

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Konstrukte

Die Methode, Proteingene mit Genen autofluoreszierender Proteine (AFP) zu koppeln und damit fluoreszierende Fusionsproteine in der Zelle für mikroskopische Studien zu erzeugen, wurde Anfang der 90-iger Jahre entwickelt (Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994; Prasher, 1995). Sie ist heute eine in vielen Bereichen der Zellbiologie etablierte Technologie mit der Proteinfunktionen in lebenden Zellen analysiert werden. Das zu untersuchende Targetprotein ist mit einem Linkerpeptid direkt an das AFP gekoppelt. Beide befinden sich so in unmittelbarer räumlicher Nähe. Dadurch können Eigenschaften des Targetproteins, wie Protein-Protein-Wechselwirkungen, Enzymaktivitäten oder Lokalisationssignale, vom AFP maskiert und inhibiert werden. Deshalb müssen Fusionsproteine zusätzlich zur DNA-Sequenzbestimmung einer Funktionsprüfung unterzogen werden. Die Konstruktanalyse stellt sicher, dass in nachfolgenden Experimenten tatsächlich die Funktion des Targetproteins untersucht wird.

Die in dieser Arbeit dargestellte Klonierung der p21- und Pim-1-Gene in jeweils drei unterschiedliche AFP-Expressionsplasmide konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Alle DNA-Sequenzen wurden durch Sequenzanalyse bestätigt. Die Sequenzdaten belegten auch die in den Pim-1- und p21-Mutanten eingeführten Punktmutationen. K67M bzw. K169M in den drei Pim-1-AFP-Varianten sowie T145A in den zwei p21-AFP-Varianten. Die Transfektion der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Plasmide in eukaryotische Zellen ergab, dass die von den Expressionsvektoren kodierten p21-AFP- und Pim-1-AFP-Fusionsproteine von den Zellen exprimiert wurden. Western Blot Analysen der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Immunpräzipitate zeigten, dass die Fusionsproteine vollständig von den Zellen transkribiert und translatiert wurden. Die Molekulargewichte (MG) der p21-Fusionsproteine von 49kDa und der Pim-1-Konstrukte von 61kDa stimmten mit den theoretisch berechneten MG überein.

Das Protein p21 besitzt an seinem C-Terminus ein Kernlokalisierungssignal (NLS), das nach der Translation den Transport von p21 in den Zellkern gewährleistet (Dotto, 2000). Die hier durchgeführten Vergleichsstudien nach Immunfluoreszenzmarkierung von endogenem p21 in HeLa Zellen bestätigten die Funktionalität dieses Transportmechanismus auch in transient transfizierten p21-AFP HeLa Zellen. Mit fluoreszierenden Antikörpern markiertes endogenes p21 konnte nur im Zellkern

detektiert werden, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgespart blieben. Auch die p21-AFP-Konstrukte waren nach Expression ausschließlich in den Zellkernen transfizierter Zellen lokalisiert. Damit konnte experimentell ausgeschlossen werden, dass das am C-Terminus angehängte AFP trotz seiner direkten Nähe zur NLS von p21 die Funktion der NLS negativ beeinflusst. Lebendzellbeobachtungen p21-AFP transfizierter HeLa Zellen zeigten zudem, dass diese Zellen in der Interphase des Zellzyklus blockiert wurden und nicht mehr in die Zellteilung übergehen konnten (Daten nicht gezeigt). Dieser Arrest war auch dafür verantwortlich, dass keine mit p21-AFP stabil transfizierten Zellen hergestellt werden konnten. Beide Versuche bestätigten die zytostatische Funktion von p21, die bei Überexpression zu einem kompletten Zellzyklusarrest führte (Sancar et al., 2004).

Die Verteilung von Pim-1 in eukaryotischen Zellen ist nicht eindeutig auf ein bestimmtes Kompartiment beschränkt. Für die intrazelluläre Verteilung sind offensichtlich zelltyp- und zellzyklusabhängige Wechselwirkungen mit Proteinen der Zelle verantwortlich. Die Pim-1-AFP-Fusionsproteine konnten in hoher Konzentration im Zellkern, sowie in niedriger Konzentration im Zytosol der Zelle detektiert werden. Die Transfektion von Pim-1-Expressionsplasmiden ohne AFP zeigte dieselbe intrazelluläre Verteilung (Nachweis durch Antikörpermarkierung). Dies belegte, dass die Lokalisation der Pim-1-AFP-Fusionsproteine allein durch Pim-1 und nicht durch das AFP verursacht wurde. Die hohe Konzentration im Zellkern deutet hierbei auf Wechselwirkungen mit Proteinen des Zellkerns hin.

