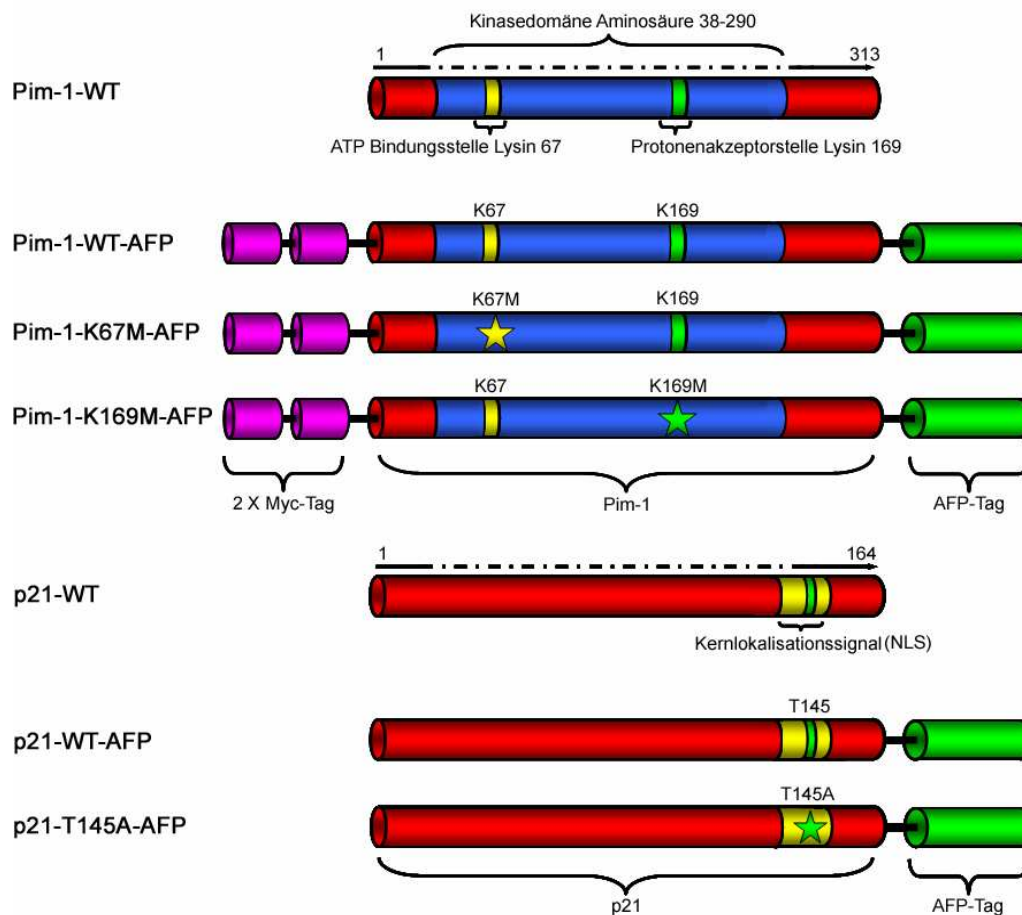


### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klonierung der p21- und Pim-1-AFP-Fusionsproteine

Um die Proteine p21 und Pim-1 mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie in Zellen untersuchen zu können, wurden beide Proteine mit autofluoreszierenden Proteinen (AFP) markiert.



**Abb. 31: Schematische Darstellung der p21- und Pim-1-AFP-Konstrukte**

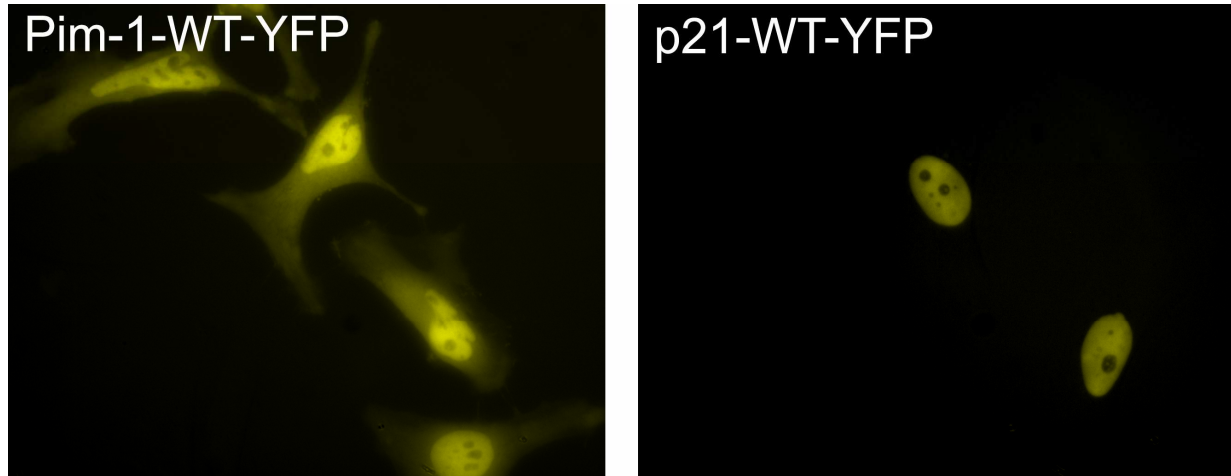
In dieser Abb. sind schematisch die Konstrukte der Pim-1- und der p21-Klonierung dargestellt. Alle Varianten von Pim-1 wurden am N-Terminus mit zwei c-Myc Tags und am C-Terminus mit einem autofluoreszierenden Protein (CFP (blau), GFP (grün) oder YFP (gelb)) versehen. Mittels Punktmutagenese wurden enzymatisch inaktive Varianten der Pim-1 Konstrukte hergestellt. Hierzu wurden das Lysin-67 (K67M) der ATP-Bindungsdomäne oder das Lysin-169 (K169M) der Protonenakzeptorstelle von Pim-1 jeweils in ein Methionin ausgetauscht. Die beiden p21-Varianten wurden am C-Terminus jeweils mit einem CFP oder YFP versehen. Das Thr-145 des p21-AFP-Fusionsproteins wurde mittels Punktmutagenese in ein Alanin umgewandelt, um eine p21-Mutante herzustellen, die nicht mehr am Thr-145 phosphoryliert werden kann.

Hierzu wurden das Gen von p21 und das Gen von Pim-1 (einschließlich zweier am N-Terminus eingefügten c-Myc-tags) amplifiziert und in N-terminale Klonierungsvektoren für CFP (blau fluoreszierend), GFP (grün fluoreszierend) und YFP (gelb fluoreszierend) kloniert. Um enzymatisch inaktive Varianten der Pim-1-

WT-GFP-Fusionsproteine herzustellen, wurden spezifische Aminosäuren der Pim-1-WT-Sequenz über Punktmutagenese ausgetauscht. Das Lys-67 in der ATP-Bindungsdomäne und das Lys-169 einer Protonenakzeptorstelle von Pim-1-WT, wurden hierbei durch ein Methionin ersetzt. Außerdem wurde das Thr-145 von p21-WT durch ein Alanin ersetzt, um so dessen Phosphorylierung durch Pim-1-WT an diesem Aminosäurerest zu unterbinden. Alle Fusionsproteine wurden über DNA-Sequenzierung überprüft.

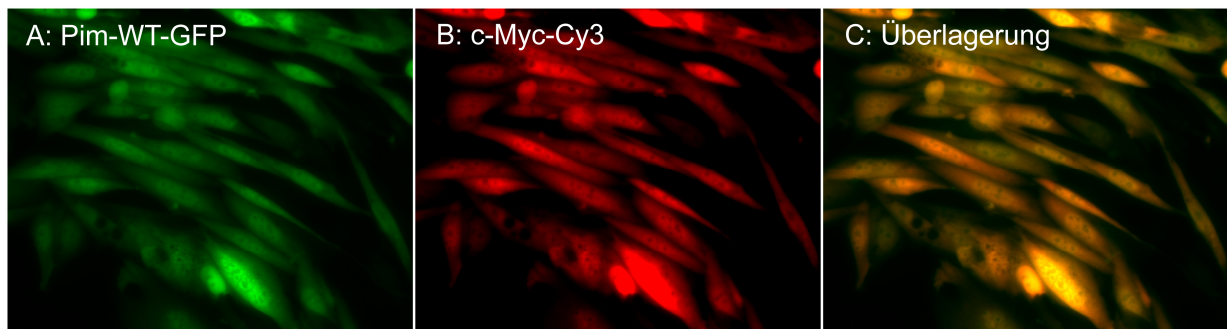
### 3.2. Transfektion, Expression und Aufreinigung der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Konstrukte

Die Fusionsproteine wurden in eukaryotische Zellen transient transfiziert und von diesen exprimiert. Die p21- und Pim-1-Fusionsproteine konnten anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der AFP-Expression in den Zellen identifiziert werden (Abb. 32). Die Pim-1-Konstrukte konnten zusätzlich mithilfe der N-terminalen c-Myc-tags und indirekter Immunfluoreszenz in den Zellen detektiert werden (Abb. 33).



**Abb. 32: Lokalisation der Pim-1-WT-YFP- und p21-WT-YFP-Konstrukte**

In dieser Abb. sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Pim-1-WT-YFP bzw. p21-WT-YFP in transient transfizierten HeLa Zellen abgebildet. Pim-1-WT-YFP war sowohl im Zytosol, als auch im Kern der Zelle lokalisiert. Die Fluoreszenzintensität im Zellkern war jedoch weitaus stärker. Dies korrelierte mit verstärkter Pim-1 Expression im Zellkern. Das Fusionsprotein p21-WT-YFP konnte ausschließlich im Zellkern lokalisiert werden. Die Nucleoli dieser Zellen zeigten keine p21-WT-YFP-Signale.

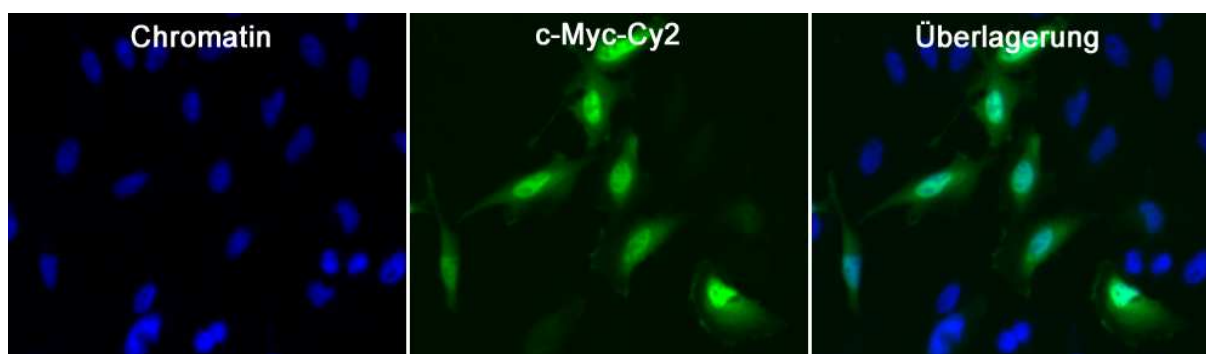


**Abb. 33: c-Myc-Immunfluoreszenzmarkierung von Pim-1-WT-GFP**

Pim-1-WT-GFP wurde stabil in CHO Zellen transfiziert. Das Fusionsprotein wurde anhand seines GFP-Tags (A) und mittels Immunfluoreszenzmarkierung der c-Myc-Tags (B) detektiert. In Bild C ist die Überlagerung von Bild A und B dargestellt. Beide Fluoreszenzsignale zeigten eine identische intrazelluläre Verteilung.

Die p21-AFP-Fusionsproteine waren ausschließlich in den Kernen der transfizierten Zellen lokalisiert (Abb. 32). Innerhalb dieser Zellkerne blieben die Nucleoli ausgespart.

Die Pim-1-AFP-Fusionsproteine konnten sowohl im Zytosol als auch im Zellkern der transfizierten Zellen detektiert werden, wobei das Fluoreszenzsignal im Zellkern weitaus stärker als das im Zytosol war (Abb. 32). Um zu überprüfen, ob das autofluoreszierende Protein die Lokalisation der Fusionskonstrukte beeinflusst, wurden zusätzlich ein Pim-1-Konstrukt transfiziert, das nicht mit einem AFP sondern nur mit zwei c-Myc-tags am N-Terminus markiert war (Abb. 34).

