

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird erstmalig eine noch unbekannte zellzyklusabhängige Phosphorylierung des zytostatischen CDK-Inhibitors p21 vorgestellt. p21 wird hierbei zu Beginn der Mitose im Zellkern am Thr-145 phosphoryliert. Es konzentriert sich im weiteren Verlauf der Mitose in spezifischen Kompartimenten der sich teilenden Zelle. Nach anfänglicher, diffuser Verteilung innerhalb des Zellkerns (Prophase) ist es im weiteren Prozess der Mitose ausschließlich an den Spindelpolen (Prometa- und Metaphase), später jedoch nur noch an der Teilungsfurche (Telophase) und im Bereich des kontraktiven Ringes (Zytokinese) zu detektieren. In eukaryotischen Zellen während der Interphase ist p21 nicht phosphoryliert. Die spezifische, zeitabhängige Lokalisation an den Spindelpolen und später im Bereich des kontraktiven Rings lassen auf verschiedene Funktionen schließen, die p-p21-Thr145 im Prozess der Mitose erfüllt. Bisherige Arbeiten beschreiben die induzierte Phosphorylierung von p21 am Thr-145 nach Substanzbehandlung oder Proteintransfektion in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus. Hierbei konnte eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden. Aufgrund der vorliegenden Daten muss also zwischen der zellzyklusabhängigen Phosphorylierung von p21 in der Mitose und der induzierten Phosphorylierung während der Interphase unterschieden werden.

Die induzierte Phosphorylierung kann durch Fehlregulationen von Kinasen verursacht werden, deren Überexpression in verschiedenen Tumorarten festgestellt wurde. Zu diesen Kinasen gehört Pim-1. Um die Interaktion zwischen Pim-1 und p21 in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden beide mit autofluoreszierenden Proteinen markiert. Zunächst wurden die p21- und Pim-1-spezifischen Funktionen der Fusionsproteine in biochemischen und zellbasierten Experimenten überprüft. In anschließenden Transfektionsstudien konnte die Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-WT-GFP im Zellkern eukaryotischer Zellen festgestellt werden. Die Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-WT-GFP führte zudem zu einer Translokation von p-p21-Thr145 in das Zytosol. Hier kann es an den Mitochondrien mit Procaspase-3 interagieren und so den Fas-vermittelten Apoptoseweg inhibieren. Die induzierte, unkontrollierte Phosphorylierung des zytostatischen Zellzyklusinhibitors p21 durch erhöhte Pim-1-Enzymaktivität, kann so eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf die Zelle haben und deren unkontrolliertes Wachstum fördern.

Zusätzlich wird in der vorliegenden Studie ein neu entwickelter funktioneller HCA-Assay vorgestellt, mit dem anhand der Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-WT-GFP potentielle Pim-1-Inhibitoren in lebenden Zellen analysiert werden können. Die Phosphorylierung von p21 wurde hierbei als Maß der Pim-1-WT-GFP-Enzymaktivität und reziprok für die Wirksamkeit eines potentiellen Inhibitors unter zellulären Bedingungen verwendet.

5.2 Summary

The protein p21 is involved in several regulating processes during the G1, S and G2 phase of the cell cycle. In the present study, we demonstrated that p21 is also involved in the process of mitosis. At the onset of mitosis, p21 is phosphorylated at Thr-145 and accumulates at the spindle poles where it remains until chromosomes segregation occurs. At the beginning of cytokinesis, phosphorylated p21 shuttles from the centrosomes to the cleavage furrow and seems to be associated with the contractile ring until the end of mitosis. The localization of p-p21-Thr145 within specific compartments during mitosis transition implies its participation in functional processes where at first the centrosomes and later the contractile ring are involved in. Previous publications described an induced phosphorylation of p21 at Thr145 after cell treatment during the interphase of the cell cycle. This phosphorylation inhibited the cytostatic properties of p21 in these cells and caused proliferative and anti-apoptotic effects. For that reason, it is important to distinguish between the cell cycle dependent phosphorylation of p21 during mitosis progression and the induced phosphorylation during the interphase of the cell cycle.

The induced phosphorylation can be a result of dysregulated kinases which are upregulated in several types of cancer. Pim-1 is one of these tumor related kinases. Pim-1 and p21 were attached to autofluorescent proteins to study their interactions in living cells. The proper functions of the fusion proteins were proved in biochemical and cell based assays. This study demonstrates that increased expression of Pim-1-WT-GFP leads to the phosphorylation of endogenous p21 within the nucleus. Additionally, p-p21-Thr145 was also detected within the cytosol in a subpopulation of these cells. Here it can interact with procaspase-3 or ASK1, preventing the induction of apoptosis. The induced phosphorylation as a result of increased Pim-1 enzyme activity can lead to proliferative and anti apoptotic effects, both of which can actively contribute to tumorigenesis.

Furthermore, the Pim-1-WT-GFP dependent phosphorylation of endogenous p21 was used to analyse the effect of potential Pim-1 inhibitors under cellular conditions in a new functional HCA assay. The intracellular phosphorylation of p21 was used as a read out parameter for the Pim-1 enzyme activity and for the effect of the potential Pim-1 inhibitors, respectively.