Eine Aussage über die funktionelle Aktivität der Pim-1-AFP-Fusionsproteine konnte sich aus diesen Versuchen nicht ableiten lassen. Deshalb wurden die Pim-1-Konstrukte in biochemischen Enzymassays getestet. Hierzu wurden sie erfolgreich aus dem Lysat von transfizierten CHO Zellen isoliert. Die Pim-1-WT-GFP-Immunpräzipitate waren in der Lage, sowohl ein vom Histon-H3 abgeleitetes Substratpeptid als auch rekombinantes p21 zu phosphorylieren. Immunpräzipitate aus nicht transfizierten CHO Zellen wiesen dagegen keine Enzymaktivität auf. Die gemessene Enzymaktivität war allein auf die Aktivität der Pim-1-WT-GFP-Fusionsproteine zurückzuführen. Außerdem konnte im biochemischen Enzymassay gezeigt werden, dass die Pim-1-Mutante Pim-1-K67M-GFP, keine Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt). Damit konnte festgestellt werden, dass die Pim-1-WT-GFP-Fusionsproteine trotz zusätzlicher c-Myc-Anhänge (C-terminal) und AFP-Anhänge (N-terminal) enzymatisch aktiv waren.

Die Experimente belegten, dass die p21-AFP- und Pim-1-AFP-Fusionsproteine vollständig in eukaryotischen Zellen exprimiert wurden. Die p21-AFP-Konstrukte zeigten in Transfektionsexperimenten endogene Funktionen bezüglich ihrer Kernlokalisierung und zytostatischen Inhibition des Zellzyklus. In biochemischen Experimenten konnte die Enzymaktivität der Pim-1-AFP-Fusionsproteine und die Phosphorylierung von rekombinanten p21 durch Pim-1 nachgewiesen werden. Beide Fusionsproteine waren daher geeignet, in nachfolgenden (Ko-)Transfektionsexperimenten die induzierte Phosphorylierung von p21 durch Pim-1 näher zu untersuchen.

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

Aus biochemischen Experimenten und zellulären Modellsystemen ist bekannt, dass verschiedene Kinasen p21 am Thr-145 phosphorylieren können (Scott et al., 2000). Diese induzierte Phosphorylierung beeinflusst Wechselwirkungen von p21 mit verschiedenen Proteinen. Zum Beispiel wird die Interaktion mit PCNA während der S-Phase inhibiert. Bisher ist nichts bekannt über Funktion und Auswirkung der endogenen Thr-145-Phosphorylierung von p21 in eukaryotischen Zellen. Die vorliegende Studie ergab, dass endogenes p21 zellzyklusabhängig am Thr-145 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von p21 findet dabei ausschließlich in mitotischen Zellen statt, nicht aber in Interphase-Zellen.

In den durchgeführten Analysen wurde p21 zu Beginn der Prophase am Thr-145 phosphoryliert und war zunächst diffus im gesamten Zellkern verteilt. Da die Kernmembran zu diesem Zeitpunkt noch intakt ist (Beaudouin et al., 2002), konnte eine unspezifische Diffusion von Kinasen in den Zellkern ausgeschlossen werden. Vielmehr musste eine für die p21-Phosphorylierung verantwortliche Kinase zu Beginn der Mitose in den Zellkern importiert oder innerhalb des Kerns aktiviert worden sein. Es sind mehrere Kinasen bekannt, die am G2/M-Übergang aktiviert werden und so verschiedene mitotische Prozesse einleiten (Smits et al., 2001). Zu den bekanntesten Kinasen, die während des G2/M-Übergangs im Kern aktiviert werden bzw. diesen initiieren, gehört der CDK1/Cyclin-B-Komplex. Phosphorylierungsstellen von CDKs weisen jedoch ein Prolin neben dem zu phosphorylierenden Serin oder Threonin auf, das essentiell für die Substraterkennung der Kinase ist. Für den aktivierten CDK1/Cyclin-B-Komplex wurde folgende Konsensussequenz bestimmt: (K/R)S/TP(X)K/R (Maller et al., 1989;

