

Funktionelle Charakterisierung von Interaktionspartnern der Polo-like Kinase 1 (Plk1)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Frank Eckerdt
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2003

(D F 1)

Vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan:

Gutachter: Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz und Herr Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputation

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Zellzyklus	1
1.1.1	Die Mitose	1
1.1.2	Cdk/Cyclin-Komplexe	2
1.2	MPF (<i>M-phase-promoting-factor</i>)	4
1.2.1	Regulation des MPF	4
1.2.2	Cyclin B1.....	6
1.3	Polo-like Kinase 1 (Plk1)	8
1.3.1	Strukturelle Eigenschaften von Plk1	10
1.3.2	Funktionen und Interaktionspartner von Plk1	10
1.3.3	Plk1 und Krebs	13
1.4	Pin1	13
1.4.1	Isomerisierung von Phosphoproteinen durch Pin1	14
1.4.2	Strukturelle Eigenschaften von Pin1	15
1.4.3	Pin1-Substrate	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	19
2.1.2	Lösungen und Puffer	19
2.1.3	Enzyme	23
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Oligonukleotide	25
2.1.6	Vektoren	27
2.1.7	Bakterien und Bakterien-Medien	29
2.1.8	Zelllinien und Zellkultur-Medien	30
2.1.9	Laborgeräte.....	31
2.2	Methoden	33
2.2.1	Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren	33
2.2.2	Zellkultur	35
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	37
2.2.4	Quantitative Auswertung der Autoradiogramme und Gele.....	42

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Subzelluläre Lokalisation von humanem Plk1	43
3.2	Einfluß von Plk1 auf die Aktivierung des Cyclin B1/Cdk1-Komplexes.....	45
3.2.1	Koverteilung von Plk1 und Cyclin B1 in verschiedenen Mitosephasen.....	45
3.2.2	Kinetik der Plk1- und Cyclin B1-Expression während des Zellzyklus.....	47
3.2.3	Interaktion von Plk1 und Cyclin B1 <i>in vitro</i>	49
3.2.4	Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1	50
3.2.5	Phosphorylierung der CRS von Cyclin B1 durch Plk1	51
3.2.6	Phosphorylierung der CRS-Mutanten	52
3.2.7	Kooperative Phosphorylierung der CRS von Cyclin B1 durch Plk1 und MAPK	54
3.2.8	Bindungsstudie von Plk1 und Cyclin B1	54
3.2.9	Phosphorylierung des Ser-133 in Cyclin B1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	55
3.2.10	Untersuchung des nukleären Transports von Cyclin B1 in Abhängigkeit von dessen Phosphorylierung an Ser-133	57
3.3	Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Pin1	59
3.3.1	Subzelluläre Lokalisation von Pin1	59
3.3.2	Bindungsstudie von Plk1 und Pin1	60
3.3.3	Einfluß der Phosphorylierung von Plk1 auf die Pin1-Plk1-Interaktion	61
3.3.4	Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1	62
3.3.5	Kartieren der Phosphorylierungs-Stelle in Pin1	62
3.3.6	Phosphorylierung der Pin1-Domänen durch Plk1	64
3.3.7	Experimentelle Eingrenzung der Phosphorylierungs-Stelle in Pin1	65
3.3.8	Einfluß der Phosphorylierung an Ser-65 auf die katalytische Aktivität von Pin1 <i>in vitro</i>	66
3.3.9	Einfluß der Phosphorylierung an Ser-65 auf die Stabilität von Pin1	68
4	DISKUSSION	71
4.1	Regulation der Zellteilung	71
4.2	Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Cyclin B1	71
4.2.1	Korrelation der Expression und Lokalisation von Plk1 und Cyclin B1 in der frühen Mitose	71
4.2.2	Interaktion von Plk1 und Cyclin B1	73
4.2.3	Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1	73
4.2.4	Funktion der Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1	77
4.3	Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Pin1	78
4.3.1	Lokalisation von Plk1 und Pin1	78
4.3.2	Bindungsverhalten von Plk1 und Pin1	79
4.3.3	Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1	81
4.3.4	Bedeutung der Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
7	LITERATUR.....	95

8	ANHANG	104
8.1	Veröffentlichungen.....	104
8.2	Veröffentlichte Abstracts.....	104
8.2.1	Vortrag	104
8.2.2	Poster.....	104
8.3	Danksagung.....	105

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Die Cdk/Cyclin-Komplexe und ihre Funktionen im Zellzyklus.	3
Abb. 1-2: Regulation des MPF (Cyclin B1/Cdk1).	5
Abb. 1-3: Schematische Darstellung des humanen Cyclin B1.	6
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Regulation des Imports und Exports von Cyclin B1 durch dessen CRS.	8
Abb. 1-5: Die Familie der Polo-like Kinasen.	9
Abb. 1-6: Plk1-Substrate.	11
Abb. 1-7: Plk1-Funktionen beim Eintritt und Austritt aus der Mitose.	12
Abb. 1-8: Modell der Phosphorylierungs-spezifischen Isomerisierung durch die PPIase Pin1.	15
Abb. 1-9: Struktur von Pin1.	16
Abb. 2-1: Positionsgerichtete Mutagenese durch SOEing.	35
Abb. 3-1: Immunfluoreszenz-Studie von Plk1 in der Mitose.	44
Abb. 3-2: Immunfluoreszenz-Studie von Plk1 und Cyclin B1 in verschiedenen Mitosestadien.	46
Abb. 3-3: Kinetik der Plk1- und Cyclin B1-Expression in synchronisierten HeLa S3-Zellen.	48
Abb. 3-4: Interaktions-Studie von Plk1 und Cyclin B1.	49
Abb. 3-5: In vitro-Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1.	51
Abb. 3-6: Generierung und Phosphorylierung von CRS-Mutanten aus humanem Cyclin B1.	53
Abb. 3-7: Untersuchung der CRS-Phosphorylierung durch Plk1 und MAPK.	54
Abb. 3-8: Untersuchung der Bindung von Plk1 an CRS- und Cyclin B1-Mutanten.	55
Abb. 3-9: Untersuchung der Phosphorylierung des Ser-133 von Cyclin B1 in vitro und in vivo.	56
Abb. 3-10: Untersuchung des nukleären Imports von Cyclin B1.	58
Abb. 3-11: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Pin1.	60
Abb. 3-12: Interaktion von Pin1 und Plk1.	61
Abb. 3-13: Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1.	63
Abb. 3-14: Charakterisierung der Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1.	66
Abb. 3-15: Isomerisierungs-Studie mit GST-Pin1 und den gezeigten Mutanten.	67
Abb. 3-16: Untersuchung der Stabilität von Pin1.	70
Abb. 4-1 Modell der Regulation von Pin1 durch PKA und Plk1.	87

1 EINLEITUNG

1.1 Der Zellzyklus

Den gesamten Vorgang vom Entstehen zweier erbgleicher Zellen aus einer somatischen Mutterzelle bis zur erneuten Teilung der beiden Tochterzellen nennt man Zellzyklus. Man gliedert ihn in Interphase und M-Phase. Die Interphase ist die Phase, in der die Zelle wächst, bzw. ihre somatischen Funktionen erfüllt. Sie wird unterteilt in die Phasen G_1 (*Gap 1*; Synthese von Proteinen, RNA und anderen Zellbestandteilen), S (DNA-Synthese) und G_2 (*Gap 2*; Sicherheitspause: Überprüfung des genetischen Materials und der Zellgröße) (siehe Abb. 1-1). Zellen, die ausdifferenzieren und sich nicht weiter teilen, gehen nach der G_1 -Phase nicht in die S-Phase über, sondern treten aus dem Zellzyklus in die G_0 -Phase über (Restriktionspunkt), in der sie verbleiben. Nach der G_2 -Phase geht die Zelle in die M-Phase. Diese ist die Phase der Kern- und Zellteilung. Sie wird unterteilt in Mitose (Kernteilung) und Cytokinese (Teilung des Cytoplasmas). In der M-Phase muß sichergestellt werden, daß beide Tochterzellen je ein Centrosom, den gleichen Satz an genetischem Material und die erforderliche Menge an Cytoplasma und Organellen erhalten. Das Durchlaufen der Mitose wird durch Proteolyse und Isomerisierung von mitotischen Proteinen reguliert, als auch durch sekundäre Modifikationen wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung.

1.1.1 Die Mitose

Die Mitose ist der Prozeß der Kernteilung, in dem vor allem sichergestellt wird, daß jede der beiden Tochterzellen jeweils einen kompletten Chromosomensatz erhält. Sie wird mikroskopisch in fünf verschiedene Phasen unterteilt: Prophase (Kondensierung des Chromatins, Verschwinden der Nucleoli, Zerfall des Cytoskeletts, Ausbildung der Mitosespindel), Prometaphase (Auflösung der Kernhülle, Auswachsen der Spindel-Mikrotubuli, Ausbilden der Kinetochoren), Metaphase (Chromosomen in der Äquatorialebene, Anheften der Mikrotubuli an den Kinetochoren), Anaphase (Trennung der Chromosomen) und Telophase (Kinetochor-Mikrotubuli verschwinden, Chromosomen an den Polen, Bildung der neuen Kernhüllen, Auflockerung des Chromatins beginnt, Nucleoli bilden sich). Die Cytokinese beschreibt die Aufteilung des Cytoplasmas auf die Tochterzellen. Sie beginnt bereits in der späten Anaphase und endet mit der Trennung der Tochterzellen.

1.1.1.1 Regulation und Kontrollpunkte der Mitose

Die Aufteilung des genetischen Materials wird von dem Spindelfaser-Apparat organisiert. Dieser wichtige Prozeß wird durch mehrere Regulationsmechanismen, sogenannte Kontrollpunkte, überwacht. Sie halten den Zellzyklus an, wenn Schäden am Genom oder der Spindel entdeckt werden. Über den DNA-Replikationspunkt wird der G₂/M-Übergang und über den Spindelkontrollpunkt die Meta-Anaphase-Transition gesteuert (Molinari, 2000). Dabei werden bei fehlerhafter DNA-Replikation oder Spindel-Organisation Signalwege aktiviert, deren Ziel es ist, Schlüsselenzyme wie z. B. den *M-phase-promoting-factor* (MPF) und die *Polo-like Kinase 1* (Plk1) zu inhibieren. Beide regulieren über die Phosphorylierung mitotischer Substrate den Einstieg und das Durchlaufen der Mitose.

1.1.2 Cdk/Cyclin-Komplexe

Der Zellzyklus wird von Kinase-Komplexen durch reversible Phosphorylierung reguliert (Abb. 1-1). Diese Kinase-Komplexe bestehen aus je einem Cyclin und einer assoziierten Cdk (*cyclin-dependent kinase*). Cdks wurden zuerst in Hefen entdeckt und dort ursprünglich Cdc (*cell division cycle*) genannt. Cycline sind die regulatorischen Untereinheiten dieser Kinase-Komplexe und werden zyklisch während des Zellzyklus exprimiert und abgebaut. Die unterschiedlichen Cyclin-Typen erfüllen ihre Funktionen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus: die Cycline D und E während der G₁-Phase, die Cycline E und A in der S-Phase und die Cycline A und B während der Mitose (siehe Abb. 1-1).

Cdks sind katalytisch inaktiv, solange sie nicht mit ihrem Cyclin assoziiert vorliegen. Sie liegen in der Regel als inaktives Enzym im Überschuß zu ihrem zugehörigen Cyclin vor. Damit wird die Aktivität der Cdks durch die Cyclin-Konzentration kontrolliert. Die Aktivität der Cdks wird zusätzlich durch Kinasen und Phosphatasen reguliert (siehe Kap. 1.2.1). Eine weitere Kontrolle der Cdk-Aktivität wird durch spezifische Inhibitorproteine, den CKIs ausgeübt.

Eine Aufgabe des Cyclin D in der G₁-Phase besteht darin, externe Signale (mitogene Signale durch Wachstumsfaktoren) in den Zellzyklus zu integrieren. Dem entgegengesetzt wirken antimitogene Signale, die durch Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) vermittelt werden, und dazu führen können, daß die Zelle in der G₁-Phase stehen bleibt bzw. in die G₀-Phase übergeht. Überwiegen die mitogenen Signale, so phosphoryliert der Cyclin D/Cdk-Komplex das Tumorsuppressor-Protein pRb- (Retinoblastom)-Protein. Die Phosphorylierung des pRb-Proteins ist mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F verbunden, wodurch eine gesteigerte Transkription von Genen herbeigeführt wird, die für die S-Phase benötigt

werden. Zusätzlich wird durch E2F die Transkription von Cyclin E erhöht, welches wiederum zur Phosphorylierung von pRB beiträgt. Nach diesem Ereignis hat die Zelle den Restriktionspunkt überschritten und begibt sich in die S-Phase (Coqueret, 2002).

In der S-Phase reguliert der Cyclin A/Cdk-Komplex die Initiation der DNA-Replikation und verhindert eine mehrmalige DNA-Replikation. Die Rolle des Cyclin A/Cdks in G₂- und M-Phase ist noch nicht geklärt. Allerdings besitzt dieser Komplex auch MPF-Aktivität, und bislang konnte man die mitotischen Funktionen des Cyclin A/Cdk1-Komplexes nicht eindeutig von denen des Cyclin B/Cdk1-Komplexes unterscheiden. Ferner führt Cyclin A-Hemmung zu einer Anreicherung der Zellen in der G₂-Phase (Yam et al., 2002).

Über die feinabgestimmte Regulation der Aktivität der verschiedenen Cdk/Cyclin-Komplexe wird an den Kontrollpunkten der korrekte Ablauf des Zellzyklus gesteuert. So steigt die Zelle erst nach erfolgreichem Passieren des jeweiligen Kontrollpunktes in die nächste Phase ein (Abb. 1-1).

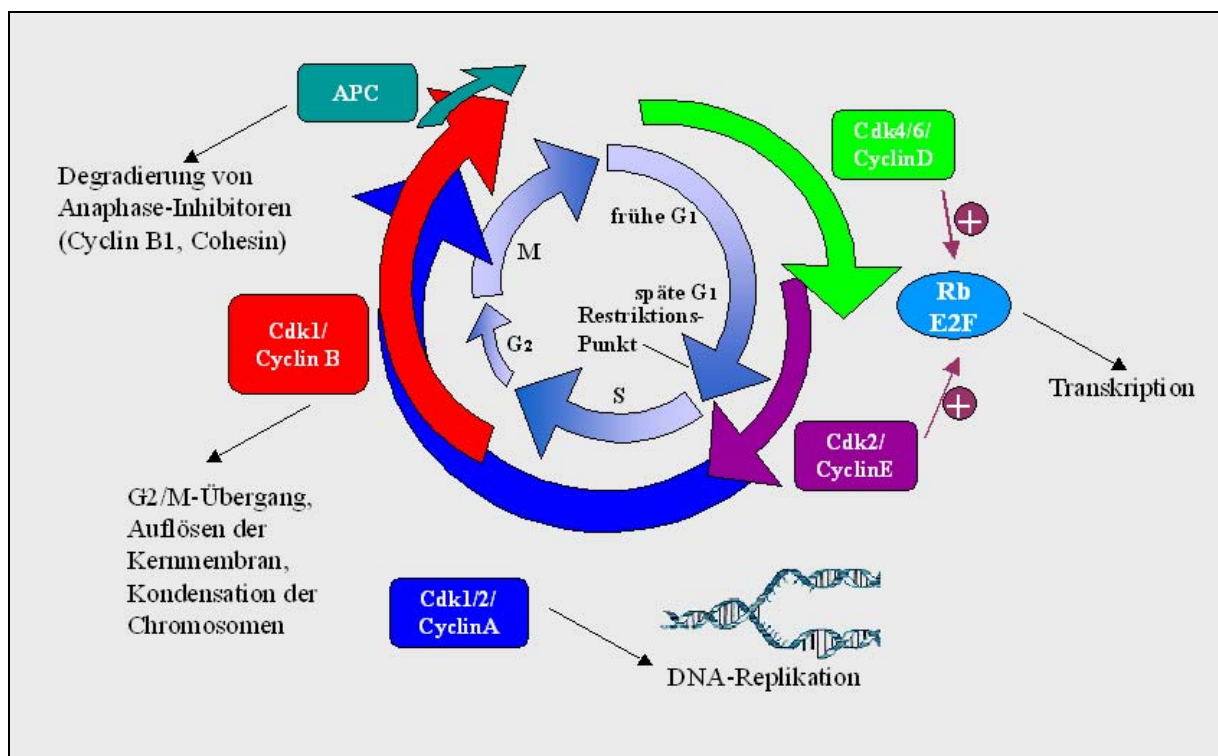


Abb. 1-1: Die Cdk/Cyclin-Komplexe und ihre Funktionen im Zellzyklus.

Die unterschiedlichen Cdk/Cyclin-Komplexe regulieren die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Für die Mitose von essentieller Bedeutung ist der MPF (Cdk1/Cyclin B). Die Inaktivierung des MPF ist essentiell für den Beginn der Anaphase. Diese Inaktivierung wird über den Abbau der Cyclin B1-Untereinheit vermittelt, indem Cyclin B1 durch den APC (anaphase-promoting complex) mit Ubiquitin markiert wird. Die Cyclin D/Cdk- und Cyclin E/Cdk-Komplexe regulieren das Fortschreiten der G₁-Phase. Der Cyclin A/Cdk-Komplex reguliert die Progression der S-Phase und ist aktiv bis in die Mitose hinein.

1.2 MPF (*M-phase-promoting-factor*)

Cycline vom B-Typ heterodimerisieren mit Cdk1 und bilden den MPF (Gautier et al., 1990). Bislang wurden drei verschiedene Cyclin B-Typen charakterisiert, die mit Cdk1 heterodimerisieren. Der Cyclin B2/Cdk1-Komplex ist vorwiegend am Golgi-Apparat lokalisiert (Jackman et al., 1995), der Cyclin B3/Cdk1-Komplex befindet sich im Nukleus (Gallant und Nigg, 1994). Ausschließlich der Cyclin B1/Cdk1-Komplex verändert seine Lokalisation während der Mitose. Er ist in der Interphase im Cytoplasma und an den Centrosomen zu finden und transloziert in der Prophase in den Nukleus (Ookata et al., 1992; Pines und Hunter, 1991). Nur für den Cyclin B1/Cdk1-Komplex gilt, daß seine Aktivität essentiell für die G₂/M-Transition ist. So führt auch nur der Cyclin B1-*knock-out* zu einem letalen Phänotyp in der Maus, wohingegen sich Cyclin B2-defiziente Mäuse, abgesehen von einer leicht reduzierten Größe, normal entwickeln (Ohi und Gould, 1999; Brandeis et al., 1998).

Cyclin B1 stellt die regulatorische Untereinheit des MPF dar. Dessen katalytische Untereinheit ist Cdk1 bzw. Cdc2 (Arion et al., 1988; Masui und Markert, 1971; Doree und Hunt, 2002). Aktiver MPF katalysiert die Phosphorylierung wichtiger Serin-Reste der Lamine (Hauptbestandteile der Kernmembran), welche dissoziieren, und damit die Auflösung der Kernmembran verursachen. Ferner phosphoryliert MPF Histon H1, welches für die Verpackung der DNA in Nucleosomen notwendig ist. Weiterhin greift MPF in das Verhalten der Mikrotubuli während der Mitose ein, indem er Mikrotubuli-assoziierte Proteine phosphoryliert (Burke und Ellenberg, 2002; Ookata et al., 1993; Yamashiro und Matsumura, 1991). Um diese verschiedenen Aufgaben zu erfüllen, muß der MPF aktiviert werden. Die Aktivierung des MPF ist das Schlüsselereignis, welches essentiell für den Eintritt in die Mitose ist (Nurse, 1990).

1.2.1 Regulation des MPF

Die Aktivität des MPF wird über drei Mechanismen reguliert: Synthese und Abbau der Cyclin-Untereinheit sowie Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Cyclin- und der Cdk-Untereinheit.

Als Bestandteil des MPF reguliert Cdk1 den Eintritt in die Mitose (Nurse, 1990). Cdk1 wird durch Phosphorylierung des Thr-161 von dem *cdk activating complex* (CAK), einem Kinase-Komplex, aktiviert (Fisher und Morgan, 1994). Gleichzeitig wird es vor der Mitose durch die inhibitorischen Kinasen Wee1 und Myt1 in einer inaktiven Form gehalten. Im Zellkern lokalisiertes Wee1 phosphoryliert Tyr-15 des Cdk1 (Heald et al., 1993), cytoplasmatisches

Myt1 phosphoryliert Thr-14 des Cdk1 (Booher et al., 1997; Liu et al., 1997). Durch diese Phosphorylierungen des Cdk1 wird der MPF während der G₂-Phase oder bei DNA-Schäden in einer inaktiven Form gehalten, wodurch ein vorzeitiger Eintritt in die Mitose verhindert wird. Beim Übergang in die Mitose dephosphoryliert die Phosphatase Cdc25C Thr-14 und Tyr-15 und aktiviert Cdk1 (Draetta und Eckstein, 1997). Die Cdc25C-Phosphatase wird wiederum von der *Polo-like Kinase 1* (Plk1) phosphoryliert und damit aktiviert (Kumagai und Dunphy, 1996; Qian et al., 2001; Roshak et al., 2000). In *Xenopus* wurde gezeigt, daß Plk1 wiederum durch MPF aktiviert werden kann (Abrieu et al., 1998; Karaïskou et al., 1998; Qian et al., 1998). Aus diesen Untersuchungen wurde abgeleitet, daß es sich hierbei um eine Amplifikations-Schleife handelt, bei der sich die Enzyme gegenseitig aktivieren können (Abb. 1-2). Funktion dieser gegenseitigen Aktivierung ist die rapide Anreicherung von aktivem MPF, dem Schlüsselenzym für den Eintritt in die Mitose.

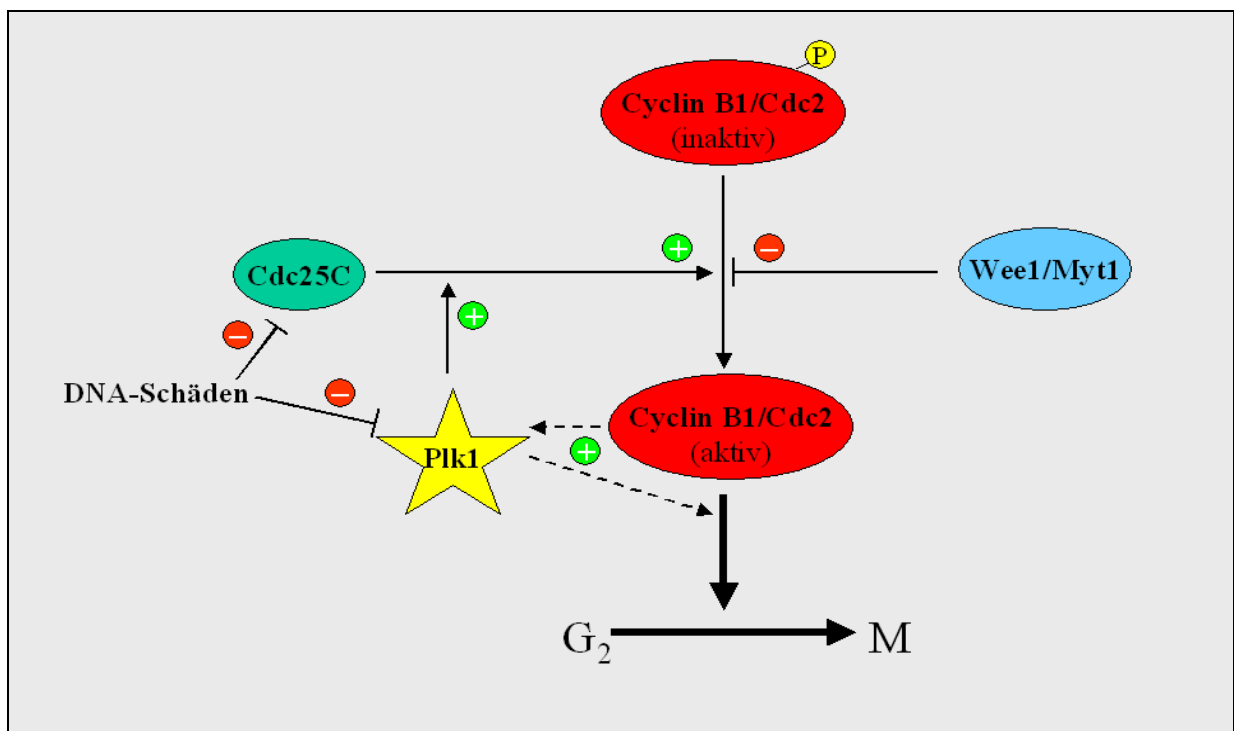


Abb. 1-2: Regulation des MPF (Cyclin B1/Cdk1).

Der MPF wird von den Kinasen Wee1/Myt1 inaktiv gehalten und von der Phosphatase Cdc25C aktiviert. Cdc25C wiederum wird von Plk1 aktiviert. Es wird angenommen, daß Plk1 auf eine bislang unbekannte Art und Weise auch direkt zur Aktivierung des MPF beiträgt. Verlagert sich einmal das Gleichgewicht auf die Seite von Cdc25C, so sind MPF und Plk1 in der Lage, sich wiederum gegenseitig zu aktivieren. Dies führt zur sogenannten Aktivierungs-Schleife, deren Resultat große Mengen von aktivem MPF ist.