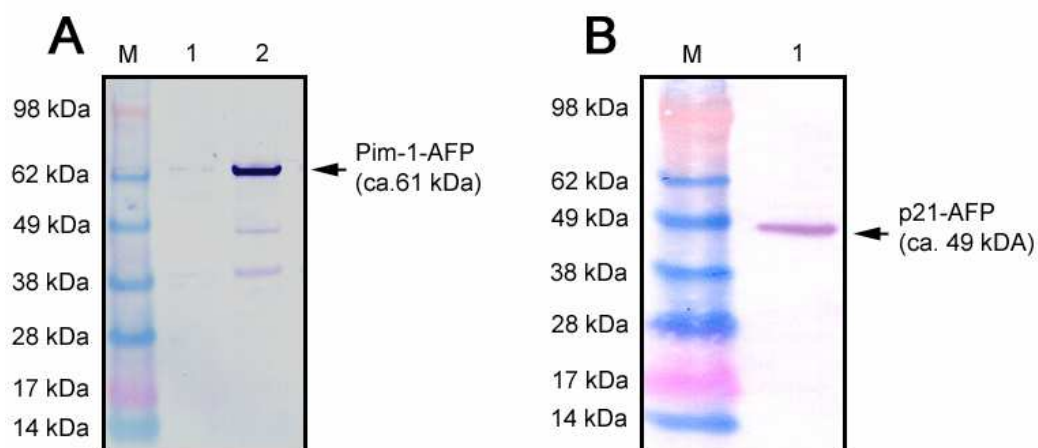


**Abb. 34: c-Myc-Immunfluoreszenzmarkierung von Pim-1-WT-c-Myc**

HeLa Zellen wurden mit dem Pim-1-WT-c-Myc Expressionsplasmid transfiziert. Mit einem anti-c-Myc Antikörper konnte die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins detektiert werden. Pim-1-WT-c-Myc konzentrierte sich im Zellkern der transfizierten Zellen. In geringerer Konzentration konnte es auch im Zytosol lokalisiert werden. Die intrazelluläre Verteilung von Pim-1-WT-c-Myc entsprach der Verteilung von Pim-1-WT-GFP in transfizierten HeLa Zellen.

Die Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenz zeigte die identische intrazelluläre Verteilung wie bei den Pim-1-AFP-Fusionsproteinen. Somit war die intrazelluläre Verteilung der exprimierten Pim-1-AFP-Fusionsproteine auf Lokalisationssignale von Pim-1 und nicht auf mögliche Effekte der AFPs zurückzuführen.

Sowohl die p21-AFP- als auch die Pim-1-AFP-Fusionsproteine konnten mittels Immunpräzipitation (IP) aus transfizierten Zellen isoliert werden. Die aufgereinigten Proteinkonstrukte wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Molekulargewichte im Western Blot bestimmt (Abb. 35). Die p21-Fusionskonstrukte wiesen hierbei ein Molekulargewicht (MG) von 49kDa auf. Das MG der Pim-1-Konstrukte betrug dagegen 61kDa. Beide MG stimmten mit den theoretisch berechneten MG der Fusionsproteine überein. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Fusionsproteine in voller Länge von den transfizierten Zellen exprimiert wurden.



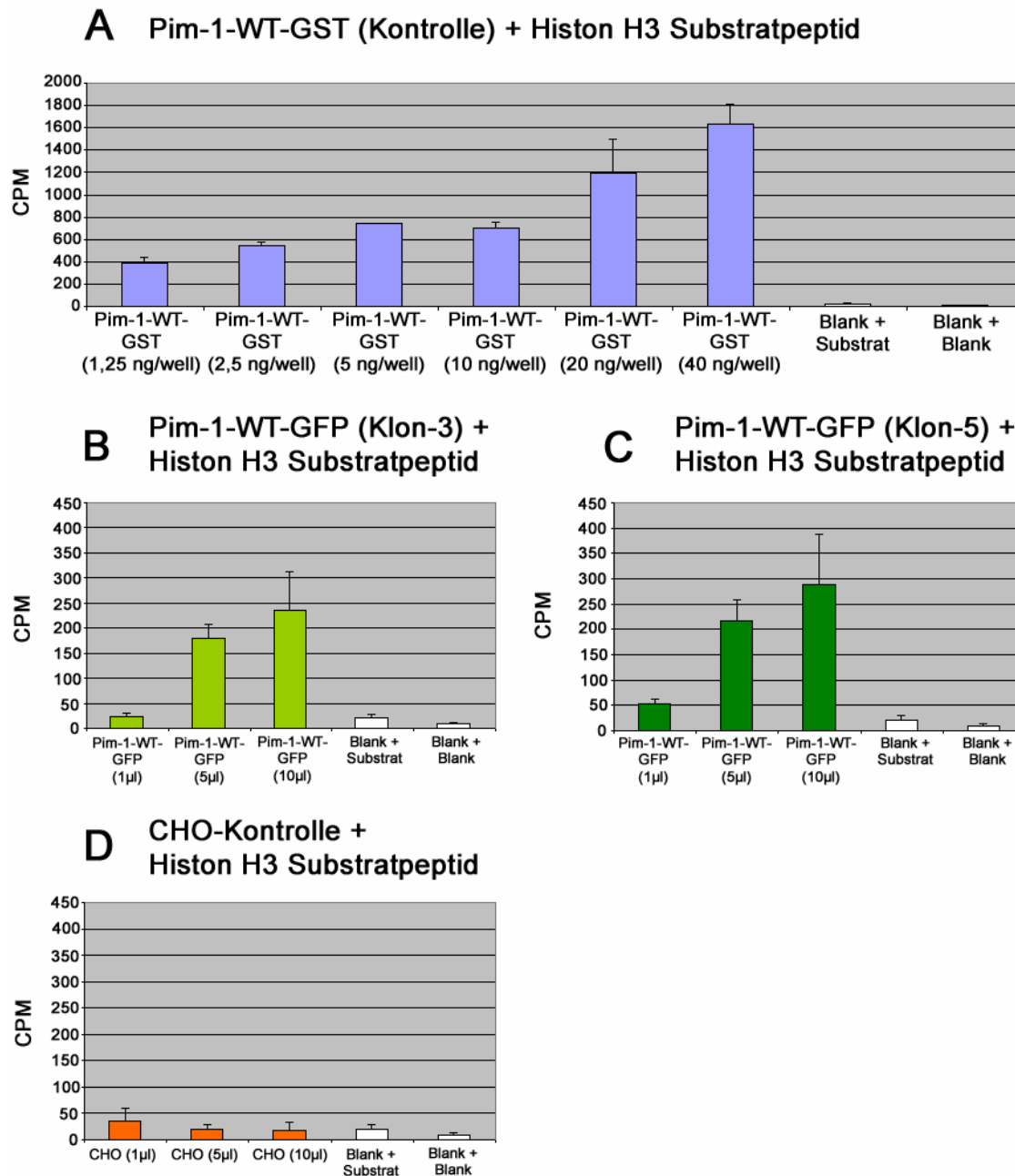
**Abb. 35: Western Blot der Pim-1-WT-GFP- und der p21-WT-CFP-Immunpräzipitate**

Mittels Western Blot wurden die Immunpräzipitate von Pim-1-WT-GFP und der p21-WT-CFP analysiert. Das Pim-1-Konstrukt hatte ein Molekulargewicht von ca. 61 kDa (A, Spur 1 enthielt keine Probe). Das p21-AFP Fusionsprotein war ca. 49 kDa groß (B). Die Molekulargewichte beider Fusionsproteine stimmten mit den theoretisch berechneten Molekulargewichten überein.

### 3.3. Enzymaktivität der Pim-1-AFP-Konstrukte im biochemischen Assay

Die Enzymaktivität der Pim-1-AFP-Fusionsproteine wurde in biochemischen Kinaseexperimenten überprüft. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die N- als auch C-terminalen c-Myc- bzw. AFP-Anhänge die Phosphorylierung von Substraten verhindern.

In einem so genannten „FlashPlate scintillation proximity kinase assay“ konnte die Phosphorylierung von biotinylierten Substratpeptiden gemessen werden (Abb. 33).



### Abb. 36: FlashPlate Kinaseexperiment

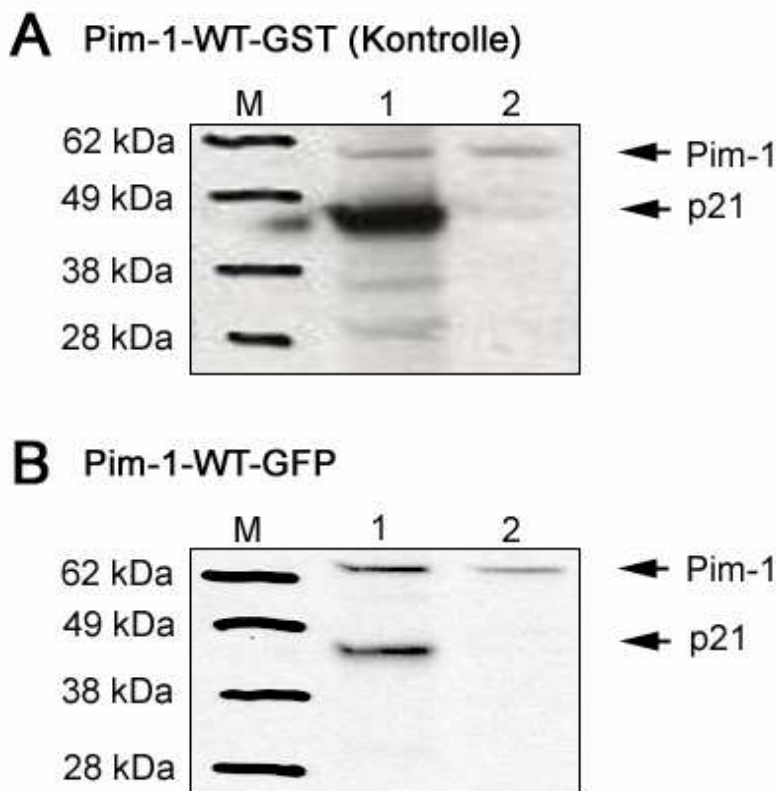
In einem FlashPlate Kinaseexperiment wurde die Phosphorylierung eines Substratpeptides (abgeleitet von Histon-H3) durch Pim-1 untersucht.

A: Konzentrationsabhängige Substratphosphorylierung durch rekombinantes Pim-1-GST (Referenzexperiment). B: Substratphosphorylierung durch den Pim-1-WT-GFP-Immunkomplex (aus Pim-1-WT-GFP stabil transfizierten CHO Zellen, Klon 3). C: Substratphosphorylierung durch den Pim-1-WT-GFP-Immunkomplex (aus Pim-1-WT-GFP stabil transfizierten CHO Zellen, Klon 5). D: Substratphosphorylierung durch den CHO-Kontrollimmunokomplex (aus nicht transfizierten CHO Zellen). Das aus transfizierten CHO Zellen isolierte Pim-1-WT-GFP zeigte bei diesem Experiment deutliche Enzymaktivität.

Für dieses Experiment wurde ein Substratpeptid gewählt, das vom Histon-H3 abgeleitet war und von Pim-1 phosphoryliert werden konnte. Sowohl das als Kontrolle benutzte Pim-1-WT-GST, als auch aus transfizierten CHO Zellen isoliertes

Pim-1-WT-GFP konnten das Substratpeptid konzentrationsabhängig phosphorylieren. Um zu zeigen, dass die Enzymaktivität des Pim-1-WT-GFP-Immunpräzitationskomplexes ausschließlich von Pim-1 und nicht von einer zusätzlich gebundenen Kinase stammte, wurde dieselbe IP-Methode mit nicht transfizierten Zellen durchgeführt. Der IP-Komplex aus nicht transfizierten CHO Zellen wies keine Enzymaktivität auf.

In einem weiteren Kinase Experiment wurde die Phosphorylierung von p21 durch Pim-1 mittels Autoradiographie überprüft. Wie in Abb. 37 deutlich gezeigt, sind sowohl Pim-1-WT-GST als auch Pim-1-WT-GFP in der Lage p21 zu phosphorylieren (Bande bei ca. 49kDa). Die Autophosphorylierung von Pim-1-WT-GST als auch von Pim-1-WT-GFP bewies die Enzymaktivität beider Konstrukte (Bande bei ca. 61kDa).

