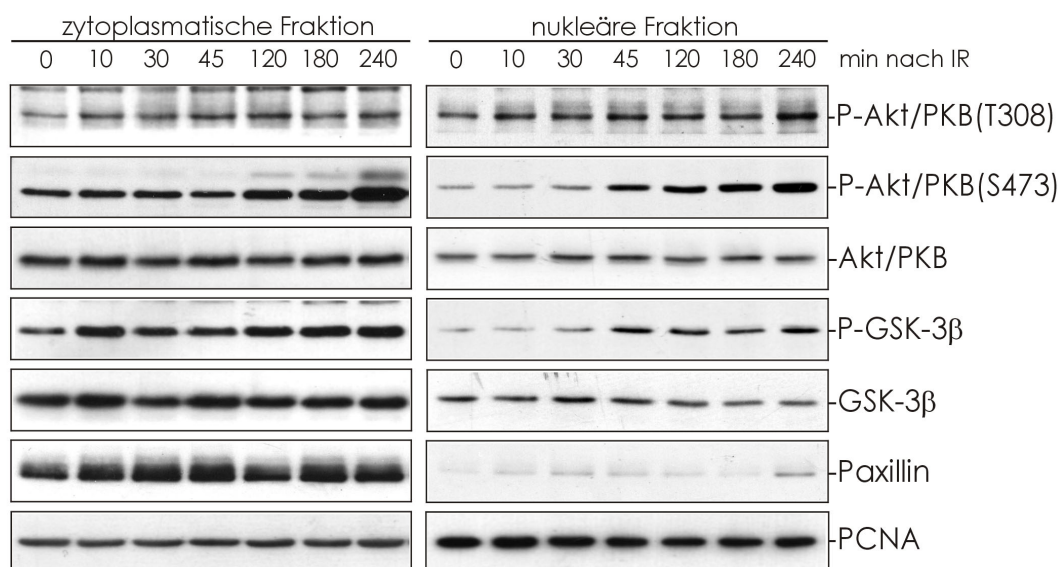


Abb. 3.5: Akt/PKB und GSK-3β werden nach ionisierender Strahlung im Zellkern phosphoryliert.

GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Bei der Lyse wurden zytoplasmatische und nukleäre Fraktion voneinander getrennt. Je 50 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen an Threonin 308 oder Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.4).

Die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nahm im Zytoplasma bereits 10 Minuten nach Bestrahlung zu und blieb anschließend erhöht. In Übereinstimmung mit

veröffentlichten Daten (Bijur und Jope, 2003 a) war die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins im Zellkern sehr gering. 30 Minuten nach Bestrahlung stieg die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 jedoch leicht an und nahm im weiteren Versuchsverlauf weiter zu. Wie die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 stieg auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins im Zellkern stärker an als im Zytoplasma (Abb. 3.5).

Zum Nachweis einer sauberen Trennung von zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion wurden die Membranen mit Antikörpern gegen das Paxillin Protein inkubiert. Das Gerüstprotein Paxillin ist vor allem in fokalen Kontaktpunkten der Zellmembran lokalisiert, obwohl geringe Mengen auch im Zellkern vorkommen können (Übersicht in: Wang und Gilmore, 2003). Wie erwartet war das Paxillin Protein fast ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion und nur in sehr geringen Mengen in der nukleären Fraktion nachzuweisen (Abb. 3.5). Das PCNA Protein, das hauptsächlich zur Überprüfung der Beladung des Gels mit der gleichen Proteinmenge benutzt wurde, sollte als Kofaktor der Polymerase δ vorwiegend im Zellkern lokalisiert sein (Waseem und Lane, 1990). Diese primäre Lokalisation des PCNA Proteins im Zellkern konnte auch in diesem Experiment beobachtet werden (Abb. 3.5).

3.4.3 Akt/PKB ist nach ionisierender Strahlung im Zellkern aktiviert

Wie bereits in Kapitel 3.4.2 gezeigt, nimmt die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 im Zellkern nach ionisierender Strahlung deutlich, die Phosphorylierung an Threonin 308 hingegen kaum zu. Eine effiziente Aktivierung von Akt/PKB setzt jedoch eine Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen, Threonin 308 und Serin 473, voraus. Es stellte sich deshalb die Frage, ob ein Anstieg der Phosphorylierung an Serin 473 nach ionisierender Strahlung für eine wirksame Aktivierung von Akt/PKB im Zellkern ausreichen könnte oder ob Akt/PKB infolge der fehlenden Zunahme der Phosphorylierung an Threonin 308 nach ionisierender Strahlung im Zellkern inaktiv bleibt. Um diese Frage zu beantworten wurde die Aktivität von Akt/PKB in den zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen von prä-B Lymphozyten vor und nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung analysiert. Als Substrat für diese Analyse wurde ein bakteriell exprimiertes GST-GSK-3 β Fusionsprotein verwendet, das die ersten 100 Aminosäuren des GSK-3 β Proteins enthält.

GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. 240 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und bei der Lyse in zytoplasmatische und nukleäre Fraktion aufgeteilt. Aus je 600 μ g der Lysate wurde das Akt/PKB Protein mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörper präzipitiert. Zusätzlich wurden 600 μ g eines Gesamtzelllysats

mit Protein A Sepharose, jedoch ohne Antikörper, inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurde das präzipitierte Akt/PKB Protein mit dem GST-GSK-3 β Fusionsprotein und [γ -³²P]-ATP für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Zur Überprüfung der in der Kinase-Analyse eingesetzten Menge an Akt/PKB und GST-GSK-3 β Protein wurde die Membran anschließend mit Antikörpern gegen das Akt/PKB Protein und den GST-Anteil des Fusionsproteins hybridisiert.

Wie in Abb. 3.6 A zu sehen ist, war die aus der zytoplasmatischen Fraktion präzipitierte Kinase Akt/PKB in unbestrahlten Zellen bereits leicht aktiv. Nach Bestrahlung nahm in dieser Fraktion die Phosphorylierung des GST-GSK-3 β Substrats durch Akt/PKB allerdings nur wenig zu. Im Gegensatz dazu war im Nukleus eine basale Aktivität von Akt/PKB kaum nachzuweisen. Nach Bestrahlung wurde das GSK-3 β Protein hingegen deutlich durch die aus der Kernfraktion präzipitierte Kinase Akt/PKB phosphoryliert. Dabei war die aus der nukleären Fraktion präzipitierte Menge an Akt/PKB Protein deutlich geringer als die aus der zytoplasmatischen Fraktion präzipitierte Menge. Die Hybridisierung mit einem gegen GST gerichteten Antikörper zeigte, dass in allen Ansätzen eine vergleichbare Menge an GSK-3 β Substrat eingesetzt worden war.

Zur Überprüfung der Phosphorylierung der Akt/PKB und GSK-3 β Proteine nach ionisierender Strahlung sowie zur Kontrolle der Fraktionierung wurden je 50 μ g der zytoplasmatischen und nukleären Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen die katalytische Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs), gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert.

In Übereinstimmung mit der Fähigkeit von Akt/PKB das GSK-3 β Protein zu phosphorylieren, nahm auch die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 im Zellkern stärker zu als im Zytoplasma (Abb. 3.6 B). Entsprechend der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins in der Kinaseaktivitäts-Analyse von Akt/PKB, stieg nach Bestrahlung auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins im Zytoplasma kaum an. Im Zellkern war das GSK-3 β Protein hingegen deutlich stärker an Serin 9 phosphoryliert (Abb. 3.6 B).

Um die Einheitlichkeit der Fraktionierung zu überprüfen, wurde die Membran mit Antikörpern gegen das DNA-PKcs Protein und gegen das Paxillin Protein hybridisiert. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten (Nilsson et al., 1999) war das DNA-PKcs Protein hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Eine geringere Menge an DNA-PKcs Protein war jedoch auch in der zytoplasmatischen Fraktion vorhanden. In beiden

Fraktionen nahm die Menge des DNA-PKcs Proteins nach ionisierender Strahlung zu. Das Paxillin Protein war fast ausschließlich im Zytoplasma vorhanden (Abb. 3.6 B).

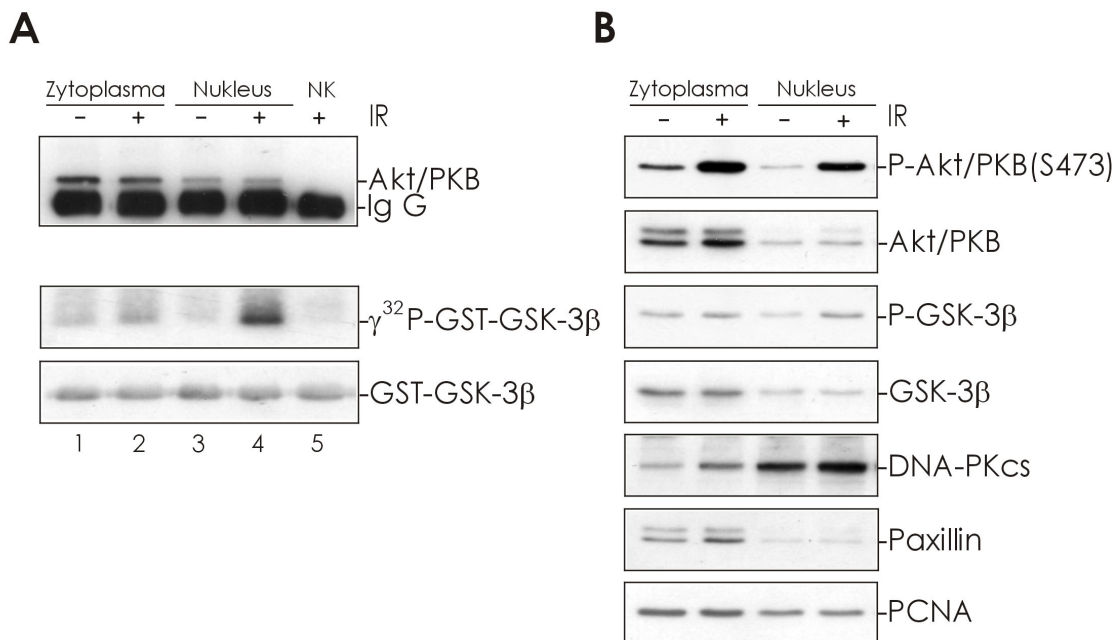


Abb. 3.6: Akt/PKB wird im Zellkern durch ionisierende Strahlung aktiviert.

