

**Mechanistische Analysen zur zellzyklusabhängigen
und induzierten Phosphorylierung von p21 in
eukaryotischen Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Philip Denner
aus Berlin
Juli, 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Assay Development & High Throughput Screening der Schering AG durchgeführt und entstand im Zeitraum von Juni 2003 bis Juli 2006.

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. D. Kuhl (1. Gutachter)
Prof. Dr. M. R. Schneider (2. Gutachter)
Prof. Dr. G. Multhaup
Prof. Dr. V. A. Erdmann

Disputation am : 19.12.2006

„omnis cellula e cellula“ (Rudolf Virchow)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Zellzyklusregulation von eukaryotischen Zellen.....	1
1.2. Die Funktion Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK).....	1
1.3. Kontrolle der CDKs durch CDK-Inhibitoren	5
1.4. Der zytostatische CDK-Inhibitor p21.....	5
1.5. Regulation der Funktion und Lokalisation von p21 durch Phosphorylierung	8
1.6. Funktion von p21 während der Apoptose.....	10
1.7. p21 als Tumormarker in der Krebsdiagnose.....	11
1.8. Pim-1	12
1.9. Pim-1 als Tumormarker in der Krebsdiagnose	14
1.10. Fragestellung und Ziel der Doktorarbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Molekularbiologische Methoden	16
2.1.1. p21- und Pim-1-Klonierung.....	16
2.1.1.1. p21- und Pim-1-Klonierung: Amplifikation	16
2.1.1.2. p21- und Pim-1-Klonierung: Restriktionsverdau	19
2.1.1.3. p21- und Pim-1-Klonierung: Ligation	20
2.1.2. Kolonie-PCR	21
2.1.3. Präparative Plasmidisolierung aus Escherichia coli (5ml Volumen).....	22
2.1.4. Sequenzierung der p21- und Pim-1-Konstrukte	23
2.1.5. Punktmutagenese der p21- und Pim-1-Konstrukte	26
2.1.6. Präparative Plasmidisolierung aus Escherichia coli.....	28
2.2. Biochemische Methoden	29
2.2.1. Immunpräzipitation der p21- und Pim-1-Konstrukte.....	29
2.2.2. SDS-Gelelektrophorese	31
2.2.3. Western Blot	31
2.2.4. Phosphorylierungsnachweis mittels Flashplate-Kinaseexperiment.....	33
2.2.5. Phosphorylierungsnachweis mittels Autoradiographie.....	35
2.3. Zellbiologische Methoden.....	37
2.3.1. Zellkultur	37
2.3.2. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	38
2.3.3. Entwicklung von Pim-1-WT-GFP stabil transfizierten CHO Zellen.....	39
2.3.4. Fluoreszenzfärbung von Chromatin	40

2.3.5. Immunfluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine	40
2.3.6. Lebendzellbeobachtung transfizierter Zellen.....	43
2.3.7. Test von Pim-1-Inhibitoren im zellulären Assay	44
2.4. „High-Content Analysis“.....	45
2.4.1. Einleitung	45
2.4.2. Algorithmus A: Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-AFP	48
2.4.3. Algorithmus B: Phosphorylierung von p21-CFP durch Pim-1-YFP	51
2.4.4. Algorithmus C: Intrazelluläre Verteilung von p-p21-Thr145	57
3. Ergebnisse.....	63
3.1. Klonierung der p21- und Pim-1-AFP-Fusionsproteine.....	63
3.2. Transfektion, Expression und Aufreinigung der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Konstrukte	64
3.3. Enzymaktivität der Pim-1-AFP-Konstrukte im biochemischen Assay	66
3.4. Endogene Phosphorylierung von p21 am Thr-145 während des Zellzyklus ...	69
3.5. Intrazelluläre Lokalisation von stabil transfiziertem Pim-1-WT-GFP während des Zellzyklus	75
3.6. Zelluläre Effekte der Pim-1-Transfektion	78
3.6.1. Phosphorylierung von p21 durch Pim-1	78
3.6.2. Kontrolle der p-p21-Thr145- und p-p21-Ser146-Antikörper	84
3.6.3. Intrazelluläre Lokalisation von p-p21-Thr145	86
3.6.4. Test von potentiellen Pim-1-Inhibitoren.....	87
4. Diskussion.....	89
4.1. Charakterisierung der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Konstrukte	89
4.2. Endogene Phosphorylierung von p21 am Thr-145 während des Zellzyklus ...	91
4.3. Intrazelluläre Lokalisation von Pim-1-WT-GFP während des Zellzyklus.....	93
4.4. Pim-1 abhängige Phosphorylierung von p21	94
4.5. Möglicher Effekt einer unkontrollierten p21-Phosphorylierung während der Tumorentwicklung	95
4.6. Test von potentiellen Pim-1-Inhibitoren	97
4.7. Ausblick	98
5.1 Zusammenfassung	100
5.2 Summary.....	101
6. Anhang.....	103

6.1. Biochemische Bestimmung der Enzymaktivität von Pim-1 nach Substratbehandlung	103
6.2. Sequenzen	105
6.2.1. p21-WT-Sequenz des pOTB7 Expressionsvektors.....	105
6.2.2. c-Myc-Pim-1-WT-Sequenz des pCMV-tag3 Expressionsvektors	106
6.2.3. p21-WT-CFP-Sequenz	107
6.2.4. p21-WT-YFP-Sequenz.....	108
6.2.5. p21-T145A-CFP-DNA-Sequenz.....	109
6.2.6. Pim-1-WT-CFP-Sequenz	110
6.2.7. Pim-1-WT-GFP-Sequenz.....	111
6.2.8. Pim-1-K67M-GFP-Sequenz	112
6.2.9. Pim-1-WT-YFP-Sequenz	113
6.2.10. Pim-1-K67M-YFP-Sequenz.....	114
6.3. Listen.....	115
6.3.1. Chemikalien und Reagenzien	115
6.3.2. Laborgeräte und Materialien	117
6.3.3. Antikörper.....	117
6.3.4. Expressionsplasmide	118
6.3.5. Computerprogramme	118
6.3.6. Abkürzungen.....	119
7. Verzeichnis der Abbildungen.....	120
8. Literatur	122
Danksagung	134