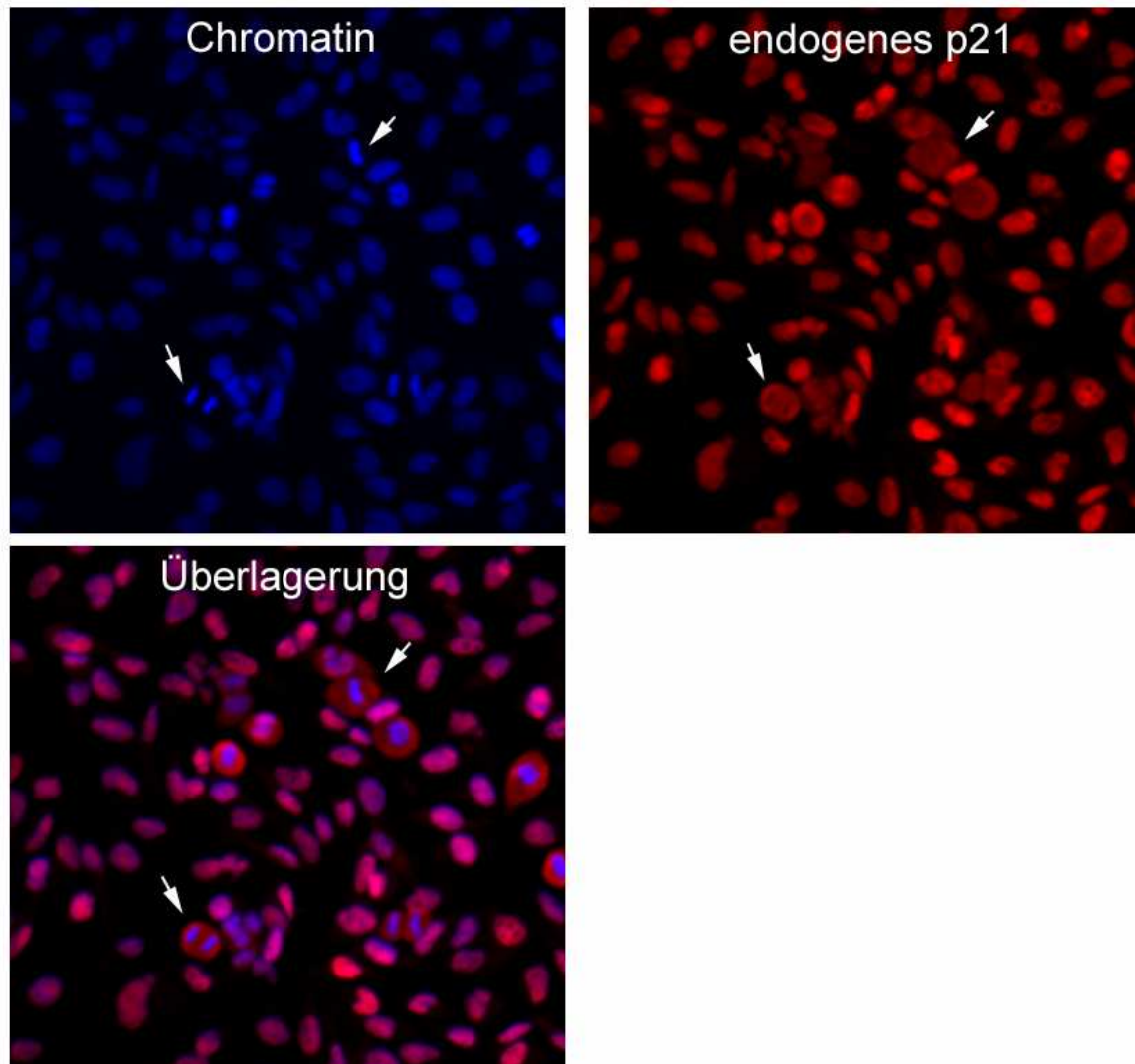


**Abb. 37: Autoradiographie der p21-Phosphorylierung**

In einem Phosphorylierungsexperiment unter Zusatz von  $[\gamma^{33}]$ -ATP wurde die Phosphorylierung von p21 durch Pim-1 untersucht. Als Kinasen dienten rekombinantes Pim-1-WT-GST (A) und der aus HeLa Zellen isolierte Pim-1-WT-GFP-Immunkomplex (B). Für beide Kinasereaktionen wurde p21-GST als Substrat eingesetzt. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die radioaktiven Produkte per Autoradiographie detektiert. Die Spur 1 zeigt die Proteine der vollständigen Kinasereaktion (A und B). In Spur 2 ist jeweils das Kontrollexperiment aufgetragen, bei dem das Substrat p21 durch Reaktionspuffer ersetzt war (A und B). Alle genutzten Pim-1-Konstrukte wiesen zudem Autophosphorylierung auf (Bande bei ca. 61 kDa) und waren somit enzymatisch aktiv. p21 wurde von beiden Pim-1-Konstrukten phosphoryliert (Bande bei ca. 49 kDa).

### 3.4. Endogene Phosphorylierung von p21 am Thr-145 während des Zellzyklus

Um die intrazelluläre Verteilung von endogenem p21 in HeLa Zellen zu untersuchen, wurde das Protein mittels Immunfluoreszenz detektiert. Hierzu wurde ein Antikörper benutzt, der p21 am N-Terminus erkannte. Alle HeLa Zellen, die sich im Moment der Zellfixierung in der Interphase des Zellzyklus befanden, wiesen endogenes p21 ausschließlich im Kern auf (Abb. 38).

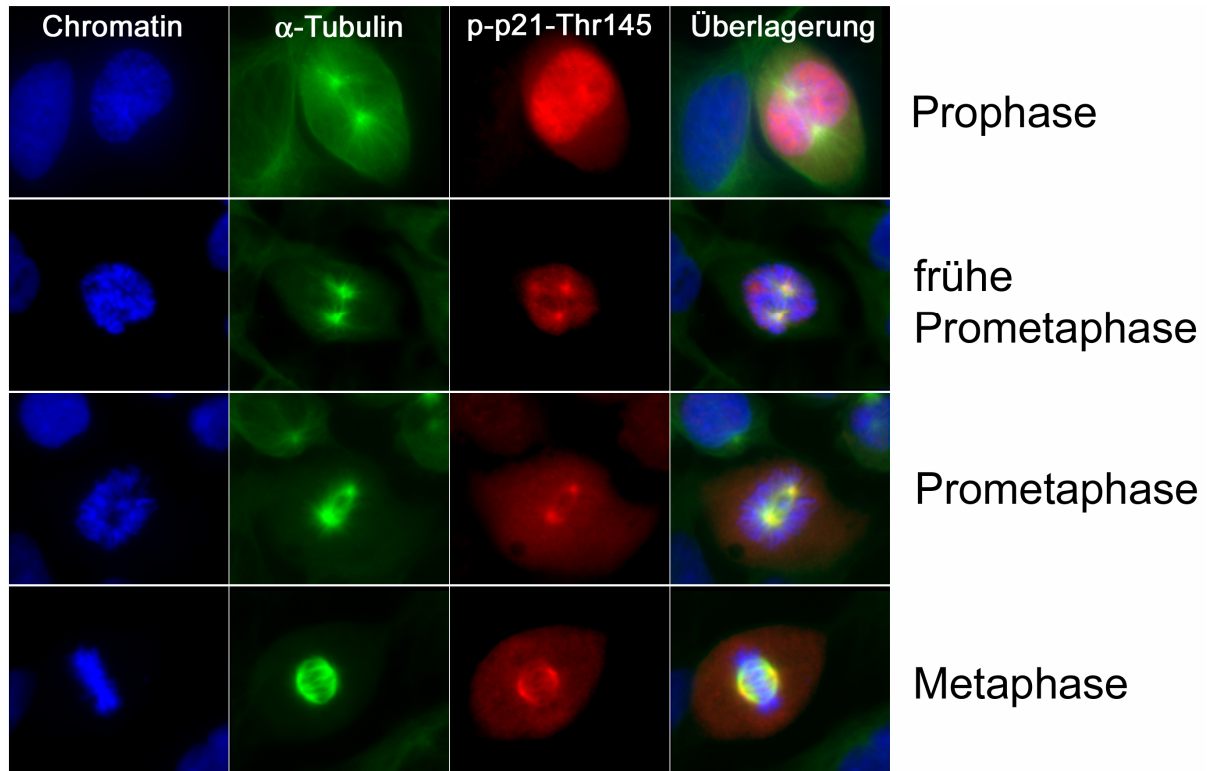


**Abb. 38: Lokalisation von endogenem p21 in HeLa Zellen**

In dieser Abb. ist die intrazelluläre Verteilung von endogenem p21 in HeLa Zellen dargestellt. In Zellen, die sich in der Interphase des Zellzyklus befanden, war p21 ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In mitotischen Zellen war das Protein diffus in den sich abgerundeten Zellen verteilt, wobei Bereiche mit kondensiertem Chromatin ausgespart waren (Pfeile).

Um die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 während des Zellzyklus näher zu untersuchen, wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch das phosphorylierte Epitop (p-Thr-145) von p21 am C-Terminus erkannte. In fixierten HeLa Zellen, die

sich in der Interphase des Zellzyklus befanden, konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz kein phosphoryliertes p21 erkannt werden.

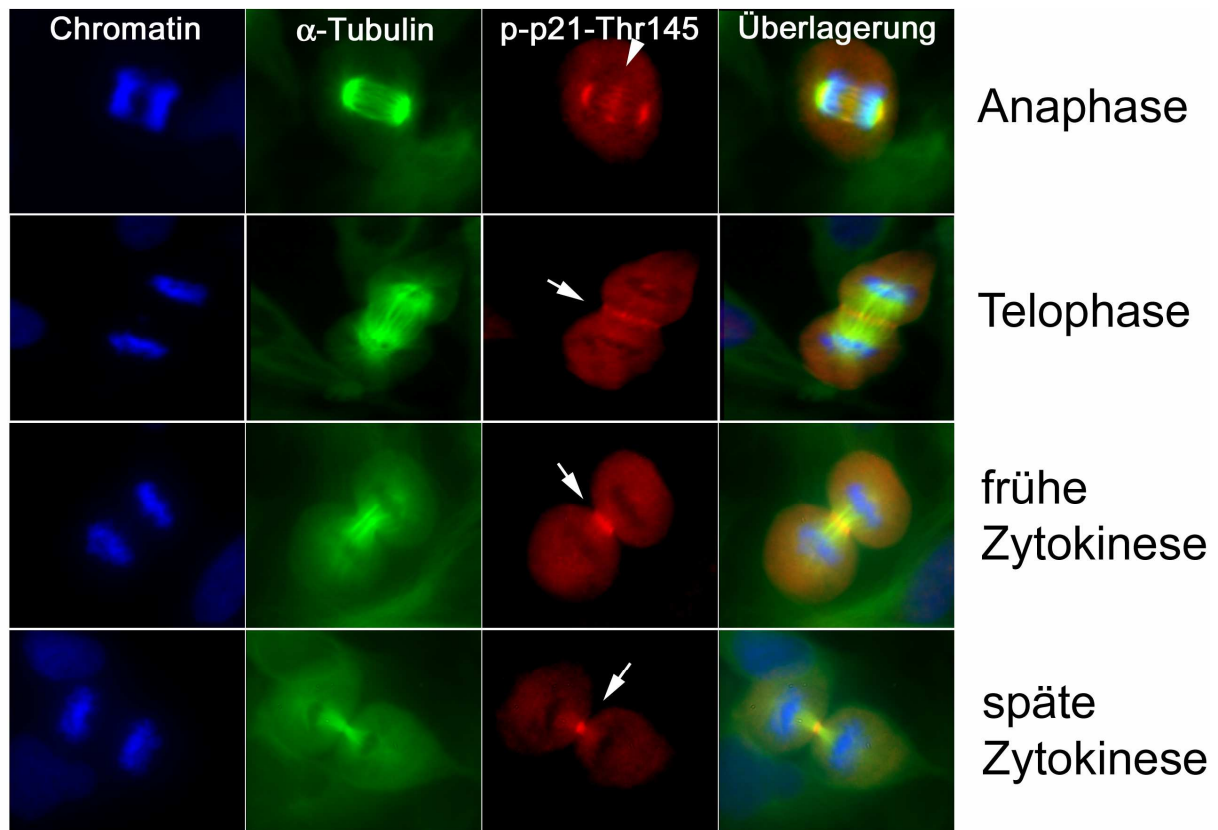


**Abb. 39.a: Lokalisation von endogenem p-p21-Thr145 während der Mitose**

In dieser Abb. ist die intrazelluläre Verteilung von endogenem p-p21-Thr145 in verschiedenen Phasen der Mitose dargestellt. Das am Thr-145 phosphorylierte, endogene p21 und das  $\alpha$ -Tubulin wurden mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert.

Die obere Bildfolge zeigt eine HeLa Zelle in der frühen Prophase. Dies war der früheste Zeitpunkt des Zellzyklus, zu dem endogene p-p21-Thr145-Signale detektiert werden konnten. p-p21-Thr145 war zu dieser Phase diffus im Zellkern verteilt. In der frühen Prometaphase konnte p-p21-Thr145 bereits an den Spindelpolen detektiert werden. Zusätzlich war es aber noch im Bereich des sich auflösenden Zellkerns lokalisiert. Im weiteren Verlauf der Prometaphase war p-p21-Thr145 ausschließlich an den Spindelpolen lokalisiert. In der Metaphase konnte p-p21-Thr145 an den Spindelpolen und an den zur Äquatorialebene ausgerichteten Spindelfasern detektiert werden.