1.2.2 Cyclin B1

Cyclin B1 ist ein wichtiger Regulator für die G₂/M-Transition, denn bei DNA-Schäden wird die Cyclin B1-Expression unterdrückt, und die Zelle kann die G₂-Phase nicht verlassen (King et al., 1996; Maity et al., 1995). Die Cyclin B1-Proteinmenge steigt stetig in der S-Phase an, und erreicht ihren Höhepunkt in der G₂-Phase und der Mitose. An der Meta-Anaphase-Transition muß Cyclin B1 abgebaut werden (Pines und Hunter, 1991) und somit der MPF inaktiviert sein, damit die Zelle die Mitose verlassen kann (Holloway et al., 1993). Die schnelle Proteolyse von Cyclin B1 wird durch den *anaphase-promoting complex* (APC), eine Ubiquitin-Ligase, vermittelt. APC erkennt eine 9 Aminosäuren (AS) lange Sequenz im N-Terminus des Cyclins, die *destruction box* (D-Box) (siehe Abb. 1-3) und katalysiert den Transfer des Ubiquitins vom UBC-Ubiquitin-Komplex an die D-Box, um Cyclin B1 für die Degradierung durch das Proteasom zu markieren (Sudakin et al., 1995).

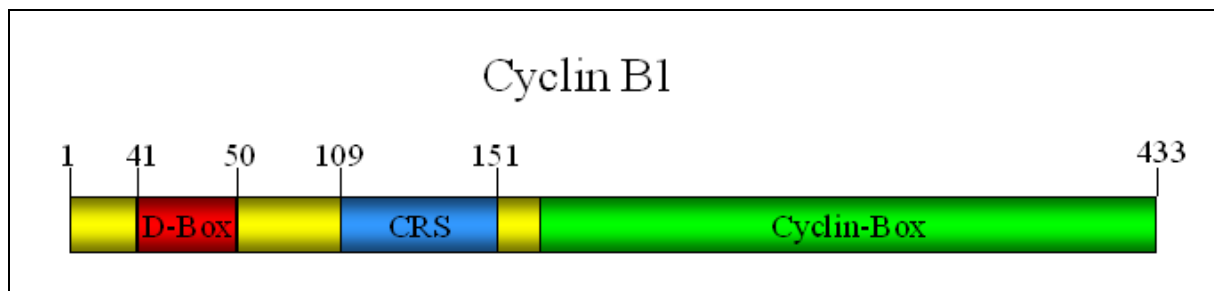


Abb. 1-3: Schematische Darstellung des humanen Cyclin B1.

Cyclin B1 ist 433 Aminosäuren lang. Es besitzt an seinem N-Terminus eine D-Box (*destruction box*), über die am Meta-Anaphase-Übergang die Ubiquitinierung durch den APC und anschließend die Proteolyse von Cyclin B1 erfolgt. Die CRS (cytoplasmic retention signal) ist verantwortlich für den permanenten Kernexport in der Interphase und G₂-Phase (siehe Kap. 1.2.2.1). Über die C-terminal gelegene Cyclin-Box bindet und aktiviert Cyclin B1 Cdk1, die katalytische Untereinheit des MPF.

1.2.2.1 Nukleäre Translokation von Cyclin B1

Zur Initiation der Mitose muß aktiver MPF in der Prophase in den Zellkern gelangen, um dort seine Substrate zu phosphorylieren. Diese nukleäre Translokation wird über die Phosphorylierung von Cyclin B1 vermittelt (Hagting et al., 1998). Phosphorylierung von Cyclin B1 ist nicht nötig für die Cdk1-Kinase Aktivität oder die Bindung an Cdk1, ist aber essentiell für die Funktionen des MPF *in vivo* (Li et al., 1995). In der Interphase lokalisiert Cyclin B1 hauptsächlich im Cytoplasma (Bailly et al., 1992; Pines und Hunter, 1991), da es permanent aus dem Kern exportiert wird (Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998). Erst in der Prophase (kurz vor dem Auflösen der Kernmembran) wandert es in den Zellkern. Die Phosphorylierung von Cyclin B1 steuert dessen Transport in den Zellkern,

indem ein Zurückhalten im Cytoplasma unterbunden und nukleäre Translokation möglich wird (Li et al., 1997).

Eine aminoterminal Region im Cyclin B1, das *cytoplasmic retention signal* (CRS) (AS 109-151) ist verantwortlich für die cytoplasmatische Lokalisation des Cyclin B1 während der Interphase, indem sie den Kern-Export reguliert (Pines und Hunter, 1994). Innerhalb der CRS sind vier Serin-Reste vorhanden (im humanen Cyclin B1 an den Positionen Ser-126, Ser-128, Ser-133 und Ser-147), deren Phosphorylierung die Lokalisation des Cyclin B1 steuert (Abb. 1-4). Ein Austausch aller vier Serin-Reste zu Alanin verhindert die nukleäre Translokation des Cyclins in der Mitose, da ein unphosphorylierbarer Zustand geschaffen wird (Hagting et al., 1999; Li et al., 1997). Die Vortäuschung eines phosphorylierten Zustandes durch Ersetzen der vier Serine durch Glutamat verstärkt dagegen den nukleären Import in humanen Interphase-Zellen (Hagting et al., 1999).

Innerhalb der CRS wurde ein *nuclear export signal* (NES) (AS 142-151) charakterisiert. (Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998). Die NES ist eine Leucinreiche Sequenz, welche an Exportin1/CRM1 (*chromosomal region maintenance*) bindet (Abb. 1-4) (Fornerod et al., 1997). CRM1 ist verantwortlich für den Kern-Export von poly(A)⁺-RNA und NES-beihaltenden Proteinen, welche somit im Cytoplasma lokalisieren. Der CRM1-vermittelte Transport ins Cytoplasma kann spezifisch von Leptomycin B (LMB) gehemmt werden (Nishi et al., 1994) (Abb. 1-4). LMB wurde ursprünglich als Antibiotikum aus *Streptomyces sp.* isoliert (Hamamoto et al., 1983).

Für Cyclin B1 aus *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, daß das innerhalb der NES liegende Ser-113 (entspricht Ser-147 in humanem Cyclin B1) das einzige Serin ist, bei dem durch Austausch zu Glutamat der Kernexport verhindert werden kann (Yang et al., 2001). Bei den anderen drei Serinen der CRS führt ein singulärer Austausch nur zu einer Verlangsamung des Exports. Dennoch ist die Rolle einzelner Phosphorylierungs-Stellen weiterhin unklar. Es wird angenommen, daß erst die koordinierte Phosphorylierung aller vier Serin-Reste zum schnellen Übertritt in den Kern führt (Yang et al., 2001). Dies wird nicht nur über den verminderten Export vermittelt, sondern auch über einen verstärkten Import, dessen Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Zwar wurde gezeigt, daß eine verkürzte Form von *Xenopus laevis*-Cyclin B1 an Importin- β binden und in den Kern transportiert werden kann (Moore et al., 1999), und auch ein Cyclin F-vermittelter Importmechanismus konnte demonstriert werden (Kong et al., 2000). Doch beide Mechanismen können nicht den schnellen Übertritt von Cyclin B1 in den Kern während der Prophase erklären.

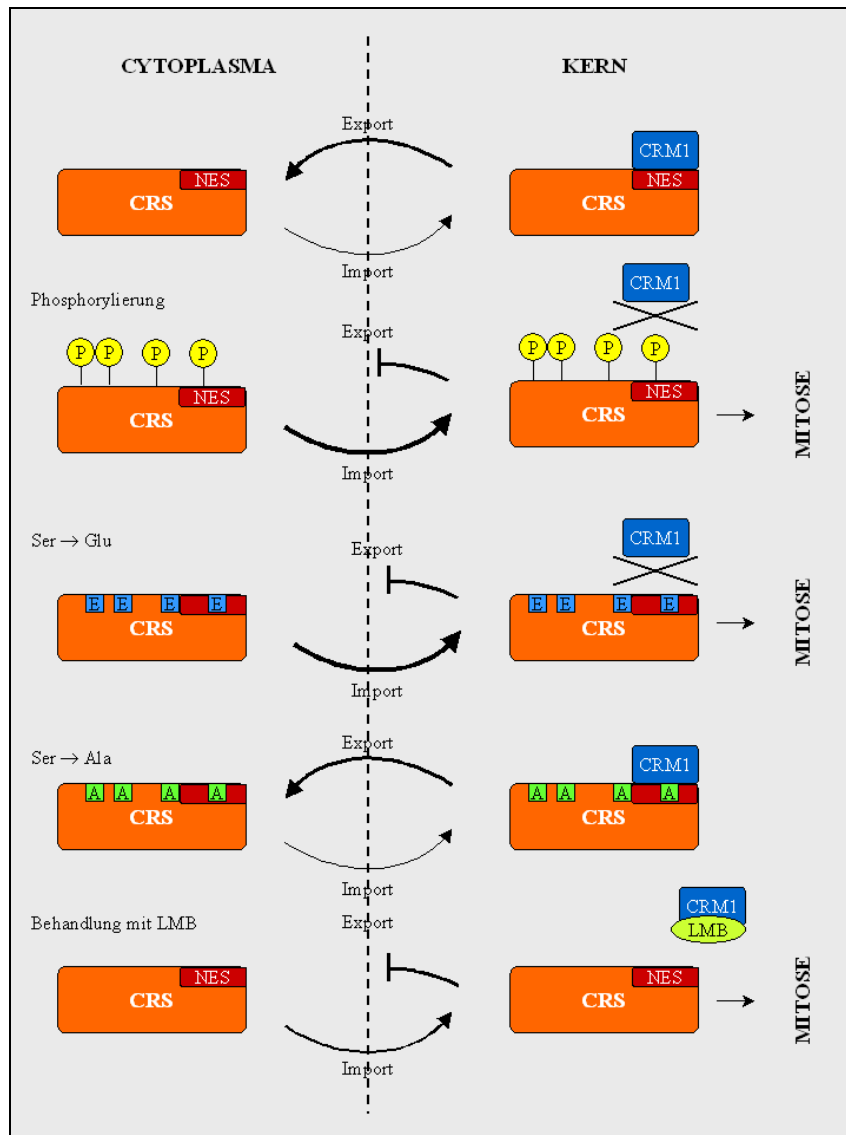


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Regulation des Imports und Exports von Cyclin B1 durch dessen CRS.

Während der Interphase wandert Cyclin B1 permanent zwischen Kern und Cytoplasma hin und her, wobei der Export überwiegt. Durch Phosphorylierung innerhalb der CRS wird der Import verstärkt. Die Phosphorylierung am Ser-147 innerhalb der NES verhindert den Export durch CRM1 (Exportin). Akkumuliert Cyclin B1 im Kern, so beginnt die Mitose. Der gleiche Effekt kann erzielt werden, indem die Serin-Reste zu Glutamat ausgetauscht werden, welche Phosphoserine vortäuschen. Ein Austausch der Serine zu Alanin dagegen verhindert den schnellen Import. Gleichzeitig kann der Export nicht unterbunden werden. Unter Zugabe von LMB, welches an CRM1 (Exportin1) bindet, wird der Export verhindert und Cyclin B1 kann im Kern akkumulieren.

Für *Xenopus*-Cyclin B1 wurde gezeigt, daß sowohl durch den MPF selbst als auch durch MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) die Serine an Position Ser-94 und Ser-96 (entsprechen Ser-126 und Ser-128 in humanem Cyclin B1) phosphoryliert werden (Izumi und Maller, 1991; Borgne et al., 1999). Für humanes Cyclin B1 wurde dies bisher noch nicht demonstriert. Die Kinasen, die verantwortlich sind für die Phosphorylierung der Serine an Position Ser-133 und Ser-147, waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt.

1.3 Polo-like Kinase 1 (Plk1)

Polo-like Kinase 1 (Plk1) gehört zur Familie der mitotischen Kinasen, die sowohl den G₂/M-Übergang als auch das Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese reguliert. Es handelt sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die von der Hefe bis zum Menschen hochkonserviert ist.

Der erste Vertreter der Plk-Familie wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt und *polo* benannt (Sunkel und Glover, 1988). *Polo*-Homologe sind Cdc5 aus *Saccharomyces cerevisiae*, Plt1 aus *Schizosaccharomyces pombe*, Plx1 aus *Xenopus laevis* und Plk1 aus Mammalia (Abb. 1-5). Säuger-Plk1 wurde mit einem PCR-basierenden Ansatz zur Suche nach humanen Kinasen in Lungentumoren identifiziert (Holtrich et al., 1994). Plks besitzen eine hochkonservierte katalytische Kinase-Domäne am Aminoterminus (AS 53-305 für humanes Plk1) und drei konservierte Polo-Boxen am Carboxyterminus, wobei die Polo-Box 1 (PB1) die am meisten konservierte und zuerst identifizierte Polo-Box darstellt (PB1: AS 410-440, für humanes Plk1) (Hamanaka et al., 1994; Reynolds und Ohkura, 2003).

Wenn auch für Mammalia und *Xenopus* bislang je drei Vertreter der Plks bekannt sind (Plk1, Plk2/Prk/Fnk und Plk3/Snk, bzw. Plx1, Plx2 und Plx3), die auch alle in die Regulation der Mitose involviert sind, so erfüllen doch nur Plk1 (bzw. Plx1) und seine homologen Vertreter in den verschiedenen Spezies die klassischen mitotischen Funktionen, die auch bei *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5 und *Drosophila polo* zu beobachten sind. Plk2/Prk/Fnk (*fibroblast growth factor inducible kinase*) und Plk3/Snk (*serum inducible kinase*) wurden als „*immediate-early gene*“ (IEG) identifiziert (Clay et al., 1993; Dai et al., 2000; Lake und Jelinek, 1993; Li et al., 1996; Ouyang et al., 1997). Die robuste und transiente Aktivierung von IEG-Transkription ist eine der ersten zellulären Antworten auf Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Streß. Durch sie werden oft Signalwege der MAPKs angeschaltet. Mitose-relevante Funktionen konnten bisher für Plk2 in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden (Ouyang et al., 1997). Plk3 ist vor allem in der G₁-Phase aktiv (Ma et al., 2003). Ein weiterer Vertreter, Sak, scheint auch Zellzyklus-relevante Funktionen zu haben, besitzt allerdings nur eine einzige Polo-Box (Fode et al., 1996; Leung et al., 2002). Essentiell für die G₂/M-Transition und das Durchlaufen der Mitose ist jedoch nur Plk1.

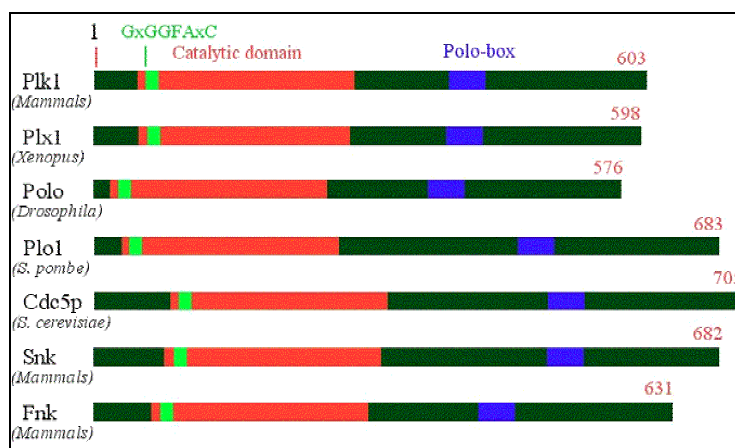


Abb. 1-5: Die Familie der Polo-like Kinasen.

Dargestellt sind die Vertreter der Polo-like Kinasen der verschiedenen Spezies. In Säugern existieren drei Vertreter, von denen aber nur Plk1 essentielle Funktionen in der Mitose erfüllt (ebenso in *Xenopus*, hier nicht dargestellt). Die konservierte katalytische Domäne (rot) kann in elf Subdomänen unterteilt werden. Die ATP Bindestelle, ist hellgrün, der Bereich der ersten Polo-Box ist blau dargestellt. (Leonard Mada)

1.3.1 Strukturelle Eigenschaften von Plk1

Der offene Leserahmen des humanen Plk1 codiert für ein Protein mit einer Länge von 603 Aminosäuren (AS). Charakteristisch für Serin/Threonin-Kinasen kann die katalytische Domäne in 11 Subdomänen eingeteilt werden (Hanks et al., 1988; Golsteyn et al., 1994; Hamanaka et al., 1994; Holtrich et al., 1994). Innerhalb der Kinase-Domäne wurde ein *nuclear localization signal* (NLS) charakterisiert, welches für die nukleäre Translokation in der Mitose verantwortlich ist (Taniguchi et al., 2002). Kennzeichnend für Vertreter der Plks sind die hochkonservierten Polo-Boxen am C-Terminus. Sie umfassen in humanem Plk1 folgende Aminosäuren: PB1: AS 410-440, PB2: AS 480-491, PB3: AS 515-540 (Reynolds und Ohkura, 2003). Die Polo-Boxen werden benötigt für die mitotischen Funktionen und die subzelluläre Lokalisation der Kinasen. Ferner haben sie die Fähigkeit Dimere zu bilden (Leung et al., 2002). Dem C-Terminus (incl. Polo-Boxen) werden drei Funktionen zugeschrieben: Er ist verantwortlich für die subzelluläre Lokalisation an den Centrosomen und am mitotischen Apparat (Lee et al., 1998; Leung et al., 2002; Seong et al., 2002; Song et al., 2000). Er fungiert als Protein-Interaktions-Domäne (Elia et al., 2003; Reynolds und Ohkura, 2003) und er kann die katalytische Aktivität des Enzyms durch Bindung an den N-Terminus negativ regulieren (Jang et al., 2002a). Der carboxyterminale Teil ist essentiell für die Plk1-Funktion. Wurden dem C-Terminus von Plk1 bislang zwei Polo-Boxen zugeschrieben (Elia et al., 2003), so wird doch zunehmend die Annahme vertreten, daß es sich um drei Polo-Boxen handelt (Reynolds und Ohkura, 2003).

1.3.2 Funktionen und Interaktionspartner von Plk1

Zu Beginn der Mitose reguliert Plk1 die G₂/M-Transition durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25C, welches wiederum den MPF zu aktivieren vermag (Abb. 1-2, Abb. 1-7) (Abrieu et al., 1998; Karaiskou et al., 1999; Kumagai und Dunphy, 1996; Qian et al., 1998). Zu Beginn der Mitose müssen verschiedene Proteine zu den Centrosomen rekrutiert werden, ein Reifungsprozeß, bei dem Plk1 essentiell ist (Lane und Nigg, 1996; Sunkel und Glover, 1988). Fehlerhafte Centrosomenreifung führt zu illegitimer Verteilung des genetischen Materials und oft zu aneuploiden Zellen – ein Merkmal entarteter Zellen. Plk1 wird auch benötigt für das Ausbilden einer bipolaren Spindel (Lane und Nigg, 1996)(Qian et al., 2001; Ohkura et al., 1995; Qian et al., 1998; Sunkel und Glover, 1988). Ferner spielt es eine Rolle beim durch DNA-Schäden induzierten Kontrollpunkt, um den Eintritt in die Mitose zu verhindern (Sanchez et al., 1999; Smits et al., 2000; Toczyski et al., 1997). Somit ist Plk1

ein essentieller Aktivator der G₂/M-Transition und Regulator organisatorischer Prozesse, ohne die die Mitose nicht oder nur fehlerhaft stattfinden kann.

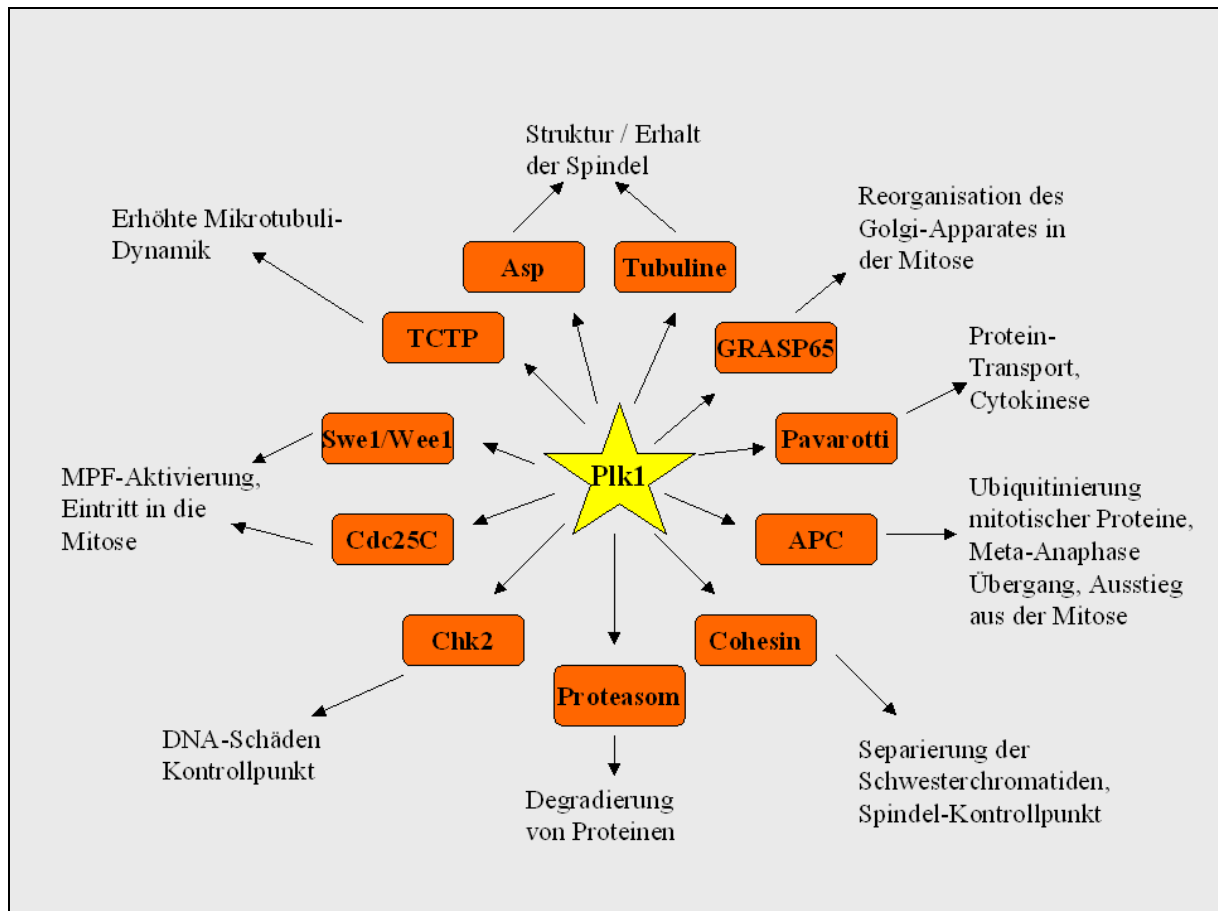


Abb. 1-6: Plk1-Substrate.

Schematische Darstellung der verschiedenen bislang bekannten Substrate von Plk1 und der Auswirkungen ihrer Phosphorylierungen.

Plk1 ist wichtig für den Meta-Anaphase Übergang und damit für das korrekte Verlassen der Mitose. Plk1 interagiert mit und reguliert den APC, welcher für die Degradierung mitotischer Proteine (u.a. Cyclin B1) verantwortlich ist (Charles et al., 1998; Descombes und Nigg, 1998; Golan et al., 2002; Kotani et al., 1998; Kotani et al., 1999; May et al., 2002; Shirayama et al., 1998). Ferner phosphoryliert Plk1 Cohesin und markiert es damit für die Proteolyse – ein essentieller Prozeß für die korrekte Separierung der Schwester-Chromatiden, der zur Initiation der Anaphase führt (Alexandru et al., 2001; Sumara et al., 2002). In der Cytokinese erfüllt Plk1 Mikrotubuli-stabilisierende Funktionen und ist in der Spaltheife über seine Beteiligung am hier vorhandenen „spindle-assembly“-Kontrollpunkt an der Bildung des cytokinetischen Actomyosin-Ringes beteiligt (Mulvihill und Hyams, 2002; Ohkura et al., 1995; Yarm, 2002).

1996). Zusammenfassend kann konstatiert werden, daß Plk1 essentielle Funktionen bei der Centrosomenreifung, der G₂/M-Transition, dem Meta-Anaphase-Übergang und der Cytokinese erfüllt.

1.3.3 Plk1 und Krebs

Ruhende NIH-3T3-Fibroblastenzellen können durch Mikroinjektion von Plk1 mRNA in den Zellzyklus zurückgeführt werden. Die konstitutive Expression von Plk1 verursacht in diesen Zellen einen transformierten Phänotyp (Smith et al., 1997). Die Plk1-Expression ist in schnell proliferierenden Zellen generell erhöht (Holtrich et al., 1994; Yuan et al., 1997). Diese Untersuchungen zeigen, daß es sich bei Plk1 um einen Proliferationsmarker mit prognostischem Potential handelt (Wolf et al., 1997). Außerdem ist Plk1 an Signalwegen beteiligt, die Kontrollpunkte überwachen können (Smits et al., 2000; Tsvetkov et al., 2003; van Vugt et al., 2001). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, basierend auf Antisense-Oligonukleotiden (ASOs), RNAi (RNA-Interferenz) mittels siRNA (*small interfering RNA*) oder inhibitorischen Peptiden zeigen, daß durch Plk1 vielversprechende Anti-Krebs-Ansätze verfolgt werden können (Spankuch-Schmitt et al., 2002b; Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Yuan et al., 2002a). Um diese Plk1-vermittelten Effekte genauer zu erklären, ist es notwendig, die molekularen Mechanismen dieser Hemmversuche weiter zu ergründen und Plk1-Funktionen genauer zu charakterisieren. Diese Ansätze werden unterstützt von der Charakterisierung neuer Interaktionspartner mit Mitose-regulierenden Funktionen, wie z.B. der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Pin1 (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998).