Ubersax et al., 2003). Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass aktivierte CDK/Cyclin-Komplexe für die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 zu Beginn der Mitose verantwortlich sind. Eine weitere Kinase, die eine Rolle am G2/M-Übergang spielt, ist AKT (Liang and Slingerland, 2003), von der man weiß, dass sie während verschiedener Stadien der Interphase p21 am Thr-145 phosphorylieren kann (Rossig *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). In der späten S-Phase und während der G2-Phase phosphoryliert AKT die Kinase Wee1 am Ser-642 im Zellkern (Katayama et al., 2005). Diese Phosphorylierung führt zur Inaktivierung von Wee1, das dabei in das Zytosol der Zelle transportiert wird. Dieser Mechanismus ist mitverantwortlich für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose, da er indirekt zur Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes führt (Lundgren et al., 1991). Dies liefert jedoch keinen Hinweis darauf, dass AKT nach dem G2/M-Übergang aktiv im Zellkern vorliegt und so für die Phosphorylierung von p21 in der Prophase verantwortlich sein könnte. Eine potentielle Kinase, die für diese Phosphorylierung verantwortlich sein kann, ist Pim-1. Zu Beginn der Mitose ist Pim-1 im Zellkern lokalisiert, wo sie mit dem Protein NUMA (nuclear mitotic apparatus) interagiert und dieses phosphoryliert (Bhattacharya et al., 2002). Die Phosphorylierung von NUMA bewirkt die Wechselwirkung zwischen NUMA, HP1 β (heterochromatin-associated protein 1), Dynein und Dynactin. Diese bilden zusammen einen Komplex, der anschließend zu den Zentrosomen transportiert wird und der für die Ausbildung des Spindelapparates zuständig ist. Aktives Pim-1 ist somit in der Prophase im Zellkern lokalisiert und kann aus diesem Grund auch für die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 verantwortlich sein.

In der frühen Prometaphase konzentrierte sich p-p21-Thr145 an den Spindelpolen. Es war aber zusätzlich noch im Bereich des kondensierten Chromatins zu finden. Im weiteren Verlauf der Prometaphase war p-p21-Thr145 ausschließlich an den Spindelpolen lokalisiert. In der nachfolgenden Metaphase konnte p-p21-Thr145 neben den Spindelpolen auch an den zur Äquatorialebene ausgerichteten Spindelfasern detektiert werden. Der Übergang von einer diffusen Verteilung im Zellkern hin zu einer konzentrierten Lokalisation an den Zentrosomen, setzt einen gerichteten Transportprozess voraus. Solche zentrosomengerichteten Transportwege sind für verschiedene Proteine bekannt. Das Protein NUMA wird mithilfe des zytoplasmatischen Motorproteins Dynein und dessen Koaktivator Dynactin entlang der Spindelfasern, aus dem sich auflösenden Zellkern zu den Zentrosomen transportiert (Sparks et al., 1995; Merdes et al., 2000). Dieser zum