**Abb. 39.b: Lokalisation von endogenem p-p21-Thr145 während der Mitose**

In dieser Abb. ist die intrazelluläre Verteilung von endogenem p-p21-Thr145 in verschiedenen Phasen der Mitose dargestellt. Das am Thr-145 phosphorylierte, endogene p21 und das  $\alpha$ -Tubulin wurden mittels Immunofluoreszenzmarkierung detektiert. Während der Anaphase war p-p21-Thr145 an den Spindelpolen lokalisiert. Zusätzlich konnte es auch in der Äquatorialebene zwischen den sich trennenden Schwesterchromatiden detektiert werden (Pfeilkopf, siehe auch Abb.40). In der nachfolgenden Telophase war p-p21-Thr145 nicht mehr an den Spindelpolen lokalisiert, sondern ausschließlich in der Äquatorialebene im Bereich der Teilungsfurche (Pfeil). Die letzten beiden Bildfolgen zeigen jeweils eine HeLa Zelle in der frühen und späten Zytokinese. p-p21-Thr145 war in diesen Zellen innerhalb der postmitotischen Brücke lokalisiert. In der frühen Zytokinese hatte das p-p21-Thr145 Signal eine linienförmige und zum Ende der Zytokinese eine punktförmige Struktur (Pfeile).

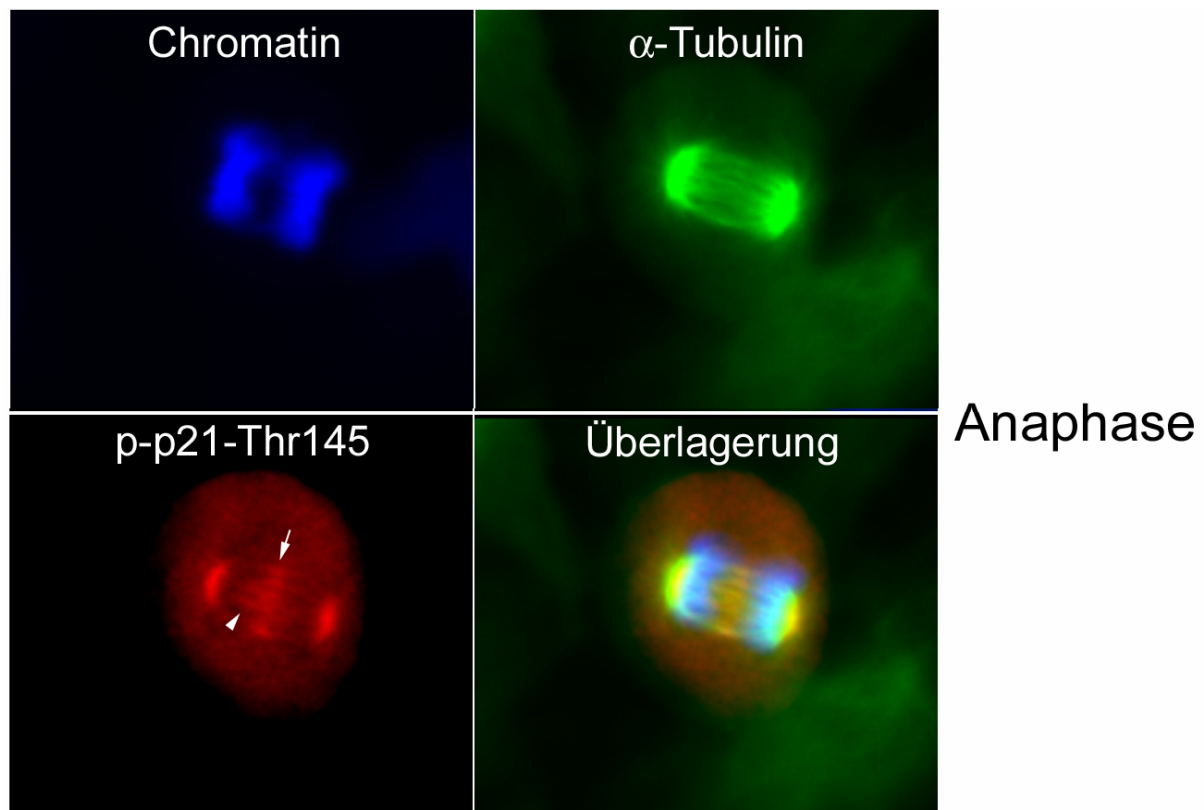
Erst zu Beginn der Mitose wurde endogenes p21 im Zellkern am Thr-145 phosphoryliert (Abb. 39). Um den Zeitpunkt der p21-Phosphorylierung festzulegen, als auch die Abfolge verschiedener Transportvorgänge von phosphoryliertem p21 näher bestimmen zu können, war es notwendig, die einzelnen Phasen der Mitose mithilfe zellulärer Marker zu definieren. Die verschiedenen mitotischen Phasen lassen sich anhand von Veränderung bestimmter zellulärer Strukturen definieren. Der Übergang von der G2-Phase in die mitotische Zellteilung konnte durch zelluläre Umstrukturierungen im Zytosol und im Zellkern erkannt werden. Ein spezifischer Vorgang zu Beginn der Mitose war hierbei die Bildung von polaren Spindelfasern an bzw. zwischen den beiden Zentrosomen und deren auseinanderdriften zu

entgegengesetzten Polen der Zelle (Abb. 39.a, Prophase). Die Translokation der Zentrosomen wurde hierbei durch die stetige Längenzunahme der polaren Spindeln verursacht. Die Zentrosomen bildeten später die Spindelpole während der Mitose. Dieser Prozess konnte durch das Anfärben von  $\alpha$ -Tubulin, einem Bestandteil der Zentrosomen und der Spindelfasern, erkannt werden. Ein weiterer Prozess zu Beginn der Mitose, war die Chromatinkondensation unter Entstehung von Chromosomen. Dies betraf auch die Chromatinschleifen des Nucleolus, der somit zu Beginn der Prophase verschwand. Diese Umstrukturierung der DNA konnte durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 detektiert werden.

In der ersten Bildfolge der Abb. 39.a ist eine HeLa Zelle in der Prophase gezeigt. Die Zentrosomen befanden sich hier noch außerhalb des Zellkerns, der zu diesem Zeitpunkt der Mitose noch intakt war und eine deutliche Kernstruktur aufwies. Innerhalb des Zellkerns konnte die Umstrukturierung des Chromatins hin zu kompakten Chromosomen erkannt werden. In Zellen dieser Phase konnte die Thr-145-Phosphorylierung von p21 (p-p21-Thr145) im Zellkern detektiert werden. Dies war der früheste Zeitpunkt des Zellzyklus, bei dem die p21-Phosphorylierung beobachtet werden konnte. Die Fluoreszenzsignale von p-p21-Thr145 konnten hierbei im gesamten Zellkern detektiert werden, sparten jedoch Bereiche von dicht gepacktem Chromatin aus. Die Verteilung von p-p21-Thr145 innerhalb des Zellkerns während der Prophase, war mit der Lokalisation von p21 in der G2-Phase vergleichbar.

In der frühen Prometaphase konnte p-p21-Thr145 an den Spindelpolen und im Bereich des sich auflösenden Zellkerns detektiert werden (Abb.39.a, frühe Prometaphase). Im weiteren Verlauf der Prometaphase begannen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene der abgerundeten Zelle zwischen den beiden Spindelpolen zu positionieren (Abb. 39.a, Prometaphase). Zu diesem Zeitpunkt konnte p-p21-Thr145 nicht mehr im Zellkern lokalisiert werden, sondern befand sich ausschließlich an den zwei Spindelpolen der Zelle. Die Positionierung der Chromosomen in der Äquatorialebene der sich teilenden Zelle definiert die Metaphase der Mitose (Abb.39.a, Metaphase). Zu diesem Zeitpunkt der Mitose konnte p-p21-Thr145 an den beiden Spindelpolen und an den zur Äquatorialebene ausgerichteten Spindelfasern detektiert werden. In der Anaphase wurden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und jeweils zu einem Pol der Zelle gezogen. Auch in dieser Phase war p-p21-Thr-145 mit den Spindelpolen assoziiert

(Abb. 39.b, Anaphase). Zusätzlich konzentrierte es sich zwischen den sich trennenden Schwesterchromatiden. Hierbei konnte es entlang der Spindelfasern nahe der Äquatorialebene und in einzelnen Bereichen in dieser Ebene detektiert werden (Abb. 40).



**Abb. 40: Lokalisation von endogenem p-p21-Thr145 während der Anaphase**

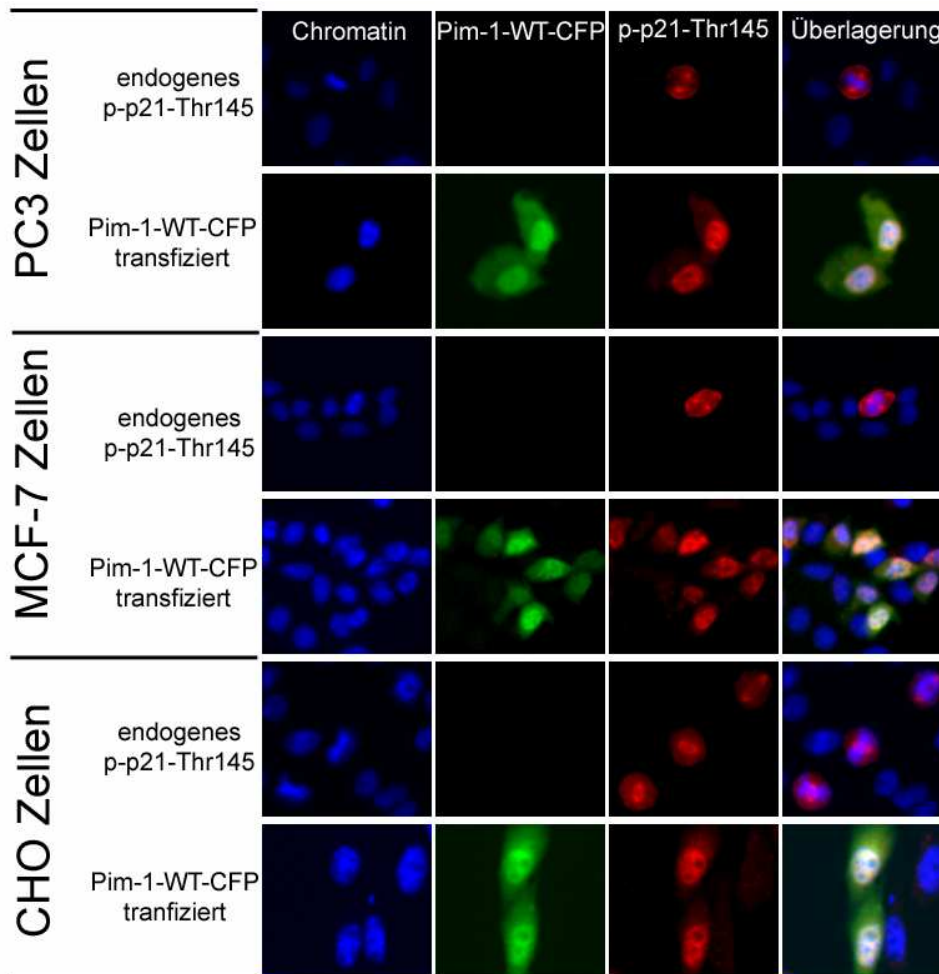
Diese Abb. zeigt eine HeLa Zelle während der Anaphase der Mitose. Die Schwesterchromatiden wurden voneinander getrennt und jeweils zu einem Spindelpol gezogen. Die Spindelfasern ( $\alpha$ -Tubulin-Färbung) verbanden noch die Spindelpole der sich trennenden Tochterzellen. Neben den beiden Spindelpolen und konnte p-p21-Thr145 entlang der Spindelfasern detektiert werden (Pfeilköpfe), wobei es sich in der Äquatorialebene in einzelnen Bereichen konzentrierte (Pfeil).

In der Telophase war p-p21-Thr145 nicht mehr an den Spindelpolen der sich teilenden Zelle zu erkennen. In dieser Phase konnte p-p21-Thr145 als linienförmiges Signal entlang der gebildeten Teilungsfurche detektiert werden (Abb. 39.b, Telophase).