1.4 Pin1

Pin1 ist eine Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase (PPIase), die mit Plk1 aus mitotischen Zellen interagiert (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998). Pin1 wurde ursprünglich bei der Suche nach Proteinen, die an der Regulation der Mitose beteiligt sind, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner von *never in mitosis A* (NIMA) gefunden (Lu et al., 1996). NIMA ist eine Kinase aus *Aspergillus nidulans* mit Mitose-fördernder Funktion (Osmani et al., 1988). Pin1 interagiert mit der Protein-Interaktions-Domäne von NIMA und unterdrückt dessen Mitose-fördernde Aktivität (Lu et al., 1996). Pin1 ist essentiell für das Zellwachstum, teilt 45% Identität mit den Hefe-Proteinen Ess1/Ptf1 und komplementiert den letalen Effekt *ess1⁻/ess1⁻* diploider Hefezellen (Lu et al., 1996). Überexpression von Pin1 führt zur Anreicherung von HeLa-Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus, wohingegen ein *knock-out* des *Ess1*-Gens in *Saccharomyces cerevisiae* oder Antisense-Ansätze gegen humanes Pin1 aus

HeLa Zellen zu einer Anreicherung der Zellen in der Mitose führen (Fujimori et al., 1999; Hanes et al., 1989; Lu et al., 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen wird postuliert, daß Pin1 ein negativer Regulator des G₂/M-Übergangs, aber ein positiver Regulator für das Durchlaufen der Mitose ist. Ferner wurde beobachtet, daß die Herunterregulation von Pin1 in Mammalia-Zellen zu Apoptose führen kann (Rippmann et al., 2000).

Pin1 ist ein negativer Regulator für den Einstieg in die Mitose, wird aber gleichzeitig benötigt für das Durchlaufen der Mitose. Also ist Pin1 eine wichtige PPIase, welche die Mitose in humanen Zellen reguliert. Im Gegensatz zu dem letalen Phänotyp in der Hefe sind die *knock-outs* des *dodo*-Gens in *Drosophila* und des *Pin1*-Gens in der Maus nicht letal (Fujimori et al., 1999; Maleszka et al., 1997). Die adulte Pin1 *knock-out* Maus ist kleiner, weist ein geringeres Körpergewicht auf, zeigt Atrophie der Testis und eine degenerierte Retina. Ferner sind weibliche Mäuse nicht in der Lage, die für die Schwangerschaft klassischen proliferativen Veränderungen des Brustgewebes zu entwickeln (Liou et al., 2002).

Pin1-Überexpression ist in mehreren humanen Krebsarten, wie Brust- und Prostata-Krebs, zu finden (Ryo et al., 2001; Wulf et al., 2001). In normalem Brustgewebe liegt Pin1 vorwiegend im phosphorylierten Zustand vor, wohingegen überexprimiertes Pin1 in Brustkrebs-Geweben hauptsächlich unphosphoryliert ist (Wulf et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, daß Pin1 durch Phosphorylierung negativ reguliert wird (Lu et al., 2002a). Da Inhibierung von Pin1 in Tumorzellen zu Apoptose führt (Lu et al., 1996; Lu et al., 2002a; Rippmann et al., 2000), könnte die Verwendung von Pin1-Inhibitoren eine neue Möglichkeit der Anti-Krebs-Therapie darstellen.

1.4.1 Isomerisierung von Phosphoproteinen durch Pin1

PPIasen sind ubiquitär verbreitete Enzyme mit hoher phylogenetischer Konservierung (Galat und Metcalfe, 1995). Sie katalysieren eine Rotation um die dem Prolin vorausgehende Aminosäure-Verbindung und sind an wesentlichen zellulären Prozessen beteiligt, wie der *de novo*-Proteinbiosynthese und der Proteinfaltung (Steinmann et al., 1991; Schmid, 1995). Die Einteilung der PPIasen in die Familien der Cyclophiline, der FK506-bindenden Proteine (FKBP) und der Parvuline erfolgt nach ihrer Sequenzhomologie, Substratspezifität und der Sensitivität gegenüber Inhibitoren. Dabei wird die PPIase-Aktivität der Cyclophiline spezifisch durch Cyclosporin A und die der FKBP durch FK506 und Rapamycin inhibiert. Die Aktivität der Parvuline wird durch Juglon inhibiert. Pin1, wie Parvulin, wird weder von Cyclosporin A noch einem FK506-Analogon inhibiert (Rahfeld et al., 1994). Es unterscheidet sich von anderen PPIasen durch seine Substratspezifität. Pin1 kann nur dann ein Substrat

isomerisieren, wenn dessen Prolin-Rest ein phosphorylierter Serin- oder Threonin-Rest vorausgeht (pSer/Thr-Pro) (Abb. 1-8). Diese Ser/Thr-Pro-Motive sind wichtige regulatorische Phosphorylierungs-Motive, die während der Mitose (vor allem von Cdk's und MAPK) phosphoryliert werden. Pin1 reguliert mehrere mitotische Proteine, welche pSer/Thr-Pro-Motive aufweisen (Lu et al., 2002b). Da Pin1 die einzige Isomerase ist, die diese Substrate effizient isomerisieren kann (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997), wurde vorgeschlagen, Pin1 nicht länger zur Familie der Parvuline zu zählen, sondern eine eigene Unterfamilie der Pin1-ähnlichen Isomerasen zu definieren (Lu et al., 2002b).

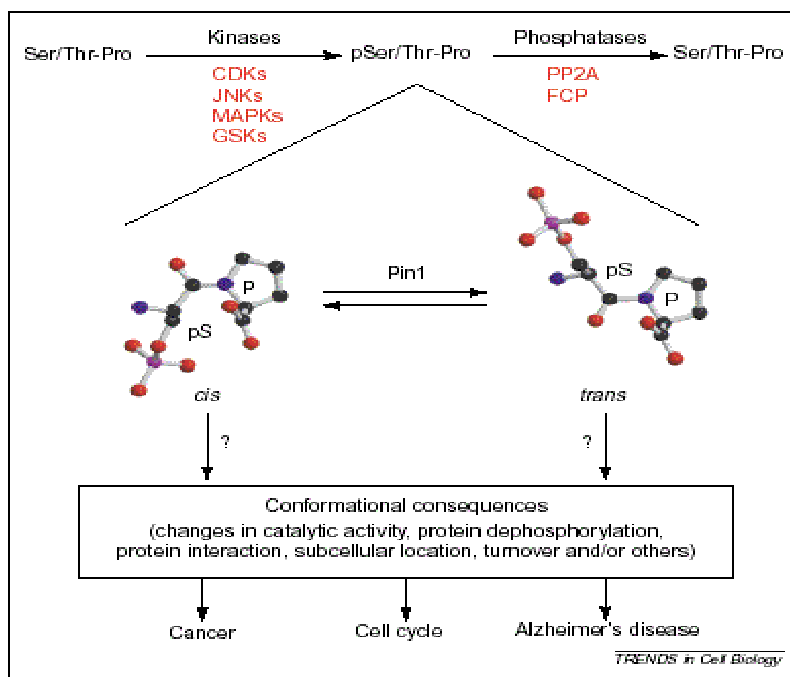


Abb. 1-8: Modell der Phosphorylierungs-spezifischen Isomerisierung durch die PPIase Pin1.

Pin1 isomerisiert die Peptidbindung des Prolins, welches einem phospho-Serin oder phospho-Threonin folgt. Dadurch verändert sich die Konformation des Gesamtproteins. Kinasen, die durch Phosphorylierung Pin1-Substrate generieren, sind meist mitotische Kinasen wie Cdk's und MAPK. Aus: (Lu et al., 2002b)

1.4.2 Strukturelle Eigenschaften von Pin1

Alle eukaryontischen Pin1-Homologe bestehen aus zwei Domänen: einer kurzen, N-terminalen WW-Domäne (mit zwei konservierten Tryptophanen) und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Abb. 1-9). Beim humanen Pin1 umspannt die WW-Domäne die AS 5-42 und die PPIase-Domäne die AS 59-163. Die WW-Domäne erkennt – wie *Src homology 3* (SH3) Domänen – Prolin-reiche Sequenzen und dirigiert Pin1 zu seinen Substraten. Die Bindung an Substrate ist verantwortlich für die fast ausschließliche Lokalisation von Pin1 im Kern, welches dort an *speckles*-ähnlichen Strukturen konzentriert zu finden ist (Rippmann et al., 2000). Die Phosphorylierung von Pin1 durch die *cAMP-dependent protein kinase A* (PKA) an Ser-16 stört die nukleäre Lokalisation durch Inhibierung der Bindung an seine Substrate in HeLa-Zellen (Lu et al., 2002a). Überexpression der PPIase-Domäne führt zu

massiver Apoptose, sogar wenn diese Domäne durch gerichtete Mutagenese katalytisch inaktiviert wurde, was auf einen dominant-negativen Effekt zurückzuführen ist (Rippmann et al., 2000). Dies ist bei Überexpression der WW-Domäne nicht zu beobachten. In Hefe konnte gezeigt werden, daß Pin1 oder seine PPIase-Domäne alleine genügt, um das Zellwachstum zu unterstützen, während dies für die WW-Domäne nicht zutrifft (Zhou et al., 2000). Dies demonstriert die essentielle Rolle der PPIase-Domäne für die Pin1-vermittelten Funktionen. Jedoch konnte bislang kein Regulator der PPIase-Domäne identifiziert werden.

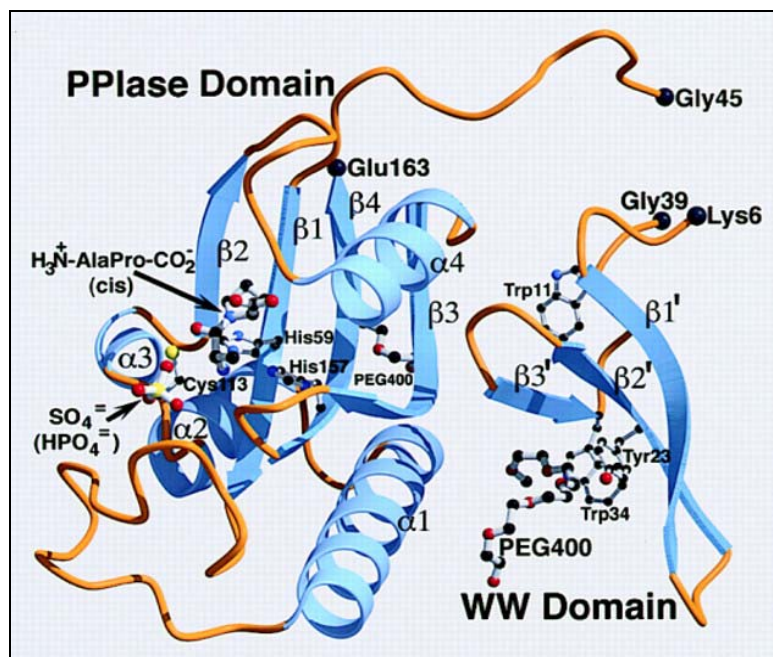


Abb. 1-9: Struktur von Pin1

Die katalytische Domäne (PPIase) besteht aus vier α -Helices und vier β -Faltblättern. Die Sulfatgruppe (gelb) repräsentiert die Lage der gebundenen Phosphatgruppe des Substrats (pSer/Thr-Pro). Die WW-Domäne besitzt drei β -Faltblätter und ist verantwortlich für die Bindung des Substrats. Die Struktur der ersten sechs Aminosäuren (AS 1-6) und des Linkers (AS 39-45) konnte bislang nicht geklärt werden. Aus: (Ranganathan et al., 1997).

1.4.3 Pin1-Substrate

Pin1 interagiert mit Phosphoproteinen, von denen viele mitotische Funktionen ausüben. Pin1-Substrate sind oft Zellzyklusregulatoren, wie z.B. Cdc25C, (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998), p53 (Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002), Cyclin D1 (Liou et al., 2002), rab4 (Gerez et al., 2000), aber auch RNA-Polymerase II (Albert et al., 1999), der Transkriptionsfaktor NFAT (Liu et al., 2001), β -Catenin (Ryo et al., 2001) und c-Jun (Wulf et al., 2001). Die Funktionen von Pin1 sind damit nicht auf die Mitose beschränkt, denn über die Regulation von Transkriptions-Aktivatoren erfüllt es Funktionen während des gesamten Zellzyklus, vor allem aber an der G₁/S-Phase. Cyclin D1, ein Regulator der G₁/S-Phase, kann von Pin1 über drei verschiedene Wege reguliert werden: 1) Pin1 kooperiert mit aktiviertem Ras oder *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK) und steigert die transkriptionelle Aktivität von c-Jun gegenüber dem Cyclin D1-Promotor. 2) Pin1 stabilisiert β -Catenin im Kern, wodurch

dieses wiederum die Expression von Genen wie *c-myc* und *Cyclin D1* verstärkt. 3) Pin1 interagiert direkt mit Cyclin D1 und erhöht dessen Stabilität. Auch die Beobachtung, daß der Phänotyp der Pin1-*knock-out*-Maus dem der Cyclin D1 *knock-out*-Maus ähnelt, spricht für eine Regulation von Cyclin D1 durch Pin1 (Liou et al., 2002).

Ferner kann Pin1 über die Isomerisierung von phosphoryliertem Tau die Bildung der typischen Neurofibrillenbündel der Alzheimer-Krankheit hemmen, indem es Tau wieder befähigt, Mikrotubuli zu binden (Lu et al., 1999).

Interaktionen für Pin1 und mitotische Kinasen konnten bislang gezeigt werden für NIMA (Lu et al., 1996), Wee1 und Myt1 (Shen et al., 1998), *casein kinase II* (CK2) (Messenger et al., 2002) und PKA (Lu et al., 2002a). In Pulldown-Experimenten wurde gezeigt, daß Pin1 auch mit Plk1 interagiert (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998). Über den Mechanismus und die Bedeutung dieser Interaktion ist jedoch bislang nichts bekannt. Diese Interaktion soll in der hier durchgeführten Arbeit näher untersucht werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Mitose ist ein streng regulierter Prozeß, der vor allem gewährleistet, daß beide Tochterzellen den gleichen Satz an genetischem Material erhalten. Verschiedene Kontrollmechanismen überwachen den Eintritt in die Mitose, die Dynamik des Spindelfaser-Apparates und die korrekte Aufteilung des Chromosomensatzes. Kinasen und Phosphatasen sind essentielle Enzyme, die das Durchlaufen der Mitose regulieren und in die Überwachung der Mitose durch Kontrollpunkte involviert sind. Die Charakterisierung neuer Interaktionspartner mitotischer Kinasen trägt dazu bei, den komplizierten Prozeß der Mitose besser zu verstehen. Polo-like Kinase 1 (Plk1) ist eine Kinase mit Mitose-fördernder Funktion. Als essentieller Regulator der M-Phase erfüllt Plk1 Funktionen bei der Centrosomenreifung, der G₂/M-Transition, dem Meta-Anaphase-Übergang und der Cytokinese. In den hier aufgeführten Untersuchungen sollten neue Interaktionspartner der Polo-like Kinase 1 (Plk1) charakterisiert werden.

Da Plk1-Aktivität nötig ist, um den Cyclin B1/Cdk1-Komplex (MPF), nicht aber den Cyclin A/Cdk1-Komplex zu aktivieren (Abrieu et al., 1998), sollte untersucht werden, ob dieser Aktivierung eine Interaktion von Plk1 mit der Cyclin B1-Untereinheit zugrunde liegen könnte. Auf dieser Basis sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenz- und Interaktions-Studien untersucht werden, ob Plk1 und Cyclin B1 miteinander interagieren. Phosphorylierungs-Studien sollten klären, ob der MPF direkt von Plk1 reguliert werden kann.

Ein weiterer Regulator der M-Phase ist die Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerase Pin1, die mitotische Phosphoproteine isomerisiert und reguliert. Plk1 aus mitotischen Zellextrakten ist in der Lage mit Pin1 zu interagieren (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998). Pin1 ist ein negativer Regulator der G₂/M-Transition, gleichzeitig aber essentiell für das Durchlaufen der Mitose. Da Pin1 verschiedene mitotische Kinasen (wie z.B. NIMA, Wee1, Myt1) zu regulieren scheint, und Plk1 mit rekombinantem Pin1 assoziiert, sollte diese Interaktion mit Hilfe von Pulldown-Experimenten näher untersucht und analysiert werden. Dabei ist in Phosphorylierungs-Studien zu ergründen, ob Plk1 in der Lage ist, Pin1 zu phosphorylieren.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Charakterisierung neuer Interaktionspartner von Plk1 und durch die Untersuchung dieser Interaktionen zum besseren Verständnis der Regulation der Mitose beizutragen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können wiederum dazu dienen, neue therapeutische Ansätze für die Hemmung schnell proliferierender Tumorzellen zu entwickeln.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs/CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen. Radiochemikalien und Filme wurden von Amersham Biosciences (Freiburg) geliefert. Als Proteaseinhibitor wurde der Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™ von Roche (Mannheim) verwendet, Phosphataseinhibitoren (Cocktail 1 und 2) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Molekulargewichtsmarker für Proteine (Benchmark) wurde von Invitrogen (Karlsruhe) und DNA-Fragmente (1 kb und 100 bp-Leiter) von NEB (Schwalbach) bezogen. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde BIO-Rad Protein Assay-Lösung von BIO-Rad (München) eingesetzt. Plastikmaterial, Membranen und Filtersysteme für Labor und Zellkultur wurden von den Firmen Costar (Bodenheim), Fisher Scientific (Schwerte), Greiner (Frickenhäuser), Millipore (Eschborn), Schleicher & Schüll (Dassel), BD Biosciences (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY/USA) bezogen.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen und Puffer wurden, autoklaviert (20 min bei 121°C und 2,0 bar) oder im Falle der Hitzeinstabilität sterilfiltriert (Sterilfilter: 0,22 µm Porenweite, Fa. Millipore).

Agaroselösungen für ein x%iges Gel (100 ml)

x g Agarose
ad 100 ml 1x TAE

10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)

1 g APS
ad 10 ml H₂O bidest.
in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern

Blocking-Puffer für Western-Blots

5 % Magermilchpulver (w/v)
in 1x PBS

Blotting-Puffer für Western-Blots

1,4 %	Glycin (w/v)
0,3 %	Tris-Base (w/v)
20 %	MeOH (v/v)

Coomassie-Färbelösung

40 %	Methanol (v/v)
10 %	Essigsäure (v/v)
0,125 %	Coomassie Brillantblau R 250 (w/v)

6x DNA-Probenpuffer

0,1 %	Bromphenolblau (w/v)
0,1 %	Xylencyanol (w/v)
30 %	Glycerin (v/v)

Elutionspuffer (GST)

100 mM	NaCl
50 mM	TrisHCl pH 8
20 mM	Glutathion

Elutionspuffer (Ni-NTA)

300 mM	NaCl
50 mM	NaH ₂ PO ₄
250 mM	Imidazol

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml EtBr in 1x TAE

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 l)

100 µl	Ethidiumbromid-Stammlsg. (10 mg/ml)
ad 1 L	1 x TAE

Fixierlösung

70 %	H ₂ O bidest (v/v)
20 %	MeOH(v/v)
10 %	Essigsäure (v/v)

Hoechst 33342-Stammlösung (10 mg/ml)

0,5 mg/ml Hoechst 33342 (Bisbenzimid)

Hoechst 33342-Gebrauchslösung (2 µg/ml) in PBS**Kinasepuffer (Plk1)**

20 mM	HEPES pH 7,4
150 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
0,5 mM	DTT
5 mM	NaF
0,1 mM	Na ₃ VO ₄

Laufpuffer für Western-Blot (1l)

1,4 % Glycin (w/v)
 0,3 % Tris-Base (w/v)
 2 % SDS (w/v)

Lysepuffer

250 mM NaCl
 50 mM Tris pH 8,0
 1 % Triton X-100
 10 % Glycerol

Proteaseinhibitor frisch zugeben

3 M Na-Acetat pH 5,2

3 M Na-Acetat
 in H₂O bidest. lösen und mit Essigsäure (96%) auf pH 5,2 einstellen

NENT-2-Puffer

100 mM NaCl
 20 mM Tris-HCl pH 8
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 0,2 % NP-40

Ni-NTA Waschpuffer

300 mM NaCl
 50 mM NaH₂PO₄
 20 mM Imidazol

Proteaseinhibitor frisch zugeben

1x PBS

137 mM NaCl
 2,6 mM KCl
 8,1 mM Na₂HPO₂ x 2H₂O bidest
 1,5 mM KH₂PO₄

mit 1N HCl auf pH 7,4 einstellen; Lagerung bei RT

PBS-BSA

1 x PBS
 1 % BSA (w/v) zugeben und bei RT sedimentieren lassen

PBS-T

0,2 % Tween-20
 in 1x PBS

4 % Paraformaldehydlösung

4 % Paraformaldehyd (PFA) (w/v)
 in 1x PBS
 bei 60°C inkubieren bis PFA gelöst ist; in Aliquots zu 25 ml bei -20 °C lagern

Proteaseinhibitor (50x)

1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™ (Roche) in 1 ml H₂O bidest lösen
Lagerung bei -20°C

10x RB

14 % Glycin (w/v)
3 % Tris-Base (w/v)

RIPA-Puffer

150 mM NaCl
50 mM Tris pH 8,0
0,5 % Na-Desoxycholat (w/v)
1 % NP-40 (v/v)
0,1 % SDS (w/v)
1 mM EDTA

Proteaseinhibitor und je 1 mM DTT, PMSF und Na₃VO₄ frisch zugeben

Schnellentfärber (Coomassie)

40 % EtOH (v/v)
20 % Essigsäure (v/v)
40 % H₂O bidest (v/v)

10 % SDS

10 % SDS (w/v)
bei 68°C in H₂O bidest lösen
pH 7,2 einstellen

5x SDS-Probenpuffer

65 mM Tris-HCl pH 8,8
0,2 % Bromphenolblau (w/v)
5 % SDS (w/v)
250 mM DTT
20 % Glycerin (v/v)

STET-Lösung

50 mM Tris-HCl pH 8
50 mM EDTA
0,5 % Triton X-100 (v/v)
8 % Saccharose (w/v)
steril filtrieren und bei 4°C lagern

Strip-Lösung für Western-Blots

62 mM Tris-HCl pH 6,7
2 % SDS (v/v)
100 mM β-Mercaptoethanol

50x TAE-Puffer

2 M Tris
0,05 M EDTA (pH 8)
1 M Eisessig

TE Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 8,0

TFB I-Puffer

30 mM K-Acetat pH 5,8 (mit 2M Essigsäure einstellen)
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin (v/v)
steril filtrieren und bei 4°C lagern

TFB II-Puffer

10 mM MOPS pH 7,5
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % Glycerin (v/v)
steril filtrieren und bei 4°C lagern

TIF-Puffer

150 mM NaCl
20 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM MgCl₂
0,1 % NP-40 (v/v)
10 % Glycerol
Proteaseinhibitor frisch zugeben

Tris-HCl 1M

121,1 g Tris-Base
in 700 ml H₂O bidest lösen; erwünschten pH mit konz. HCl einstellen;
mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Enzyme wurden in einem glycerinhaltigen Puffer bei -20°C gelagert und zu den, von dem Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer eingesetzt.

2.1.3.2 Nukleinsäure-modifizierende Enzyme

Enzym	Charakterisierung	Bezugsquelle (Fa.)
T4-DNA-Ligase	Ligase	NEB
Quick T4-DNA-Ligase	Ligase	NEB
T4-Kinase	Kinase	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Polymerase	Invitrogen
<i>Platinum Pfx</i> -DNA-Polymerase	Polymerase	Invitrogen
<i>Klenow</i> -Fragment	Polymerase	NEB
CIP	Phosphatase	NEB
T7-DNA-Polymerase	Polymerase	Amersham

2.1.3.3 Sonstige Enzyme

Enzym	Charakterisierung	Bezugsquelle (Fa.)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Muramidase	Roche
Ribonuklease A	Ribonuklease	Roche
Trypsin	Serinprotease	Amersham
Faktor Xa	Protease	Amersham
Thrombin	Protease	Amersham
TEV-Protease	Protease	Dr. K. Saxena

2.1.4 Antikörper

Sekundäre Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper, die gegen Maus IgG, Kaninchen IgG und Ziege IgG gerichtet sind, wurden von Santa Cruz, Heidelberg, bezogen. Sekundäre CyTM3- und DTAF-konjugierte Antikörper wurden von Dianova, Hamburg geliefert.