Minusende der Spindelfasern gerichtete Transportmechanismus kann auch für den Transport von p-p21-Thr145 verantwortlich sein. Welche genaue Funktion p-p21-Thr145 an den Zentrosomen erfüllt, kann aus diesen Experimenten jedoch nicht abgeleitet werden. Viele der dort lokalisierten Proteine sind jedoch für die Ausrichtung des kondensierten Chromatins in der Metaphase und für die anschließende Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase verantwortlich (Doxsey et al., 2005). In der Anaphase war p-p21-Thr145 nicht nur an den Spindelpolen lokalisiert, sondern konzentrierte sich zusätzlich zwischen den sich trennenden Schwesterchromatiden. Hierbei konnte es an den Spindelfasern nahe der Äquatorialebene detektiert werden. Diese Signale führten jeweils zu Bereichen hoher p-p21-Thr145-Konzentration entlang der Äquatorialebene. In der nachfolgenden Telophase war es dann ausschließlich entlang der sich bildenden Teilungsfurche als linienförmiges Signal erkennbar. In diesem Bereich bildet sich der so genannte kontraktile Ring, der sich im Verlauf der Zytokinese zusammenzieht und so die Zelle in zwei Tochterzellen teilt. Auch zwischen den Zentrosomen und dem kontraktilen Ring sind Transportprozesse entlang der Mikrotubuli bekannt (Edamatsu, 2001), über die p-p21-Thr-145 transportiert werden könnte. Die Lokalisation entlang der Teilungsfurche und später in der postmitotischen Brücke sowie die Änderung des p-p21-Thr145-Signals von einem linienförmigen zu einem punktförmigen Signal sind Indizien dafür, dass p-p21-Thr145 mit dem kontraktilen Ring assoziiert ist. Das Zusammenziehen des Ringes wird im Mikroskop zweidimensional abgebildet und ergibt so ein linienförmiges Signal, das immer kleiner wird, bis schließlich nur noch ein Punkt detektierbar ist. Phosphoryliertes p21 kann demnach für die Teilung der Zelle während Zytokinese mitverantwortlich sein. Die Ergebnisse dieser fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung zeigen, dass p21 nicht nur Funktionen während der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus erfüllt, sondern in phosphorylierter Form auch an verschiedenen Prozessen während der Mitose beteiligt ist. Hierbei scheint es sowohl Funktionen an den Zentrosomen in der frühen Mitose, als auch am kontraktilen Ring während der Zytokinese zu erfüllen.

4.3. Intrazelluläre Lokalisation von Pim-1-WT-GFP während des Zellzyklus

Über die intrazelluläre Verteilung von Pim-1 während des Zellzyklus von eukaryotischen Zellen ist wenig bekannt (Ionov et al., 2003; Xie et al., 2006). Die Lebendzellbeobachtung von Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen lieferte neue

Informationen über die zellzyklusabhängige Lokalisation. Mit diesem experimentellen Ansatz können Pim-1-Funktionen innerhalb bestimmter Zellkompartimente nachgewiesen werden.

Während der Interphase konnte Pim-1-WT-GFP in hohen Konzentrationen im Zellkern beobachtet werden. Auch während der Mitose war das Fusionsprotein nicht diffus in der sich teilenden Zelle lokalisiert, sondern konzentrierte sich während der Metaphase in Bereichen um die Zentrosomen und später während der Zytokinese in der postmitotischen Brücke. Die spezifische intrazelluläre Verteilung kann durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen verursacht sein. Für die zellzyklusabhängige Lokalisation von Pim-1-WT-GFP bietet sich durchaus die Interaktion mit endogenem p21 an, da es in den selben Kompartimenten der mitotischen Zelle lokalisiert ist (siehe 4.4). Die Wechselwirkung mit NUMA führt möglicher Weise ebenfalls zur Lokalisation im Bereich der Zentrosomen, da dieses Protein in der Prophase von Pim-1 phosphoryliert und anschließend mithilfe von Dynein/Dynactin zu den Zentrosomen transportiert wird (Bhattacharya et al., 2002). Ob endogenes Pim-1 die gleiche intrazelluläre Verteilung während des Zellzyklus aufweist wie stabil transfiziertes Pim-1-WT-GFP, wurde in dieser Studie jedoch nicht weiter verfolgt und kann Gegenstand von nachfolgenden Experimenten sein. Aus solchen Befunden ließen sich zellzyklusabhängige Funktionen von endogenem Pim-1 in definierten Zellkompartimenten ableiten.

4.4. Pim-1 abhängige Phosphorylierung von p21

Die Phosphorylierung von p21 wurde in bisherigen Veröffentlichungen anhand biochemischer Analysemethoden (z.B. Western Blot) nachgewiesen (Scott *et al.*, 2000; Dash *et al.*, 2005). Die vorliegende Studie zeigt, dass transfizierte Pim-1-WT-AFP-Fusionsproteine mit endogenem p21 im Zellkern interagieren und es am Thr-145 und am Ser-146 phosphorylieren können. Die Phosphorylierungen wurden mithilfe von Antikörpern detektiert, deren Epitopspezifität in einem Pim-1-GFP/p21-CFP Kotransfektionsexperiment bestätigt wurde.