(A): GM02184 prä-B Lymphozyten wurden mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt, oder blieben als Kontrolle unbehandelt. 240 Minuten nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet. Von einem Teil der Zellen wurde ein Gesamtzelllysate hergestellt (Spur 5), der Rest wurde bei der Lyse in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion aufgeteilt (Spur 1-4). Das Akt/PKB Protein wurde mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten und gegen das Akt/PKB Protein gerichteten Antikörper aus je 600 μg der Lysate präzipitiert (Spur 1-4). Das Gesamtzelllysate wurde als negative Kontrolle mit Protein A Sepharose inkubiert, an die kein Antikörper gekoppelt worden war (Spur 5, NK). 1,5 μg rekombinantes GST-GSK-3 β Protein wurde in Gegenwart der präzipitierten Kinase Akt/PKB mit 250 $\mu\text{Ci/ml}$ [γ - ^{32}P]-ATP inkubiert und die Proben anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und gegen einem Röntgenfilm exponiert. Nach der Exposition wurde die Membran mit Antikörpern gegen das Akt/PKB Protein und den GST-Anteil des Fusionsproteins hybridisiert. (B): Je 50 μg der zytoplasmatischen und nukleären Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das DNA-PKcs Protein, gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.4).

3.4.4 Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt in Abhängigkeit von Akt1/PKB α

Die Analyse der Aktivität von Akt/PKB zeigte, dass Akt/PKB nach ionisierender Strahlung im Zellkern aktiv ist und das GSK-3 β Protein direkt phosphorylieren kann. Bei Akt/PKB handelt es sich jedoch um kein einzelnes Protein, sondern um eine Proteinfamilie. Bei Nagetieren und Menschen sind drei Isoformen von Akt/PKB

vorhanden. Es stellte sich deshalb die Frage, welche der drei Isoformen das GSK-3 β Protein nach ionisierender Strahlung phosphoryliert. Da das Akt3/PKB γ Protein bei Mäusen lediglich in Gehirn, Hoden und Lunge in größerer Menge nachgewiesen wurde, in zahlreichen anderen Geweben aber vollständig fehlt (Yang et al., 2003), war eine Beteiligung von Akt3/PKB γ eher unwahrscheinlich.

Die am häufigsten exprimierte Isoform von Akt/PKB ist Akt1/PKB α . Mäuse mit genetischer Deletion von Akt1/PKB α haben einen Wachstumsdefekt und sterben nach ionisierender Strahlung deutlich schneller als WT-Mäuse (Chen et al., 2001). Wenn Akt/PKB an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins beteiligt ist, war es daher am wahrscheinlichsten, dass die Akt1/PKB α Isoform diese Aufgabe übernimmt.

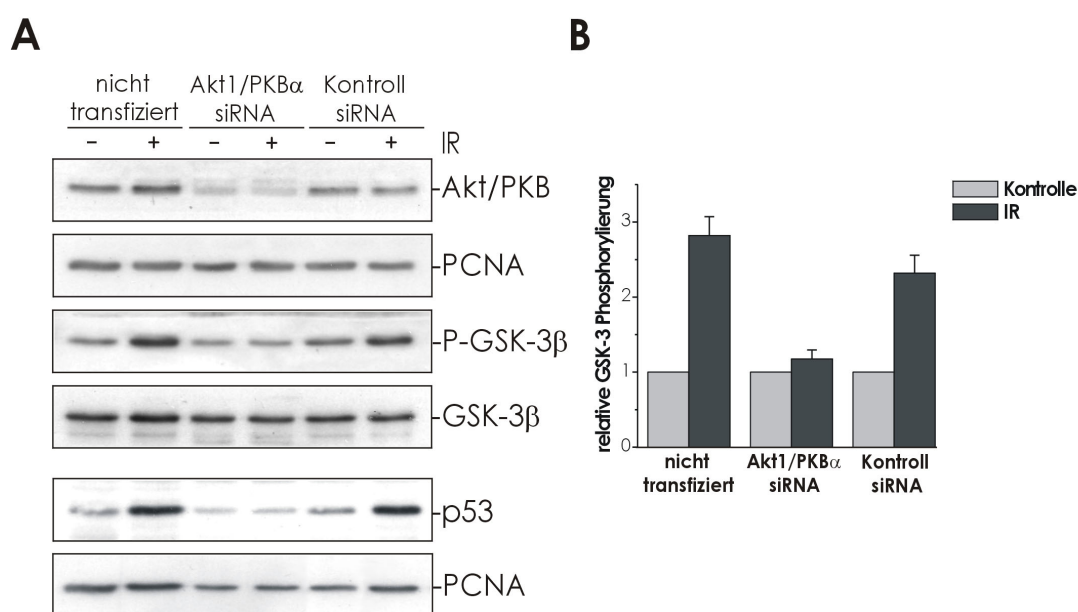


Abb. 3.7: Akt1/PKB α wird für die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung benötigt.

(A): U2OS Osteosarkom Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs gegen Akt1/PKB α oder mit einer unspezifischen Kontroll siRNA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen geerntet. Je 50 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das p53 Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.1). (B): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale von vier unabhängigen Experimenten erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

Um eine Beteiligung von Akt1/PKB α an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurde Akt1/PKB α durch siRNA ausgeschaltet. Dazu wurden U2OS Osteosarkom Zellen mit einer Mischung aus zwei verschiedenen gegen Akt1/PKB α gerichteten siRNAs bzw. zur Kontrolle mit einer siRNA, die gegen keine endogene Sequenz gerichtet ist, transfiziert. Als weitere

Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. 4 Stunden nach Bestrahlung wurden alle Zellen geerntet. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen übertragen. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das p53 Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert.

Wie Abb. 3.7 A zeigt, verminderte die Transfektion gegen Akt1/PKB α gerichteter siRNA die Gesamtmenge des Akt/PKB Proteins im Vergleich zu nicht transfizierten oder den mit einer Kontroll siRNA transfizierten Zellen stark. Daneben verhinderte die Transfektion der spezifisch gegen die Akt1/PKB α Isoform gerichteten siRNA nach ionisierender Strahlung die Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 beinahe vollständig (Abb. 3.7 A und B).

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch GSK-3 β absolut notwendig für die Degradation des p53 Proteins (siehe Kapitel 1.1.4). Die Inhibition von GSK-3 β durch ionisierende Strahlung führt zur Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins und trägt damit zur Stabilisierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung bei (Kulikov et al., 2005). Sollte die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung durch Akt1/PKB α physiologisch relevant sein, so sollte das Ausschalten von Akt1/PKB α nicht nur die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins verhindern sondern darüber hinaus auch die Mengenzunahme des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung.

Entsprechend der Hypothese, dass Akt1/PKB α über die Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 β die Mengenzunahme des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung reguliert, verhinderte die Transfektion einer spezifisch gegen Akt1/PKB α gerichteten siRNA die Akkumulation des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung. Im Gegensatz dazu nahmen sowohl die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins als auch die Menge des p53 Proteins in untransfizierten Zellen sowie in Zellen, die mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, deutlich zu (Abb. 3.7 A und B).

3.4.5 Einfluss von Akt2/PKB β auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Um festzustellen, ob neben Akt1/PKB α möglicherweise auch Akt2/PKB β an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt ist, wurden U2OS Osteosarkom Zellen mit zwei verschiedenen gegen Akt2/PKB β gerichteten siRNAs transfiziert. Zur Kontrolle wurden wiederum Zellen mit einer siRNA transfiziert, die gegen keines der bekannten Transkripte gerichtet ist. Als weitere

Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach weiteren 4 Stunden wurden alle Zellen geerntet. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das Akt2/PKB β Protein, gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert.

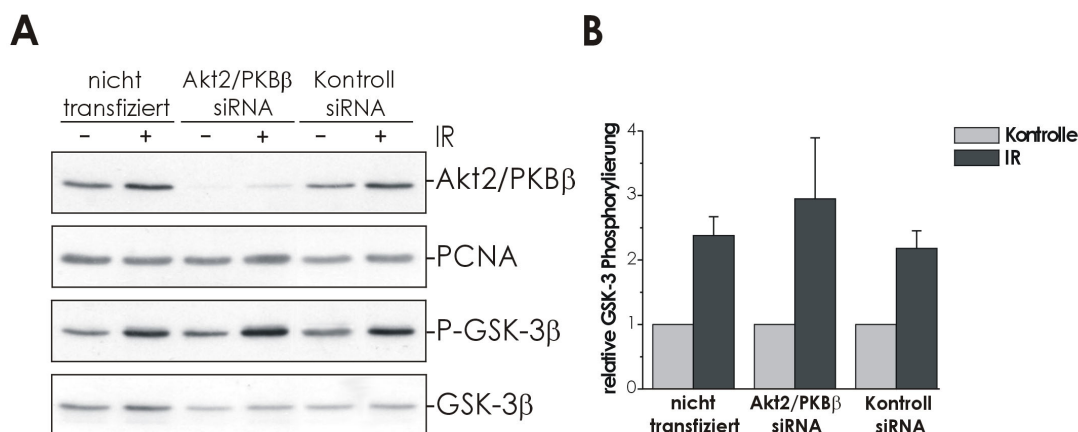


Abb. 3.8: Die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung erfolgt unabhängig von Akt2/PKB β .

(A): U2OS Osteosarkom Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs gegen Akt2/PKB β oder mit einer unspezifischen Kontroll siRNA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach weiteren 4 Stunden wurden alle Zellen geerntet. Je 50 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das Akt2/PKB β Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.1). (B): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale von vier unabhängigen Experimenten erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

Die Transfektion der gegen Akt2/PKB β gerichteten siRNAs verhinderte die Expression des Akt2/PKB β Proteins nahezu vollständig. Die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung fiel allerdings in den mit der spezifisch gegen Akt2/PKB β gerichteten siRNA transfizierten Zellen genauso deutlich aus wie in Zellen, welche entweder mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren oder untransfiziert blieben (Abb. 3.8 A). Die deutliche Abnahme der Akt2/PKB β Proteinmenge nach Transfektion der gegen Akt2/PKB β gerichteten siRNA konnte damit die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung nicht verhindern. Interessanterweise war das GSK-3 β Protein in Zellen, die mit gegen Akt2/PKB β gerichteten siRNAs transfiziert worden waren, im Mittel sogar stärker phosphoryliert (Abb. 3.8 B).

3.5 Die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 nach ionisierender Strahlung benötigt die katalytische Untereinheit von DNA-PK

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 gezeigt, wird sowohl die basale Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 als auch deren Anstieg nach ionisierender Strahlung durch den PI3 Kinase Inhibitor LY294002 nahezu vollständig verhindert. Dies spricht für die Beteiligung einer PI3 Kinase an der basalen und induzierten Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins. Tatsächlich wurden mehrere Mitglieder der PI3 Kinase Familie mit der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 in Verbindung gebracht, darunter mTOR, ATM und DNA-PK (Übersicht in: Dong und Liu, 2005). Für PI3K p110 und DNA-PKcs liegen die IC₅₀ Werte von LY294002 übereinstimmend bei 1,4 µM (Edwards et al., 2002; Izzard et al., 1999), für mTOR und ATM bei 5 µM bzw. 6 µM (Brunn et al., 1996; Goodarzi und Lees-Miller, 2004). Da im Experiment (siehe Kapitel 3.4.1) 30 µM LY294002 verwendet wurden, wurden vermutlich alle PI3 Kinasen zumindest teilweise inhibiert. Von ATM und DNA-PK ist außerdem bekannt, dass sie durch ionisierende Strahlung aktiviert werden (Übersicht in: Niida und Nakanishi, 2006). DNA-PK kann zudem das Akt/PKB Protein an Serin 473 phosphorylieren (Feng et al., 2004). Es war deshalb denkbar, dass DNA-PK das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung an Serin 473 phosphoryliert.