Antigen	Name/Charakteristik	Spezies	Hersteller/Referenz
α -Tubulin	monoklonal	Maus	Dianova, Hamburg
β -Aktin	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plk1	monoklonal, cocktail	Maus	Zymed, San Francisco/USA
Plk1	monoklonal	Maus	BD Biosciences Transduction Laboratories, Heidelberg
Plk1	polyklonal	Kaninchen	(Yuan et al., 1997)
Plk1	polyklonal	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Plk1	polyklonal	Kaninchen	Upstate, NY/USA
Cdc25C	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Pin1	polyklonal	Kaninchen	Upstate, NY/USA
Pin1	polyklonal	Kaninchen	Prof. Vincent, Quebec/KAN
Cyclin D1	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin B1	monoklonal	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin B1	monoklonal, Protein A-gekoppelt	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
GFP	polyklonal	Kaninchen	Clontech, Heidelberg
Anti Xpress TM	monoklonal	Maus	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Oligonukleotide

Name	Verwendungszweck	Sequenz
CyB 5 Sma	5'-Primer mit SmaI für humanes Cyclin B1	CTGCACCCGGGTGAA GAGG
CyB 3 Not	3'-Primer mit NotI für humanes Cyclin B1	CCGGGCGGCCGCACA GATGCACATGTGCC
CyB 3 Pst	3'-Primer mit PstI für humanes Cyclin B1	CCGGCTGCAGACAGA TGCACATGTGCC
CyB 5 Hind	5'-Primer mit HindIII für humanes Cyclin B1	GGTGAAGAGGAAGCT TTGGCGCTCCGAGTC
CyB 3 Bam	3'-Primer mit BamHI für humanes Cyclin B1	CTCCAACCTCAAGGAT CCAAGTTACACCTTT GC
CRS 5 Eco	5'-Primer mit EcoRI ab AS 109 für humanes Cyclin B1	CAGAGCCAGAATTTCG AGCCAGAACCTGAG
CRS 3 Xho	3'-Primer mit XhoI bis AS 159 für humanes Cyclin B1	GGTTTGGATCAGCTC GAGCTTCTGCATCCA C
CRS S126A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S126 zu A in humanem Cyclin B1	GGTTGATACTGCCGC TCCAAGCCCAATGG
CRS S126A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S126 zu A in humanem Cyclin B1	CCATTGGGCTTGGAG CGGCAGTATCAACC
CRS S128A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S128 zu A in humanem Cyclin B1	GATACTGCCTCTCCA GCCCAATGGAAAC
CRS S128A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S128 zu A in humanem Cyclin B1	GTTTCCATTGGGGCT GGAGAGGCAGTATC
CRS S133A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S133 zu A in humanem Cyclin B1	CCAATGGAAACAGCT GGATGTGCC
CRS S133A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S133 zu A in humanem Cyclin B1	GGCACATCCAGCTGT TTCCATTGG
CRS S147A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S147 zu A in humanem Cyclin B1	GTCAGGCTTTCGCTG ATGTAATTC
CRS S147A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S147 zu A in humanem Cyclin B1	GAATTACATCAGCGA AAGCCTGAC
CRS S126,128A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S126, 128 zu A in humanem Cyclin B1	GGTTGATACTGCCGC TCCAGCCCCAATGGA AAC
CRS S126,128A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S126, 128 zu A in humanem Cyclin B1	GTTTCCATTGGGGCT GGAGCGGCAGTATCA ACC
Plk 5 Eco	5'-Primer mit EcoRI für humanes Plk1	CTGCAGCGCGAATTC GGGAGCATGAGTG
Plk 3 Eco	3'-Primer mit XhoI für humanes Plk1	CAGTATGGGCTCGAG ATGCAGGTGGGAGTG

Pin-WW-E-5	5'-Primer mit EcoRI für humanes Pin1	GTTGAATTCATGGCG GACGAGGAGAAGCTG C
Pin-PPI-X-3	3'-Primer mit XhoI für humanes Pin1	GGCTCTCGAGCCTCA CTCAGTGCGGAGGAT G
Pin1-PPI-E-5	5'-Primer mit EcoRI ab AS 59 für humanes Pin1	CGCGAATTCCACCTG CTGGTGAAGCACAGC
Pin1-WW-X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 42 für humanes Pin1	CACCACTCGAGCTGT TGCCGCTGGGCCGCT CC
Pin1 AA1-49 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 49 für humanes Pin1	CAGGCCTCGAGTGCC CGTTTTTGCCACC
Pin1 AA1-62 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 62 für humanes Pin1	GGCTGCTCGAGACCA GCAGGTGCGAGCAG
Pin1 AA1-70 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 70 für humanes Pin1	GCCAGCTCGAGGGCC GCCGTGACTGGCTG
Pin1 AA1-89 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 89 für humanes Pin1	AGCCGCTCGAGAGCT CCAGGGCCTCCTC
Pin1 AA1-113 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 113 für humanes Pin1	TGGCTCTCGAGCAGT CGCTGAACTGTGAG
Pin1 AA1-133 X-3	3'-Primer mit XhoI bis AS 133 für humanes Pin1	CGTCTCTCGAGGGCT TCTGCATCTGACC
Pin1 S65E down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S65 zu E in humanem Pin1	GGTGAAGCACGAACA GTCACGGC
Pin1 S65E up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S65 zu E in humanem Pin1	GCCGTGACTGTTCGT GCTTCACC
Pin1 S65A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S65 zu A in humanem Pin1	GGTGAAGCACGCCCA GTCACGGC
Pin1 S65A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S65 zu A in humanem Pin1	GCCGTGACTGGGCGT GCTTCACC
Pin1 S67E down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S67 zu E in humanem Pin1	GCACAGCCAGGAACG GCGGCCCTC
Pin1 S67E up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S67 zu E in humanem Pin1	GAGGGCCCGCCTCC TGGCTGTGC
Pin1 S67A down	Sense-Strang Primer für Mutagenese von S67 zu A in humanem Pin1	GCACAGCCAGGCACG GCGGCCCTC
Pin1 S67A up	Anti-Sense-Strang Primer für Mutagenese von S67 zu A in humanem Pin1	GAGGGCCCGCCTGCC TGGCTGTGC

2.1.6 Vektoren

2.1.6.1 Parentale Plasmid-Vektoren

Plasmid	Herkunft/Referenz
pGEX 5x-1/2/3	Amersham Biosciences (Freiburg)
pKM 263	Krishna Saxena (Frankfurt)
pET-30A/C+	Novagen (Madison/USA)
pEGFP-C1/3	Clontech (Heidelberg)
pECFP-C1	Clontech (Heidelberg)
pEYFP-C1	Clontech (Heidelberg)
pcDNA3.1/HisA/B/C	Invitrogen (Karlsruhe)
pCMV-HA	Clontech (Heidelberg)

2.1.6.2 Verwendete Plasmid-Vektoren

Name	Kodiertes Insert	Referenz/Bezugsquelle
pACT2-Plk1	AS 1-603 von humanem Plk1	Dietmar Kuhl, Hamburg
pEGFP-Plk1	AS 1-603 von humanem Plk1	Uwe Holtrich, Frankfurt
pEYFP-Plk1	AS 1-603 von humanem Plk1	Diese Arbeit
pCI-Plk1-WT pCI-Plk1-K82M PCI-Plk1-T210D	AS 1-603 von Ratten-Plk1	Raymond Erikson, Cambridge/USA
pGEX-Plk1	AS 1-603 (aus pACT2-Plk)	Diese Arbeit
pET-Plk1	AS 1-603 (aus pGEX-Plk1)	Diese Arbeit
pCMX-Cyclin B1	AS 1-433 von humanem Cyclin B1	Jonathan Pines, Cambridge/UK
pGEX-Cyclin B1	AS 1-433, human	Diese Arbeit
pGEX-CRS	AS 109-159 von humanem Cyclin B1	Diese Arbeit
pGEX-CRS-S126A	AS 109-159, mit S126 zu A	Diese Arbeit, mit dem Praktikanten Ali Tinazli
pGEX-CRS-S128A	AS 109-159, mit S128 zu A	
pGEX-CRS-S133A	AS 109-159, mit S133 zu A	
pGEX-CRS-S147A	AS 109-159, mit S147 zu A	
pET-Cyclin B1	AS 1-433, human	Diese Arbeit
pET-Cyclin B1-S126,128A	AS 1-433, mit S126, 128 zu A	Diese Arbeit
pET-Cyclin B1-S133A	AS 1-433, mit S133 zu A	Diese Arbeit
pET-Cyclin B1-S147A	AS 1-433, mit S147 zu A	Diese Arbeit
pET-Cyclin B1-S126,128,133A	AS 1-433, mit S126, 128, 133 zu A	Diese Arbeit
pECFP-Cyclin B1	AS 1-433, human	Diese Arbeit
pcDNA-Cyclin B1	AS 1-433, human	Diese Arbeit
pcDNA-Cyclin B1-S126,128A	AS 1-433, mit S126, 128 zu A	Diese Arbeit

pcDNA-Cyclin B1-S133A	AS 1-433, mit S133 zu A	Diese Arbeit
pcDNA-Cyclin B1-S147A	AS 1-433, mit S147 zu A	Diese Arbeit
pcDNA-Cyclin B1-S126,128,133A	AS 1-433, mit S126, 128, 133 zu A	Diese Arbeit
pEGFP-Pin1	AS 1-163 von humanem Pin1	Andreas Schnapp, Biberach
pGEX 4T-1-Pin1	AS 1-163 von humanem Pin1	
pGEX 4T-1-Pin1-RR	AS 1-163 mit R68, 69 zu L	
pEGFP-Pin1-WW	AS 1-42 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP-Pin1-1-49	AS 1-49 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-1-62	AS 1-62 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-1-70	AS 1-70 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-1-89	AS 1-89 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-1-113	AS 1-113 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-1-133	AS 1-133 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP-PPI	AS 59-163 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-S65A	AS 1-163 mit S65 zu A	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-S65E	AS 1-163 mit S65 zu E	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-S67A	AS 1-163 mit S67 zu A	Diese Arbeit
pEGFP- Pin1-S67E	AS 1-163 mit S67 zu E	Diese Arbeit
pCMV- Pin1	AS 1-163	Andrea Krämer und Juping Yuan
pCMV- Pin1-S65A	AS 1-163 mit S65 zu A	
pCMV- Pin1-S65E	AS 1-163 mit S65 zu E	
pCMV- Pin1-S67A	AS 1-163 mit S67 zu A	
pCMV- Pin1-S67E	AS 1-163 mit S67 zu E	
pCMV- Pin1-S65,67A	AS 1-163 mit S65, 67 zu A	
pCMV- Pin1-S65,67A	AS 1-163 mit S65, 67 zu E	
pET-30-Pin1-S65A	AS 1-163 mit S65 zu A	Diese Arbeit
pET-30-Pin1-S65E	AS 1-163 mit S65 zu E	Diese Arbeit
pGEX-Pin1-WW	AS 1-42 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX -Pin1-1-49	AS 1-49 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-1-62	AS 1-62 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-1-70	AS 1-70 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-1-89	AS 1-89 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-1-113	AS 1-113 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-1-133	AS 1-133 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX-PPI	AS 59-163 von humanem Pin1	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-S65A	AS 1-163 mit S65 zu A	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-S65E	AS 1-163 mit S65 zu E	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-S67A	AS 1-163 mit S67 zu A	Diese Arbeit
pGEX- Pin1-S67E	AS 1-163 mit S67 zu E	Diese Arbeit
pET-Pin1	AS 1-163 von humanem Pin1	Krishna Saxena
pET-Pin1-WW	AS 1-54 von humanem Pin1	
pET-Pin1-Cat	AS 44-163 von humanem Pin1	
pKM-Pin1-Cat	AS 44-163 von humanem Pin1	
pKM-Pin1-Cat-S65A	AS 44-163 mit S65 zu A	Diese Arbeit
pKM-Pin1-Cat-S67A	AS 44-163 mit S67 zu A	Diese Arbeit

2.1.7 Bakterien und Bakterien-Medien

2.1.7.1 Bakterienstämme:

Stamm	Genotyp
DH5 α	<i>endA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁻) supE44, thi⁻, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, 80dlacI^qZD M15</i>
BL21 (DE3) pLysS	<i>F⁻, ompT, hsdS_B, (r_B⁻, m_B⁻) dcm, gal, lambda (DE3), pLysS (Cm^r)</i>
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL-X strain ^a	<i>E. coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal l (DE3) endA Hte meta::Tn5(KanS^r) [argU ileY leuW Cam^r]*</i>

2.1.7.2 Bakterienmedien und -Zusätze

Antibiotika wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Fluka (Buchs/CH), Medienbestandteile von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) geliefert.

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) (10 ml)

1 g Ampicillin
ad 10 ml H₂O bidest
 sterilfiltrieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
 wird im Verhältnis 1:1000 eingesetzt

Chloramphenicol-Lösung 34 mg/ml (10 ml)

340 mg Chloramphenicol
ad 10 ml H₂O bidest
 sterilfiltrieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
 wird im Verhältnis 1:1000 eingesetzt

Kanamycin-Lösung 50 mg/ml (10 ml)

500 mg Kanamycin
ad 10 ml H₂O bidest
 sterilfiltrieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
 wird im Verhältnis 1:1000 eingesetzt

LB-Medium

1 % Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
 0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
 1 % NaCl (w/v)
 pH 7 mit NaOH einstellen, autoklavieren

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
 autoklavieren

SOB-Medium (1 l)

2 % Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
 0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
 0,05 % NaCl (w/v)
 add 950 ml H₂O bidest
 pH auf 7,0 einstellen
 2,5 mM KCl
 add 1 l H₂O bidest
 autoklavieren
 5 ml 2 M MgCl₂ (steril, frisch zugeben)

2.1.8 Zelllinien und Zellkultur-Medien**2.1.8.1 Zelllinien**

HeLa, humanes epitheliales Cervix-Karzinom (DSMZ, Braunschweig)

HeLa S3, humanes epitheliales Cervix-Karzinom (ATCC, USA)

COS-7, Affen-Nierenzelllinie (DSMZ, Braunschweig)

293, humane embryonale Nierenzelllinie (DSMZ, Braunschweig)

2.1.8.2 Zellkulturmedien

Sämtliche Medien, fötales Kälberserum, Antibiotika und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen wurden von BioWhittaker (Vervies/B), PAA-Laboratories (Pasching/A), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) geliefert.

HeLa S3:

HAM'S NUTRIENT Medium F12, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin

COS-7:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin

293, HeLa:

MEM (Modified Eagle Medium), 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin

Einfriermedium:

50 % jeweiliges Kulturmedium, 40 % FCS, 10 % DMSO

2.1.9 Laborgeräte

Bakterienschüttler (B.Braun, Melsungen)
Brutschrank BBD 6220 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank BB 6060 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank 37°C Kelvitron (Heraeus, Hanau)
Blotting-Apparatur Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad, München)
CELLQuest (BD Biosciences, Heidelberg)
Digitalkamera DC290 (Kodak, Stuttgart)
Elektrophoreseapparatur Mini-Protean III (Bio-Rad, München)
Elektrophoreseapparatur Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, München)
Entwicklermaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch)
FACScan (BD Biosciences, Heidelberg)
Filmkassette X-Omatic[®] (Kodak, Stuttgart)
Filmkassette Hypercassette[™] (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Fluoreszenzmikroskop DM RB (Leica, Wetzlar)
Geltrockner Model 583 Gel Dryer (Bio-Rad, München)
Gefrierschrank –20°C (Liebherr, Ochsenhausen)
Gefrierschrank –80°C (Revco Scientific, Veenendal/Niederlande)
GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego/USA)
Heizplatte 60°C DHP 37 (Fisher Scientific, Nidderau)
Hybridisierungsofen Model 310 (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach)
Konfokales Laserscan-Mikroskop (Leica, Wetzlar)
Kühlplatte Jung Histoblock (Leica, Bensheim)
Kühlschrank +4°C (Liebherr, Ochsenhausen)
Magnetrührer Ikamak RTC (IKA Labortechnik, Staufen)
Mikro-Dismembrator II (B.Braun, Melsungen)
Mikroskop IDO3 (Zeiss, Jena)
Mikrowellengerät (Bosch, Stuttgart)
ModFit LT for Mac (BD Biosciences, Heidelberg)
Netzgerät Power PAC 300 (Bio-Rad, München)
pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter HI 9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
Photodokumentationssystem Kodak 1D 3.5 (EDAS 290) (Kodak, Stuttgart)
Pipetten 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100µl; 50-200µl; 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe Automatic Sarpette (Desaga, Wiesloch)

QIArack (Qiagen, Hilden)
QIAVac 24 Vacuum Manifold (Qiagen, Hilden)
Rotator (Fisher-Scientific, Nidderau)
Schüttler (Fisher-Scientific, Nidderau)
SpeedVac SVC100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)
Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Sterilbank HB2448 (Heraeus, Hanau)
Sterilbank Lamin Air[®] HA 2448 GS HA (Heraeus, Hanau)
Sterilbank HERAsafe (Heraeus, Hanau)
Stickstoffbehälter (AirLiquide, Wiesbaden)
Thermoblock DRI-Block BB-3A (TECHNE, Burkhardtsdorf)
Thermo-Cycler (Perkin Elmer Cetus, Köln)
Thermo-Cycler (Eppendorf, Hamburg)
Transilluminator (Vilber Lourmat, Frankreich)
Trockenschrank 6200 (Heraeus, Hanau)
VacConnector (Qiagen, Hilden)
Vakuumpumpe Refrigerated Condensation Trap RT100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)
Vakuumpumpe Membranpumpe (Vacuumbrand GmbH + Co., Wertheim)
Vortex Janke & Kunkel (Ika Labortechnik, Staufen)
Waage Mettler PM 2000 (Mettler Instruments GmbH, Gießen)
Wasserbad klein (Mettler, Schwalbach)
Wasserbad groß (Mettler, Schwalbach)
Zellzählkammer Neubauer (Renner, Darmstadt)
Zentrifuge Rotanta/RPC (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation kompetenter Bakterien

Die Präparation chemokompetenter Bakterien (der Stämme Dh5 α , BL21 und BL21 CodonPlus) erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983).

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde mit der Bakteriensuspension gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 2 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit 800 μ l LB-Medium versetzt und für 30-60 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Analytische Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte nach der *boiling*-Methode (Holmes und Quigley, 1981) und anschließender Isopropanol-Fällung: Das geklärte Bakterien-Lysat wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 1 Vol Isopropanol versetzt. Die gefällte DNA wurde pelletiert (16000 x g, 10 min. bei 4°C), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 50 μ l Wasser aufgenommen.

2.2.1.4 Präparative Plasmidisolierung

Die Kultur der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmide aus der Übernachtskultur erfolgte mit dem Qiagen Maxi Plasmid Purification Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Die Konzentration der DNA wurde photometrisch über den OD₂₆₀-Wert bestimmt (1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml DNA). Die Ausbeute lag bei 200-500 μ g/ μ l. Die Reinheit der DNA betrug OD₂₆₀/OD₂₈₀>1,8. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. Für geringere DNA-Mengen wurde das Spin-Präparations Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Ausbeute lag hier bei 100-300 μ g/ μ l.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren DNA an kurzen, definierten Nukleotidsequenzen. Die DNA wurde mit den entsprechenden Enzymen unter den vom

Hersteller empfohlenen Bedingungen (Puffer, Enzymmenge, Temperatur, Reaktionszeit) inkubiert.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase können komplementär überhängende oder stumpfe DNA-Enden kovalent verknüpft werden. Das Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiester-Brücke zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe von doppelsträngiger DNA. Die Reaktion wurde mit der T4-DNA-Ligase oder der Quick-T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

5'-Enden von linearisierten Plasmiden wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Selbstligation zu verhindern. Nach dem Restriktionsverdau wurde pro µg eingesetzte Plasmid-DNA 0,5 U Alkalische Phosphatase (NEB, Schwalbach) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Fragmenten

Klenow Enzym (das große Fragment der DNA-PolymeraseI von *E. coli*) agiert als DNA-abhängige 5'-3'-Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Diese Reaktion wurde für das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden angewandt, wenn diese als stumpfe Enden ligiert werden sollten. Die Reaktion wurde mit dem Klenow-Enzym nach Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

2.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wird die Größe von DNA-Fragmenten analysiert. Für Fragmente kleiner als 4 kb wurden 1-2 %ige Agarose Gele mit 1 x TAE-Puffer, für größere Fragmente 0,8 %ige Agarose-Gele mit 1 x TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und in die Taschen der Gele geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1-5 V/cm durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Lauf mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Als Größenstandard dienten 1 kb-Leiter und 100 bp-Leiter (NEB, Schwalbach).

2.2.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Bei anschließender Ligation erfolgte die Extraktion von DNA aus Agarosegelen nach Herstellerangaben mit dem Gel-Extraction-Kit der Fa. Qiagen. Alle anderen Aufreinigungen erfolgten mit dem DA-Ultra-free-Kit der Fa. Millipore (Eschborn).

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR wird spezifisch ein DNA-Abschnitt zwischen zwei bekannten Regionen amplifiziert. Dies geschieht mit einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq, *Thermus aquaticus*) (Saiki et al., 1988). Diente die PCR der anschließenden Klonierung des PCR-Produkts, so wurde die Platinum Pfx-Polymerase aus *Pyrococcus sp.* verwendet. Diese Polymerase besitzt eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (*proofreading*) erlaubt und geringere Fehlerquoten als die Taq-Polymerase aufweist. Die PCR wurde nach Empfehlung des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

2.2.1.12 Positionsgerichtete Mutagenese

Die positionsgerichtete Mutagenese wurde nach der Methode „Two-Sided-SOEing“ („Two-Sided Splicing by Overlap Extension“) (Horton et al., 1990) durchgeführt.

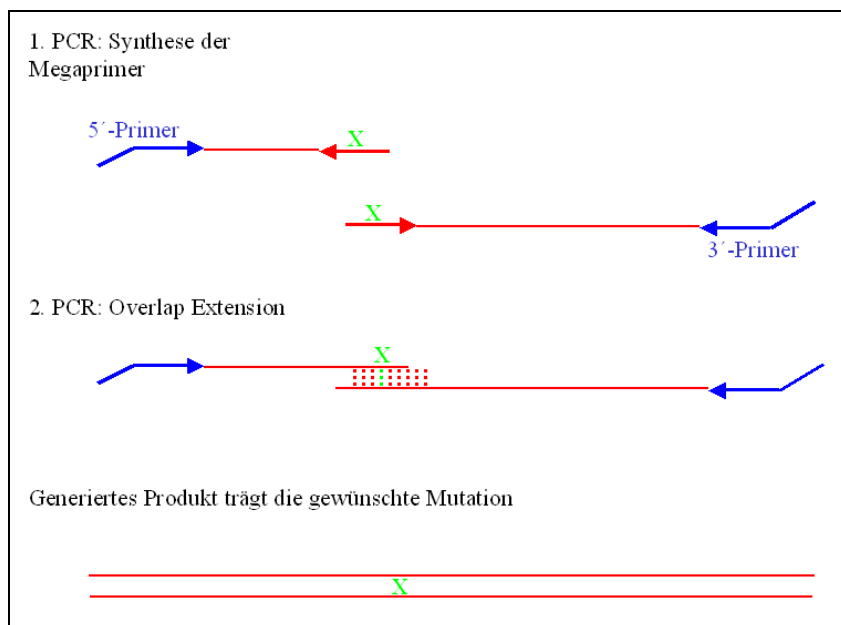


Abb. 2-1: Positionsgerichtete Mutagenese durch SOEing.

Im ersten Schritt werden zwei getrennte PCR-Ansätze durchgeführt. Zwei komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation tragen (grün) dienen der Amplifikation der Megaprimer (1. PCR). Die generierten Megaprimer dienen zusammen als Matrize für die zweite PCR, in der die bereits vorher verwendeten außenliegenden Primer (blau) erneut eingesetzt werden (2. PCR). Das resultierende Produkt trägt dann die gewünschte Mutation.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (Sterilbank HERAsafe und Sterilbank Lamin Air, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Inkubator mit feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen oder -flaschen kultiviert. Es wurden regelmäßige Sterilitäts- und Mycoplasmenkontrollen durchgeführt.

2.2.2.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren adhärenter Zellen wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen und danach für ca. 3-5 min. mit trypsinhaltiger Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und bei 248 x g bei RT 10 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung neu ausgeät.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Zellpellet einer konfluenten Flasche wurde in Einfriermedium (vgl. Kapitel 2.1.8.2) aufgenommen, in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen wurden im 37°C -Wasserbad rasch aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und pelletiert (248 x g, 7 min., RT). Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.2.4 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion adhärenter Zellen mit Expressionsplasmiden wurden nach Optimierung für die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet. HeLa- und HeLa S3-Zellen wurden mit FuGENE™6 (Roche, Mannheim), 293-Zellen mit Polyfect (Qiagen, Hilden) und COS-7-Zellen mit Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Transfektionen wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Als serumfreies Medium diente Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.2.5 FACScan-Analyse (Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie)

Für Bestimmungen der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurden die Zellen trypsinisiert, 1x mit PBS gewaschen und zentrifugiert (248 x g, 10 min., RT). Anschließend erfolgte die Behandlung gemäß dem Protokoll zum Cycle TEST™ PLUS DNA reagent Kit (BD Biosciences, Heidelberg). Bei dieser Prozedur wird der Farbstoff Propidiumiodid an die DNA gebunden, wodurch anschließend der DNA-Gehalt der Zelle aufgrund der Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Programms CellQuest bestimmt werden kann. Die quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte mittels ModFit LT für Mac.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Gesamt-Zellextrakte

Die Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (500 x g, 5 min., 4°C) und in eiskaltem RIPA-Puffer, der mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt wurde, resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat geklärt (16000 x g, 10 min., 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt nach Bradford (s.u.) bestimmt.