In der frühen Zytokinese war die eigentliche Mitose abgeschlossen. Die Schwesterchromatiden hatten sich vollständig voneinander getrennt und die Kernhüllen begannen sich neu zu strukturieren. Die Teilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen erfolgte durch das langsame Zusammenziehen des kontraktiven Ringes, der in der Telophase gebildet wurde. Während dieses Teilungsprozesses

waren die Tochterzellen noch durch eine immer dünner werdende tubusähnliche Struktur, der mitotischen Brücke, miteinander verbunden. Spindelfasern, die zu diesem Zeitpunkt beide Tochterzellen verbanden, wurden hierbei immer weiter zusammengezogen (Abb. 39.b, Telophase und Zytokinese). In der frühen Zytokinese war p-p21-Thr-145 ausschließlich in einer linienförmigen Struktur zwischen den sich trennenden Schwesterzellen zu erkennen. Durch die linienförmige Struktur des p-p21-Thr-145-Signals zogen sich die Spindelfasern und markieren das Ausmaß der die beiden Schwesterzellen verbindenden mitotischen Brücke (Abb. 39.b, frühe Zytokinese). In der späten Zytokinese war das Fluoreszenzsignal von p-p21-Thr-145 nur noch als punktförmige Struktur zu erkennen (Abb. 39.b, späte Zytokinese). Genau an dieser Stelle waren die beiden Schwesterzellen noch miteinander verbunden. Die verbleibenden Spindelfasern sind an diesem Punkt stark eingeschnürt. Ob die tubusähnliche Verbindung zu diesem Zeitpunkt noch offen oder durch die Einschnürung des kontraktilen Ringes schon geschlossen war, ließ sich aus den vorliegenden Bildern nicht erkennen.

Die von den mitotischen Phasen abhängige Lokalisation von endogenem p-p21-Thr145 konnte ebenfalls in PC3, MCF-7 und CHO Zellen gezeigt werden (Abb. 41). Darüberhinaus wurde in Pim-1-WT-CFP transfizierten PC3, MCF-7 und CHO Zellen generell endogenes p21 im Zellkern am Thr-145 phosphoryliert (Abb.41).

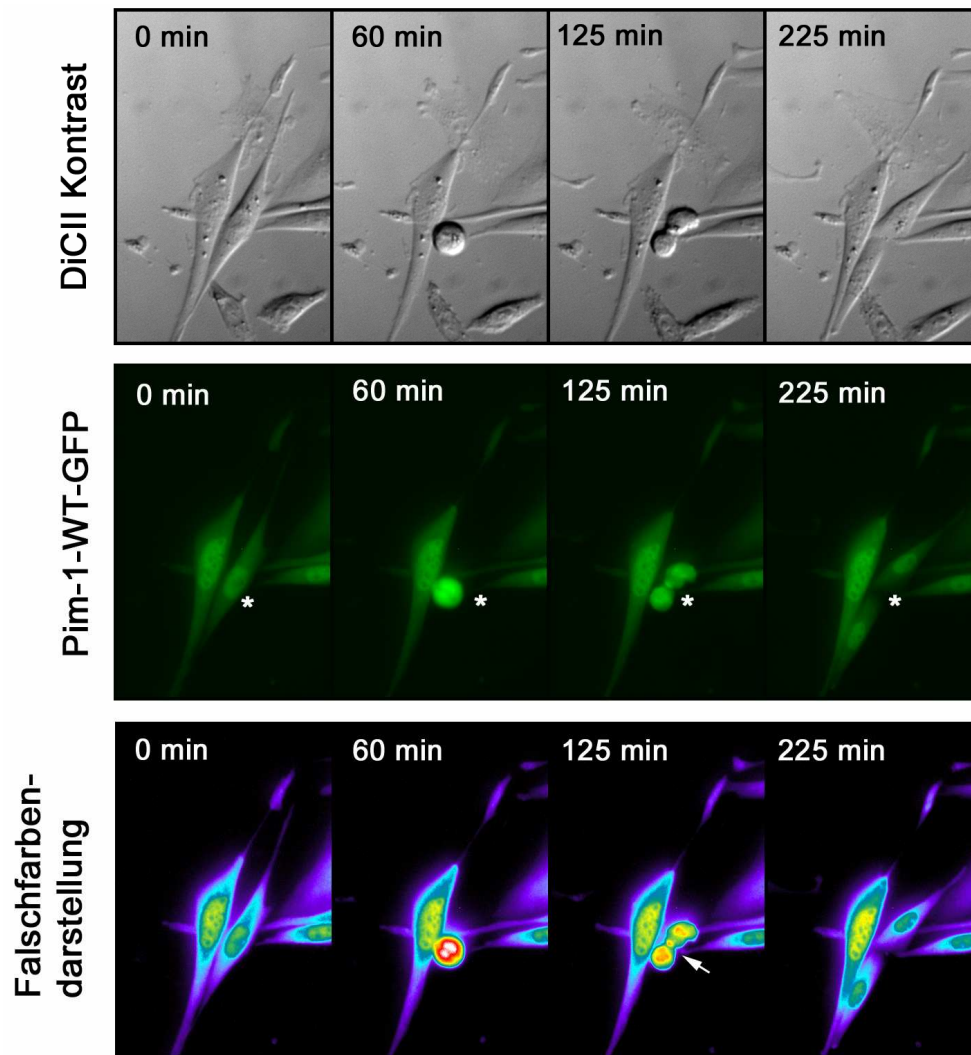


**Abb. 41: p-p21-Thr145 in PC3, MCF-7 und CHO Zellen**

In dieser Abb. ist die Lokalisation von p-p21-Thr145 in Pim-1-WT-CFP transfizierten und nicht transfizierten PC3, MCF-7 und CHO Zellen dargestellt. In nicht transfizierten Zellen (obere Reihe jeder Bildfolge) war endogenes p-p21-Thr145 nur in mitotischen Zellen zu finden. In Pim-WT-CFP transfizierten Zellen wurde generell endogenes p21 im Zellkern am Thr-145 phosphoryliert.

### 3.5. Intrazelluläre Lokalisation von stabil transfiziertem Pim-1-WT-GFP während des Zellzyklus

Um die zellzyklusabhängige Lokalisation von Pim-1 in lebenden Zellen näher untersuchen zu können, wurde das Pim-1-WT-GFP-Fusionskonstrukt stabil in CHO Zellen transfiziert. In Abb. 42 ist eine Lebendzellbeobachtung dieser Zellen über einen Zeitraum von 225 Minuten anhand von Beispielbildern dargestellt. Die Bildfolge zeigt die mitotische Teilung einer stabil transfizierten Zelle (durch \* gekennzeichnet). In der unteren Bildfolge ist die Intensität des Pim-1-WT-GFP-Signals in einer Falschfarbendarstellung („heat map“ Darstellung) gezeigt. Die hier verwendete Falschfarbenskala stellt Signale schwacher Intensität in blauen Farbtönen und Signale starker Intensität in roten Farbtönen dar (weiß bei max. Intensität).

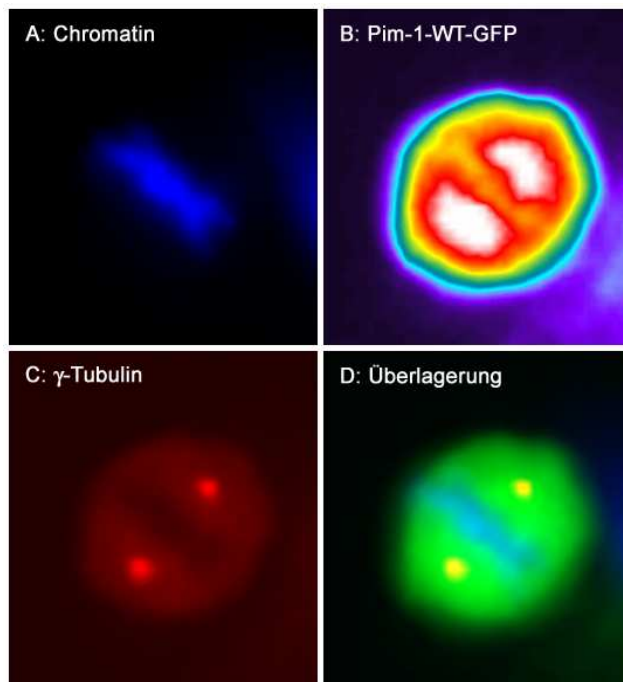


**Abb. 42: Intrazelluläre Verteilung von stabil transfiziertem Pim-1-WT-GFP**

In dieser Abb. ist die intrazelluläre Verteilung von Pim-1-WT-GFP in einer stabil transfizierten CHO Zelle während der Mitose (mit einem \* gekennzeichnet) gezeigt. Die Bildfolgen zeigen Ausschnitte einer Lebendzellbeobachtung. Bei der letzten Bildfolge handelt es sich um eine Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzintensität von Pim-1-WT-GFP. Die Falschfarbenskala stellt Signale schwacher Intensität in blauen Farbtönen und Signale starker Intensität in roten Farbtönen (weiß bei max. Intensität) dar. Während der Mitose konzentrierte sich Pim-1-WT-GFP in definierten intrazellulären Bereichen der abgerundeten Zelle. In der Metaphase (60min) war Pim-1-WT-GFP im Bereich der Spindelpole lokalisiert. Später, in der Zytokinese (125min), konzentrierte sich Pim-1-WT-GFP sowohl in den sich restrukturierenden Zellkernen als auch in der postmitotischen Brücke (Pfeil).

Zu Beginn der Lebendzellbeobachtung (0min) befanden sich die beiden stabil transfizierten CHO Zellen in der Interphase des Zellzyklus. Pim-1-WT-GFP war hier sowohl im Zellkern als auch im Zytosol der Zellen lokalisiert. Im weiteren Verlauf der Beobachtung teilte sich die rechte der beiden Zellen. Nach 60 Minuten befand sich die rechte Zelle in der Mitose. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich zwei Orte stark erhöhter Pim-1-WT-GFP-Konzentration in der sich teilenden Zelle erkennen. Die genaue Lokalisation von Pim-1-WT-GFP während der Mitose einer stabil

transfizierten Zelle konnte zu einem späteren Zeitpunkt an fixierten Zellen festgestellt werden (Abb. 43). Die in Abb. 43 dargestellte stabil transfizierter CHO Zelle in der Metaphase zeigte deutlich, dass Pim-1-WT-GFP jeweils in halbkreisförmigen Strukturen an den Zentrosomen ( $\gamma$ -Tubulinfärbung) um die äquatorial ausgerichteten Chromosomen maximal exprimiert wurde.



**Abb. 43: Lokalisation von stabil transfiziertem Pim-1-WT-GFP in der Metaphase**

Diese Abb. zeigt eine Pim-1-WT-GFP stabil transfizierter CHO Zelle in der Metaphase der Mitose. A: Das Chromatin wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. B: Falschfarbendarstellung der Pim-1-WT-GFP Fluoreszenzintensität. Die Falschfarbenskala stellt Signale schwacher Intensität in blauen Farbtönen und Signale starker Intensität in roten Farbtönen (weiß bei max. Intensität) dar. C: Mithilfe einer  $\gamma$ -Tubulinfärbung wurden die Zentrosomen sichtbar gemacht. D: Überlagerung von Bild A, B und C. Pim-1-WT-GFP konzentrierte sich in zwei halbkreisförmigen Bereichen zwischen den Zentrosomen und der Äquatorialebene der abgerundeten Zelle.

Nach 125 Minuten befand die sich teilende Zelle, die in der Lebendzellbeobachtung gezeigt wurde, in der Zytokinese (Abb. 42). Hier konnte beobachtet werden, dass sich Pim-1-WT-GFP in den sich reorganisierenden Zellkernen der beiden Schwesterzellen konzentrierte. Zusätzlich konnte eine erhöhte Signalintensität von Pim-1-WT-GFP innerhalb der postmitotischen Brücke erkannt werden (Abb. 42, Pfeil).

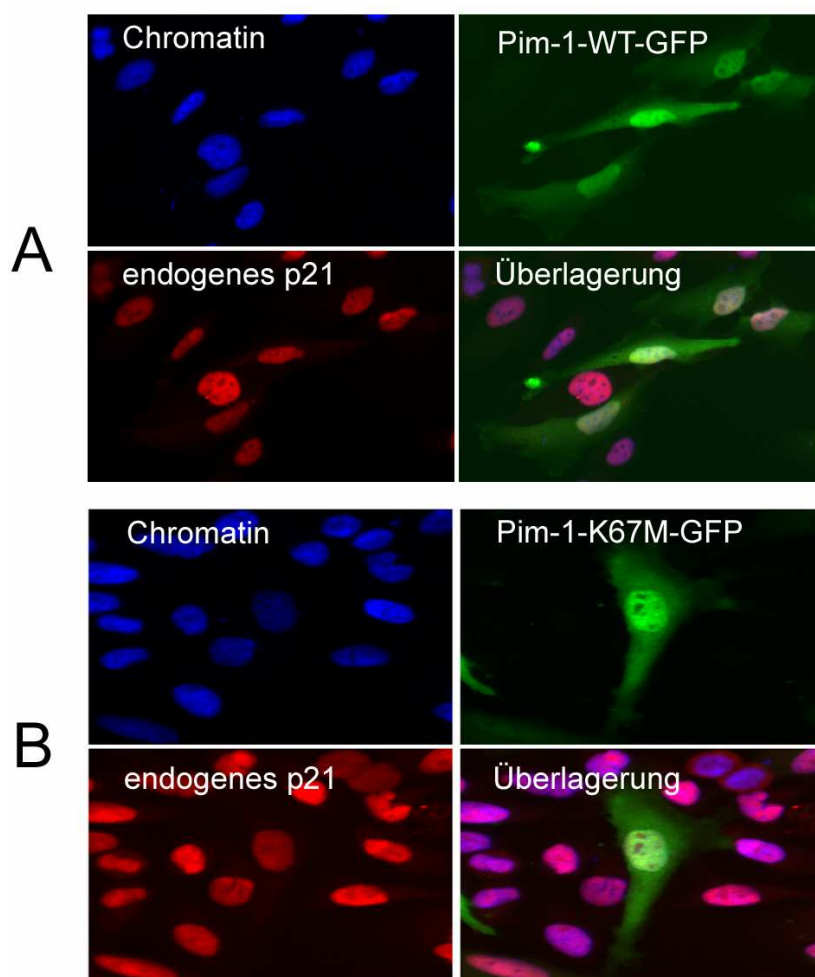
Diese Ergebnisse zeigen, dass Pim-1-WT-GFP während der Mitose zwischen verschiedenen Kompartimenten der sich teilenden Zelle translozierte.