Um erste Hinweise zu erhalten, ob DNA-PK an der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins und damit auch des GSK-3β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt sein könnte, wurden die Phosphorylierungen von Akt/PKB und GSK-3β in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) von gesunden Mäusen mit denen in Fibroblasten von „Severe Combined Immuno Deficiency“ (SCID) Mäusen verglichen. Zellen von SCID Mäusen tragen eine Mutation im Gen für die katalytische Untereinheit von DNA-PK (*prkdc*), welche zur Expression eines C-terminal verkürzten Proteins führt. Diese Mutante von DNA-PKcs zeigt nur noch eine sehr geringe Kinaseaktivität und ist außerdem wesentlich instabiler als das WT-Protein (Beamish et al., 2000).

MEF und SCID Zellen wurden mit 10 Gray γ-Strahlung bestrahlt, nach 0, 30, 120 und 240 Minuten geerntet und bei der Lyse in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion aufgeteilt. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen übertragen. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3β Protein, gegen das gesamte GSK-3β Protein, gegen das PARP Protein, gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert.

Wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, nahm sowohl die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 als auch die Phosphorylierung des GSK-3β Proteins an Serin 9 in embryonalen Mausfibroblasten nach ionisierender Strahlung im Zytoplasma und

Zellkern zu. Wie zuvor für GM02184 prä-B Lymphozyten beschrieben (siehe Kapitel 3.4.2) nahmen die Phosphorylierungen auch in den Mausfibroblasten im Zellkern stärker zu als im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu war in Fibroblasten von SCID Mäusen im Zytoplasma lediglich 240 Minuten nach Bestrahlung eine leichte Zunahme der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 zu beobachten. Im Zellkern stieg die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht an. Entsprechend war in Fibroblasten von SCID Mäusen die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 weder im Zytoplasma noch im Zellkern nachzuweisen.

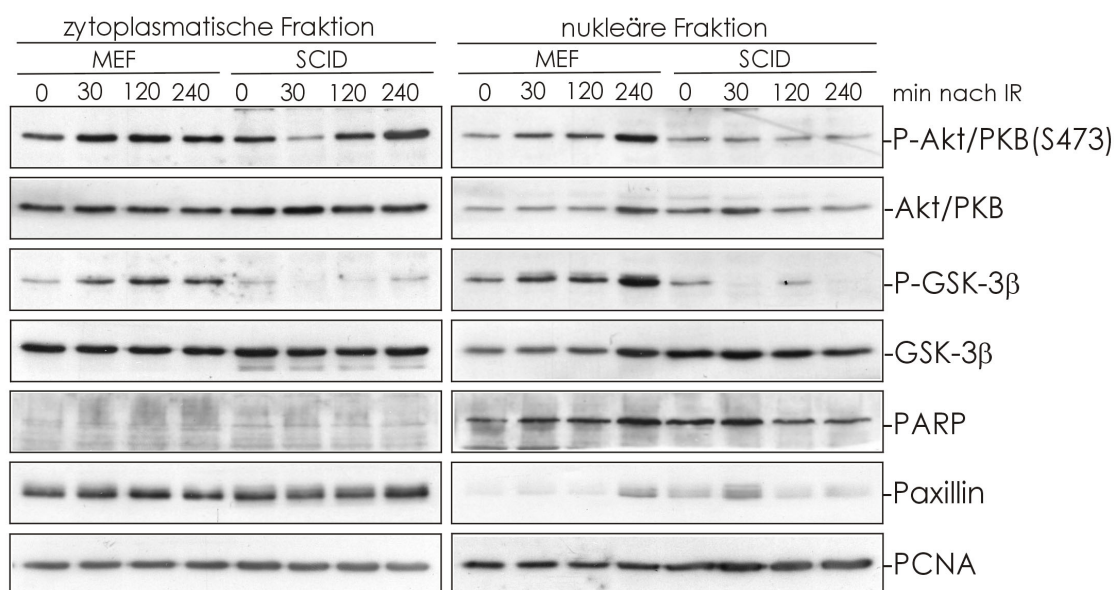


Abb. 3.9: Die Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 nach ionisierender Strahlung ist abhängig von DNA-PK.

Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) sowie Fibroblasten von „Severe Combined Immuno Deficiency“ (SCID) Mäusen wurden mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Bei der Lyse wurden zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen hergestellt. Je 50 μ g der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die an Serin 473 phosphorylierte Form des Akt/PKB Proteins, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das PARP Protein, gegen das Paxillin Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.4).

Die Hybridisierung mit Antikörpern gegen die Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP), ein Protein, das hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist (Schreiber et al., 1992), sowie gegen das Paxillin Protein wies auf eine gleichmäßige Separierung der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion hin (Abb. 3.9).

Der Vergleich von MEF und SCID Zellen ist allerdings problematisch, da beide Zelllinien einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben. Zudem handelt es

sich im Gegensatz zu den in den bisherigen Experimenten verwendeten menschlichen Zelllinien um Zellen einer anderen Spezies.

Analog zu den Ergebnissen der Analyse von Fibroblasten aus SCID Mäusen zeigte jedoch auch der Vergleich von zwei Zelllinien aus einem menschlichen Glioblastom (MO59K und MO59J), die sich durch eine Rastermutation im *prkdc* Gen der MO59J Zellen unterscheiden (Anderson et al., 2001; Galloway et al., 1999), dass eine intakte katalytische Untereinheit von DNA-PK für die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 und des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung zwingend notwendig ist (ohne Abbildung).

Um die Hypothese, dass DNA-PK für die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 nach ionisierender Strahlung verantwortlich ist, weiter zu untermauern wurde die katalytische Untereinheit von DNA-PK durch siRNA ausgeschaltet. Dazu wurden U2OS Osteosarkom Zellen mit einer Mischung aus zwei verschiedenen gegen die katalytische Untereinheit von DNA-PK gerichteten siRNAs transfiziert. Zur Überprüfung von unspezifischen Einflüssen der Transfektion oder der Oligonukleotide auf die Strahlen-Antwort wurden U2OS Zellen zusätzlich mit einer siRNA transfiziert, die kein bekanntes Transkript regulieren kann. 96 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. 4 Stunden nach der Bestrahlung wurden alle Zellen geerntet. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die katalytische Untereinheit von DNA-PK, gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt/PKB Protein, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen an Serin 9 phosphoryliertes GSK-3 β Protein, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das p53 Protein und gegen das PCNA Protein hybridisiert.

Nach der Transfektion der gegen DNA-PKcs gerichteten siRNA war die katalytische Untereinheit von DNA-PK kaum noch nachweisbar. Zugleich nahmen weder die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 noch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung zu. Dagegen stieg sowohl in untransfizierten Zellen als auch in Zellen, die mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 und des GSK-3 β Proteins an Serin 9 deutlich an (Abb. 3.10 A und B).

Wie nach dem Ausschalten von Akt1/PKB α (siehe Kapitel 3.4.4) nahm die Menge des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung auch nach dem Verlust von DNA-PKcs kaum zu, während die Gesamtmenge des p53 Proteins in nicht transfizierten Zellen und in Zellen, die mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, stark anstieg (Abb. 3.10 A).

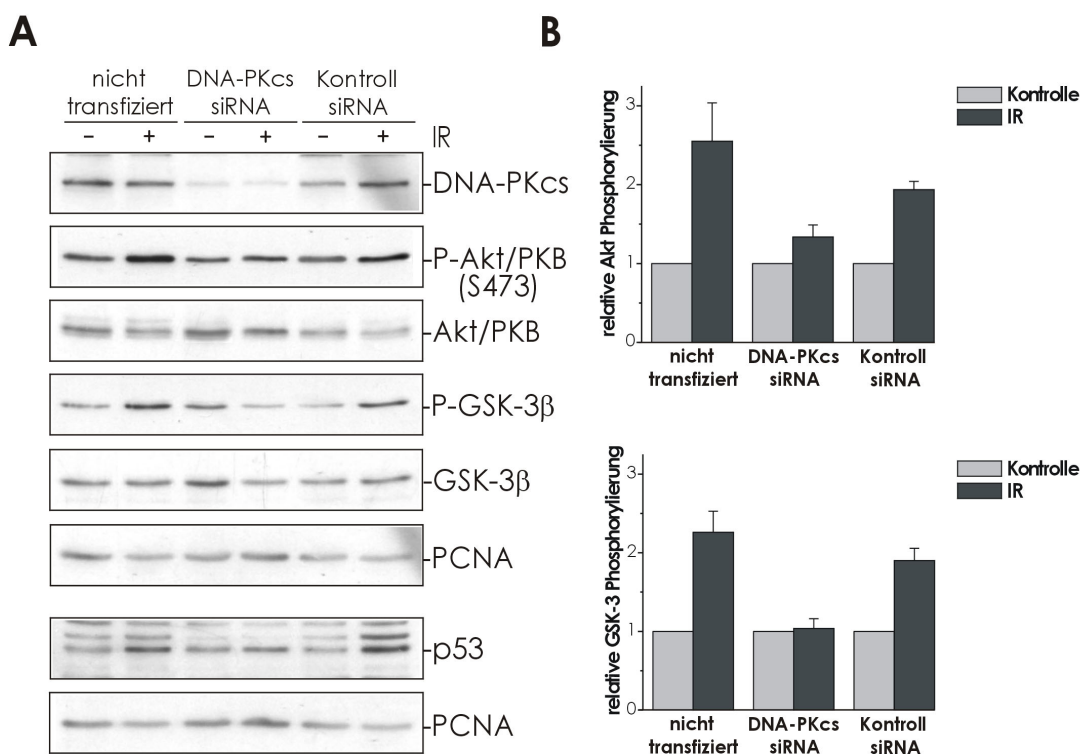


Abb. 3.10: DNA-PKcs ist an der Phosphorylierung von Akt/PKB an Serin 473 nach ionisierender Strahlung beteiligt.

(A): U2OS Osteosarkom Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs gegen die katalytische Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs) oder mit einer unspezifischen Kontroll siRNA transfiziert. 96 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 Gray γ -Strahlung (IR) bestrahlt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach weiteren 4 Stunden wurden alle Zellen geerntet. Je 50 μ g der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf zwei Immobilon P-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen das DNA-PKcs Protein, gegen die an Serin 473 phosphorylierte Form des Akt/PKB Proteins, gegen das gesamte Akt/PKB Protein, gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK-3 β Proteins, gegen das gesamte GSK-3 β Protein, gegen das p53 Protein, und gegen das PCNA Protein hybridisiert (siehe Abb. 3.4) (B): Die Quantifizierung und graphische Darstellung der Western Blot Signale von drei unabhängigen Experimenten erfolgte wie im Text zu Abb. 3.1 beschrieben.