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die durch Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine resultierende Veränderung des Absorptionsmaximums kann am Photometer bei einer OD₅₉₅ gemessen werden (Bradford, 1976). Dazu wurden 800 µl H₂O bidest mit 200 µl BIO-Rad Protein Assay-Lösung und 1 µl Zellextrakt gemischt und die Absorption bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Entsprechend der Eichgeraden entspricht eine Absorption von OD₅₉₅ = 1,0 einer Proteinkonzentration von 17,9 µg/µl.

2.2.3.3 *In vitro*-Transkription und Translation

Die Transkription von cDNA und die anschließende Synthese von Proteinen in Gegenwart von ³⁵S-Methionin wurde mit Hilfe des TNT-Quick coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.4 GST-Fusionsproteine: Präparation von Rohlysaten

Mit Hilfe von GST-Fusions-Vektoren (pGEX, Amersham Biosciences, Freiburg) können fremde Polypeptide in *E. coli* als Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum* hergestellt werden. Dieses Vektorsystem ermöglicht eine induzierbare Expression sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins über immobilisiertes Glutathion. Der entsprechende GST-Vektor wurde in den Bakterienstamm BL21 transformiert. Eine Vorkultur von 5-10 ml LB-Medium mit Antibiotika wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am Folgetag wurde die Kultur in die 50fache Menge LB-Medium mit Antibiotika überführt und bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,6 kultiviert. Die Expression der GST-Proteine wurde durch Zugabe von Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 0,5-1,0 mM) induziert. Nach ca. 2-4 Stunden wurden die Bakterien pelletiert (3000 x g, 15 min., 4°C) und

in Lysepuffer resuspendiert. Scheren der DNA erfolgte durch Ultraschall-Behandlung (Homogenisator/Sonifier Sonoplus HD 2070, Bandelin, Berlin). Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g (20 min., 4°C) geklärt. Der Überstand (=Rohlysat) wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.5 Poly-Histidin-Fusionsproteine: Präparation von Rohlysaten

Für die Herstellung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen wurde das pET-Vektorsystem von Novogene verwendet. Die Fusions-Proteine wurden in BL21 exprimiert und die Fusionsproteine über ein Poly-Histidin-Anhang aufgereinigt. Der Vektor enthält einen T7-Promotor vor der für das Fusionsprotein kodierenden Region. Die cDNA der T7-Polymerase ist im Genom der BL21-DE3-Lys kodiert und deren Expression wird durch einen Tac-Promotor reguliert, d.h. nach Induktion mit IPTG wird zunächst die T7-Polymerase gebildet, welche dann wiederum das entsprechende Gen im pET-Vektor transkribiert. Die Kultur der Bakterien, die Induktion der Expression und die Lyse erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.4 beschrieben. Abweichend davon wurden die Bakterien zusätzlich unter Chloramphenicol gehalten.

2.2.3.6 Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die in den Kapiteln 2.2.3.4 und 2.2.3.5 beschriebenen Rohlysate wurden mit äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg), bzw. Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) für 1 h bei 4°C inkubiert. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Lysepuffer bzw. Ni-NTA-Waschpuffer entfernt. Die immobilisierten Proteine wurden entweder direkt in Studien eingesetzt oder eluiert.

Zur Elution wurden die immobilisierten Proteine mit dem jeweiligen Elutionspuffer (GST, bzw. Ni-NTA) eluiert. Die Eluate wurden anschließend gegen 1 x PBS oder den gewünschten Puffer (z. B. Kinase-Puffer) dialysiert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kapitel 2.2.3.2).

Sollten die Proteine ohne Fusionsanteil in Studien eingesetzt werden, so wurden die immobilisierten Proteine mit Faktor Xa oder Thrombin (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben proteolytisch vom Fusionsanteil abgespalten. Kodierte der Vektor pKM-263 (Dr. K. Saxena) für das Fusionsprotein, so wurde der Fusionsanteil mit der TEV (*tobacco etch virus*)-Protease (Carrington et al., 1989; Kapust und Waugh, 1999) in 1x PBS mit 5 mM DTT abgespalten. Die Proteine im Überstand wurden entweder direkt verwendet oder einer Dialyse unterzogen. Auch hier erfolgte anschließend die Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kaptitel 2.2.3.2).

2.2.3.7 Protein-Interaktions-Studien (Pulldown-Experimente)

Mit Hilfe von GST- und His-Pulldown-Experimenten wurde die *in vitro*-Interaktion von Proteinen untersucht. Dabei wurde der eine Partner als GST- bzw. His-Fusionsprotein vorgelegt, während das zweite Protein entweder ein *in vitro*-translatiertes, radioaktiv markiertes Protein darstellte, oder aus Gesamt-Zellextrakten von Säugerzellen stammte. (An Stelle von bakteriell exprimierten Proteinen können auch immunpräzipitierte Proteine vorgelegt werden.) Immobilisierten Fusionsproteine wurden mit TIF-Puffer gewaschen und das radioaktive Protein bzw. der Zellextrakt wurde zugegeben und in TIF-Puffer für 4-8 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TIF-Puffer wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und über SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.8 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurden Proteine und Protein-Komplexe aus Zellen analysiert. Das Zellextrakt wurde zunächst zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine mit Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg) inkubiert. Nach 1 h wurde die Agarose durch Zentrifugation (16000 x g, 5 min., 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde mit Antikörper (je 2-5 µg) versetzt. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotator bei 4°C über Nacht. Danach wurden 25 µl Protein A/G PLUS-Agarose zugegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation wurde die Agarose pelletiert (500 x g, 2 min., 4°C) und dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Das Immunpräzipitat wurde in Interaktionsstudien (Kapitel 2.2.3.7) und Kinase-Assays (2.2.3.14) eingesetzt oder mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.9 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Bei der denaturierenden SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden Polypeptide in Proteingemischen nach dem Molekulargewicht aufgetrennt, da sich das negativ geladene SDS durch hydrophobe Wechselwirkung an das Protein anlagert und so eine negative Überschlußladung entsteht. Es wurde das mini-Protean III Gelelektrophoresesystem von Bio-Rad, München verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele wurde dem Protokoll von Sambrook (1989) entnommen. Die Gele wurden in eine Gelkammer mit Laufpuffer aufgebaut. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min. bei 95°C erhitzt, 3 min. bei 16000 x g zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 30 mA/77 cm² Gel durchgeführt.

2.2.3.10 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden 1-3 Stunden in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Sie wurden mit Schnellentfärber entfärbt. Danach wurden die Gele gewässert und auf einem Whatmannpapier im Gelrockner getrocknet.

2.2.3.11 Detektion von ³²P- und ³⁵S-markierten Proteinen in Polyacrylamid-Gelen (Fluorographie)

Für die fluorographische Detektion wurden die Gele ³⁵S-markierter Proteine (siehe 2.2.3.3) vor dem Trocknen für 15 min. in Amplifier (Amersham Bioscience, Freiburg) inkubiert. Gele mit ³²P-markierten Proteinen (siehe 2.2.3.14) wurden direkt auf einem Gelrockner getrocknet. Die Gele wurden über Nacht in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80°C auf Röntgenfilmen (HyperfilmTMMPTTM; Amersham Biotech, Freiburg) exponiert.

2.2.3.12 Western-Blot und Immunodetektion

Der Western-Blot dient dem Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE auf Membranen (Towbin et al., 1979). Auf der Membran können Proteine dann über spezifische Antikörper detektiert werden. Für den Western-Blot wurde eine Naß-Zell Elektrophoreseapparatur, Mini-Sub Cell GT der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer mit, entweder bei 80 V für 2h oder bei 40 V über Nacht unter Kühlung. Die PVDF-Membran wurde von Millipore (Eschborn), Gel-Blottingpapiere von Schleicher und Schüll (Dassel) bezogen. Die PVDF-Membran wurde für 1 min. mit MeOH und für 5 min. in H₂O vorbehandelt, bevor sie – wie die Blottingpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) auch - in Blotpuffer äquilibriert wurde. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Kathode / 2 Blottingpapiere / Gel / Membran / 2 Blottingpapiere / Anode. Nach dem Transfer wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und zur Absättigung freier Proteinbindestellen für 1 h in Blocking-Puffer inkubiert. Danach wurde für 1-2 h mit dem jeweiligen Antikörper (in Blocking-Puffer) inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (3x 5 min.) mit PBS-T entfernt. Der gebundene Primärantikörper wurde mit Meerettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (in Blocking-Puffer) für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mit Hilfe von ECL (enhanced chemiluminescent solution, Fa. Pierce, Bonn). Die bei der Substratumsetzung emittierten Licht-Signale wurden mittels Röntgenfilm (HyperfilmTMECLTM; Amersham Biotech, Freiburg) detektiert.

2.2.3.13 Immunfluoreszenz-Färbung

Ziel der Immunfluoreszenz-Färbung ist es, die Lokalisation von Proteinen in morphologisch weitgehend erhaltenen Zellen zu analysieren. Dazu werden Zellen auf „Slide-Flasks“ (Objektträger-Zellkulturgefäße, 10 cm², Fa. NUNC, Wiesbaden) kultiviert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS (3x 5 min.) wurden die Zellen entweder in eiskaltem MeOH (20 min.) oder in 4 %iger Paraformaldehydlösung (30 min.) fixiert. Im letzteren Falle schloß sich ein Permeabilisierungsschritt (20 min.) mit 0,2 % Triton X-100 in 1x PBS an. Nach erneutem dreimaligem Waschen (s.o.) erfolgte die Blockierung in PBS-BSA für 20 min., gefolgt von der Inkubation mit dem Erstantikörper (1-2 h) in PBS-BSA. Wieder wurde dreimal gewaschen (s.o.) und mit dem CyTM3- und/oder dem DTAF-konjugierte Sekundär-Antikörper für 1 h in PBS-BSA inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde die DNA mit Hilfe von Hoechst 33342-Gebrauchslösung gefärbt (20 min.). Schließlich erfolgte der letzte Waschschritt (s.o.) mit anschließendem Eindeckeln mit Vectashield (Linaris, Wertheim) und Fixieren des Deckgläschens mit Nagellack (freundliche Gabe von Inga Müller, Fa. Douglas, Frankfurt). Die Präparate können anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung erfolgte entweder am konfokalen Laserscan-Mikroskop (Leica, Wetzlar) oder mit Axiophot; Carl Zeiss Microimaging, Inc. (digitale Kamera MagnaFire®; Optronics und Image-Pro® Software, Media Cybernetics, Inc.).

2.2.3.14 Phosphorylierungs-Studien (Kinase-Assays)

Durch den Einsatz von [γ -³²P]ATP und freiem ³²P-Orthophosphat kann durch Phosphorylierungs-Studien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, die Phosphorylierung eines Substrates von Kinasen detektiert werden. Für *in vitro* Studien wurde immunpräzipitierte Plk1 oder Plk1 aus Sf9-Zellen verwendet. Plk1 aus Sf9-Zellen wurde anfangs von Prof. R. Erikson, Cambridge/USA geliefert und anschließend von Andrea Krämer (Universitäts-Frauenklinik, Frankfurt) hergestellt. Im allgemeinen wurden 2 µg aufgereinigtes Fusionsprotein (vgl. Kapitel 2.2.3.6) in 30 µl Kinase-Puffer mit 2 µCi [γ -³²P]ATP und kaltem ATP (Endkonzentration 100 µM) versetzt. Die Inkubation mit Plk1 (1-2 µl) erfolgte für 30 min. bei 30°C. Phosphorylierungs-Studien mit MAPK (Erk2) und MPF erfolgten nach Herstellerangaben (NEB, Schwalbach) für 30 min. bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.2.3.9) und Fluorographie (vgl. Kapitel 2.2.3.11) analysiert.

Für *in vivo* Studien wurden HeLa-Zellen mit CFP-fusionierten Cyclin B1-Konstrukten transfiziert (vgl. Kapitel 2.2.2.4). Nach 2 Tagen wurden die Zellen erst für 3 h in

phosphatfreiem Medium ohne, und anschließend weitere 3 h mit ^{32}P -Orthophosphat (500 $\mu\text{Ci/ml}$) gehalten. Nach Herstellen der Zellextrakte (vgl. Kapitel 2.2.3.1) erfolgte die Immunpräzipitation (vgl. Kapitel 2.2.3.8) mit anschließender SDS-PAGE (vgl. Kapitel 2.2.3.9) und Fluorographie (vgl. Kapitel 2.2.3.11).

2.2.4 Quantitative Auswertung der Autoradiogramme und Gele

Filme und Gele wurden abfotografiert und mit Hilfe des Kodak-Fotodokumentationssystems (1D 3.5) die Intensität der Banden quantifiziert. Zur Standardisierung der geladenen Proteinmengen wurde der Quotient mit der jeweiligen Kontrolle (z.B. Ladekontrolle oder β -Aktin-Wert) gebildet.

3 ERGEBNISSE

Plk1 lokalisiert während dem Durchlaufen der Mitose und der Cytokinese zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Orten in der Zelle (Glover et al., 1998). In den folgenden Untersuchungen sollten HeLa S3-Zellen analysiert werden, da hierin die Untersuchung des G₂/M-Übergangs aufgrund des guten Ansprechens dieser Zelllinie auf Synchronisations-Experimente gut zu reproduzieren ist.

3.1 Subzelluläre Lokalisation von humanem Plk1

Plk1 erfüllt während der Mitose unterschiedliche Funktionen. Über die Phosphorylierung seiner Substrate reguliert es den Zellzyklus in vielfältiger Weise (siehe 1.3.2). Diese unterschiedlichen Funktionen müssen zu verschiedenen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Orten in der Zelle wahrgenommen werden.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von endogenem Plk1 wurden verschiedene kommerziell erhältliche Antikörper und der Antikörper der eigenen Arbeitsgruppe (Yuan et al., 1997) in indirekte Immunfluoreszenzstudien eingesetzt. Nur der eigene Antikörper hatte die notwendige Sensitivität, um Plk1 in den unterschiedlichen Phasen detektieren zu können. Um die Strukturen des Spindelfaser-Apparates zu visualisieren, wurde gleichzeitig mit einem Antikörper gegen α -Tubulin gefärbt. Mit einer Färbung gegen α -Tubulin werden nicht nur die Centrosomen als Mikrotubuli-Organisationszentren gefärbt, sondern der gesamte Spindelfaser-Apparat.

Abb. 3-1 zeigt erstmalig, daß Plk1 auch in HeLa S3-Zellen in der Mitose an den Centrosomen zu finden ist (Abb. 3-1A und B). Beim Übergang von der Meta- zur Anaphase wandert Plk1 entlang des Spindelfaser-Apparats zum kontraktiven Ring (Abb. 3-1C). Dort akkumuliert Plk1 und kann in der Cytokinese am Mittelkörper (dünne Brücke zwischen den Tochterzellen, welche die überlappenden Mikrotubuli enthält) detektiert werden (Abb. 3-1D). Anhand der gleichzeitigen Färbung mit α -Tubulin ist zu sehen, daß Plk1 und Tubulin lediglich an den Centrosomen kolokalisieren, nicht aber an anderen Strukturen des Spindelfaser-Apparats.

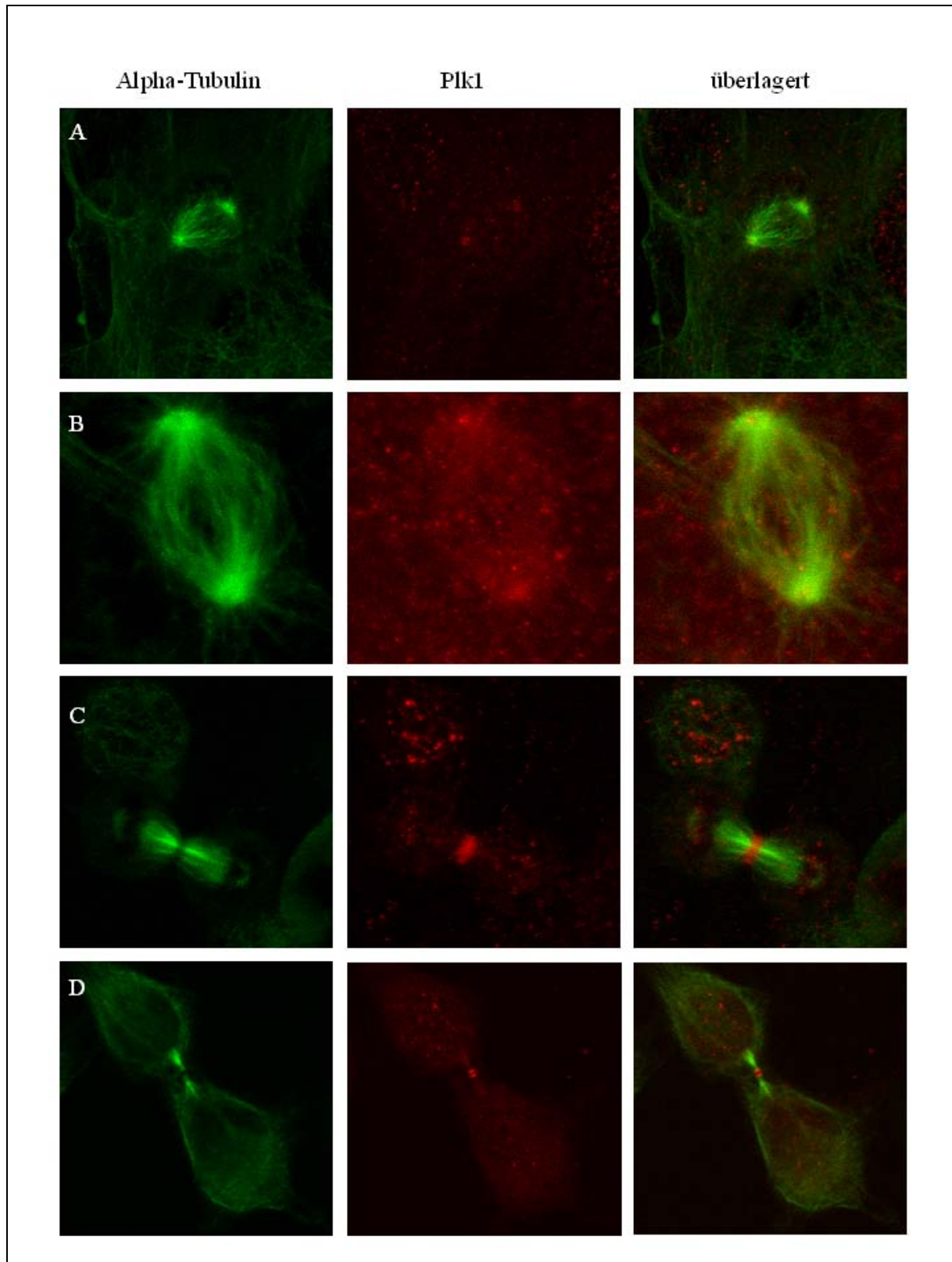


Abb. 3-1: Immunfluoreszenz-Studie von Plk1 in der Mitose.

HeLa S3-Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und nach Blockieren mit 1% BSA in PBS mit Antikörpern gegen α -Tubulin (grün) und Plk1 (rot) behandelt. Die Färbung erfolgte über Cy3- und DTAF-konjugierte sekundäre Antikörper. Zellzyklus-Phasen wurden anhand der α -Tubulin-Färbung (grün) und DNA-Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 3342) charakterisiert. Zellen wurden in verschiedenen Mitose-Stadien aufgenommen: A: Prometaphase, B: Metaphase, C: Anaphase, D: Telophase (Cytokinese).

3.2 Einfluß von Plk1 auf die Aktivierung des Cyclin B1/Cdk1-Komplexes

Nachdem mit dem Antikörper der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, daß Plk1 in HeLa S3-Zellen während der Mitose an verschiedenen mitotischen Strukturen konzentriert zu finden ist (siehe Kap. 3.1) sollte eruiert werden, ob Plk1 mit Cyclin B1 interagieren kann. Dazu sollte untersucht werden, ob Plk1 und Cyclin B1 eine ähnliche Expressionskinetik aufweisen, und ob beide Proteine zu bestimmten Mitosephasen kolokalisieren.

3.2.1 Koverteilung von Plk1 und Cyclin B1 in verschiedenen Mitosephasen

Cyclin B1 akkumuliert in der G₂-Phase im Cytoplasma, transloziert in der Prophase in den Kern und assoziiert mit den Centrosomen (Bailly et al., 1992; Pines und Hunter, 1994). Um zu untersuchen, ob Cyclin B1 und Plk1 in den unterschiedlichen Mitosephasen an denselben mitotischen Strukturen lokalisieren, wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien mit endogenen Proteinen durchgeführt.

Abb. 3-2A zeigt, daß Plk1 und Cyclin B1 in der G₂-Phase im perinukleären Raum kovertgelt sind. Die cytoplasmatische Lokalisation beider Proteine ändert sich beim Übergang in die Mitose. In der Prophase, in der die Kernmembran sich noch nicht aufgelöst hat, sind beide Proteine im Zellkern zu finden (Abb. 3-2B). Sowohl in Prometaphase (Abb. 3-2C) als auch in der Metaphase (Abb. 3-2D) sind beide Proteine an den Chromosomen zu finden. Im Gegensatz zu Plk1 ist Cyclin B1 gut an den Mikrotubuli zu sehen, die von den Centrosomen ausgehen. An den Centrosomen selbst ist eine Kolokalisation von Plk1 und Cyclin B1 in Prometa- und Metaphase zu finden (Abb. 3-2C und D). In der Cytokinese (Abb. 3-2E) ist Cyclin B1 bereits abgebaut und Plk1 zeigt die typische Färbung des Mittelkörpers.

Da Plk1 und Cyclin B1 in G₂- und Prophase kovertgelt sind und in der Metaphase beide an den Spindel-Polen kolokalisieren, soll durch Bindungs-Studien untersucht werden, ob beide Proteine miteinander interagieren können.

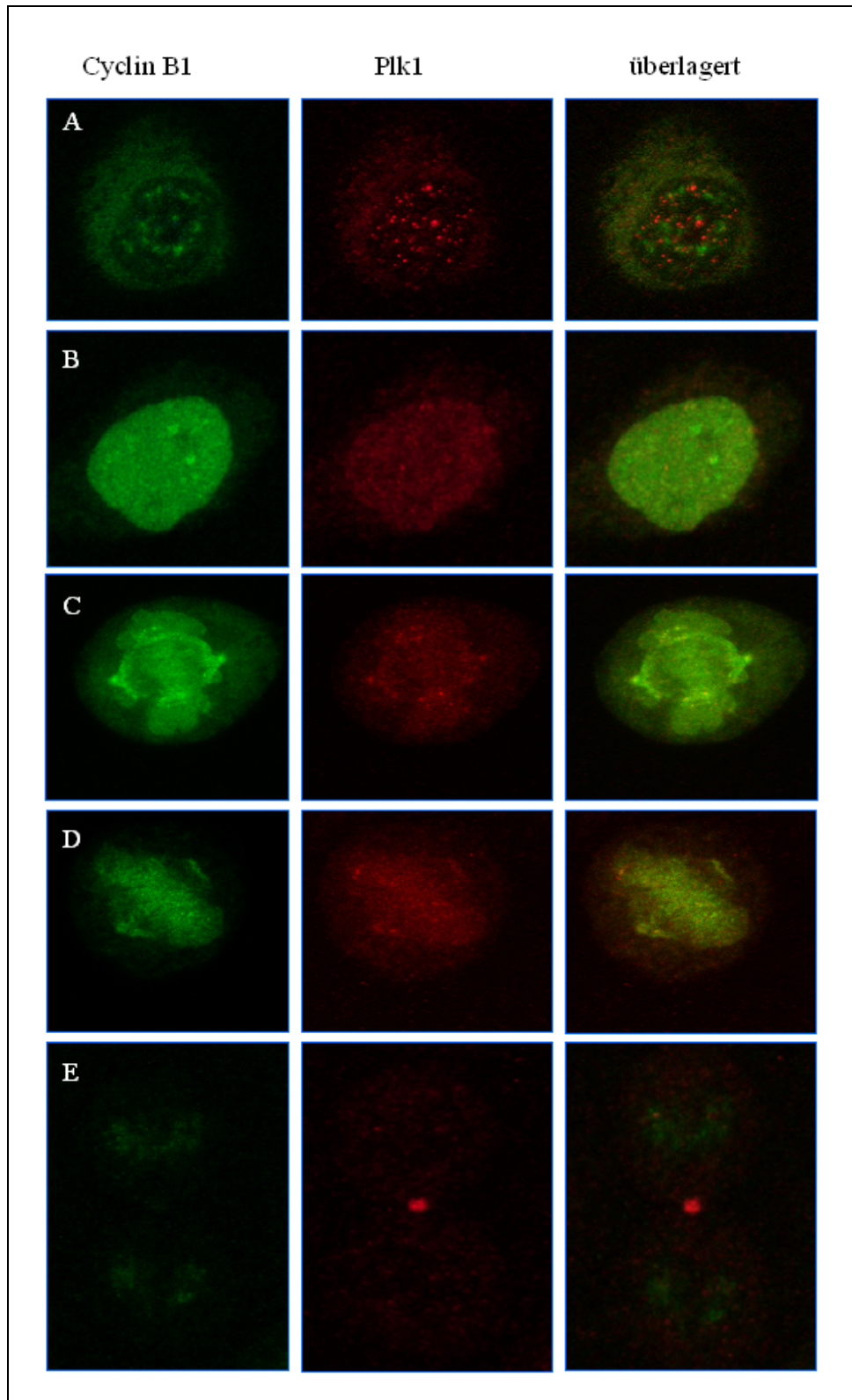


Abb. 3-2: Immunfluoreszenz-Studie von Plk1 und Cyclin B1 in verschiedenen Mitosestadien.