### 3.6. Zelluläre Effekte der Pim-1-Transfektion

Die Phosphorylierung von p21 durch in Tumoren überexprimierte Kinasen sind (z.B. Pim-1 in Prostatakarzinomzellen), kann die Funktionen von p21 beeinflussen und so zur Entartung von normalen Zellen zu Tumorzellen führen. In diesem Kapitel wird der Einfluss einer erhöhten Expression von Pim-1 auf endogenes p21 beschrieben.

#### 3.6.1. Phosphorylierung von p21 durch Pim-1

Zunächst wurde die Verteilung von endogenem p21 in transfizierten HeLa Zellen untersucht.



**Abb. 44: Lokalisation von endogenem p21 in Pim-1-GFP transfizierten Zellen**

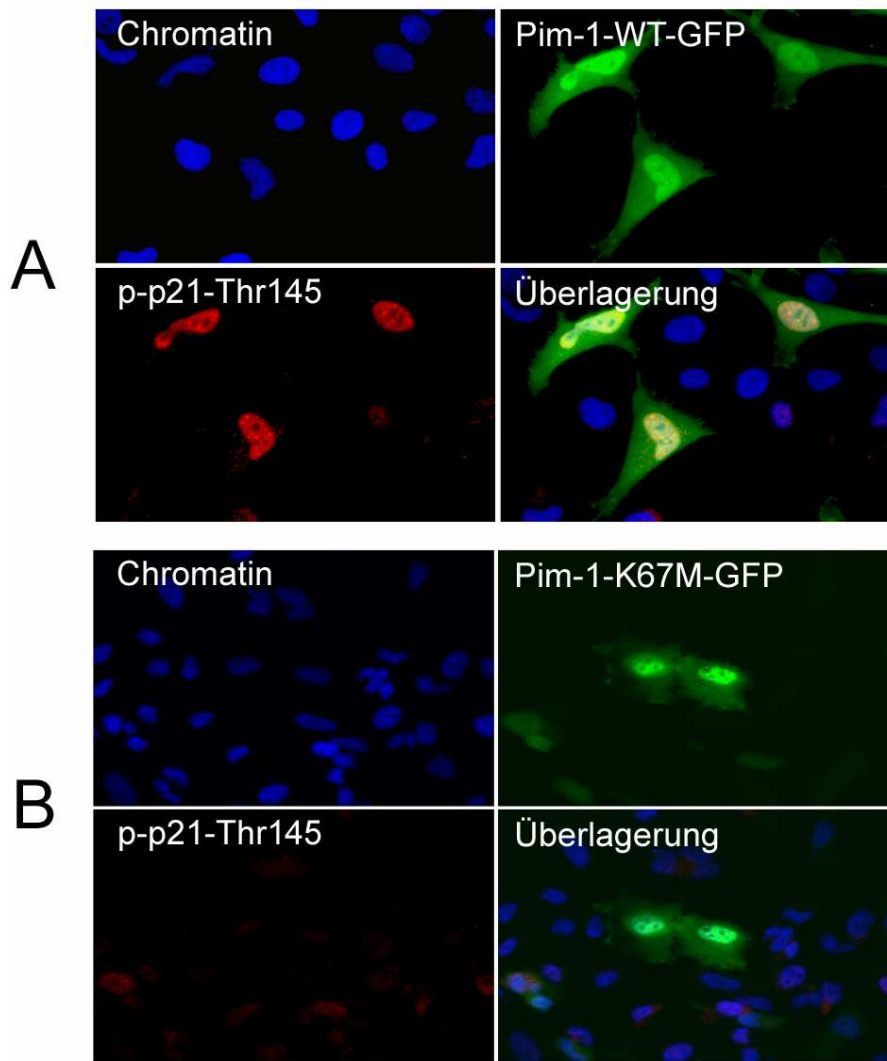
In dieser Abb. wird die intrazelluläre Verteilung von endogenem p21 in Pim-1-WT-GFP (A) und Pim-1-K67M-GFP (B) transfizierten HeLa Zellen gezeigt. Sowohl Zellen, die die aktive Variante Pim-1-WT-GFP exprimierten als auch Zellen, die die inaktive Variante Pim-1-K67M-GFP exprimierten und Zellen, die nicht transfiziert waren, wiesen endogenes p21 im Zellkern auf.



Hierzu wurde ein Antikörper verwendet, der ein Epitop am N-Terminus von p21 erkannte. Für die Transfektionsexperimente wurden die Plasmidvektoren der Fusionsproteine Pim-1-WT-GFP und Pim-1-K67M-GFP (Abb. 44 und 46-B) verwendet.

Alle abgebildeten Zellen, die sich in der Interphase des Zellzyklus befanden, zeigten p21-Fluoreszenzsignale in den Zellkernen, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgespart waren. (Abb. 44, siehe auch Abb. 38). Die Verteilung von endogenem p21 in transfizierten und nicht transfizierten Zellen wurde unter Verwendung der HCA-Technologie statistisch analysiert. Der für die Auswertung entwickelte Bildanalysealgorithmus bestimmte zunächst die Anzahl und Position aller Zellen anhand der Chromatinfärbung. Danach wurden alle transfizierten und nicht transfizierten Zellen im Bildausschnitt unterschieden und die Kernlokalisierung von endogenem p21 bestimmt. Es war dadurch möglich, alle Zellen eines Experiments, transfizierte und nicht transfizierte, unter gleichen Versuchsbedingungen miteinander zu vergleichen. Insgesamt wurden 1400 bis 2400 Zellen pro Transfektionsexperiment auf Einzelzellebene evaluiert. Die Auswertung ergab, dass alle transfizierten sowie alle nicht transfizierten HeLa Zellen in der Interphase endogenes p21 im Zellkern aufwiesen (Abb. 46-B).

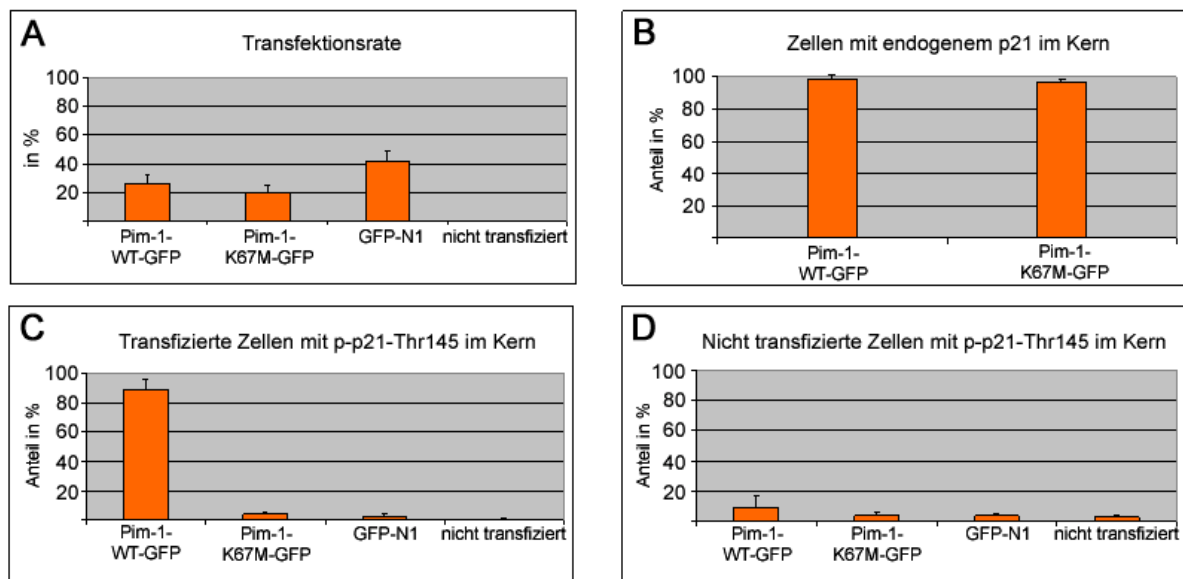
Im folgenden Experiment wurde die Phosphorylierung von endogenem p21 in transfizierten und nicht transfizierten HeLa Zellen untersucht (Abb. 45). Hierzu wurde ein Antikörper benutzt, der die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 markierte. Für die Transfektionsexperimente wurden die Plasmidvektoren der Fusionsproteine Pim-1-WT-GFP und Pim-1-K67M-GFP sowie der Leervektor GFP-N1 als Kontrolle benutzt. Auch diese Transfektionsexperimente wurden mithilfe der HCA-Methode statistisch ausgewertet. Der hierbei verwendete Bildanalysealgorithmus ist in seinem Aufbau mit dem oben beschriebenen Verfahren vergleichbar, nur erkennt er anstelle von endogenem p21 am Thr-145 phosphoryliertes p21. Insgesamt wurden jeweils ca. 30.000 Zellen pro Transfektionsexperiment auf Einzelzellebene ausgewertet.



**Abb. 45: Lokalisation von p-p21-Thr145 in Pim-1-GFP transfizierten Zellen**

In dieser Abb. ist die Verteilung von p-p21-Thr145 in Pim-WT-GFP (A) und in Pim-1-K67M-GFP (B) transfizierten HeLa Zellen dargestellt. Alle transfizierten Zellen befanden sich in der Interphase des Zellzyklus. Nur die Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen zeigten p-p21-Thr145-Signale im Zellkern (A).

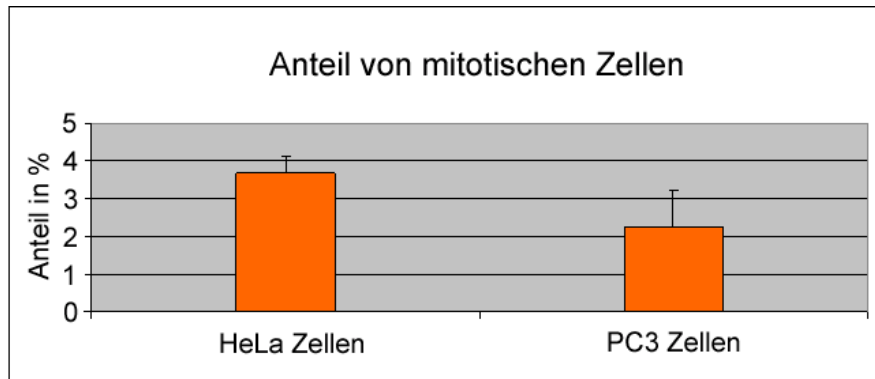
Die Transfektion von HeLa Zellen mit dem enzymatisch aktiven Pim-1-WT-GFP-Konstrukt führte zur Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr-145 (Abb. 45-A). In ca. 90% der Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen konnte am Thr-145 phosphoryliertes p21 in den Zellkernen detektiert werden (Abb. 46-C). Die p-p21-Thr145-Färbung erstreckte sich über die gesamte Kernfläche transfizierter Zellen. Die Bereiche der Nukleoli waren ausgespart. Die Transfektion mit dem enzymatisch inaktiven Pim-1-K67M-GFP-Konstrukt führte hingegen nicht zu einer bemerkenswerten Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr-145 (Abb. 45-B). Nur ca. 4-6% der Pim-1-K67M-GFP transfizierten Zellen zeigten p-p21-Thr-145-Signale (Abb. 46-C).