Eine Beteiligung von ATM an der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 erscheint nach diesen Ergebnissen zwar unwahrscheinlich, kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden. Unglücklicherweise konnte ein „Knockdown“ von ATM durch eine entsprechende siRNA noch nicht verifiziert werden, da kommerziell kein gegen das ATM Protein gerichteter Antikörper erhältlich war, mit dem sich endogenes ATM Protein nachweisen lässt.

4 Diskussion

Bislang galt das Dogma, dass die Stabilisierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung in Abhängigkeit von ATM erfolgt. ATM phosphoryliert nach ionisierender Strahlung das p53 Protein an Serin 15. Außerdem induziert ATM durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Chk2 die Phosphorylierung des p53 Proteins an Serin 20. Diese und weitere Phosphorylierungen werden *in vitro* mit der Stabilisierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung in Verbindung gebracht, indem sie die Interaktion von Mdm2 und p53 verhindern (Übersicht in: Bode und Dong, 2004). Allerdings akkumuliert das p53 Protein nach ionisierender Strahlung auch in lymphoiden Zelllinien von Patienten mit Ataxia Telangiectasia (AT), bei denen das *atm* Gen mutiert ist (Übersicht in: McKinnon, 2004) sowie in Gegenwart eines spezifischen Inhibitors der ATM Kinase (Böhme et al., zur Veröffentlichung eingereicht). In diesen Zellen sind Phosphorylierungen des p53 Proteins an Serin 15 und Serin 20 kaum nachweisbar. Folglich muss es einen alternativen Signalweg geben, der nach ionisierender Strahlung zur Mengenzunahme des p53 Proteins führt und keine Phosphorylierung des p53 Proteins an Serin 15 oder Serin 20 erfordert. Außerdem akkumuliert in Gegenwart ionisierender Strahlung ubiquitiniertes p53 Protein (Maki und Howley, 1997). Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, dass die Assoziation des p53 Proteins mit dem Mdm2 Protein auch in bestrahlten Zellen gegeben ist. Ein alternatives Modell besagt, dass die Mengenzunahme des p53 Proteins durch die Strahlen-bedingte Hypophosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins hervorgerufen wird (Blattner et al., 2002). GSK-3 β phosphoryliert die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins und ermöglicht dadurch die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins in Proteasomen. Nach ionisierender Strahlung wird GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 inaktiviert. Die daraus resultierende Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins verhindert die Mdm2-vermittelte Degradation des p53 Proteins (Kulikov et al., 2005). Um den Signalweg aufzuklären, der zum Anstieg der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins und damit zur Stabilisierung des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung führt, untersuchte ich eine Beteiligung der bekannten GSK-3 Kinasen (Übersicht in: Doble und Woodgett, 2003). Dabei fand ich, dass Akt/PKB, eine der wichtigsten GSK-3 Kinasen, die GSK-3 in mehreren Signalwegen inhibiert (Pap und Cooper, 1998; Übersicht in: Patel et al., 2004), auch in diesem Signalweg eine entscheidende Rolle spielt.

4.1 Akt/PKB phosphoryliert und inaktiviert GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung induziert die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 und Threonin 308 (Contessa et al., 2002; Edwards et al., 2002). Interessanterweise verhinderte die Behandlung mit LY294002, einem Inhibitor von Mitgliedern der PI3 Kinase Familie (Übersicht in: Stein, 2001), die basale Phosphorylierung sowie jegliche Zunahme der Phosphorylierung von Serin 473 des Akt/PKB Proteins nach ionisierender Strahlung. Im Gegensatz dazu nahm die Phosphorylierung von Threonin 308 nach der Vorbehandlung mit LY294002 nach ionisierender Strahlung zwar nicht weiter zu, blieb aber nach wie vor nachweisbar. Neben der Phosphorylierung von Akt/PKB wurde auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung durch LY294002 verhindert. Diese Korrelation impliziert, dass die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 zur Strahlen-abhängigen Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins beitragen könnte.

Bei Nagetieren und Menschen werden drei Isoformen von Akt/PKB exprimiert. Allerdings sind nur das Akt1/PKB α und das Akt2/PKB β Protein in allen Zellen nachweisbar. Akt1/PKB α ist die in den meisten Geweben am häufigsten exprimierte Isoform von Akt/PKB (Yang et al., 2003). Mäuse mit genetischer Deletion von Akt1/PKB α haben einen Wachstumsdefekt und sterben nach ionisierender Strahlung deutlich schneller als WT-Mäuse (Chen et al., 2001). Es war daher denkbar, dass Akt1/PKB α an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurde Akt1/PKB α durch die Transfektion spezifischer siRNA ausgeschaltet. Die Gesamtmenge des Akt/PKB Proteins sank nach der Transfektion Akt1/PKB α spezifischer siRNA stark. Zugleich wurde die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beinahe vollständig verhindert. Da das Ausschalten von Akt1/PKB α auch die Akkumulation des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung inhibierte, zeigt dies, dass Akt1/PKB α tatsächlich an dem Signalweg beteiligt ist, der zur Akkumulation des p53 Proteins führt.

Die Transfektion gegen Akt2/PKB β gerichteter siRNA verhinderte zwar die Expression des Akt2/PKB β Proteins nahezu vollständig, hatte aber keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung. Daraus ist zu schließen, dass Akt2/PKB β nicht an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt ist. Eine Beteiligung von Akt3/PKB γ an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung wurde nicht untersucht, erscheint auf Grund der in den meisten Geweben geringen Expression aber unwahrscheinlich. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Akt3/PKB γ möglicherweise in Geweben, wo es stark exprimiert wird, in diesen Signalweg involviert ist.

Das Akt/PKB Protein ist vorwiegend im Zytoplasma und an der Zellmembran lokalisiert, wo es durch PDK1 an Threonin 308 phosphoryliert und aktiviert wird (Übersicht in: Hanada et al., 2004). Für seine volle Aktivität benötigt Akt/PKB jedoch eine weitere Phosphorylierung an Serin 473 (Alessi et al., 1996). Diese wird offensichtlich Zelltyp- und Signalweg-abhängig durch verschiedene Kinasen katalysiert (Übersicht in: Dong und Liu, 2005). Nach seiner Aktivierung an der Zellmembran kann das Akt/PKB Protein in den Zellkern translozieren (Andjelković et al., 1997; Meier et al., 1997). Da nach der Inhibition von GSK-3 β ubiquitiniertes p53 Protein in Gegenwart von Mdm2 im Zellkern akkumuliert (Kulikov et al., 2005) und ein Teil des GSK-3 β Proteins ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist (Bijur und Jope, 2003 a), war zu vermuten, dass auch die inhibitorische Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung im Zellkern erfolgt. Zellfraktionierungen zeigten, dass die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 nach ionisierender Strahlung im Zellkern deutlich früher und stärker zunahm als im Zytoplasma. In Übereinstimmung mit der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 stieg auch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins im Zellkern stärker an als im Zytoplasma. Darüber hinaus war die Phosphorylierung von Serin 473 auch mehrere Stunden nach Bestrahlung noch deutlich erhöht (Edwards et al., 2002). Die Phosphorylierung von Threonin 308 nahm hingegen vor allem im Zytoplasma zu, stieg im Zellkern aber kaum an. Die Unterschiede der Kinetiken der Phosphorylierungen des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 und Serin 473 lassen vermuten, dass beide Phosphorylierungen nach ionisierender Strahlung unabhängig voneinander durch verschiedene Signalwege vermittelt werden. Diese Annahme stimmt mit Berichten überein, dass ionisierende Strahlung die Aktivierung von RTKs der ErbB Familie induziert und dadurch über den PI3 Kinase Signalweg einen transienten Anstieg der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 verursacht (Contessa et al., 2002).

Da die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Threonin 308 im Zellkern nach ionisierender Strahlung kaum zunahm, stellte sich die Frage, ob Akt/PKB allein durch den Anstieg der Phosphorylierung an Serin 473 im Zellkern aktiviert werden kann. Daher wurde das Akt/PKB Protein aus den zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen bestrahlter und unbestrahlter Zellen präzipitiert und eine Analyse der Kinase-Aktivität durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass übereinstimmend mit der Phosphorylierung von Serin 473 auch die Aktivierung von Akt/PKB nach ionisierender Strahlung vor allem im Zellkern erfolgte. Sowohl die endogene Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 als auch die Phosphorylierung eines rekombinanten GSK-3 β Substrates waren in der nukleären Fraktion deutlich ausgeprägter. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Phosphorylierung von Serin 473 entscheidend ist für die Aktivierung von Akt/PKB im Zellkern.

In den Fraktionierungsexperimenten wurde das Paxillin Protein als zytoplasmatischer und entweder das PARP oder das DNA-PKcs Protein als nukleärer Marker verwendet. Obwohl die nukleären und zytoplasmatischen Proteine stets in der entsprechenden Fraktion angereichert waren, waren die Marker immer auch in der anderen Fraktion in gewissem Umfang enthalten. Möglicherweise ist die Präsenz geringer Mengen an DNA-PK und PARP Proteinen im Zytoplasma darauf zurückzuführen, dass alle Proteine im Zytoplasma synthetisiert werden, und ein Protein deshalb niemals ausschließlich im Zellkern lokalisiert sein kann. Umgekehrt ist auch das Paxillin Protein, welches als Marker für die zytoplasmatische Fraktion verwendet wurde, teilweise im Zellkern nachzuweisen (Übersicht in: Wang und Gilmore, 2003).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Akt1/PKB α nach ionisierender Strahlung durch Phosphorylierung an Serin 473 aktiviert wird und daraufhin das GSK-3 β Protein im Zellkern phosphoryliert. GSK-3 β wird dadurch inaktiviert und kann das Mdm2 Protein nicht länger phosphorylieren. Auch wenn GSK-3 β nicht die einzige Kinase ist, die das Mdm2 Protein in der zentralen Domäne phosphoryliert und dadurch die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins ermöglicht, so reicht das Ausbleiben der Phosphorylierung durch GSK-3 β dennoch aus, um die Degradation des p53 Proteins zu verhindern.

Um in den Zellkern translozieren zu können, muss das Mdm2 Protein im Zytoplasma durch Akt/PKB an Serin 166 und Serin 186 phosphoryliert werden (Mayo und Donner, 2001). Auf Grund der Tatsache, dass Akt/PKB nach ionisierender Strahlung kaum im Zytoplasma aktiviert wird, kann seine Funktion bei der Translokation des Mdm2 Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern allerdings vernachlässigt werden.