HeLa S3-Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und nach Blockieren mit 1% BSA in PBS mit Antikörpern gegen Cyclin B1 (grün) und Plk1 (rot) detektiert. Die Färbung erfolgte über Cy3- und DTAF-konjugierte sekundäre Antikörper. Zellzyklus-Phasen wurden anhand der DNA-Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) charakterisiert. A: G₂-Phase, B: Prophase, C: Prometaphase, D: Metaphase, E: Telophase (Cytokinese).

3.2.2 Kinetik der Plk1- und Cyclin B1-Expression während des Zellzyklus

Voraussetzung für eine Interaktion zweier Proteine ist das Vorhandensein beider Proteine zu gleichen Zeitpunkten in der Zelle. Um dies zu untersuchen wurden HeLa S3-Zellen durch Doppel-Thymidinblock in der G₁/S-Phase des Zellzyklus angereichert. Nach der zweiten Thymidinbehandlung wurden die Zellen aus der G₁/S-Phase entlassen und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. Anschließend folgten Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der relativen Plk1- bzw. Cyclin B1-Proteinmenge. Die Anreicherung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen wurde mittels FACS (*fluorescence activated cell scanning* / Durchflußcytometer)-Analyse verifiziert. Abb. 3-3B (synK.001) zeigt die typische Verteilung unbehandelter HeLa S3-Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen. Hier befindet sich nur ein geringer Teil (ca. 15%) der Zellen in der G₂/M-Phase. Dies korreliert mit der geringen Menge an Plk1 und Cyclin B1 im Western-Blot (Abb. 3-3A, unbehandelt). Nach dem Doppel-Thymidinblock befinden sich beinahe alle Zellen in der G₁-Phase (Abb. 3-3B, syn0h.002), die Plk1- und Cyclin B1-Expression ist vergleichsweise niedrig (Abb. 3-3A, 0h). Vier Stunden nach dem Block befinden sich die meisten Zellen in der S-Phase, einige Zellen sind bereits in der G₂/M-Phase (Abb. 3-3B, syn4h.003). Die Expression von Plk1 und Cyclin B1 beginnt anzusteigen und erreicht ihr Maximum nach 8–10 Stunden (Abb. 3-3A, 8h und 10h). Hier befinden sich die meisten Zellen in der G₂/M-Phase (Abb. 3-3B, syn8h.005 und syn10h.006). Allerdings sinkt die Cyclin B1-Menge nach 10 Stunden bereits wieder ab, während die Plk1-Menge noch einmal ansteigt. Dies zeigt, daß Cyclin B1 vor Plk1 abgebaut wird. Zwölf Stunden nach der Synchronisation zeigt die Zellpopulation beinahe wieder eine typische Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen (Abb. 3-3B, syn12h.007 und synK.001).

Somit wurde gezeigt, daß beide Proteine ihr Expressionsmaximum in G₂- und Mitose-Phase haben, daß jedoch beim Durchlaufen der Mitose Cyclin B1 früher abgebaut wird als Plk1. Eine Interaktion beider Proteine ist folglich in der G₂-Phase und in einem frühen Mitosestadium wahrscheinlich.

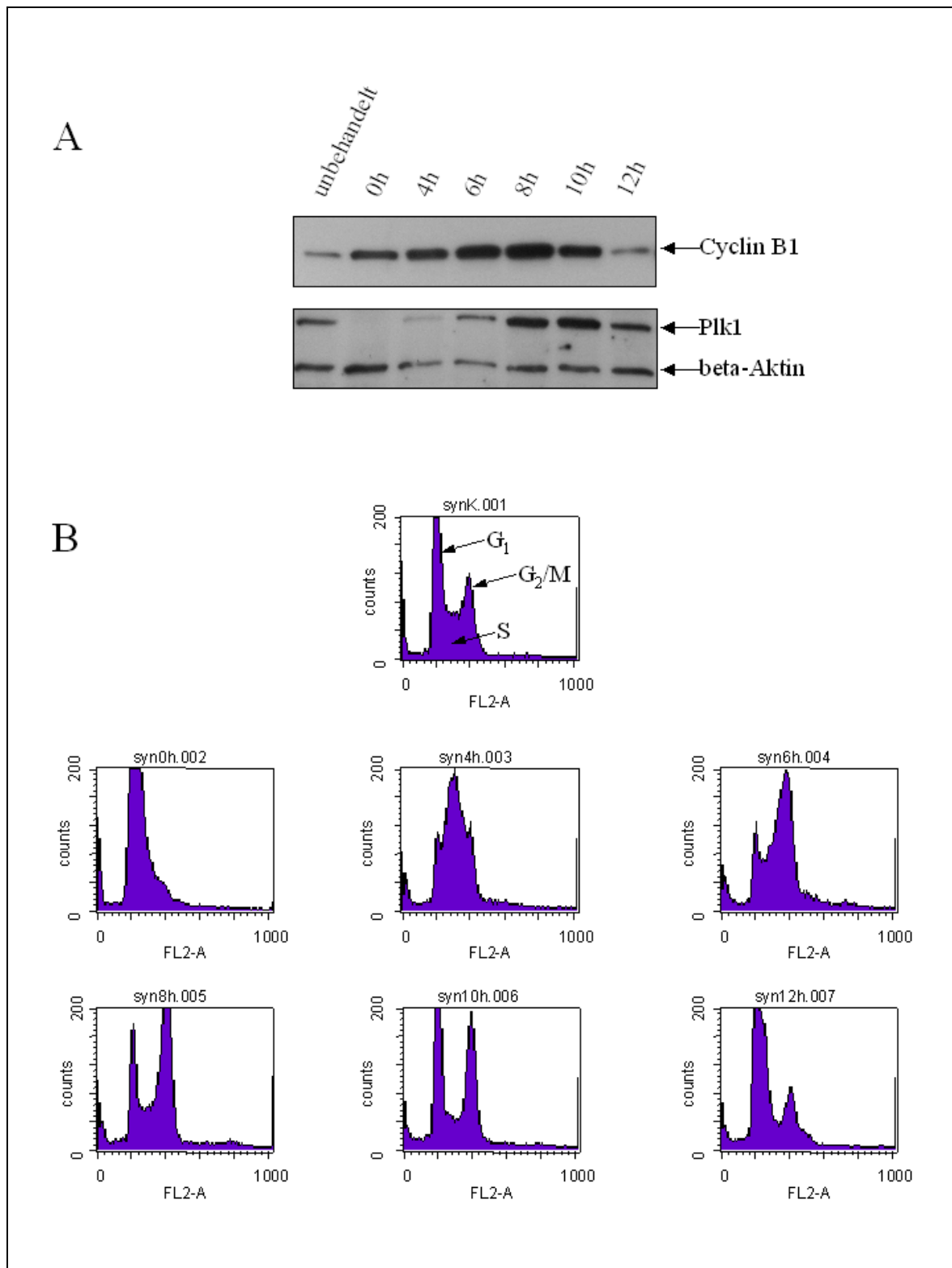


Abb. 3-3: Kinetik der Plk1- und Cyclin B1-Expression in synchronisierten HeLa S3-Zellen.

HeLa S3-Zellen wurden durch Doppel-Thymidin-Block in der G₁-Phase angereichert. Nach Entfernen des Thymidins wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert, und je 30 µg Gesamtprotein für den Western-Blot verwendet (A). Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Der andere Teil wurde nach Behandlung mit Propidium-Jodid einer Zellzyklus-Analyse mittels FACS unterzogen (B), um die Anreicherung der Zellen in den Zellzyklusphasen zu untersuchen. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen.

3.2.3 Interaktion von Plk1 und Cyclin B1 *in vitro*

Plk1 aktiviert über Cdc25C die katalytische Untereinheit des MPF (Roshak et al., 2000). Eine direkte Interaktion des MPF mit Plk1 wurde bislang noch nicht gezeigt. Da Plk1 und Cyclin B1, die regulatorische Untereinheit des MPF, eine ähnliche Expressionskinetik in der Mitose aufweisen, und da beide Proteine in der Prophase kovertelt sind und in der Metaphase an den Centrosomen kolokalisieren, sollte untersucht werden, ob beide Proteine direkt miteinander interagieren. Protein-Interaktions-Studien (GST-Pulldown-Experimente) mit rekombinanten Proteinen dienen der Untersuchung der Interaktion. Cyclin B1 wurde in Retikulozytenlysaten (TNT-Quick Transcription-Translation System, Fa. Promega) *in vitro* translatiert und durch den Einbau von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Plk1 wurde entweder aus mitotischen HeLa S3-Zellextrakten präzipitiert oder als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt.

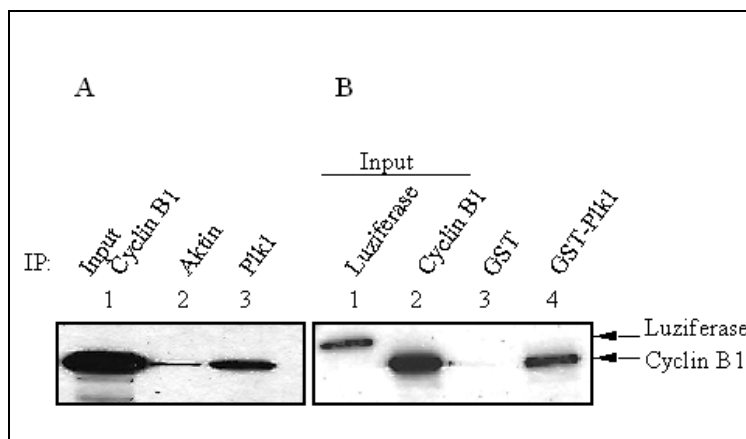


Abb. 3-4: Interaktions-Studie von Plk1 und Cyclin B1.

A: Plk1 wurde aus mitotischen HeLa S3-Zellextrakten präzipitiert und mit ³⁵S-Methionin markiertem Cyclin B1 versetzt (Spur 3). Präzipitiertes Aktin diente als Hintergrund-Kontrolle (Spur 2). 10 % des eingesetzten Cyclin B1 diente als Ladekontrolle (Spur 1). B: GST-Plk1 wurde mit ³⁵S-Methionin markiertem Cyclin B1 versetzt (Spur 4). GST diente als negativ-Kontrolle (Spur 3). 10 % des eingesetzten Cyclin B1 (Spur 2) und 10 % der eingesetzten Luziferase (Spur 1) dienen als Ladekontrolle.

Cyclin B1 interagiert mit präzipitiertem Plk1 aus HeLa S3-Zellen (Abb. 3-4A, Spur 3). Die Aktin-Immünpräzipitation, die als Negativkontrolle dient, zeigt ein deutlich schwächeres Cyclin B1-Signal (Abb. 3-4A, Spur 2). Dieses schwache Signal ist als unspezifischer Hintergrund zu werten. Um auszuschließen, daß diese Interaktion über kopräzipitierte Plk1-Bindungspartner aus HeLa-Zellen sekundär vermittelt wird (z.B. über Cdc25C), wurden Pulldown-Experimente mit bakteriell exprimiertem GST-Plk1 durchgeführt. Hier ist auszuschließen, daß mitotische Proteine in den bakteriellen Extrakten vorhanden sind, welche die Interaktion vermitteln könnten. Zusätzlich zur GST-Kontrolle wurde Luziferase in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin translatiert und in den Experimenten mitgeführt, um die Spezifität der Interaktion zu untersuchen. Die Luziferase ist ein Enzym aus *Photinus pyralis* (Glühwürmchen), welches nicht mit Plk1 assoziiert und somit als Kontrolle dafür dient, daß Plk1 nicht grundsätzlich mit *in vitro*-translatierten Proteinen aus dem Retikulozytenlysate interagiert. Abb. 3-4B zeigt, daß ca. 5-7% des eingesetzten Cyclin B1 an das GST-Plk1 gebunden haben. Die GST-Kontrolle demonstriert, daß die Assoziation beider Proteine nicht

über den GST-Fusionsanteil erfolgt ist. Da keine Luziferase in der GST-Plk1-Spur detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, daß es sich um eine spezifische Interaktion handelt. Sie demonstriert, daß die Interaktion nicht von Komponenten des Retikulozytenlysates vermittelt werden kann.

In diesem Experiment wurde die Assoziation von Cyclin B1 sowohl mit Plk1 aus HeLa S3-Zellextrakten als auch mit GST-Plk1 aus Bakterien detektiert. Die Kontrollen belegen, daß es sich um eine spezifische Interaktion handelt, die nicht durch sekundäre Komponenten vermittelt wird. Vielmehr handelt es sich um den Nachweis der direkten Interaktion von Plk1 und Cyclin B1 *in vitro*.

3.2.4 Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1

Der MPF ist nur biologisch aktiv, wenn dessen Cyclin B1-Untereinheit phosphoryliert vorliegt (Li et al., 1995). Plk1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche hauptsächlich Mitose-regulierende Proteine phosphoryliert (siehe Abb. 1-6). Die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, daß Plk1 und Cyclin B1 ihr Expressionsmaximum in der G₂/M-Phase haben, an mitotischen Strukturen kolokalisieren und *in vitro* direkt miteinander interagieren. Da die Funktionen von Cyclin B1 durch Phosphorylierung reguliert werden, wurden Phosphorylierungs-Studien durchgeführt. Aktive Plk1-Kinase wurde als GST-Fusionsprotein in Sf9-Zellen exprimiert und aufgereinigt. Cyclin B1 wurde als CFP-Fusionsprotein in 293-Zellen exprimiert und über den Fusionsanteil mit dem GFP-Antikörper präzipitiert und in eine Phosphorylierungs-Studie eingesetzt. Hierbei erkennt der GFP-Antikörper auch GFP-Derivate, wie CFP und YFP. Zur Kontrolle wurde Zellextrakt mit einem Kaninchen IgG (Immunglobulin G) präzipitiert. Diese IgG-Negativkontrolle dient dazu, unspezifisch an den Kaninchen-Antikörper gebundene Proteine zu detektieren. Sie sollte dem Nachweis dienen, daß das in der anschließenden Fluorographie zu detektierende Protein nicht unspezifisch über den Kaninchen-Antikörper, sondern spezifisch über den CFP-Anteil präzipitiert wurde. 50% der über Protein A/G-Plus pelletierten, immunpräzipitierten Proteine wurden als Ladekontrolle in einen Western-Blot mit einem Antikörper gegen Cyclin B1 eingesetzt, um zu zeigen, daß Cyclin B1 spezifisch präzipitiert wurde (Abb. 3-5A, unten).

Da in der IgG-Kontrolle weder ein Phosphorylierungs-Signal, noch Cyclin B1-Protein im Western-Blot detektiert werden konnte (Abb. 3-5A, linke Spur), im Gegensatz dazu ein Signal des phosphorylierten Fusionsproteins in der GFP-Präzipitation zu sehen ist (Abb. 3-5A, rechte Spur), muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem radioaktiv markierten

Protein um CFP-Cyclin B1 handelt. Dieses Experiment demonstriert, daß Plk1 in der Lage ist, Cyclin B1 zu phosphorylieren.

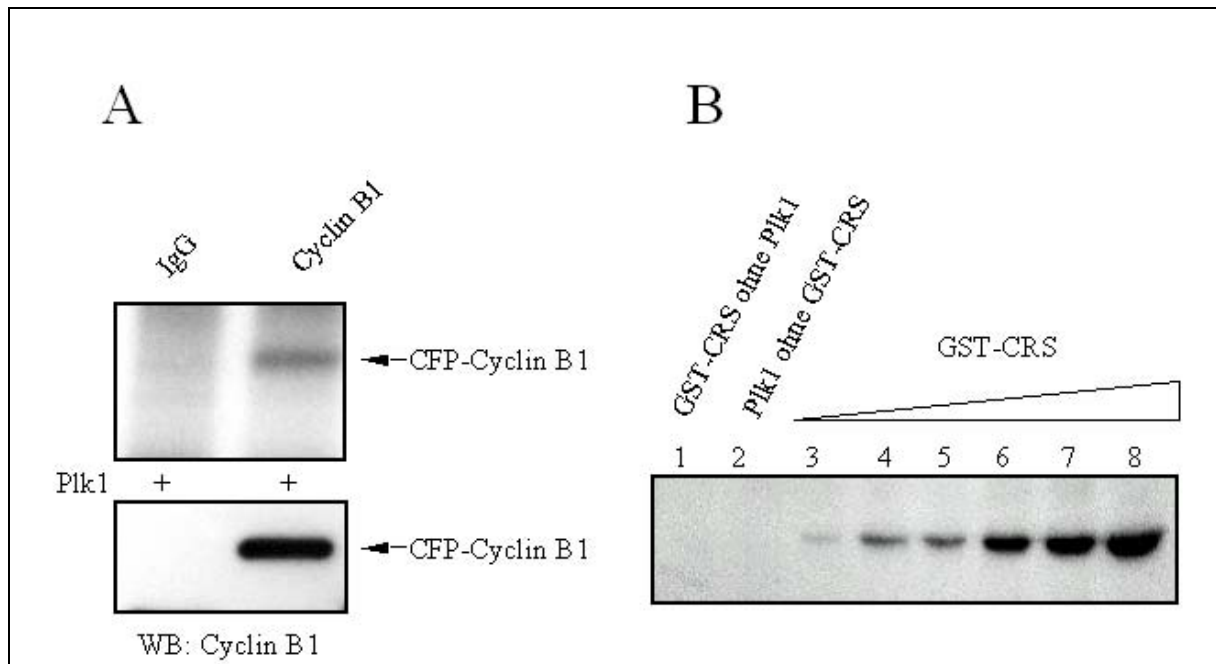


Abb. 3-5: In vitro-Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1.

A: CFP-Cyclin B1 wurde aus 293-Zellen präzipitiert, IgG-Präzipitation diente als negativ-Kontrolle. Die Präzipitate wurden in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt (oben), 50% diente als Ladekontrolle für den Western-Blot (unten). B: GST-CRS wurde in ansteigender Menge in Phosphorylierungs-Studien mit Plk1 eingesetzt. GST-CRS alleine diente als Negativkontrolle (Spur 1). Um zu zeigen, daß es sich nicht um eine unspezifische Phosphorylierung von Proteinen aus Sf9-Zellen handelt, diente Plk1 alleine als zusätzliche Negativkontrolle (Spur 2).

3.2.5 Phosphorylierung der CRS von Cyclin B1 durch Plk1

Die Phosphorylierung der CRS von Cyclin B1 steuert dessen nukleäre Translokation (Hagting et al., 1999; Li et al., 1997). Zum Zeitpunkt der nukleären Translokation von Cyclin B1 in der G₂/M-Phase erreicht Plk1 sein enzymatisches Aktivitätsmaximum (Lee et al., 1995). Diese zeitliche Korrelation gibt Anlaß zu der Frage, ob die gezeigte Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1 (vgl. Kapitel 3.2.4) zu dessen nukleärer Translokation beiträgt. Es ist bekannt, daß Phosphorylierung innerhalb der CRS von Cyclin B1 dessen Kernimport beschleunigt (siehe Kap. 1.2.2.1). Um zu untersuchen, ob die von Plk1 phosphorylierte Region in Cyclin B1 innerhalb der CRS liegt, wurde die CRS des humanen Cyclin B1 (AS 100-159) bakteriell exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurde das so generierte GST-CRS-Protein in Phosphorylierungs-Studien mit Plk1 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde sowohl Substrat ohne Kinase (Abb. 3-5B, Spur 1) und Kinase ohne Substrat (Abb. 3-5B, Spur 2) mit [γ -³²P]ATP inkubiert. Beide Negativkontrollen zeigen kein Signal. Bei der

Inkubation von Plk1 und CRS ist deutlich zu sehen, daß das Phosphorylierungs-Signal proportional mit Anstieg der Substratkonzentration zunimmt (Abb. 3-5B, Spuren 3 bis 8). Dies spricht für eine Enzym-Substrat-Reaktion, bei der die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in bestimmten Grenzen von der Konzentration des Substrates abhängig ist (Michaelis-Menten). Bei gleichbleibender Enzymmenge wird die Reaktion innerhalb einer gewissen Zeit von der Menge des Substrates limitiert. Plk1 phosphoryliert Cyclin B1 innerhalb seiner CRS.

3.2.6 Phosphorylierung der CRS-Mutanten

Mit Extrakten von *Xenopus*- und Seestern-Oozyten konnte gezeigt werden, daß sowohl MAPK als auch MPF selbst in der Lage sind, Cyclin B1 zu phosphorylieren (Izumi und Maller, 1991; Borgne et al., 1999). Diese phosphorylierten Serin-Reste entsprechen im humanen Cyclin B1 den Aminosäuren an den Positionen Ser-126 und Ser-128 (Izumi und Maller, 1991). Für humanes Cyclin B1 wurden diese Phosphorylierungen bislang noch nicht gezeigt. Für die Serin-Reste an den Positionen Ser-133 und Ser-147 ist weder in *Xenopus* noch in Mammalia bekannt, durch welche Kinasen diese Aminosäuren phosphoryliert werden. Da Plk1 in der Lage ist, die CRS zu phosphorylieren (vgl. Kapitel 3.2.5) wurden nun die Serin-Reste der CRS gegen Alanin-Reste ausgetauscht. Abb. 3-6A zeigt ein Schema der daraus resultierenden GST-Fusionsproteine, welche nach bakterieller Expression und anschließender Aufreinigung in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt wurden.

Abb. 3-6B zeigt, daß Plk1 in der Lage war, sowohl CRS-WT als auch CRS-S147A zu phosphorylieren (Abb. 3-6B, Spuren 2 und 6). Das Fusionsprotein CRS-S133A konnte nicht mehr von Plk1 phosphoryliert werden (Abb. 3-6B, Spur 5). Dies zeigt, daß Ser-133 die Hauptphosphorylierungs-Stelle innerhalb der CRS für Plk1 darstellt. Interessanterweise hatte ein Aminosäure-Austausch N-terminal des Ser-133 einen negativen Einfluß auf die Phosphorylierung der CRS. So ist zu beobachten, daß die CRS-Phosphorylierungs-Intensität bei der Mutante CRS-S126A leicht, bei CRS-S128A stark abnahm (Abb. 3-6B, Spuren 3 und 4). Da bei dem Fusionsprotein CRS-S133A, in welchem die Serine an den Positionen Ser-126 und Ser-128 intakt sind, kein Phosphorylierungs-Signal zu detektieren war, muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei Ser-126 und Ser-128 nicht um weitere Phosphorylierungs-Stellen für Plk1 handelt. Vielmehr führen Aminosäure-Substitutionen an diesen Positionen zu einem veränderten Phosphorylierungs-Verhalten.

Wurden die gleichen CRS-Proteine in Phosphorylierungs-Studien mit MAPK (Erk2) eingesetzt, zeigte sich ein vollkommen unterschiedliches Phosphorylierungs-Muster (Abb.

3-6C). Aminosäure-Substitutionen an den Positionen Ser-126 und Ser-128 führten zu einer erheblichen Inhibierung der Phosphorylierung durch MAPK (Abb. 3-6C, Spuren 2 und 3), wohingegen die Mutanten CRS-S133A und CRS-S147A gut phosphoryliert wurden (Abb. 3-6C, Spuren 4 und 5). Allerdings verschwindet das Phosphorylierungs-Signal nicht vollständig, was darauf zurückzuführen ist, daß beide Serin-Reste (Ser-126 und Ser-128) möglicherweise gleichermaßen von MAPK phosphoryliert werden können. Interessanterweise werden von MAPK genau jene Serin-Reste phosphoryliert, deren Austausch zu Alaninen die Plk1-vermittelte Phosphorylierung der CRS hemmen.