**Abb. 46: Quantitative Auswertung der p21-Phosphorylierung durch Pim-1**

In dieser Abb. ist die quantitative Auswertung der Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1 dargestellt. Ausgewertet wurden HeLa Zellen, die entweder mit Pim-1-WT-GFP, Pim-1-K67M-GFP oder GFP-N1 transfiziert waren bzw. nicht transfiziert waren. A: Diese Grafik zeigt Transfektionsraten aller vier Transfektionsansätze. Das Kontrollexpressionsplasmid GFP-N1 zeigte hierbei eine Transfektionsrate von 40%, wohingegen die beiden Pim-1-GFP-Expressionsplasmide eine Rate von 20% aufwiesen. B: Diese Grafik zeigt den Anteil an Pim-1-WT-GFP und Pim-1-K67M-GFP transfizierten Zellen mit endogenem p21 im Zellkern. In allen Pim-1-WT-GFP und Pim-1-K67M transfizierten Zellen konnte endogenes p21 zu nahezu 100% im Zellkern detektiert werden. C: In dieser Grafik ist der Anteil an transfizierten Zellen, die p-p21-Thr145-Signale im Zellkern aufwiesen, dargestellt. Ca. 90% der Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen wiesen p-p21-Thr-145 im Zellkern auf. D: In dieser Auswertung sind nur die nicht transfizierten Zellen eines jeden Transfektionsexperimentes berücksichtigt. Nur ca. 4-6% aller nicht transfizierten Zellen wiesen p-p21-Thr145-Signale auf. Für jedes Transfektionsexperiment wurden ca. 30.000 Zellen ausgewertet.

HeLa Zellen, die nicht transfiziert waren, zeigten p-p21-Thr145-Signale ebenfalls in ca. 4-6% der Zellen (Abb. 46-D). Bei einem nachfolgenden Experiment konnte ermittelt werden, dass dieser Wert genau dem Anteil an mitotischen Zellen entspricht, den nicht synchronisierte HeLa Zellen einer Zellkultur unter den verwendeten Kulturbedingungen aufweisen (Abb. 47).

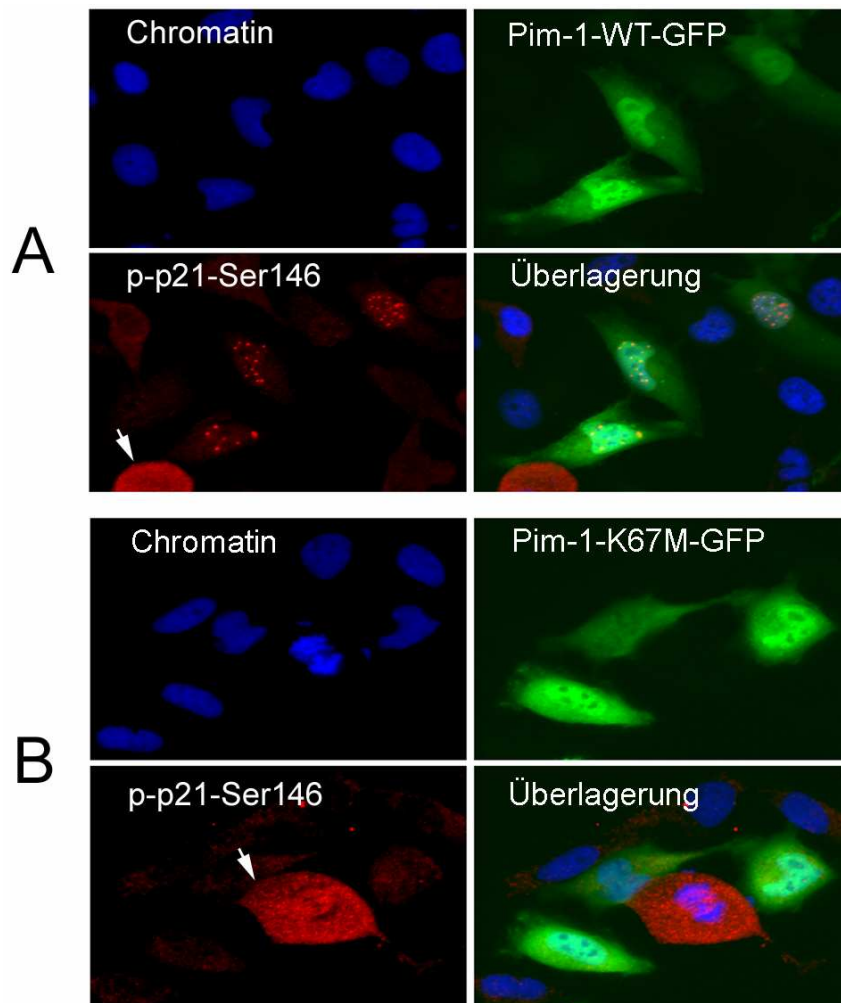


**Abb. 47: Anteil von mitotischen Zellen in einer HeLa und PC3 Zellkultur**

In dem Experiment dieser Abb. wurde der Anteil von mitotischen Zellen einer nicht synchronisierten HeLa und PC3 Zellkultur bestimmt. Als Marker für mitotische Zellen diente ein Antikörper, der das am Ser-10 phosphorylierte Epitop von Histon-H3 detektierte. HeLa Zellen wiesen hierbei einen Anteil von 4% und PC3 Zellen einen Anteil von ca. 2-3% auf.

Die Transfektion mit dem Kontrollplasmid GFP-N1 beeinflusste weder die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von p21 am Thr-145 in mitotischen Zellen noch verursachte sie die Phosphorylierung von p21 in transfizierten Zellen (Abb. 46-C und -D). Die p-p21-Thr145-Signale dieser Zellpopulation konnten ausschließlich in 4-6% der Zellen detektiert werden. Der Anteil mitotischer Zellen lag auch bei 4-6%. Somit konnte gezeigt werden, dass das autofluoreszente GFP die Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr-145 nicht beeinflusste.

Im folgenden Experiment wurde gezeigt, dass bei Erhöhung des Pim-1-Expressionslevels zusätzlich zur Phosphorylierung des Thr-145 auch das Ser-146 von p21 phosphoryliert wurde (Abb. 48). Hierzu wurde ein Antikörper verwendet, der die Phosphorylierung von p21 am Ser-146 über ein spezifisches Epitop am C-Terminus von p21 erkannte. Für die Transfektionsexperimente wurden die Plasmidvektoren der Fusionsproteine Pim-1-WT-GFP und Pim-1-K67M-GFP sowie der Leervektor GFP-N1 als Kontrolle benutzt.



**Abb. 48: Lokalisation von p-p21-Ser146 in Pim-1-GFP transfizierten Zellen**

Diese Abb. zeigt die Verteilung von p-p21-Ser146 in Pim-1-WT-GFP und in Pim-1-K67M-GFP transfizierten HeLa Zellen. Nur die Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen zeigten p-p21-Ser146-Signale im Zellkern. Diese Signale waren im Gegensatz zu den p-p21-Thr145-Signalen nicht diffus im Zellkern verteilt, sondern in mehreren diskreten Punkten im Zellkern konzentriert. Ausschließlich mitotische Zellen der nicht transfizierten Subpopulation zeigten diffuse p-p21-Ser146-Signale (Pfeil).

Nicht transfizierte Zellen zeigten, dass nur mitotische Zellen die Ser-146-Phosphorylierung von p21 aufwiesen (Abb. 48, Pfeil). HeLa Zellen, die mit Pim-1-WT-GFP transfiziert wurden, zeigten alle deutliche p-p21-Ser146 Signale in den Zellkernen (Abb. 48-A). Der Phänotyp dieser Fluoreszenzfärbung unterschied sich jedoch stark vom Phänotyp der p-p21-Thr145-Färbung in Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen. Die p-p21-Ser146-Signale verteilten sich nicht wie die p-p21-Thr145-Signale diffus über den gesamten Zellkern, sondern waren in einzelnen Punkten im Zellkern lokalisiert. Die Transfektion mit der enzymatisch inaktiven Variante Pim-1-K67M hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von endogenem p21 am Ser-146 (Abb. 48-B).

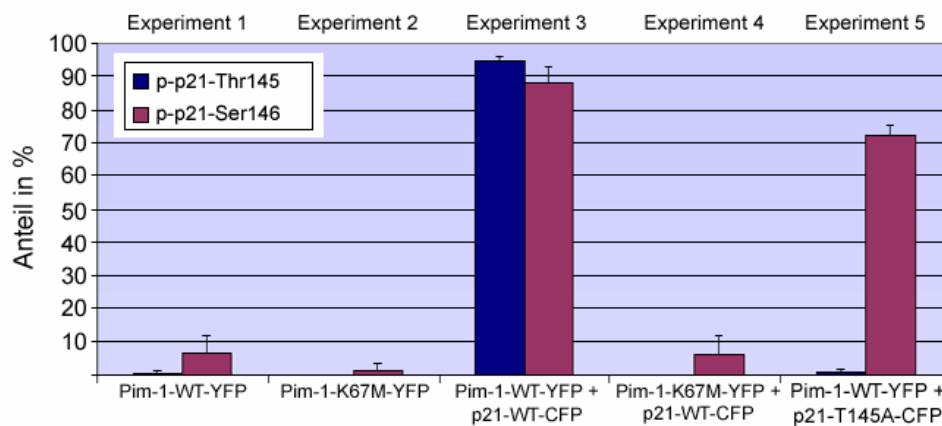
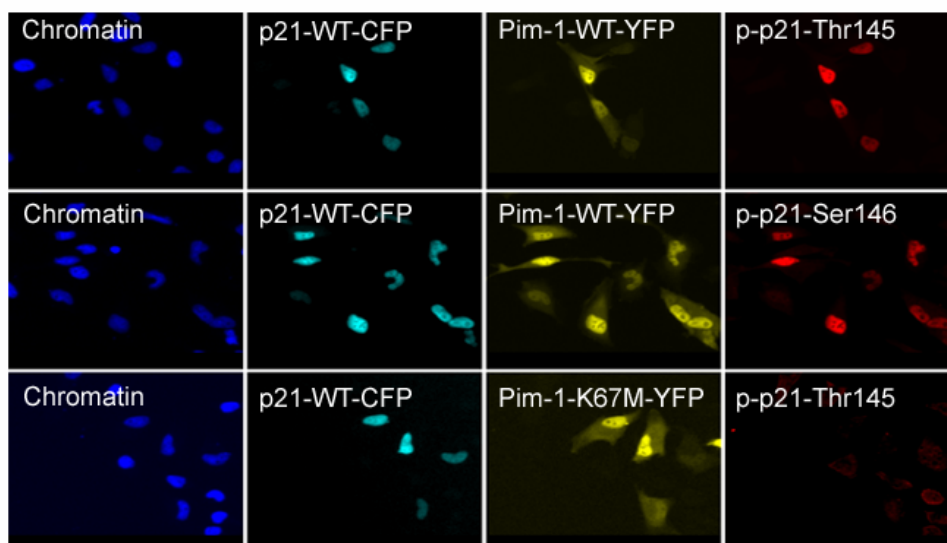
Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die Erhöhung des Expressionslevels von enzymatisch aktiven Pim-1 in eukaryotischen Zellen zu einer Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr-145 und am Ser-146 führte. Im Gegensatz zur nativen zellzyklusabhängigen Phosphorylierung, wurde p21 von Pim-1-WT-GFP, mitoseunabhängig, während der Interphase des Zellzyklus phosphoryliert.

### **3.6.2. Kontrolle der p-p21-Thr145- und p-p21-Ser146-Antikörper**

In diesem Experiment wurde überprüft, ob die verwendeten Antikörper die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 und am Ser146 epitopspezifisch erkennen können (Abb. 49). Hierzu wurden HeLa Zellen mit den Plasmidkonstrukten Pim-1-WT-YFP, Pim-1-K67M-YFP, p21-WT-CFP und p21-T145A-CFP transfiziert bzw. kotransfiziert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von transient transfizierten p21-CFP am Thr-145 und am Ser-146 bestimmt. Für die statistische Auswertung dieses Experiments wurde ein Bildanalysealgorithmus entwickelt, der die Gesamtkernzahl bestimmte, transfizierte Zellen detektierte, Expressionslevel klassifizierte und die Phosphorylierung von transientem p21-CFP am Thr-145 oder am Ser-146 erkannte. Die Fluoreszenzsignale der endogenen p21-Phosphorylierung konnten aufgrund schwacher Signalintensität von den Fluoreszenzsignalen der transienten p21-CFP-Konstrukte deutlich unterschieden werden und wurden bei diesem Algorithmus ausgeschlossen (siehe Kapitel 2.4.3, Abb. 13).

Die Grafik in Abb. 49-A zeigt, dass transientes p21-WT-CFP von kotransfiziertem Pim-1-WT-YFP sowohl am Thr-145 als auch am Ser-146 phosphoryliert wurde (Experiment 3). Enzymatisch inaktives Pim-1-K67M-YFP war nicht in der Lage p21-WT-CFP zu phosphorylieren (Experiment 4). Bei der Kotransfektion von Pim-1-WT-YFP und p21-T145A-CFP konnte p-p21-Ser146 nach Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden (Experiment 5). Bei diesem Experiment wurde kein p-p21-Thr145-Signal nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der p-p21-Thr145-Antikörper spezifisch sein Epitop auf p21 erkannte und nicht unspezifisch band.