Die Akt/PKB-abhängige Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins wird im allgemeinen als überlebensfördernd angesehen. So wird beispielsweise im Neurotrophin-Signalweg das Überleben von Neuronen durch die Inhibition von GSK-3 gefördert (Pap und Cooper, 1998). Wenn Akt/PKB nach ionisierender Strahlung durch Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins die Akkumulation des p53 Proteins bewirkt, führt dies zum Zellzyklus-Arrest. Dieser Arrest wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass das p53 Protein die Transkription des *p21* Gens induziert (Kulikov et al., 2005). Interessanterweise nimmt die Menge der mRNA von pro-apoptotischen Genen wie *bax* und *puma* durch die Inhibition von GSK-3 β nicht wesentlich zu (Roman Kulikov, persönliche Mitteilung). Es ist daher denkbar, dass Akt/PKB in diesem Signalweg der Zelle Zeit zur Reparatur ihrer DNA-Schäden verschafft, aber nicht zwangsläufig die Apoptose induziert. Dies steht in Übereinstimmung damit, dass Akt/PKB das pro-apoptotische Protein Bad an Serin 136 phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Bad kann daraufhin nicht länger mit dem anti-apoptotischen Bcl-2 Protein interagieren und dessen Funktion neutralisieren (Datta et al., 1997).

4.2 Einfluss anderer Signalwege auf die Phosphorylierung von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Akt/PKB ist nicht die einzige Kinase, die GSK-3 phosphoryliert und inaktiviert. Um den Einfluss weiterer GSK-3 Kinasen auf die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, nutzte ich verschiedene Kinase-Inhibitoren. Die Inhibition von MEK1/2 durch den spezifischen Inhibitor U0126 verhinderte zwar offensichtlich die Aktivierung von ERK1/2, konnte aber nicht die Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung inhibieren. Daher kann die Aktivierung von p70S6K oder p90RSK durch den MAP Kinase Signalweg als Ursache der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung ausgeschlossen werden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass p70S6K und p90RSK nach ionisierender Strahlung über einen anderen Signalweg aktiviert werden. Da die ERK1/2-abhängigen Phosphorylierungen des p70S6K Proteins an Threonin 421 und Serin 424 jedoch für die Aktivierung von p70S6K essentiell sind (Iijima et al., 2002), genau wie die ERK1/2-vermittelten Phosphorylierungen des p90RSK Proteins an Threonin 573 und Serin 363 (Richards et al., 1999; Dalby et al., 1998), ist eine Aktivierung beider Kinasen ohne die Phosphorylierung durch ERK1/2 unwahrscheinlich.

Durch Verwendung von TPA, welches konventionelle und neue Isoformen von PKC analog zu DAG aktiviert, langfristig aber zu deren vollständigen Degradation führt (Lu et al., 1998; Junoy et al., 2002), wurde eine Beteiligung von PKC an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung untersucht. Auch wenn konventionelle und neue Isoformen von PKC offensichtlich wesentlich zur Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins in unbestrahlten Zellen beitragen, wie die deutliche Senkung der basalen Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach 24stündiger Behandlung mit TPA zeigte, konnte der Anstieg der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung durch die Vorbehandlung mit TPA nicht verhindert werden. Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass GSK-3 β nach ionisierender Strahlung unabhängig von konventionellen oder neuen Isoformen von PKC an Serin 9 phosphoryliert wird. Atypische Isoformen von PKC werden durch die TPA Zugabe nicht beeinträchtigt, da sie nicht durch DAG aktiviert werden (Übersicht in: Mellor und Parker, 1998). Es wurde aber bereits gezeigt, dass PKC ζ das GSK-3 Protein nicht *in vivo* phosphorylieren kann (Fang et al., 2002). Eine mögliche Beteiligung der anderen atypischen Isoform PKC ι/λ an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden.

PKA phosphoryliert das GSK-3 β Protein *in vivo* (Fang et al., 2000). Auch wenn bislang keine Aktivierung von PKA durch ionisierende Strahlung bekannt ist, überprüfte ich

dennoch eine mögliche Beteiligung von PKA an der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung. Eine Vorbehandlung mit dem spezifisch gegen PKA gerichteten Inhibitor KT5720 senkte jedoch nur die basale Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins, während die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung nicht verhindert wurde. PKA kann daher ebenfalls als GSK-3 β Kinase nach ionisierender Strahlung ausgeschlossen werden.

Auch ILK wird mit der Phosphorylierung des GSK-3 Proteins in Verbindung gebracht. Allerdings ist nicht erwiesen, ob ILK das GSK-3 Protein unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert (Übersicht in: Zervas und Brown, 2002). Deshalb wurde auf eine Untersuchung der Beteiligung von ILK an der Strahlen-vermittelten Phosphorylierung des GSK-3 Proteins verzichtet. Ein Einfluss von ILK auf die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden.

Die Zunahme einer Phosphorylierung kann immer auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen kann eine Kinase aktiviert werden, zum anderen aber auch eine Phosphatase inaktiviert werden. Das GSK-3 β Protein kann an Serin 9 durch PP2A, PP2B und PP1 dephosphoryliert werden (Lee et al., 2005; Tanji et al., 2002). Interessanterweise ist auch das Akt/PKB Protein ein Substrat von PP2A (Andjelković et al., 1996). Es erscheint daher möglich, dass auch auf diesem Weg der Akt/PKB-GSK-3 β -Signalweg nach ionisierender Strahlung aktiviert werden kann. Gegen eine Beteiligung einer Phosphatase an der Zunahme der Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins spricht allerdings, dass das Ausschalten von Akt1/PKB α durch siRNA die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins nach ionisierender Strahlung fast vollständig verhindert.

4.3 DNA-PK phosphoryliert und aktiviert Akt/PKB nach ionisierender Strahlung

Akt/PKB wird nach ionisierender Strahlung durch Phosphorylierung an Serin 473 aktiviert. Es stellte sich daher die Frage, welche Kinase das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung an dieser Stelle phosphoryliert. Da sowohl die basale Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 als auch deren Anstieg nach ionisierender Strahlung durch den PI3 Kinase Inhibitor LY294002 nahezu vollständig verhindert wurde, spricht dies für die Beteiligung einer PI3 Kinase an der basalen und induzierten Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins. In der Tat wurden mehrere Mitglieder der PI3 Kinase Familie mit der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 in Verbindung gebracht, darunter mTOR, ATM und DNA-PK (Übersicht in: Dong und Liu, 2005). ATM und DNA-PK werden außerdem durch ionisierende Strahlung aktiviert (Übersicht in: Niida und Nakanishi, 2006). Es war deshalb zu

vermuten, dass eine dieser Kinasen das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung an Serin 473 phosphoryliert.

Um den Einfluss von DNA-PK auf die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurde der Anstieg der Phosphorylierungen der Akt/PKB und GSK-3 β Proteine in embryonalen Mausfibroblasten und SCID Zellen verglichen. SCID Zellen tragen eine Mutation im Gen für die katalytische Untereinheit von DNA-PK (*prkdc*), wodurch sie ein C-terminal verkürztes Protein exprimieren, das nur noch eine sehr geringe Kinaseaktivität aufweist (Beamish et al., 2000). Tatsächlich nahm nach ionisierender Strahlung in SCID Zellen weder die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 noch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 zu. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung von DNA-PK an der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins nach ionisierender Strahlung. Der Vergleich von MEFs und SCID Zellen ist allerdings problematisch, da beide Zelllinien einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben. Außerdem handelt es sich im Gegensatz zu den in den anderen Experimenten verwendeten menschlichen Zelllinien um Zellen von Mäusen.

Es wurden daher zusätzlich die menschlichen Gliomzelllinien MO59K und MO59J verglichen (ohne Abbildung). MO59J Zellen weisen eine Rastermutation im *prkdc* Gen auf, die zur Expression eines verkürzten DNA-PKs Proteins führt (Anderson et al., 2001). Zudem ist die entstehende *prkdc* mRNA deutlich instabiler als die WT mRNA (Galloway et al., 1999). Wie in SCID Zellen konnte auch in MO59J Zellen kein Anstieg der Phosphorylierungen der Akt/PKB und GSK-3 β Proteine nach ionisierender Strahlung festgestellt werden.

Um die Hypothese, dass DNA-PK das Akt/PKB Protein nach ionisierender Strahlung phosphoryliert, weiter zu untermauern, wurde die katalytische Untereinheit von DNA-PK durch Transfektion spezifischer siRNA ausgeschaltet. In der Folge nahm weder die Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 noch die Phosphorylierung des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung zu. Interessanterweise blieb nach der Entfernung der katalytischen Untereinheit von DNA-PK auch die Mengenzunahme des p53 Proteins aus. Diese Beobachtung spricht dafür, dass DNA-PK nicht nur die Aktivität von Akt/PKB und GSK-3 nach ionisierender Strahlung reguliert, sondern auch am Signalweg, der zur Akkumulation des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung führt, beteiligt ist.

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu Veröffentlichungen, bei denen das p53 Protein auch in Zellen von SCID Mäusen nach ionisierender Strahlung zunahm (Gurley und Kemp, 1996; Fried et al., 1996). Möglicherweise reicht die geringe verbleibende Kinaseaktivität des DNA-PK Proteins in SCID Zellen jedoch aus, um die Akkumulation des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung zu induzieren. Eine andere

Erklärung wäre, dass in SCID Zellen eventuell ein alternativer Signalweg aktiviert wird, der ebenfalls zur Akkumulation des p53 Proteins führt (Burma et al., 1999; Rathmell et al., 1997).

Auf Grund der Tatsache, dass der Verlust der katalytischen Untereinheit von DNA-PK die Zunahme der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins an Serin 473 sowie des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung fast vollständig verhindert, ist eine Beteiligung von ATM an der Phosphorylierung des Akt/PKB Proteins nach ionisierender Strahlung unwahrscheinlich, kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden.

4.4 Modell der Regulation von GSK-3 β nach ionisierender Strahlung

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich ein Signalweg postulieren, in dem DNA-PKcs Akt1/PKB α nach Bestrahlung an Serin 473 phosphoryliert und aktiviert. Da DNA-PK als Sensor für DNA-Doppelstrangbrüche gilt (Martensson et al., 2003), ist es möglich, dass DNA-PK nach ionisierender Strahlung direkt im Zellkern durch DNA-Enden aktiviert wird und folglich auch das Akt1/PKB α Protein im Zellkern phosphoryliert. Für die Aktivierung von Akt1/PKB α im Zellkern reicht offensichtlich die Phosphorylierung an Serin 473 aus. Daraufhin phosphoryliert Akt1/PKB α das GSK-3 β Protein an Serin 9, wodurch GSK-3 β gegenüber prä-phosphorylierten Substraten katalytisch inaktiviert wird. Die daraus resultierende Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins reicht aus, um die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins zu verhindern (Abb. 4.1). Die Tatsache, dass die Phosphorylierungen des Akt/PKB Proteins an Serin 473 und des GSK-3 β Proteins an Serin 9 nach ionisierender Strahlung in so unterschiedlichen Zellen wie prä-B Lymphozyten, Osteosarkom Zellen, menschlichen Hautfibroblasten (ohne Abbildung) und embryonalen Mausfibroblasten ansteigen, zeigt, dass es sich bei diesem Signalweg um einen allgemein gültigen Signalweg handelt, der zwischen Menschen und Mäusen konserviert ist. Dieser neue Signalweg stellt damit eine Alternative zur ATM-abhängigen Akkumulation des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung dar.