In eukaryotische Zellen transfiziertes Pim-1-WT-GFP verursachte hinsichtlich intrazellulärer Verteilungsmuster unterschiedliche p-p21-Phänotypen. In Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen waren die p-p21-Thr-145-Signale über den gesamten Zellkern verteilt. Dieses Muster war der Verteilung von endogenem p21 in Interphasezellen ähnlich. Die Pim-1-WT-GFP bzw. Pim-1-K67M-GFP abhängige

Phosphorylierung von p21 am Thr-145 konnte mittels HCA-Analyse quantifiziert werden. Diese Analysen ergaben zudem, dass die Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 bei nicht transfizierten Zellen ausschließlich während der Mitose auftrat. Neben der Lokalisation innerhalb des Zellkerns, konnte bei ca. 40% der transfizierten Zellen p-p21-Thr145 auch im Zytosol detektiert werden. Die Translokation kann hierbei durch die Phosphorylierung von Thr-145 innerhalb des Kernlokalisationssignals von p21 ausgelöst werden. Die NLS von p21 wird dadurch maskiert wodurch das Protein in das Zytosol der Zelle transloziert. In der Literatur wurde dieser Transport anhand von p21-Mutanten beschrieben (Rodriguez-Vilarrpla et al., 2005). Mögliche Effekte der Pim-1 induzierten p-p21-Thr145-Phosphorylierung werden im Kapitel 4.5 näher diskutiert.

Die Fluoreszenzsignale der p-p21-Ser146-Phosphorylierung waren in Pim-1-WT-GFP transfizierten Zellen auf mehrere einzelne Punkte im Zellkern beschränkt. Nur an diesen Orten scheint p21 in einem Zustand vorzuliegen, der die Ser-146-Phosphorylierung erlaubt. Möglicherweise verhindert eine bestimmte Konformation von p21 oder eine Interaktion mit anderen Proteinen die Phosphorylierung von p21 am Ser-146 in den anderen Kernbereichen. In nicht transfizierten Zellen war die p-p21-Ser146-Phosphorylierung nur in mitotischen Zellen zu detektieren und scheint in diesem Prozess eine bestimmte Funktion zu erfüllen. Die Konzentration von endogenem p21 auf punktförmige Bereiche innerhalb des Zellkerns ist in der Literatur nicht beschrieben und kann ein Hinweis auf eine neue Funktion innerhalb des Zellkerns sein.

4.5. Möglicher Effekt einer unkontrollierten p21-Phosphorylierung während der Tumorentwicklung

Bisher publizierte Untersuchungen stellen Pim-1 als Protoonkogen vor, das an der Tumorgenese von Prostatakarzinomen, B-Zell-Lymphomen und verschiedenen Leukämiearten beteiligt sein kann (Wang et al., 2001). In diesen Zellen ist Pim-1 stark überexprimiert. Außerdem wird Pim-1 als anti-apoptotischer Faktor beschrieben, der die Apoptose bei erhöhter Expression inhibieren kann und somit Zellen vor ihrem programmierten Tod schützt. Der zelluläre Mechanismus, über den Pim-1 die Entartung einer normalen Zelle fördert oder einen anti-apoptotischen Effekt hervorruft, ist bisher nicht untersucht worden. Die in dieser Arbeit beschriebene

durch Pim-1 induzierte, unkontrollierte Phosphorylierung von endogenem p21 kann dabei eine Rolle spielen.

In den in Kapitel 4.4 vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die experimentell erzeugte Erhöhung der Pim-1-Expression zur Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr145 führt. Die Phosphorylierung des zytostatischen CDK-Inhibitors ist hierbei nicht auf die Mitose beschränkt, sondern umfasst den gesamten Zellzyklus, da Pim-1 in diesen Zellen zu allen Phasen konstitutiv aktiv ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in ca. 40% der Pim-1-GFP transfizierten Zellen p-p21-Thr145 im Kern und im Zytosol der Zellen vorhanden war. Die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 im Kern hat somit direkten Einfluss auf die Funktion und Lokalisation des zytostatischen CDK Inhibitors.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Phosphorylierung von p21 die Interaktion mit PCNA während der S-Phase des Zellzyklus inhibiert (Rossig *et al.*, 2001). Somit kann bei DNA-Schädigung die DNA-Replikation nicht mehr gestoppt werden, um diese Schäden mithilfe von DNA-Reparaturmechanismen zu beheben. Eine Zunahme von DNA-Mutationen ist somit die Folge. Die unkontrollierte, konstitutive Phosphorylierung von p21 am Thr-145 hat außerdem einen noch nicht absehbaren Effekt auf den Ablauf der Mitose, da es im Zellzyklus eigentlich nur während der Teilungsphase phosphoryliert wird (siehe Kapitel 4.2.). Zusätzlich bewirkt die Phosphorylierung von p21 eine Anreicherung des CDK-Inhibitors im Zytosol und kann somit die Konzentration von p21 im Zellkern beeinflussen. Die meisten zytostatischen Funktionen von p21 sind jedoch auf eine Lokalisation im Zellkern angewiesen. Nur hier kann p21 an den CDK2/Cyclin-E- (G1-Kontrollpunkt) oder CDK1/Cyclin-B-Komplex (G2-Kontrollpunkt) als Antwort auf zytostatische Signale binden und so den Zellzyklus anhalten. Eine verminderte Konzentration von p21 im Zellkern kann daher auch einen direkten Einfluss auf den Zellzyklusarrest haben und diesen inhibieren. Ein unkontrollierter Ablauf des Zellzyklus wäre die Folge.