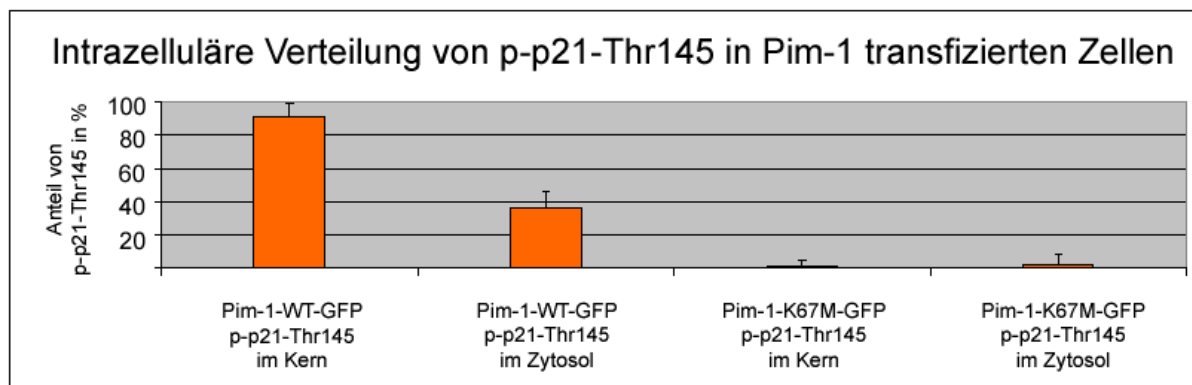
**A** Phosphorylierung von p21-CFP durch Pim-1-GFP**B** Darstellung von Experiment 3 und 4 anhand von Beispielbildern**Abb. 49: Epitopspezifität der anti-p-p21-Thr145- und anti-p-p21-Ser146-Antikörper**

Im Experiment dieser Abb. wurde die spezifische Erkennung des p-p21-Thr145-Epitops und des p-p21-Ser146-Epitops durch Antikörpermarkierung überprüft. Hierzu wurden HeLa Zellen mit den in A angegebenen Pim-1-AFP- und p21-AFP-Konstrukten (ko-)transfiziert und die Phosphorylierung der transienten p21-CFP Fusionsproteine gemessen. Der verwendete Bildanalysealgorithmus (siehe 2.4.3) berücksichtigte nur die Phosphorylierung von p21-CFP, nicht aber die Phosphorylierung von endogenem p21 (siehe Abb. 13). In 90% der mit Pim-1-WT-YFP/p21-WT-CFP kotransfizierten Zellen (Experiment 3) wurde transientes p21-WT-CFP am Thr145 und am Ser146 phosphoryliert. Die enzymatisch inaktive Variante Pim-1-K67M-YFP war nicht in der Lage p21-WT-CFP zu phosphorylieren (Experiment 4). Das p21-T145A-CFP-Konstrukt konnte nur am Ser-146 phosphoryliert werden (Experiment 5). Die drei Bildfolgen (B) zeigen beispielhaft die Fluoreszenzsignale der Pim-1-YFP/p21-CFP Kotransfektionen.

### 3.6.3. Intrazelluläre Lokalisation von p-p21-Thr145

In diesem Experiment wurde die intrazelluläre Lokalisation von endogenem p21 in Abhängigkeit der Thr-145 Phosphorylierung untersucht (Abb. 50).

Hierzu wurde zunächst ein Bildanalysealgorithmus entwickelt, der phosphoryliertes p21 erkennen konnte und zwischen der Lokalisation im Zellkern und im Zytosol unterschied. HeLa Zellen wurden entweder mit Pim-1-WT-GFP, oder mit Pim-1-K67M-GFP transfiziert. Die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 wurde über Antikörpermarkierung detektiert.



#### Abb. 50: Translation von p-p21-Thr145

In dieser Abb. ist die intrazelluläre Verteilung von endogenem p-p21-Thr145 in Pim-1-WT-GFP transfizierten HeLa Zellen dargestellt. Es wurde zwischen der p-p21-Thr145-Lokalisation im Zellkern und im Zytosol unterschieden. Ca. 90% der Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen wiesen p-p21-Thr145 im Zellkern auf. In ca. 40% der transfizierten Zellen führte die Phosphorylierung von p21 zu einer Translokation vom Zellkern in das Zytosol, wie sie sonst nur bei mitotischen Zellen vorkam (siehe Abb.39). Pim-1-K67M-GFP war nicht in der Lage endogenes p21 am Thr-145 zu phosphorylieren. Weder im Zellkern noch im Zytosol wurden verstärkte p-p21-Thr145-Signale detektiert.

In über 90% der Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen konnte p-p21-Thr145 im Zellkern detektiert werden (Abb. 50). Ca. 40% dieser Zellen zeigten p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale zusätzlich im Zytosol. Pim-K67M-GFP transfizierte Zellen hatten weder im Zellkern noch im Zytosol erhöhte p-p21-Thr145-Signale. Hier wurde nur in 3-5% der Zellen p-p21-Thr145 detektiert. Dies entspricht der durchschnittlichen Anzahl an mitotischen Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Erhöhung der Pim-1-WT-GFP-Expression in HeLa Zellen zur Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr-145 im Zellkern und zur Erhöhung der zytosolischen p-p21-Thr145-Konzentration führte.

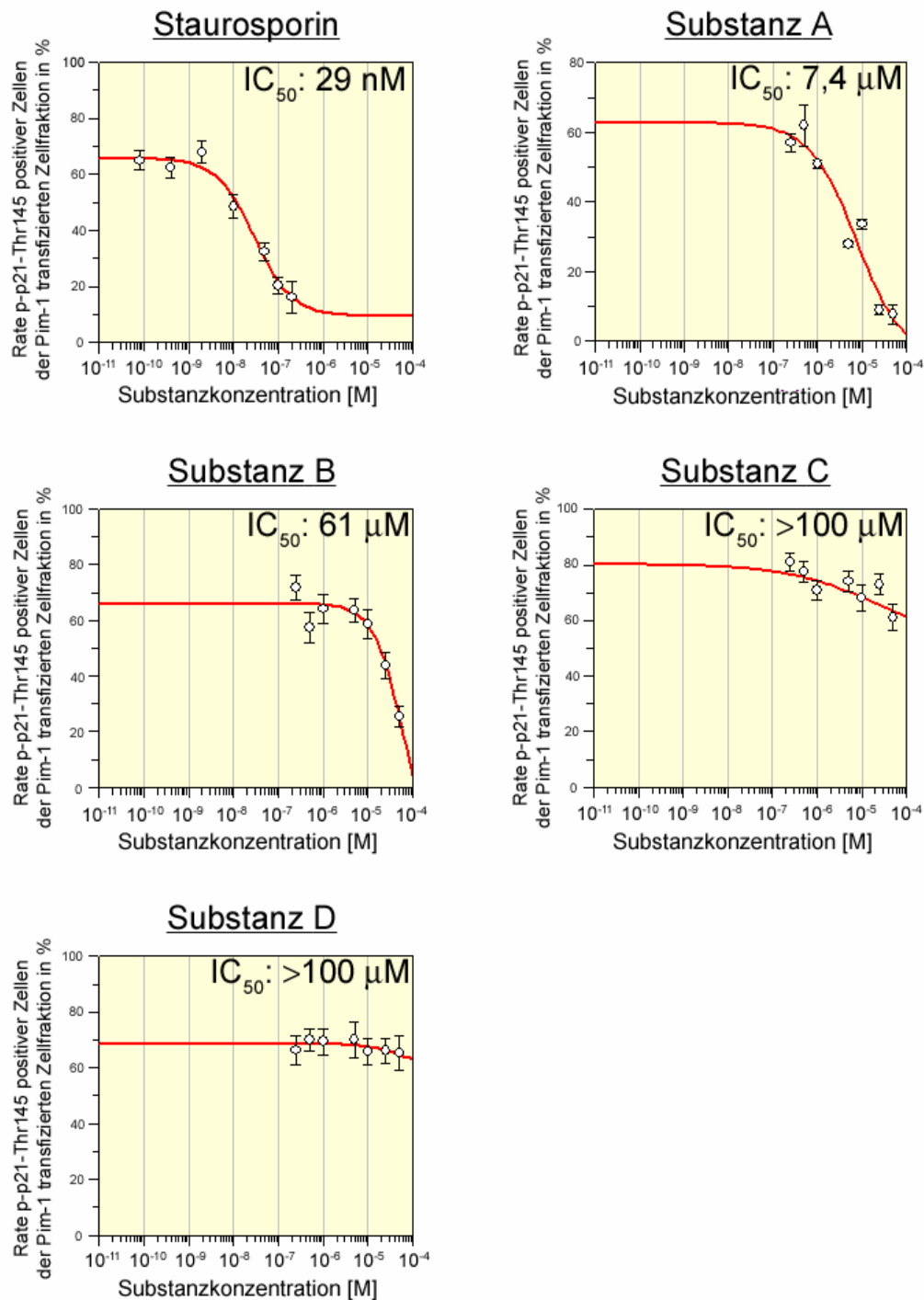


#### 3.6.4. Test von potentiellen Pim-1-Inhibitoren

In einem HCA Experiment wurde die Wirkung von potentiellen Pim-1-Inhibitoren untersucht. Als Maß für die Pim-1-WT-GFP-Enzymaktivität wurde die Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 in lebenden Zelle verwendet und anschließend statistisch ausgewertet. Zum Vergleich wurden dieselben Substanzen nachfolgend in einem biochemischen Experiment getestet. Hierbei wurde der Effekt der fünf Substanzen auf die Phosphorylierung eines Substratpeptids durch Pim-1 gemessen und die jeweiligen  $IC_{50}$  Werte bestimmt (siehe Anhang 6.1).

Als Referenzsubstanz wurde der Kinaseinhibitor Staurosporin verwendet. Im zellulären Experiment konnte diese Substanz die p21-Phosphorylierung mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 29nM inhibieren. Der biochemische Test von Staurosporin ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von ca. 2,4nM (siehe Anhang 6.1). Die Substanz A konnte ebenfalls die Phosphorylierung von p21 inhibieren, jedoch erst mit einem  $IC_{50}$  Wert von 7,4 $\mu$ M. Von den vier getesteten potentiellen Pim-1-Inhibitoren war sie die wirksamste Substanz. Der entsprechende biochemische Test ergab für die Substanz A einen  $IC_{50}$ -Wert von ca. 170nM (siehe Anhang 6.1). Somit war Substanz A auch im biochemischen Vergleichsexperiment der wirksamste der vier getesteten Pim-1-Inhibitoren. Die Substanz B konnte im zellulären Experiment erst bei hohen Konzentrationen inhibieren. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 61 $\mu$ M war dieser weit aus höher als der im biochemischen Experiment ermittelte Wert von 1,1 $\mu$ M (siehe Anhang 6.1). Die Substanzen C und D hatten nur noch eine sehr schwache bzw. keine Wirkung auf die Pim-1-WT-GFP-Enzymaktivität. Weder im zellulären noch im biochemischen Experiment konnten  $IC_{50}$ -Werte bestimmt werden.

Sowohl der biochemische als auch der zelluläre, experimentelle Ansatz zeigten die selbe Rangordnung der Substanzen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung. Die  $IC_{50}$ -Werte unter zellulären Bedingungen waren jedoch weitaus höher, als die des biochemischen Experiments.



**Abb. 51: Test von potentiellen Pim-1-Inhibitoren im HCA-Experiment**

In diesem HCA-Experiment wurde die Wirkung von ausgewählten Substanzen auf die Pim-1-WT-GFP-Enzymaktivität untersucht. Als Maß für die Enzymaktivität wurde die Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 in HeLa Zellen verwendet und anschließend statistisch ausgewertet. Staurosporin, ein bekannter Kinaseinhibitor, zeigte eine deutliche Reduktion der p21-Phosphorylierung. Bei steigender Konzentration von 0,08nM-200nM fiel die Rate von p-p21-Thr145 positiven Zellen in der Pim-1-WT-GFP-Zellfraktion von ca. 65% auf 15%. Es wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 29nM bestimmt. Die folgenden vier Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 0,25-50μM getestet. Die Substanz A ergab einen IC<sub>50</sub> Wert von 7,4μM und ist damit der effizienteste der vier getesteten potentiellen Pim-1-Inhibitoren. Die Substanz B wirkte weitaus schwächer. Es konnte ein IC<sub>50</sub> Wert von 61μM ermittelt werden. Die Substanz C zeigte kaum Inhibition und es konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden. Die Substanz D zeigte im eingesetzten Konzentrationsbereich keine Wirkung.