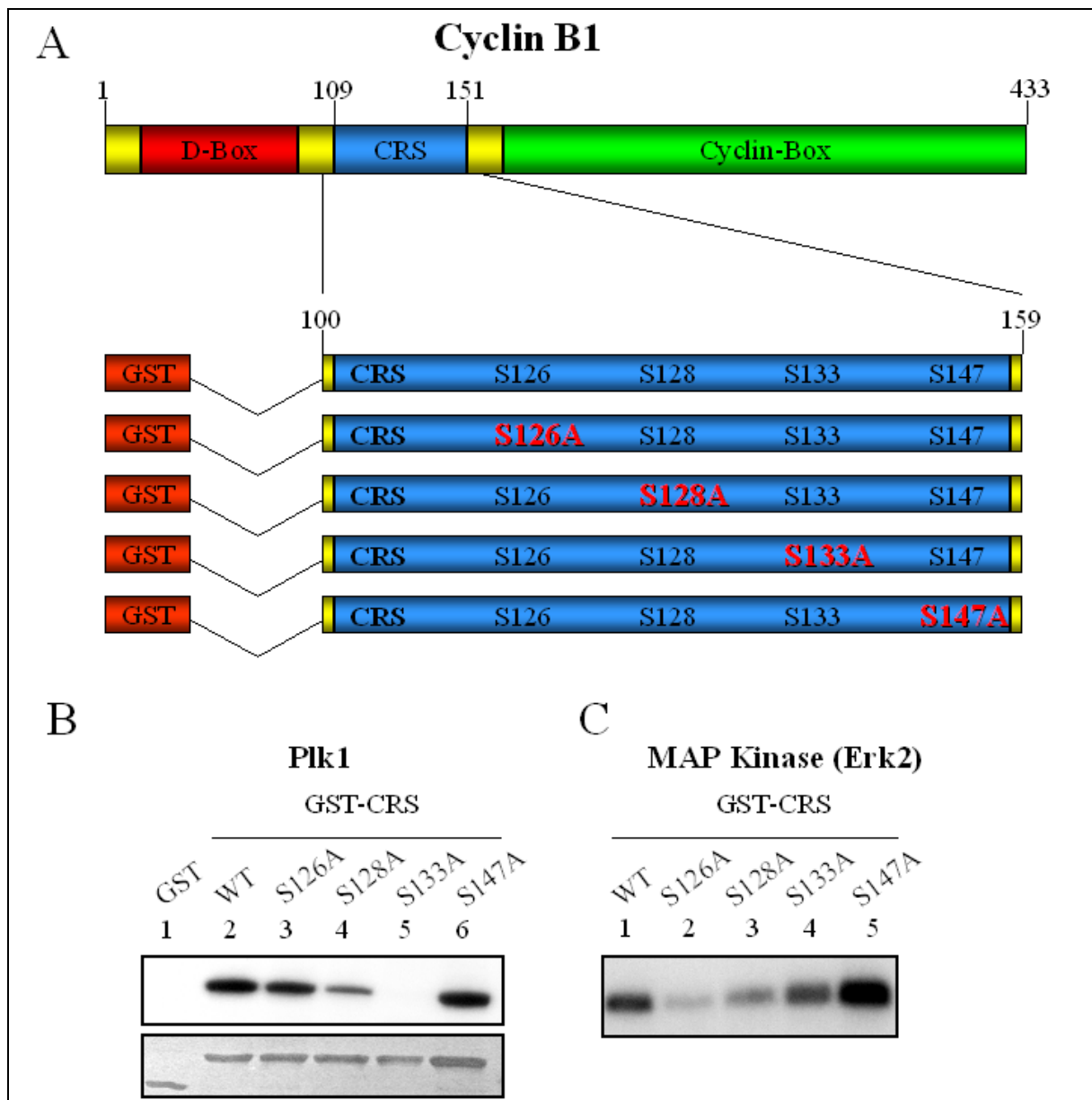


Abb. 3-6: Generierung und Phosphorylierung von CRS-Mutanten aus humanem Cyclin B1.

A: Schematische Darstellung der CRS-Mutanten. Es wurden einzelne Aminosäure-Substitutionen vorgenommen. Die CRS des humanen Cyclin B1 (WT) und ihre angezeigten Mutanten (S126A, S128A, S133A, S147A) wurden in den Vektor pGex 5x-1 kloniert und mit N-terminalem GST-Anteil in Bakterien exprimiert. B: Phosphorylierung der GST-CRS-Proteine durch Plk1. Oben: Phosphorylierung, unten: Input (Coomassie). C: Phosphorylierung der GST-CRS-Mutanten durch MAPK.

3.2.7 Kooperative Phosphorylierung der CRS von Cyclin B1 durch Plk1 und MAPK

Ausgehend von der Beobachtung, daß die CRS des humanen Cyclin B1 von verschiedenen Kinasen phosphoryliert wird, und daß Aminosäure-Substitutionen der MAPK-Phosphorylierungs-Stellen die Plk1-vermittelte CRS-Phosphorylierung beeinflussen, wurde untersucht, ob durch sequentielle Phosphorylierung eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters zu erkennen ist. Zu diesem Zweck wurde GST-CRS-WT unter nicht-radioaktiven Bedingungen mit MAPK und ATP versetzt. Nach dem Entfernen der MAPK wurde diese vorphosphorylierte CRS unter radioaktiven Bedingungen mit Plk1 inkubiert. Abbildung 3-7A zeigt, daß unter diesen Bedingungen die Plk1-vermittelte Phosphorylierung der vorphosphorylierten CRS ein 3-4 fach stärkeres Phosphorylierungs-Signal ergab, verglichen mit nicht vorbehandelter CRS. Durch Vorphosphorylierung wird die CRS als Substrat also entweder besser zugänglich, da das Enzym eine höhere Affinität zu dem vorphosphorylierten Substrat aufweist, oder aber es entstehen zusätzliche Phosphorylierungsstellen für Plk1.

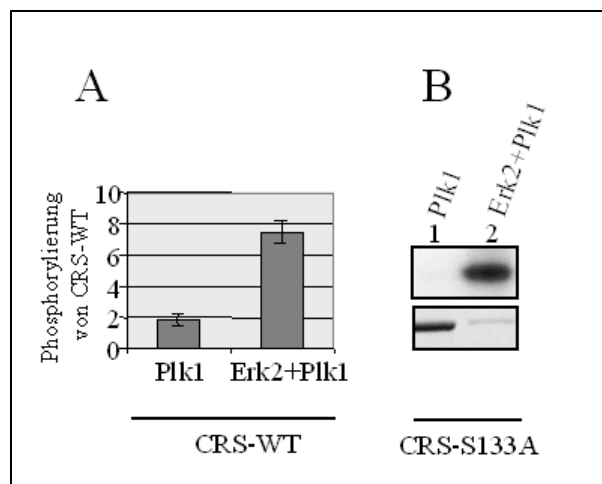


Abb. 3-7: Untersuchung der CRS-Phosphorylierung durch Plk1 und MAPK.

A: Phosphorylierung von GST-CRS-WT durch Plk1 (linker Balken) und nach Vorbehandlung der CRS unter nicht-radioaktiven Bedingungen mit ATP in Anwesenheit von MAPK (rechter Balken). B: Gleiches Experiment wie in A mit der Mutante GST-CRS-S133A. Auch hier erfolgte die Phosphorylierung (oben) durch Plk1 direkt (linke Spur) oder nach Vorbehandlung mit ATP in Anwesenheit von MAPK (rechte Spur). Das Coomassie-gefärbte Gel (unten) zeigt, daß durch starkes Waschen nach der nicht-radioaktiven Vorbehandlung die Ausbeute an GST-CRS-S133A sehr gering ist (unten).

Um dies näher zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment mit dem Fusionsprotein CRS-S133A durchgeführt, welches nicht von Plk1 phosphoryliert werden kann (siehe Abb. 3-6B). Vorbehandlung dieser Mutante mit MAPK führte nun zu einer Phosphorylierung durch Plk1 (Abb. 3-7B). Dies zeigt, daß durch Vorphosphorylierung durch MAPK neue Phosphorylierungs-Stellen für die Plk1-vermittelte Phosphorylierung entstehen. Da die beiden Serin-Reste Ser-126 und Ser-128 bereits von MAPK phosphoryliert wurden, könnte nun Ser-147 als Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 dienen.

3.2.8 Bindungsstudie von Plk1 und Cyclin B1

Um zu untersuchen, ob die CRS des humanen Cyclin B1 ausreichend ist, um an Plk1 zu binden, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die bereits

erwähnten GST-fusionierten CRS-Proteine mit ^{35}S -Methionin-markiertem Plk1 versetzt. His-fusioniertes Cyclin B1 und verschiedene Cyclin B1-Mutanten, die eine bis drei Aminosäure-Substitutionen trugen, wurden als Gesamtproteine für die Bindungsstudie eingesetzt. Während GST-CRS nur sehr geringe Mengen Plk1 (ca. 1%) binden konnte (Abb. 3-8A), waren selbst geringe Mengen His-Cyclin B1 in der Lage, größere Mengen Plk1 (>30%) zu binden (Abb. 3-8B).

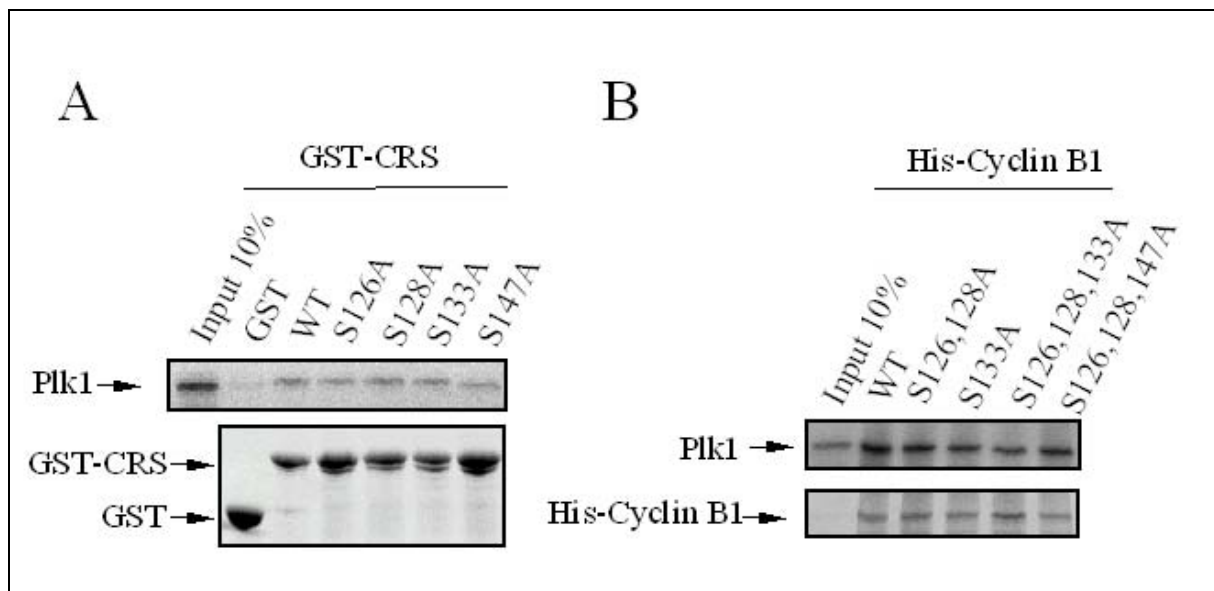


Abb. 3-8: Untersuchung der Bindung von Plk1 an CRS- und Cyclin B1-Mutanten.

A: GST-CRS und ihre Mutanten wurden in Pull-down-Experimenten mit ^{35}S -Methionin-markiertem Plk1 eingesetzt. 10% des eingesetzten Plk1-*in vitro*-Translats einerseits (oben, Spur 1) und 25% der GST-Fusions-Proteine andererseits (unten) dienten als Ladekontrolle. B: His-Cyclin B1 und seine angezeigten Mutanten wurden in Pull-down-Experimente mit ^{35}S -Methionin-markiertem Plk1 eingesetzt. Das Gel des Kinase-Assays selbst wurde mit Coomassie gefärbt, um 100% des eingesetzten His-Fusionsproteins zu visualisieren (unten). Auch hier dienten 10% des eingesetzten Plk1 als Ladekontrolle (oben, Spur 1).

Ein Einfluß der verschiedenen Aminosäure-Substitutionen auf die Bindung an Plk1 konnte weder bei GST-CRS noch bei His-Cyclin B1 festgestellt werden. Dies zeigt, daß nur das Gesamtlängen-Protein hohe Affinität zu Plk1 hat, und daß ein Austausch der Phosphorylierungs-Stellen zu Alaninen innerhalb der CRS die Bindung nicht beeinflusst. Inwieweit diese Phosphorylierung der CRS (AS 109-159) auch im Gesamtprotein (AS 1-433) zu finden ist, sollte im folgenden untersucht werden.

3.2.9 Phosphorylierung des Ser-133 in Cyclin B1 *in vitro* und *in vivo*

Mit Hilfe von Deletionskonstrukten des humanen Cyclin B1 konnte das Ser-133 innerhalb der CRS als Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 identifiziert werden. Ob diese Position auch im Gesamtprotein für Plk1 zugänglich ist, sollte durch Phosphorylierungs-Studien mit Cyclin B1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher untersucht werden.

Um zu zeigen, daß Ser-133 die Plk1-Phosphorylierungs-Stelle im Gesamtprotein ist, wurde CFP-Cyclin B1, bzw. CFP-Cyclin B1-S133A in 293-Zellen exprimiert. Das Fusionsprotein wurde anschließend über den GFP-Antikörper präzipitiert und in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt. Abb. 3-9A zeigt, daß CFP-Cyclin B1-S133A weitaus schlechter von Plk1 aus Sf9-Zellen phosphoryliert wird als der Wildtyp (Abb. 3-9A, Spuren 3 und 4). Das schwache Signal in Spur 4 ist als Hintergrund-Phosphorylierung zu werten. Diese Untersuchung bestätigt die mit der CRS durchgeführten Phosphorylierungs-Studien für das Gesamtprotein.

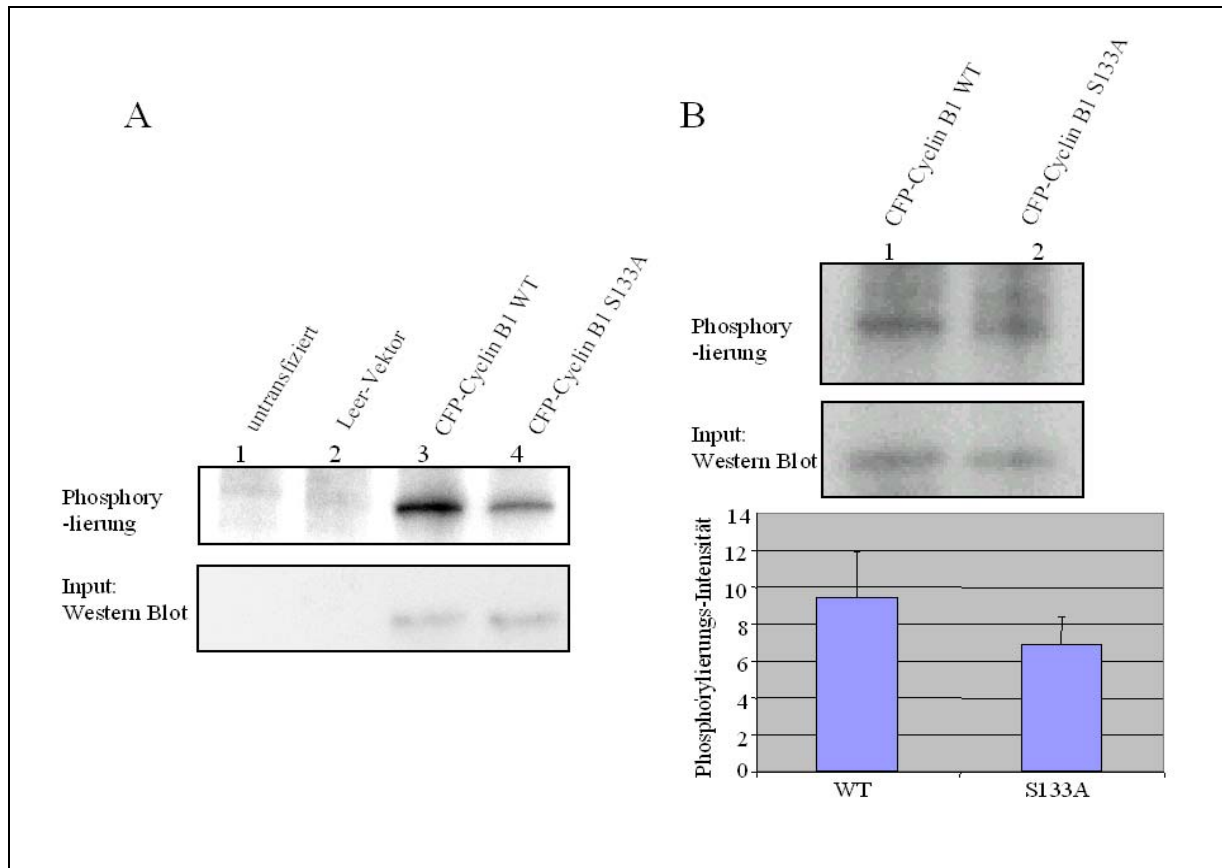


Abb. 3-9: Untersuchung der Phosphorylierung des Ser-133 von Cyclin B1 *in vitro* und *in vivo*.

A: CFP-Cyclin B1 und CFP-Cyclin B1-S133A wurden über GFP-Antikörper aus 293 Zellen präzipitiert und in Phosphorylierungs-Studien mit Plk1 eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten sowohl untransfizierte Zellen (Spur 1), als auch Leervektor-transfizierte Zellen (Spur 2). Anschließend wurde das Gel rehydriert und einem Western-Blot unterzogen, um das eingesetzte Cyclin B1 nachzuweisen (unten). B: HeLa-Zellen wurden mit CFP-Cyclin B1 oder CFP-Cyclin B1-S133A transfiziert und für 3 Stunden mit ^{32}P inkubiert. Anschließend wurde mit einem Cyclin B1-Antikörper präzipitiert und die radioaktiven Fusions-Proteine (oben) gegen endogenes Cyclin B1 (mitte) mit Hilfe des Gel-Dokumentations Systems (Kodak) standardisiert. Die Auswertung dreier unabhängiger Experimente ist im Balkendiagramm dargestellt (unten).

Um zu untersuchen, ob diese Phosphorylierung auch *in vivo* stattfindet, wurden die erwähnten Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Für HeLa-Zellen wurde gezeigt, daß sie Plk1 überexprimieren (Simizu und Osada, 2000) und sich deshalb besser eignen, um Plk1-vermittelte Phosphorylierungen *in vivo* zu detektieren. Die Zellen wurden in Phosphat-freiem Medium mit anorganischem ^{32}P kultiviert, die rekombinanten CFP-Fusionsproteine

immunpräzipitiert. Nach anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung autoradiographisch visualisiert. In Abb. 3-9B ist zu sehen, daß das Wildtyp-Protein mehr ^{32}P inkorporierte, als die Mutante CFP-Cyclin B1-S133A. Die Reduktion der Phosphorylierung betrug ca. 25%. Dies zeigt, daß der Verlust des Ser-133 in lebenden Zellen, die Plk1 überexprimieren, zu einer reduzierten Phosphorylierung von Cyclin B1 führt.

3.2.10 Untersuchung des nukleären Transports von Cyclin B1 in Abhängigkeit von dessen Phosphorylierung an Ser-133

Die Phosphorylierung der CRS beschleunigt den nukleären Import von Cyclin B1 und verhindert den stetigen Kern-Export. Um den Kern-Import unabhängig vom Export zu studieren, wurde Leptomycin B eingesetzt. Leptomycin B bindet an CRM1 und verhindert somit den CRM1-vermittelten Export verschiedener Proteine, wie auch den von Cyclin B1 (siehe Kap. 1.2.2.1; Abb. 1-4). Um die Rolle des Ser-133 in diesem Prozeß zu untersuchen, wurden verschiedene Cyclin B1-Konstrukte generiert. Diese Konstrukte tragen eine bis drei Aminosäure-Substitutionen innerhalb der CRS, welche Phosphorylierungen durch MAPK, MPF und Plk1 verhindern. Die Cyclin B1-Varianten wurden in den Vektor pcDNA 3.1/HisA kloniert. Dieser Vektor kodiert am N-Terminus für ein Anti-Xpress™-Epitop, welches mit dem entsprechenden Antikörper in Immunfluoreszenz-Studien sichtbar gemacht werden kann. Unter diesen Bedingungen wurde die Kern-Import-Rate (subzelluläre Verteilung des Proteins nach 2,5 Stunden LMB-Behandlung) der verschiedenen Cyclin B1-Proteine studiert. Abb. 3-10A zeigt Färbungen von einzelnen Zellen, die eine annähernd typische Färbung für jedes Protein darstellen. Abb. 3-10B zeigt die Auswertung für 3 x 100 gezählte Zellen. Verglichen mit dem Wildtyp-Protein zeigen alle Mutanten eine Reduktion der nukleären Lokalisation von Cyclin B1. Der Austausch der Ser-126 und Ser-128 zu Alaninen führte nur zu einer leichten Reduktion der Import-Rate. Ein ähnlich moderater Effekt wurde bei dem Austausch des Ser-133 zu Alanin detektiert. Erst eine Substitution aller drei Serine zu Alaninen (S126,128,133A) führte zu einer bemerkenswerten Reduktion des nukleären Imports. Hier wiesen über 20% der Zellen eine Lokalisation des Proteins im Cytoplasma auf. Bei weiteren 20% lokalisierte das Protein gleichermaßen im Kern wie auch im Cytoplasma. Diese Daten zeigen, daß es sich hierbei nicht um lediglich additive Effekte handelt. Vielmehr wird durch Phosphorylierung der Serin-Reste innerhalb der CRS die nukleäre Translokation von humanem Cyclin B1 in synergistischer Art und Weise reguliert.

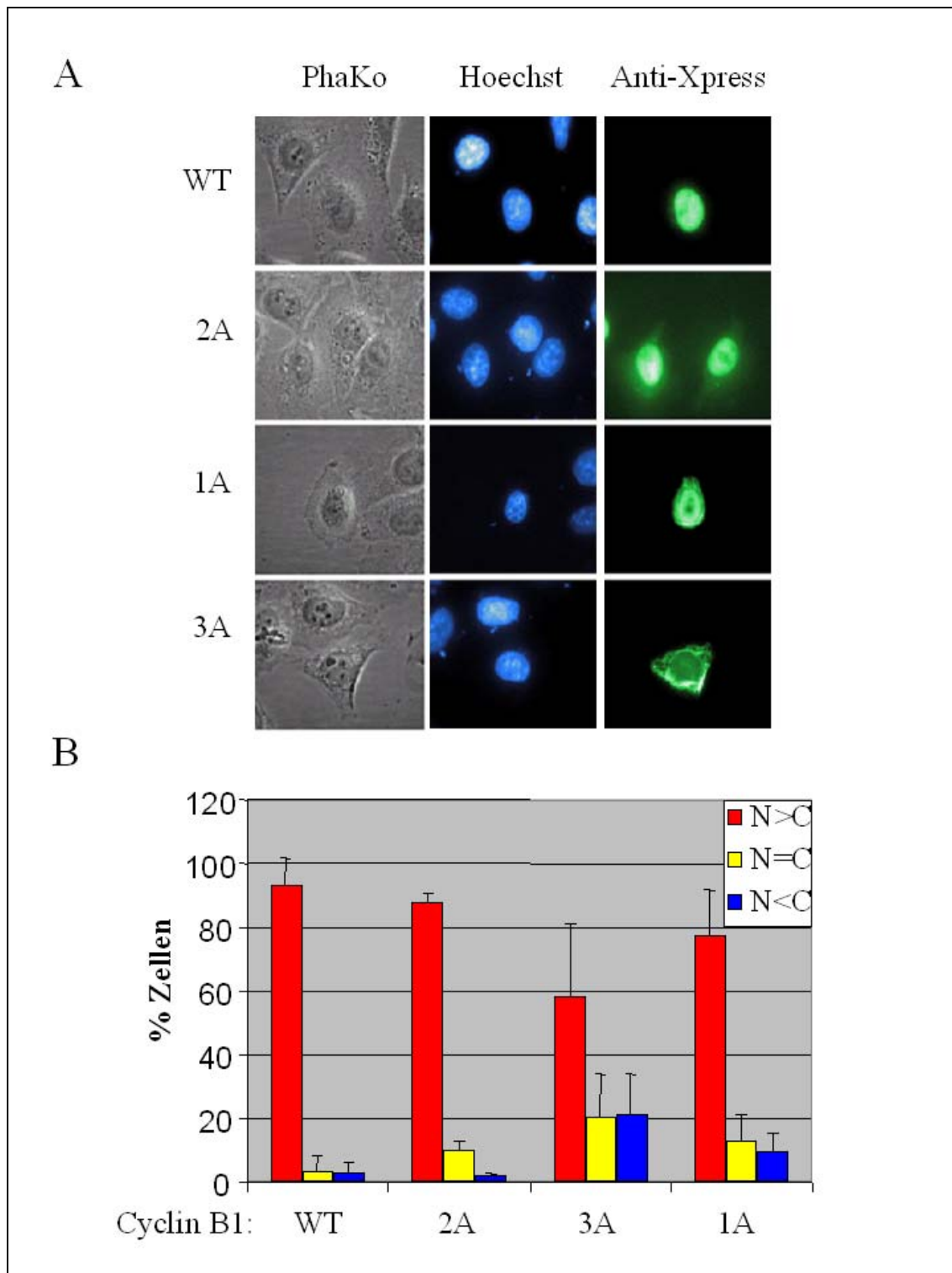


Abb. 3-10: Untersuchung des nukleären Imports von Cyclin B1.

HeLa S3-Zellen wurden mit Cyclin B1 (WT) und dessen Mutanten transfiziert (2A: S126,128A; 1A: S133A; 3A: S126,128,133A). Um den CRM1-vermittelten Export zu inhibieren, wurden die Zellen für 2,5 Stunden mit Leptomycin B (3 ng/ml) behandelt. Exogenes Cyclin B1 wurde über den Anti-Xpress-Antikörper mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. A: Färbung ausgesuchter Zellen für jedes transfizierte Konstrukt. PhaKo: Phasenkontrast, Hoechst: Bisbenzimid-Färbung (blau), Anti-Xpress: Färbung des Cyclin B1-Proteins über den Fusionsanteil (grün). B: Pro transfiziertem Cyclin B1-Konstrukt wurden 3 x 100 Zellen gezählt und die Lokalisation des rekombinanten Cyclin B1-Proteins bestimmt. N>C: stärkere Färbung im Nucleus, N=C: Kern und Cytoplasma gleichstark gefärbt, N<C: stärkere Färbung im Cytoplasma.