Im Zytosol nimmt p21 Einfluss auf die Regulation der Apoptose, in dem es hier mit der Procaspase-3 oder ASK1 interagiert und so Funktionen im Apoptosesignalweg inhibiert. Damit ist der Zelle die Möglichkeit genommen, über diese Wege den programmierten Zelltod bei hoher Zellschädigung einzuleiten.

Die hier aufgeführten Effekte einer unkontrollierten p21-Phosphorylierung können die onkogenen Funktionen von Pim-1 erklären. Erste Indizien für einen solchen Mechanismus liefern Analysen von Brustkrebsgewebe. Diese Zellen weisen eine

starke Erhöhung von p-p21-Thr145 im Zytosol auf (Xia et al., 2004). Der Befund dieser Proben korreliert zudem stark mit einer erhöhten Expression bzw. Aktivierung der Kinase AKT (Giancotti et al., 2006). AKT ist wie Pim-1 in der Lage, p21 am Thr-145 im Zellkern zu phosphorylieren und kann somit die gleichen Mechanismen in Gang setzen wie sie hier für Pim-1 beschrieben wurden. Da die Expression von Pim-1 und AKT in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorarten erhöht ist, kann die unkontrollierte Phosphorylierung von p21 bei der Entartung dieser Zellen die entscheidende Rolle spielen.

4.6. Test von potentiellen Pim-1-Inhibitoren

Die Wirksamkeit von enzymespezifischen Inhibitoren wird meist mithilfe eines optimierten biochemischen Enzymassays nachgewiesen. In diesen Assays wird die Reduzierung der Substratumsetzung als Maß für die Enzymaktivität und reziprok für die Wirksamkeit der inhibitorischen Substanzen verwendet. Es kann jedoch nur eine kleine Anzahl von möglichen biologischen Variablen, wie pH-Wert, Salzkonzentrationen oder reduzierende bzw. nicht-reduzierende Pufferbedingungen berücksichtigt werden, unter denen die Enzymreaktion abläuft. Der Vorteil dieser möglichst einfach aufgebauten Assays ist es, eine große Anzahl von potentiellen Substanzen auf ihre inhibitorische Bindung an ein spezifisches Enzym untersuchen zu können. In einer Zelle läuft eine Enzymreaktion jedoch unter wesentlich komplexeren Bedingungen ab. Die Zelle enthält eine große Anzahl von verschiedenen Molekülen, deren Zusammensetzung von der Art der Zelle, ihrem Alter und der Zellzyklusphase abhängt. Diese Moleküle können mit potentiellen Inhibitoren interagieren und so unerwünschte Nebeneffekte induzieren. Hierbei kann die inhibitorische Wirkung auf das Enzym verstärkt oder gar aufgehoben werden. Außerdem können zusätzliche Signalwege vom Inhibitor getroffen werden, die essentielle Prozesse der Zelle steuern und sie dadurch schädigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Pim-1-WT-GFP abhängigen Phosphorylierung von endogenem p21 eine neue Methode entwickelt, mit der potentielle Pim-1-Inhibitoren in einer lebenden Zelle getestet werden können. Das Maß der p21-Phosphorylierung korrelierte mit der Aktivität von Pim-1-WT-GFP und mit der Wirksamkeit eines potentiellen Pim-1-Inhibitors. Das Maß der Inhibition wurde mithilfe des HCA-Assays (siehe Kapitel 2.3.7) quantifiziert. Insgesamt wurden hierbei fünf verschiedene Substanzen im HCA- und im biochemischen Assay getestet.