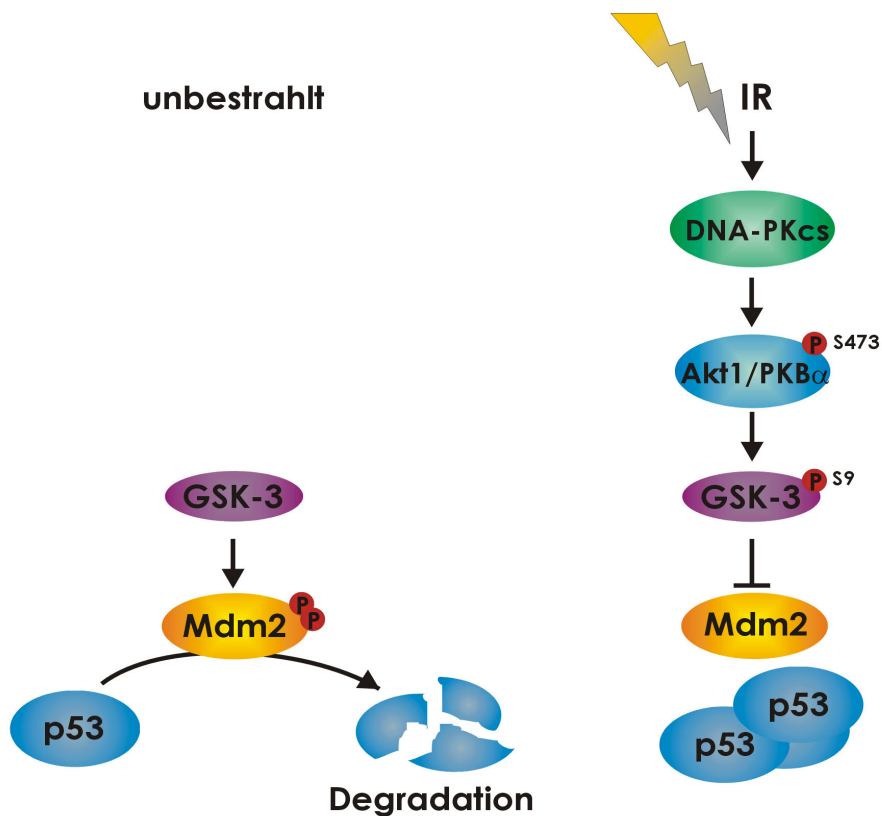


Abb. 4.1: GSK-3 β , Akt1/PKB α und DNA-PKcs tragen zur p53 Akkumulation nach ionisierender Strahlung bei.

In unbestrahlten Zellen vermittelt das Mdm2 Protein die Degradation des p53 Proteins durch Proteasomen. Für die Aktivität des Mdm2 Proteins sind mehrere Phosphorylierungen in der zentralen Domäne erforderlich. Die konstitutiv aktive GSK-3 phosphoryliert Mdm2 in der zentralen Domäne und trägt damit zur Aktivität des Mdm2 Proteins bei. Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (IR) wird DNA-PKcs aktiviert und phosphoryliert daraufhin Akt1/PKB α an Serin 473. Dies reicht aus, um Akt1/PKB α zu aktivieren, welches in der Folge GSK-3 β an Serin 9 phosphoryliert und inaktiviert. Die daraus resultierende Hypophosphorylierung des Mdm2 Proteins verhindert die Mdm2-abhängige Degradation des p53 Proteins, welches folglich in der Zelle akkumuliert.

5 Literaturverzeichnis

- Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A.; Kemler, R. (1997) β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804
- Alessi, D.R.; Andjelkovic, M.; Caudwell, B.; Cron, P.; Morrice, N.; Cohen, P. et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**: 6541-6551
- Alessi, D.R.; James, S.R.; Downes, C.P.; Holmes, A.B.; Gaffney, P.R.J.; Reese, C.B. et al. (1997 a) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* **7**: 261-269
- Alessi, D.R.; Kozlowski, M.T.; Weng, Q.P.; Morrice, N.; Avruch, J. (1997 b) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* **8**: 69-81
- Amorino, G.P.; Hamilton, V.M.; Valerie, K.; Dent, P.; Lammering, G.; Schmidt-Ulrich, R.K. (2002) Epidermal growth factor receptor dependence of radiation-induced transcription factor activation in human breast carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* **13**: 2233- 2244
- Anderson, C.W.; Dunn, J.J.; Freimuth, P.I.; Galloway, A.M.; Allalunis-Turner, M.J. (2001) Frameshift mutation in PRKDC, the gene for DNA-PKcs, in the DNA repair-defective, human, glioma-derived cell line MO59J. *Radiat. Res.* **156**: 2-9
- Andjelković, M.; Alessi, D.R.; Meier, R.; Fernandez, A.; Lamb, N.J.C.; Frech, M. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**: 31515-31524
- Andjelković, M.; Jakubowicz, T.; Cron, P.; Ming, X.F.; Han, J.W. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5699-5704
- Andrisani, O.M. (1999) CREB-mediated transcriptional control. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **9**: 19-32
- Angenstein, F.; Greenough, W.T.; Weiler, I.J. (1998) Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: A possible factor regulating synaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15078-15083
- Armstrong, J.L.; Bonavaud, S.M.; Toole, B.J.; Yeaman, S.J. (2001) Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 952-956
- Balendran, A.; Biondi, R.M.; Cheung, P.C.F.; Casamayor, A.; Deak, M.; Alessi, D.R. (2000) A 3-phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of Protein Kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J. Biol. Chem.* **275**: 20806-20813

- Barak, Y.; Juven, T.; Haffner, R.; Oren, M. (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**: 461-468
- Bassing, C.H.; Swat, W.; Alt, F.W. (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109**: S45-S55
- Basso, A.D.; Solit, D.B.; Chiosis, G.; Giri, B.; Tsiichlis, P.; Rosen, N. (2002) Akt forms an intracellular complex with Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **277**: 39858-39866
- Beamish, H.J.; Jessberger, R.; Riballo, E.; Priestley, A.; Blunt, T.; Kysela, B. et al. (2000) The C-terminal conserved domain of DNA-PKcs, missing in the SCID mouse, is required for kinase activity. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1506-1513
- Bellacosa, A.; Chan, T.O.; Ahmed, N.N.; Datta, K.; Malstrom, S.; Stokoe, D. et al. (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**: 313-325
- Bellacosa, A.; Testa, J.R.; Staal, S.P.; Tsiichlis, P.N. (1991) A retroviral oncogene, *akt*, encoding a serine-threonine kinase containing a SH2-like region. *Science* **254**: 274-277
- Bibel, M. und Barde, Y.A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **14**: 2919-2937
- Bijur, G.N. und Jope, R.S. (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β . *J. Biol. Chem.* **276**: 37436-37442
- Bijur, G.N. und Jope, R.S. (2003 a) Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neurochemistry* **14**: 2415-2419
- Bijur, G.N. und Jope, R.S. (2003 b) Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* **87**: 1427-1435
- Blattner, C.; Tobiasch, E.; Litfen, M.; Rahmsdorf, H.J.; Herrlich, P. (1999) DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene* **18**: 1723-1732
- Blattner, C.; Hay, T.; Meek, D.W.; Lane, D.P. (2002) Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 6170-6182
- Bode, A.M. und Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Rev. Cancer* **4**: 793-805
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brodbeck, D.; Hill, M.M.; Hemmings, B.A. (2001) Two splice variants of Protein Kinase B γ have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* **276**: 29550-29558
- Brodie, C. und Blumberg, P.M. (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase c δ . *Apoptosis* **8**: 19-27

- Brunn, G.J.; Williams, J.; Sabers, C.; Wiederrecht, G.; Lawrence Jr, J.C.; Abraham, R.T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* **15**: 5256-5267
- Burma, S.; Kurimasa, A.; Xie, G.; Taya, Y.; Araki, R.; Abe, M. et al. (1999) DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **274**: 17139-17143
- Chen, R.H.; Abate, C.; Blenis, J. (1993) Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10952-10956
- Chen, R.H.; Sarnecki, C.; Blenis, J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 915-927
- Chen, W.S.; Xu, P.Z.; Gottlob, K.; Chen, M.L.; Sokol, K.; Shiyanova, T. et al. (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* **15**: 2203-2208
- Cho, H.; Mu, J.; Kim, J.K.; Thorvaldsen, J.L.; Chu, Q.; Crenshaw III, E.B. et al. (2001 a) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* **292**: 1728-1731
- Cho, H.; Thorvaldsen, J.L.; Chu, Q.; Feng, F.; Birnbaum, M.J. (2001 b) Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* **276**: 38349-38352
- Chou, M.M.; Hou, W.; Johnson, J.; Graham, L.K.; Lee, M.H.; Chen, C.S. et al. (1998) Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**: 1069-1077
- Collis, S.J.; DeWeese, T.L.; Jeggo, P.A.; Parker, A.R. (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**: 949-961
- Contessa, J.N.; Hampton, J.; Lammering, G.; Mikkelsen, R.B.; Dent, P.; Valerie, K. et al. (2002) Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* **21**: 4032-4041
- Dalby, K.N.; Morrice, N.; Caudwell, F.B.; Avruch, J.; Cohen, P. (1998) Identification of regulatory phosphorylation sites in Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-activated Protein Kinase-1a/p90^{rsk} that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* **273**: 1496-1505
- Dale, T.C. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* **329**: 209-223
- Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y. et al. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241
- De Cesare, D.; Jacquot, S.; Hanauer, A.; Sassone-Corsi, P. (1998) Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12202-12207