Sowohl der biochemische als auch der zelluläre, experimentelle Ansatz zeigten dieselbe Rangordnung der Substanzen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung. Der Pan-Kinaseinhibitor Staurosporin erwies sich in beiden Experimenten als die wirksamste inhibitorische Substanz. Im zellulären als auch im biochemischen Assay zeigte die Substanz A starke und die Substanz B nur noch eine schwache Reduktion der Pim-1-Aktivität. Die beiden übrigen Substanzen wirkten in keinem der beiden Assays. Die bestimmten IC_{50} -Werte sind in ihren Absolutwerten jedoch nur bedingt vergleichbar. Im zellulären Assay können sehr viele verschiedene Faktoren die entsprechenden IC_{50} -Werte der Substanzen beeinflussen: die Löslichkeit der Substanzen im Kulturmedium, Wechselwirkungen mit dem im Medium enthaltenen Serum, die Permeabilität der Plasmamembran für die Substanzen, intrazelluläre Wechselwirkungen mit Bestandteilen der Zelle, sowie Exportmechanismen, die die Substanzen aus den Zellen wieder hinaustransportieren. Diese Einflüsse können zu erhöhten IC_{50} -Werten im Vergleich zum biochemischen Assay führen. Sie deuten jedoch die komplexe, zelluläre Umgebung an, in der die Substanzen später im Organismus wirken sollen.

Ein HCA basierter Assay, der eine Enzymreaktion in einer lebenden Zelle misst, beachtet viele verschiedene Faktoren, die für eine zelluläre Umgebung charakteristisch sind. Er bietet damit einen großen Vorteil gegenüber einem biochemischen Assay, der nur wenige biologische Variablen berücksichtigt. Der HCA-Assay ist somit geeignet, potentielle Inhibitoren im zellulären System zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Suche nach Substanzen, die letztendlich im Organismus wirken sollen, kann auf diese Weise beschleunigt werden.

4.7. Ausblick

Zur erweiterten Analyse der Funktion der zellzyklusabhängigen Phosphorylierung von p21 müssten zunächst die an diesem Prozess beteiligten p21-Interaktionspartner identifiziert werden. Durch Immunpräzipitation von p-p21-Th145 aus eukaryotischen Zellen ließen sich mögliche Interaktionspartner isolieren und mithilfe der Massenspektroskopie identifizieren. Aus der Art der Interaktionspartner, z.B. Strukturproteine oder Proteinkomplexe bekannter Funktion, können sich mögliche Funktionen von p-p21-Thr145 ableiten lassen und mittels Immundetektion und Kolokalisationsstudien in eukaryotischen Zellen näher untersuchen.

In dieser Arbeit wird diskutiert, dass die Kinasen Pim-1 oder AKT für die Phosphorylierung von p21 zu Beginn der Mitose verantwortlich sein können. Mithilfe der „small interference RNA“ Technik (Hannon, 2002) lässt sich die Expression von Pim-1 oder AKT in eukaryotischen Zellen unterdrücken. Mit dieser Methode kann festgestellt werden, welche der beiden Kinasen bzw. ob die Kinasen an der mitotischen Phosphorylierung von p21 beteiligt sind.

Die induzierte, unkontrollierte Phosphorylierung von p21 durch fehlerhaft regulierte Kinasen, kann an der Entstehung und Propagation verschiedener Tumorarten beteiligt sein. Es sind Tumorarten bekannt, in denen die Kinase Pim-1 oder AKT spezifisch hochreguliert ist. Die Immundetektion von p-p21-Thr-145 in entsprechenden Tumorgewebeproben könnte Aufschluss geben ob die Phosphorylierung und Lokalisation von p21 im Zytosol mit der Überexpression von Pim-1 oder AKT korreliert. Eine derartige Studie kann entscheidende Hinweise auf den zellulären Mechanismus geben, mit dem fehlregulierte Kinasen die Entwicklung normaler Zellen zu Tumorzellen fördern können.