- Dempsey, E.C.; Newton, A.C.; Mochly-Rosen, D.; Fields, A.P.; Reyland, M.E.; Insel, P.A. et al. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**: L429-L438
- Dent, P.; Yacoub, A.; Fisher, P.B.; Hagan, M.P.; Grant, S. (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**: 5885-5896
- Diehl, J.A.; Cheng, M.; Roussel, M.F.; Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**: 3499-3511
- Doble, B.W. und Woodgett, J.R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **116**: 1175-1186
- Dong, L.Q. und Liu, F. (2005) PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**: E187-E196
- Donjerkovic, D. und Scott, D.W. (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* **10**: 1-16
- Douville, E. und Downward, J. (1997) EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene* **15**: 373-383
- Dragoi, A.M.; Fu, X.; Ivanov, S.; Zhang, P.; Sheng, L.; Wu, D. et al. (2005) DNA-PKcs, but not TLR9, is required for activation of Akt by CpG-DNA. *EMBO J.* **24**: 779-789
- Dufner, A. und Thomas, G. (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell. Res.* **253**: 100-109
- Dupre, A.; Boyer-Chatenet, L.; Gautier, J. (2006) Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature Struct. Mol. Biol.* **13**: 451-457
- Edwards, E.; Geng, L.; Tan, J.; Onishko, H.; Donnelly, E.; Hallahan, D.E. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt Signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* **62**: 4671-4677
- Eldar-Finkelman, H.; Seger, R.; Vandenheede, J.R.; Krebs, E.G. (1995) Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 by Epidermal Growth Factor is mediated by Mitogen-activated Protein Kinase/ p90 Ribosomal Protein S6 Kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 987-990
- Embi, N.; Rylatt, D.B.; Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **107**: 519-527
- Fang, X.; Yu, S.; Lu, Y.; Bast Jr, R.C.; Woodgett, J.R.; Mills, G.B. (2000) Phosphorylation and inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 by Protein Kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11960-11965
- Fang, X.; Yu, S.; Tanyi, J.L.; Lu, Y.; Woodgett, J.R.; Mills, G.B. (2002) Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2099-2110
- Faux, M.C. und Scott, J.D. (1997) Regulation of the AKAP79-Protein Kinase C interaction by Ca²⁺/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* **272**: 17038-17044

- Feliciello, A.; Gottesman, M.E.; Avvedimento, E.V. (2001) The biological functions of A-Kinase Anchor Proteins. *J. Mol. Biol.* **308**: 99-114
- Feng, J.; Park, J.; Cron, P.; Hess, D.; Hemmings, B.A. (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**: 41189-41196
- Filippa, N.; Sable, C.L.; Filloux, C.; Hemmings, B.; van Obberghen, E. (1999) Mechanism of Protein Kinase B activation by cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4989-5000
- Fiol, C.J.; Mahrenholz, A.M.; Wang, Y.; Roeske, R.W.; Roach, P.J. (1987) Formation of Protein Kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of Casein Kinase II and Glycogen Synthase Kinase 3. *J. Biol. Chem.* **262**: 14042-14048
- Frame, S. und Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**: 1-16
- Frame, S.; Cohen, P.; Biondi, R.M. (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* **7**: 1321-1327
- Franca-Koh, J.; Yeo, M.; Fraser, E.; Young, N.; Dale, T.C. (2002) The regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J. Biol. Chem.* **277**: 43844-43848
- Fried, L.M.; Koumenis, C.; Peterson, S.R.; Green, S.L.; van Zijl, P.; Allalunis-Turner, J. et al. (1996) The DNA damage response in DNA-dependent protein kinase-deficient SCID mouse cells: Replication protein A hyperphosphorylation and p53 induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13825-13830
- Frödin, M. und Gammeltoft, S. (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **151**: 65-77
- Galloway, A.M.; Spencer, C.A.; Anderson, C.W.; Allalunis-Turner, M.J. (1999) Differential stability of the DNA-activated protein kinase catalytic subunit mRNA in human glioma cells. *Oncogene* **18**: 1361-1368
- Gonzalez, I.; Tripathi, G.; Carter, E.J.; Cobb, L.J.; Salih, D.A.M.; Lovett, F.A. et al. (2004) Akt2, a novel functional link between p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase pathways in myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 3607-3622
- Goodarzi, A.A. und Lees-Miller, S.P. (2004) Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells. *DNA Repair* **3**: 753-767
- Goode, N.; Hughes, K.; Woodgett, J.R.; Parker, P.J. (1992) Differential regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β by Protein Kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.* **267**: 16878-16882
- Goodhead, D.T. (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 7-17
- Grimes, C.A. und Jope, R.S. (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* **78**: 1219-1232

- Gurley, K.E. und Kemp, C.J. (1996) p53 induction, cell cycle checkpoints, and apoptosis in DNAPK-deficient scid mice. *Carcinogenesis* **17**: 2537-2542
- ter Haar, E.; Coll, J.T.; Austen, D.A.; Hsiao, H.M.; Swenson, L. et al. (2001) Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature Struct. Biol.* **8**: 593-596
- Hammarsten, O. und Chu, G. (1998) DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 525-530
- Hanada, M.; Feng, J.; Hemmings, B.A. (2004) Structure, regulation and function of PKB/ Akt – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**: 3-16
- Hannigan, G.; Troussard, A.A.; Dedhar, S. (2005) Integrin-linked Kinase: A cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nature Rev. Cancer* **5**: 51-63
- Harootunian, A.T.; Adams, S.R.; Wen, W.; Meinkoth, J.L.; Taylor, S.S.; Tsien, R.Y. (1993) Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol. Biol. Cell* **4**: 993-1002
- Hartley, K.O.; Gell, D.; Smith, G.C.M.; Zhang, H.; Divecha, N.; Connelly, M.A. et al. (1995) DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit: A relative of Phosphatidylinositol 3-Kinase and the Ataxia Telangiectasia gene product. *Cell* **82**: 849-856
- Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299
- Hengstermann, A.; Whitaker, N.J.; Zimmer, D.; Zentgraf, H.; Scheffner, M. (1998) Characterization of sequence elements involved in p53 stability regulation reveals cell type dependence for p53 degradation. *Oncogene* **17**: 2933-2941
- Hoeflich, K.P.; Luo, J.; Rubie, E.A.; Tsao, M.S.; Jin, O.; Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* **406**: 86-90
- Honda, R.; Tanaka, H.; Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**: 25-27
- Hongisto, V.; Smeds, N.; Brecht, S.; Herdegen, T.; Courtney, M.J.; Coffey, E.T. (2003) Lithium blocks the c-jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 6027-6036
- Hughes, K.; Nikolakaki, E.; Plyte, S.E.; Totty, N.F.; Woodgett, J.R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **12**: 803-808
- Iijima, Y.; Laser, M.; Shiraishi, H.; Willey, C.D.; Sundaravadivel, B. et al. (2002) c-Raf/MEK/ERK pathway controls Protein Kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 23065-23075
- Iliakis, G.; Wang, Y.; Guan, J.; Wang, H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 5834-5847
- Inoue, M.; Kishimoto, A.; Takai, Y.; Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* **252**: 7610-7616

- Isotani, S.; Hara, K.; Tokunaga, C.; Inoue, H.; Avruch, J.; Yonezawa, K. (1999) Immunopurified mammalian Target of Rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 Kinase α in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**: 34493-34498
- Izzard, R.A.; Jackson, S.P.; Smith, G.C.M. (1999) Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent Protein Kinase. *Cancer Res.* **59**: 2581-2586
- Jaken, S. und Parker, P.J. (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays* **22**: 245-254
- Johannes, F.J.; Prestle, J.; Eis, S.; Oberhagemann, P.; Pfizenmaier, K. (1994) PKC μ is a novel, atypical member of the Protein Kinase C family. *J. Biol. Chem.* **269**: 6140-6148
- Jones, S.W.; Erikson, E.; Blenis, J.; Maller, J.L.; Erikson, R.L. (1988) A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3377-3381
- Joep, R.S. und Johnson, G.V.W. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 95-102
- Junoy, B.; Maccario, H.; Mas, J.L.; Enjalbert, A.; Drouva, S.V. (2002) Proteasome implication in phorbol ester- and GnRH-induced selective down-regulation of PKC (α , ϵ , ζ) in α T₃-1 and L β T₂ gonadotrope cell lines. *Endocrinology* **143**: 1386-1403
- Keenan, C. und Kelleher, D. (1998) Protein Kinase C and the cytoskeleton. *Cell. Signal.* **10**: 225-232
- Konishi, H.; Matsuzaki, H.; Tanaka, M.; Takemura, Y.; Kuroda, S.; Ono, Y. et al. (1997) Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* **410**: 493-498
- Kubbutat, M.H.G.; Jones, S.N.; Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303
- Kulikov, R.; Boehme, K.A.; Blattner, C. (2005) Glycogen Synthase Kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 7170-7180
- Lakin, N.D. und Jackson, S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**: 7644-7655
- Lee, Y.I.; Seo, M.; Kim, Y.; Kim, S.Y.; Kang, U.G.; Kim, Y.S. et al. (2005) Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/ dephosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β , and this dephosphorylation involves Protein Phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 22044-22052
- Lees-Miller, S.P.; Chen, Y.R.; Anderson, C.W. (1990) Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates Simian Virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6472-6481
- Lees-Miller, S.P. und Meek, K. (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**: 1161-1173
- Le Good, J.A.; Ziegler, W.H.; Parekh, D.B.; Alessi, D.R.; Cohen, P.; Parker, P.J. (1998) Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**: 2042-2045

- Li, M.; Wang, X.; Meintzer, M.K.; Laessig, T.; Birnbaum, M.J.; Heidenreich, K.A. (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9356-9363
- Linseman, D.A.; Butts, B.D.; Precht, T.A.; Phelps, R.A.; Le, S.S.; Laessig, T.A. et al. (2004) Glycogen Synthase Kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **24** : 9993-10002
- Liu, Z.; Wu, Y.; Nicklas, E.W.; Jahn, L.A.; Price, W.J. et al. (2004) Unlike insulin, amino acids stimulate p70^{S6K} but not GSK-3 or glycogen synthase in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**: E523-E528
- Lu, Z.; Liu, D.; Hornia, A.; Devonish, W.; Pagano, M.; Foster, D.A. (1998) Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 839-845
- Maki, C.G. und Howley, P.M. (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 355-363
- Martensson, S.; Nygren, J.; Osheroff, N.; Hammarsten, O. (2003) Activation of the DNA-dependent protein kinase by drug-induced and radiation induced DNA strand breaks. *Radiat. Res.* **160**: 291-301
- Mayo, L. D. und Donner, D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11598-11603
- McKinnon, P.J. (2004) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep.* **5**: 772-776
- Meek, D.W. und Knippschild, U. (2003) Posttranslational modification of Mdm2. *Mol. Cancer Res.* **1**: 1017-1026
- Meier, R.; Alessi, D.R.; Cron, P.; Andjelković, M.; Hemmings, B.A. (1997) Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* **272**: 30491-30497
- Mellor, H. und Parker, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**: 281-292
- Mochly-Rosen, D. und Gordon, A.S. (1998) Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* **12**: 35-42
- Moller, D.E.; Xia, C.H.; Tang, W.; Zhu, A.X.; Jakubowski, M. (1994) Human *rsk* isoforms: cloning and characterization of tissue-specific expression. *Am. J. Physiol.* **266**: C351-C359
- Momand, J.; Jung, D.; Wilczynski, S.; Niland, J. (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nuc. Acids Res.* **26**: 3453-3459
- Mora, A.; Komander, D.; van Aalten, D.M.F.; Alessi, D.R. (2004) PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Sem. Cell Dev. Biol.* **15**: 161-170
- Mukai, F.; Ishiguro, K.; Sano, Y.; Fujita, S.C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/ glycogen synthase kinase 3 β . *J. Neurochem.* **81**: 1073-1083
- Newton, A.C. (1995) Protein Kinase C: Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**: 28495-28498

- Nigro, J.M.; Baker, S.J.; Preisinger, A.C.; Milburn Jessup, J.; Hostetter, R.; Cleary, K. et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**: 705-708
- Niida, H. und Nakanishi, M. (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**: 3-9
- Nilsson, A.; Sirzén, F.; Lewensohn, R.; Wang, N.; Skog, S. (1999) Cell cycle-dependent regulation of the DNA-dependent protein kinase. *Cell Prolif.* **32**: 239-248
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-496
- Okuda, H.; Saitoh, K.; Hirai, S.I.; Iwai, K.; Takaki, Y.; Baba, M. et al. (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein mediates ubiquitination of activated atypical Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* **276**: 43611-43617
- Orr, J.W.; Keranen, L.M.; Newton, A.C. (1992) Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of Protein Kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **267**:15263-15266
- Palmer, A.; Gavin, A.C.; Nebreda, A.R. (1998) A link between MAP kinase and p34^{cdc2}/cyclin B during oocyte maturation: p90^{msk} phosphorylates and inactivates the p34^{cdc2} inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* **17**: 5037-5047
- Pap, M. und Cooper, G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 19929-19932
- Parekh, D.B.; Ziegler, W.; Parker, P.J. (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**: 496-503
- Patel, S.; Doble, B.; Woodgett, J.R. (2004) Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword? *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 803-808
- Pekarsky, Y.; Koval, A.; Hallas, C.; Bichi, R.; Tresini, M.; Malstrom, S. et al. (2000) Tcl enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3028-3033
- Peng, Y.; Zhang, Q.; Nagasawa, H.; Okayasu, R.; Liber, H.L.; Bedford, J.S. (2002) Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent Protein Kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Res.* **62**: 6400-6404
- Phin, S.; Kupferwasser, D.; Lam, J.; Lee-Fruman, K.K. (2003) Mutational analysis of ribosomal S6 kinase 2 shows differential regulation of its kinase activity from that of ribosomal S6 kinase 1. *Biochem. J.* **373**: 583-591
- Pluquet, O.; Qu, L.K.; Baltzis, D.; Koromilas, A.E. (2005) Endoplasmic reticulum stress accelerates p53 degradation by the cooperative actions of Hdm2 and Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Mol. Cell. Biol.* **25**: 9392-9405
- Plyte, S.E.; Hughes, K.; Nikolakaki, E.; Pulverer, B.J.; Woodgett, J.R. (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta* **1114**: 147-162

- Qu, L.; Huang, S.; Baltzis, D.; Rivas-Estilla, A.M.; Pluquet, O.; Hatzoglou, M. et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3 β . *Genes Dev.* **18**: 261-277
- Rathmell, W.K.; Kaufmann, W.K.; Hurt, J.C.; Byrd, L.L.; Chu, G. (1997) DNA-dependent Protein Kinase is not required for accumulation of p53 or cell cycle arrest after DNA damage. *Cancer Res.* **57**: 68-74
- Reinhard, C.; Fernandez, A.; Lamb, N.J.C.; Thomas, G. (1994) Nuclear localization of p85^{S6k}: functional requirement for entry into S phase. *EMBO J.* **13**: 1557-1565
- Reinhard, C.; Thomas, G.; Kozma, S.C. (1992) A single gene encodes two isoforms of the p70 S6 kinase: Activation upon mitogenic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4052-4056
- Richards, S.A.; Fu, J.; Romanelli, A.; Shimamura, A.; Blenis, J. (1999) Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr. Biol.* **9**: 810-820
- Romanova, L.Y.; Alexandrov, I.A.; Nordan, R.P.; Blagosklonny, M.V.; Mushinski, J.F. (1998) Cross-talk between Protein Kinase C- α (PKC- α) and - δ (PKC- δ): PKC- α elevates the PKC- δ protein level, altering its mRNA transcription and degradation. *Biochemistry* **37**: 5558-5565
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. New York, USA
- Sato, S.; Fujita, N.; Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10832-10837
- Schmidt-Ullrich, R.K.; Dent, P.; Grant, S.; Mikkelsen, R.B.; Valerie, K. (2000) Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat. Res.* **153**: 245-257
- Schönwasser, D.C.; Marais, R.M.; Marshall, C.J.; Parker, P.J. (1998) Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase pathway by conventional, novel, and atypical Protein Kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 790-798
- Schouten, G.J.; Vertegaal, A.C.O.; Whiteside, S.T.; Israël, A.; Toebes, M.; Dorsman, J.C. et al. (1997) I κ B α is a target for the mitogen-activated 90kDa ribosomal S6 kinase. *EMBO J.* **16**: 3133-3144
- Schreiber, V.; Molinete, M.; Boeuf, H.; de Murcia, G.; Ménissier-de Murcia, J. (1992) The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* **11**: 3263-3269
- Seeger, R. und Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**:726-735
- Semizarov, D.; Frost, L.; Sarthy, A.; Kroeger, P.; Halbert, D.N.; Fesik, S.W. (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6347-6352

- Shima, H.; Pende, M.; Chen, Y.; Fumagalli, S.; Thomas, G.; Kozma, S.C. (1998) Disruption of the p70^{s6k}/p85^{s6k} gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* **17**: 6649-6659
- Skålhegg, B.S. und Tasken, K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Biosci.* **5**: 678-693
- Skurat, A.V. und Roach, P.J. (1996) Multiple mechanisms for the phosphorylation of C-terminal regulatory sites in rabbit muscle glycogen synthase expressed in COS cells. *Biochem. J.* **313**: 45-50
- Smith, G.C.M. und Jackson, S.P. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13**: 916-934
- Song, G.; Ouyang, G.; Bao, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **9**: 59-71
- Staal, S.P.; Hartley, J.W.; Rowe, W.P. (1977) Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3065-3067
- Stein, R.C. (2001) Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocrine Related Cancer* **8**: 237-248
- Sunahara, R.K. und Taussig, R. (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* **2**: 168-184
- Sutherland, C. und Cohen, P. (1994) The α -isoform of Glycogen Synthase Kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP Kinase-activated protein Kinase-1 in vitro. *FEBS Lett.* **338**: 37-42
- Sutherland, C.; Leighton, I.A.; Cohen, P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* **296**: 15-19
- Tanji, C.; Yamamoto, H.; Yorioka, N.; Kohno, N.; Kikuchi, K.; Kikuchi, A. (2002) A-Kinase Anchoring Protein AKAP220 binds to Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) and mediates Protein Kinase A-dependent inhibition of GSK-3 β . *J. Biol. Chem.* **277**: 36955-36961
- Taskén, K. und Aandahl, E.M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.* **84**: 137-167
- Taylor, S.S.; Yang, J.; Wu, J.; Haste, N.M.; Radzio-Andzelm, E.; Anand, G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**: 259-269
- Toker, A. (1998) Signaling through Protein Kinase C. *Front. Biosci.* **3**: d1134-1147
- Trivier, E.; De Cesare, D.; Jacquot, S.; Pannetier, S.; Zackai, E.; Young, I. et al. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* **384**: 567-570
- Valverde, A.M.; Sinnett-Smith, J.; van Lint, J.; Rozengurt, E. (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: A target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8572-8576

- Varadkar, P.A.; Krishna, M.; Verma, N.C. (2003) Dose-dependent differential expression of Protein Kinase C isozymes in mouse lymphocytes after gamma irradiation in vivo and ex vivo. *Radiat. Res.* **159**: 453-457
- Vilimek, D. und Duronio, V. (2006) Cytokine-stimulated phosphorylation of GSK-3 is primarily dependent upon PKCs, not PKB. *Biochem. Cell. Biol.* **84**: 20-29
- Vousden, K. H. und Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev. Cancer* **2**: 594-604
- Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**: 3763-3765
- Wang, Y. und Gilmore, T.D. (2003) Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim. Biophys. Acta* **1593**: 115-120
- Waseem, N.H. und Lane, D.P. (1990) Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) - Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell Sci.* **96**: 121-129
- Watcharasit, P.; Bijur, G.N.; Zmijewski, J.W.; Song, L.; Zmijewska, A. et al. (2003) Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7951-7955
- Waterman, M.J.F.; Stavridi, E.S.; Waterman, J.L.F.; Halazonetis, T.D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat. Genet.* **19**: 175-178
- van Weeren, P.C.; de Bruyn, K.M.T.; de Vries-Smits, A.M.M.; van Lint, J.; Burgering, B.M.Th. (1998) Essential role for Protein Kinase B (PKB) in insulin-induced Glycogen Synthase Kinase 3 inactivation. *J. Biol. Chem.* **273**: 13150-13156
- Wen, W.; Harootunian, A.T.; Adams, S.R.; Feramisco, J.; Tsien, R.Y.; Meinkoth, J.L. et al. (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **269**: 32214-32220
- Weng, Q.P.; Kozlowski, M.; Belham, C.; Zhang, A.; Comb, M.J.; Avruch, J. (1998) Regulation of the p70 S6 Kinase by phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 16621-16629
- Williams, M.R.; Arthur, J.S.C.; Balendran, A.; van der Kaay, J.; Poli, V. et al. (2000) The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* **10**: 439-448
- Woloschak, G.E.; Chang-Liu, C.M.; Shearin-Jones, P. (1990) Regulation of Protein Kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res.* **50**: 3963-3967
- Woodgett, J.R. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/Factor A. *EMBO J.* **9**: 2431-2438
- Woodgett, J.R. (1991) cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol.* **200**: 564-577
- Wooten, M.W.; Zhou, G.; Wooten, M.C.; Seibenhener, M.L. (1997) Transport of protein kinase C isoforms to the nucleus of PC12 cells by nerve growth factor: Association of atypical ζ -PKC with the nuclear matrix. *J. Neurosci. Res.* **49**: 393-403

Xirodimas, D.P.; Stephen, C.W.; Lane, D.P. (2001) Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp. Cell Res.* **270**: 66-77

Yang, Z.Z.; Tschopp, O.; Hemmings-Mieszczak, M.; Feng, J.; Brodbeck, D.; Perentes, E. et al. (2003) Protein kinase B α /Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J. Biol. Chem.* **278**: 32124-32131

Yavuzer, U.; Smith, G.C.M.; Bliss, T.; Werner, D.; Jackson, S.P. (1998) DNA end-independent activation of DNA-PK mediated via association with the DNA-binding protein C1D. *Genes Dev.* **12**: 2188-2199

Zervas, C.G. und Brown, N.H. (2002) Integrin adhesion: When is a kinase a kinase? *Curr. Biol.* **12**: R350-R351

Zmijewski, J.W. und Jope, R.S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts. *Aging Cell* **3**: 309-317