3.3 Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Pin1

Ein erst kürzlich beschriebener Mechanismus der Mitose-Regulation ist die Isomerisierung mitotischer Phosphoproteine durch die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1. Dieses Enzym besteht aus einer kurzen, N-terminalen WW-Domäne mit Substrat-bindender Funktion und einer C-terminalen katalytischen Domäne. In Bindungsstudien (Pull-down-Experimente) konnte gezeigt werden, daß humanes Plk1 aus mitotischen Extrakten an bakteriell exprimiertes Pin1 bindet (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998). Diese Interaktion sollte im folgenden näher untersucht werden.

3.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Pin1

Fluoreszenz-Studien mit GFP-Fusionsproteinen zeigen, daß Pin1 überwiegend im Nukleus lokalisiert, nur ein geringer Teil des Proteins ist im Cytoplasma zu finden (Abb. 3-11, oben). Im Gegensatz zum Gesamtprotein lokalisiert die WW-Domäne beinahe ausschließlich im Zellkern (Abb. 3-11, Mitte). Die WW-Domäne stellt die Protein-Interaktionsdomäne von Pin1 dar. Sie vermittelt die Bindung an Substrate und Strukturproteine und ist verantwortlich für die überwiegend nukleäre Lokalisation von Pin1. Überexpression der katalytischen Domäne verursacht innerhalb von zwölf Stunden massive Apoptose in HeLa S3-Zellen (Abb. 3-11, unten). Es wurde bereits beschrieben, daß auch katalytisch inaktive PPIase-Domäne diese massive Apoptose induziert, was einem dominant-negativen Mechanismus zugeschrieben wird, der noch nicht näher untersucht wurde (Rippmann et al., 2000). Diese Untersuchungen zeigen, daß Pin1 ein vorwiegend nukleäres Protein ist. Da das Protein auch im Cytoplasma zu finden ist, kann davon ausgegangen werden, daß Pin1 sowohl mit nukleären, als auch mit cytoplasmatischen Proteinen interagieren kann. Eine Akkumulation des Proteins an mitotischen Strukturen (z.B. Centrosomen) konnte nicht nachgewiesen werden.

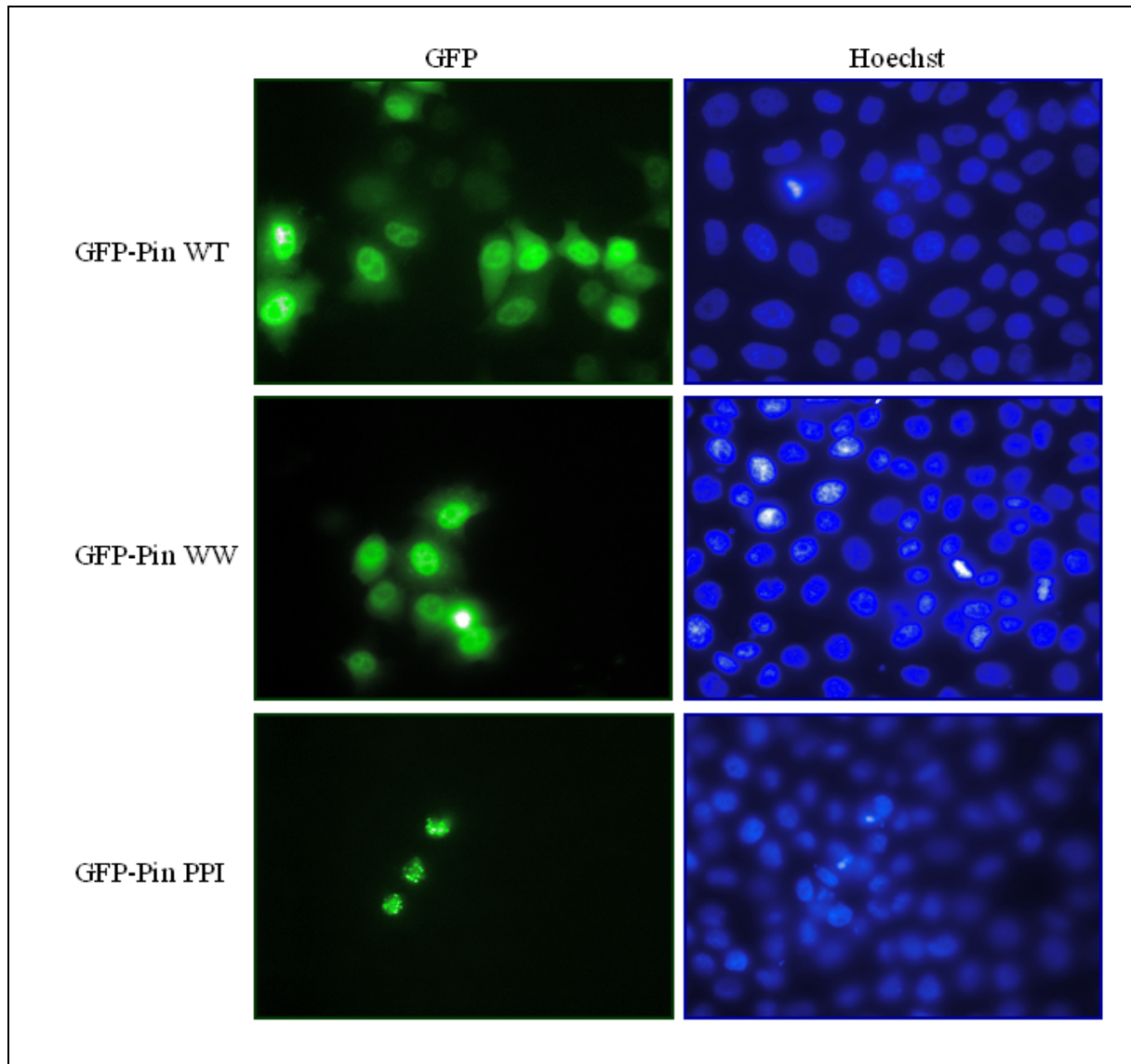


Abb. 3-11: Subzelluläre Lokalisation von GFP-Pin1.

HeLa S3-Zellen wurden mit GFP-fusioniertem Pin1 (GFP-Pin WT), der WW-Domäne (GFP-Pin WW) oder der PPIase-Domäne (GFP-Pin PPI) transfiziert (links). Die DNA-Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342) erfolgte, um apoptotische Veränderungen zu detektieren (rechts).

3.3.2 Bindungsstudie von Plk1 und Pin1

Um die Bindung von Plk1 an Pin1 näher zu untersuchen, wurden GST-Pin1 Konstrukte in Pulldown-Experimente eingesetzt. Verwendet wurden dazu die WW-Domäne, die katalytische Domäne (Pin-Cat) und eine Mutante, bei der die beiden essentiellen Arginine (Arg-68 und Arg-69) zu Leucinen ausgetauscht wurden. Für dieses Protein wurde gezeigt, daß es nicht mehr an phosphorylierte Pin1-Substrate binden kann, da die beiden basischen Arginine (Arg-68 und Arg-69) die Bindung des phosphorylierten Substrates koordinieren (Rippmann et al., 2000). Die GST-Fusionsproteine wurden mit mitotischen Zell-Extrakten inkubiert. In Abb. 3-12 ist zu sehen, daß ca. 50% des in den mitotischen Extrakten

vorhandenen Plk1 mit Pin1 assoziierte (Abb. 3-12A, Spur 6). Ausreichend für diese Interaktion ist die WW-Domäne des Pin1, denn auch mit diesem Deletionsprotein konnten ca. 20% der eingesetzten Plk1-Menge präzipitiert werden (Abb. 3-12A, Spur 3). Weder die katalytische Domäne allein noch die Pin1-Mutante (R68,69L) assoziierten mit detektierbaren Mengen Plk1 (Abb. 3-12A, Spuren 4, 5).

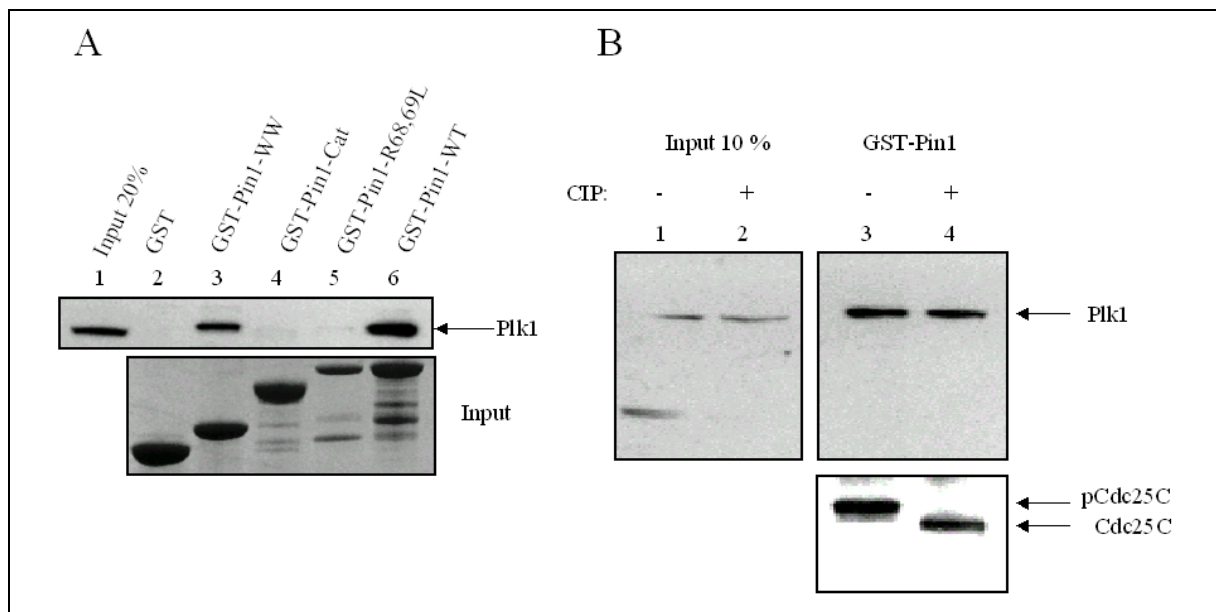


Abb. 3-12: Interaktion von Pin1 und Plk1.

Pulldown-Experimente: GST-Pin1 wurde mit mitotischen HeLa S3-Zellextrakten inkubiert. Der Nachweis des assoziierten Plk1 erfolgte mittels Western-Blot. A: GST, GST-Pin1-WW (AS 1-42), GST-Pin1-Cat (AS 44-163), GST-Pin1-R68,69L und GST-Pin1-WT wurden in Pulldown-Experimenten eingesetzt und mit Zellextrakten mitotischer HeLa S3-Zellen inkubiert. Die Ansätze wurden über SDS-PAGE analysiert (Spuren 2-6). 20 % des eingesetzten Zellextraktes diente als Ladekontrolle (Spur 1). B: Extrakte mitotischer HeLa S3-Zellen wurden mit Phosphatase-Inhibitoren (Spur 3) oder ohne Inhibitoren, aber mit CIP (Spur 4) versetzt. 10 % des eingesetzten Zellextraktes diente als Ladekontrolle. Anschließend wurden die Extrakte mit GST-Pin1-WT inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Analyse mittels Plk1-Antikörper (Transduction Laboratories) (oben) wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Cdc25C analysiert (unten).

3.3.3 Einfluß der Phosphorylierung von Plk1 auf die Pin1-Plk1-Interaktion

Da die WW-Domäne die Interaktion mit phosphorylierten Pin1-Substraten vermittelt, wurde nun untersucht, ob Plk1 nach Behandlung mit Phosphatase noch immer an Pin1 binden kann. Dazu wurde erneut ein Pulldown-Experiment durchgeführt, wobei die Hälfte der mitotischen Zellextrakte mit *calf intestinal phosphatase* (CIP) behandelt wurde. Nach der Detektion des assoziierten Plk1 wurde die selbe Membran mit einem Antikörper, der gegen Cdc25C gerichtet ist, inkubiert. Trotz Behandlung mit Phosphatase konnte die Pin1-Plk1-Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 3-12B, Spuren 3 und 4, oben). Im Vergleich dazu ist die Interaktion von Pin1 mit Cdc25C deutlich schwächer geworden (Abb. 3-12B, Spuren 3 und 4, unten). Für Cdc25C ist nach Dephosphorylierung das veränderte Laufverhalten zu erkennen

(Abb. 3-12, Spur 3 vs. 4, unten). Ein verändertes Migrationsverhalten für Plk1 war nicht zu erwarten, da für Plx1 gezeigt wurde, daß sich dessen Laufverhalten nur durch die Phosphorylierung einer Phosphorylierungsstelle (Ser-340) verändert, diese Phosphorylierungsstelle jedoch in humanem Plk1 nicht konserviert ist (Kelm et al., 2002). Da die CIP-vermittelte Dephosphorylierung für die Proteine der HeLa-Zellextrakte über das veränderte Migrationsverhalten des Pin1-assoziierten Cdc25C-Proteins gezeigt werden konnte, darf angenommen werden, daß auch Plk1 von CIP dephosphoryliert wurde. Dies hat aber die Pin1-Plk1-Interaktion nicht deutlich gehemmt. Die Cdc25C-Pin1-Interaktion wurde dagegen schwächer.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die Plk1-Pin1-Interaktion sich von den bislang bekannten Pin1-Interaktionen dergestalt unterscheidet, daß sie nicht durch Dephosphorylierung des Interaktionspartners gehemmt wird.

3.3.4 Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1

Da die Interaktion mit Pin1 nicht durch Behandlung von Plk1 mit CIP gehemmt wird, ist auch zu erwägen, daß Plk1 gar kein Substrat von Pin1 ist, sondern es sich um eine anders geartete enzymatische Interaktion handelt. Folglich sollte untersucht werden, ob Pin1 ein Substrat von Plk1 sein könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Phosphorylierungs-Studien mit GST-fusioniertem Pin1 durchgeführt. In Abb. 3-13A ist zu sehen, daß zwar GST-Pin1 (rechte Spur, oben), nicht aber GST alleine (linke Spur, oben) von Plk1 aus Sf9-Zellen phosphoryliert wurde. Durch Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 3-13A, unten) wurde sichergestellt, daß vergleichbare Mengen GST-Protein eingesetzt wurden.

3.3.5 Kartieren der Phosphorylierungs-Stelle in Pin1

Um festzustellen, innerhalb welcher Region Plk1 Pin1 phosphoryliert, wurden diverse Deletionskonstrukte von Pin1 mit N-terminalem GST-Anteil hergestellt und in Kinasetests mit Plk1 eingesetzt (Abb. 3-13B und C). Abb. 3-13B zeigt das Ergebnis der Phosphorylierungs-Studie, Abb. 3-13C ist eine schematische Darstellung der Deletionsproteine mit angegebener Intensität der Plk1-vermittelten Phosphorylierung. Die Verwendung gleicher Mengen an GST-Fusionsprotein (1,5 µg) für jede Kinase-Reaktion wurde durch anschließende Coomassie-Färbung des SDS-Gels sichergestellt (Abb. 3-13B, unten).

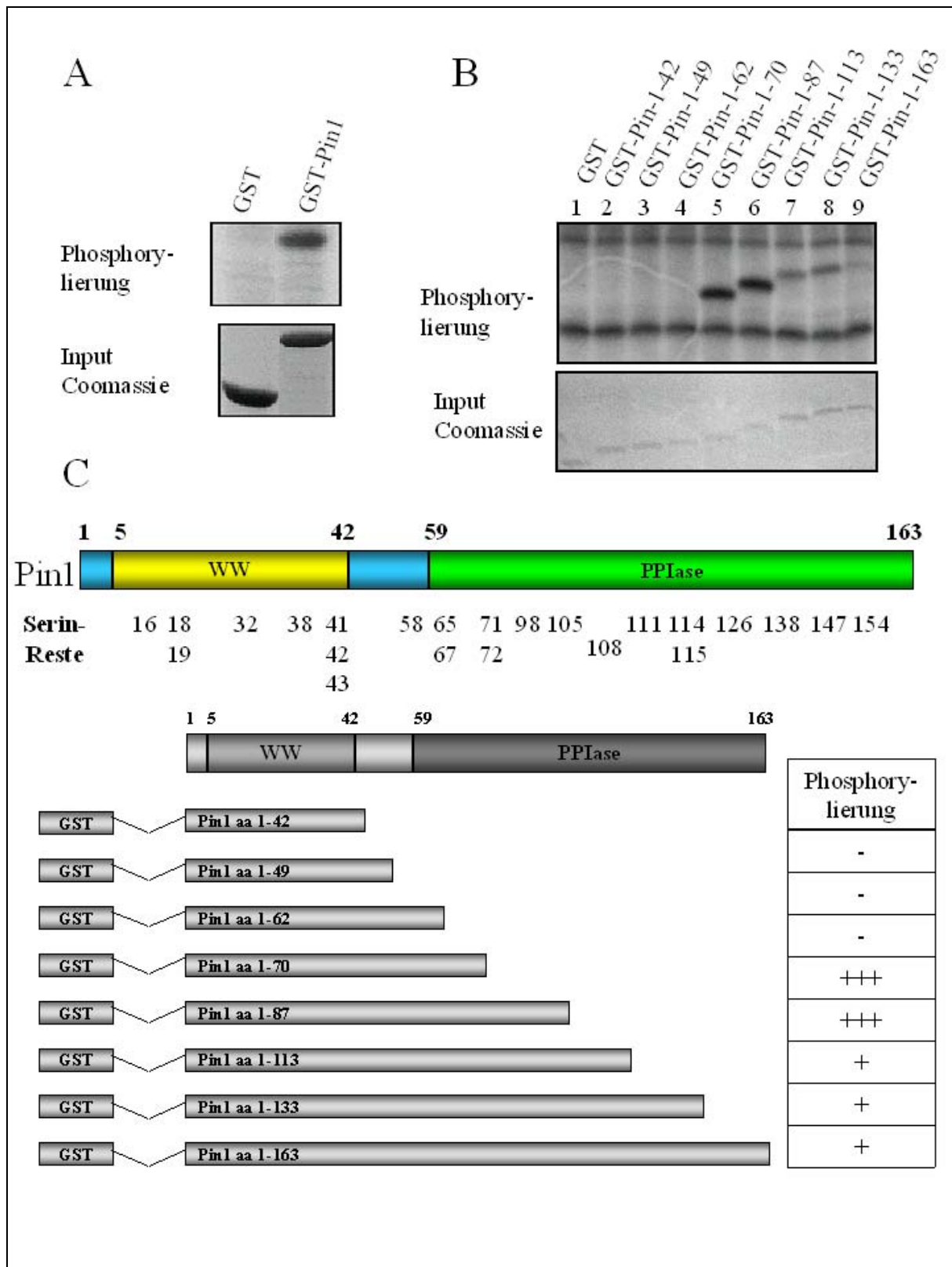


Abb. 3-13: Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1.

A: Plk1 phosphoryliert GST-Pin1 (rechte Spur), nicht aber GST alleine (linke Spur). Coomassie-Färbung der GST-Proteine diente als Ladekontrolle (unten). B: Verschiedene C-terminale Pin1-Deletionen wurden in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt. Gleiche Mengen (1,5 µg) von GST-Fusionsproteinen wurden durch anschließende Coomassie-Färbung des Gels kontrolliert (unten). C: Schematische Darstellung der hergestellten Deletionskonstrukte und die Intensität ihrer Phosphorylierung durch Plk1.

Die Phosphorylierungs-Studie zeigt, daß die WW-Domäne von Pin1 nicht durch Plk1 phosphoryliert werden kann (Abb. 3-13B, Spur 2). Auch längere Pin1-Proteine, die die N-terminale Domäne von Pin1 umfassen (z.B. AS 1-62), können von Plk1 nicht phosphoryliert werden (Abb. 3-13B, Spuren 2 bis 4). Erst das Deletionsprotein, das die Aminosäuren 1-70 umfaßt, kann sehr gut von Plk1 phosphoryliert werden (Abb. 3-13B, Spur 5). Gleiches gilt für das Konstrukt Pin1-AS 1-87 (Abb. 3-13B, Spur 6). Für längere Pin1-Proteine ist festzustellen, daß sie sich schlechter als Plk1-Substrat eignen (Abb. 3-13B, Spuren 7 bis 9). Aus der Untersuchung mit diesen Deletionskonstrukten läßt sich feststellen, daß eine Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 63 und 70 liegt. Dieser Bereich liegt innerhalb der katalytischen Domäne und beinhaltet zwei potentielle Phosphorylierungs-Stellen an den Positionen Ser-65 und Ser-67 (Abb. 3-13C).

3.3.6 Phosphorylierung der Pin1-Domänen durch Plk1

Da die Interaktion von Plk1 und Pin1 von der WW-Domäne vermittelt wird (siehe Kapitel 3.3.2), die Phosphorylierungs-Stelle jedoch in der katalytischen Domäne liegt (siehe Kapitel 3.3.5), wurde nun untersucht, ob die WW-Domäne essentiell für die Phosphorylierung ist. Außerdem wurden die Substrate in ansteigenden Konzentrationen eingesetzt (0,5-2,5 µg), um zu zeigen, daß es sich hierbei um eine Enzym-Substrat-Reaktion handelt, bei der mit steigender Substratmenge auch die Menge an phosphoryliertem Substrat ansteigt. Zusätzlich wurden die Substrate ohne den Fusionsanteil in die Reaktion eingesetzt. Diese Phosphorylierungs-Studie bestätigt die vorausgehende Beobachtung, daß die WW-Domäne alleine nicht als Substrat für Plk1 dienen kann (Abb. 3-14A, Spuren 1 bis 5). Ohne Fusionsanteil läßt sich Pin1 deutlich besser von Plk1 phosphorylieren als mit GST-Fusionsanteil (vgl. Abb. 3-14A, Spuren 11 bis 15 und Abb. 3-13B, Spur 9). Die katalytische Domäne, ohne WW-Domäne, dient als gutes Substrat für die Plk1-vermittelte Phosphorylierung *in vitro* (Abb. 3-14A, Spuren 6 bis 10). Dies ist von besonderem Interesse, da die WW-Domäne, nicht aber die katalytische Domäne an Plk1 binden konnte (siehe Kapitel 3.3.2). Dies impliziert, daß die Bindung an Plk1 über die WW-Domäne nicht für die *in vitro*-Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1 benötigt wird.

Andererseits scheint die Phosphorylierung der katalytischen Domäne alleine im Vergleich zum Gesamtprotein effizienter zu sein. Durch die Färbung der Proteine im Coomassie-Gel ist zu sehen, daß bei vergleichbaren Mengen eingesetztem Pin1-Protein die Plk1-vermittelte

Phosphorylierung der katalytischen Domäne effizienter vonstatten geht, als beim Gesamtprotein (vgl. Abb. 3-14A, Spur 10 mit Spur 13).

Aufgrund dieser Beobachtung sollte untersucht werden, ob die WW-Domäne die Phosphorylierung der katalytischen Domäne durch Plk1 beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde die Plk1-vermittelte Phosphorylierung der katalytischen Domäne in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen der WW-Domäne analysiert. Dieses Experiment wurde sowohl mit chimären GST-Pin1-Proteinen als auch mit Pin1-Proteinen ohne Fusionsanteil durchgeführt. In Abb. 3-14B ist zu sehen, daß in Anwesenheit der WW-Domäne die Phosphorylierung der katalytischen Domäne gehemmt wird (Abb. 3-14B, oben). Der Einsatz gleicher Mengen Pin1-Cat und ansteigender Mengen Pin1-WW wurde durch Färbung des Gels mit Coomassie verifiziert (Abb. 3-14B, Mitte). Eine Auswertung dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung ist im Balkendiagramm zu sehen, wobei die blauen Balken die Phosphorylierungs-Signale, die roten Balken die ansteigenden Mengen Pin1-WW darstellen (Abb. 3-14B, unten).

Dieses Experiment zeigt, daß die WW-Domäne von Pin1, die die Bindung an Plk1 vermittelt, die Phosphorylierung der katalytischen Domäne durch Plk1 negativ beeinflusst.

3.3.7 Experimentelle Eingrenzung der Phosphorylierungs-Stelle in Pin1

Da sich die katalytische Domäne von Pin1 ohne Fusionsanteil sehr gut als Substrat für Plk1 eignet (siehe Abb. 14A, Spuren 6 bis 10) wurden durch Aminosäure-Substitution mögliche Phosphorylierungs-Stellen gegen unphosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht. Die resultierenden Mutanten (Pin-Cat-S65A und Pin-Cat-S67A) wurden in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß Pin1-Cat-S67A sehr gut von Plk1 phosphoryliert wurde (Abb. 3-14C, Spur 3), während gleiche Mengen Pin1-Cat-S65A nicht mehr phosphoryliert wurden (Abb. 3-14C, Spur 2). Dabei wurde durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels sichergestellt, daß beide Mutanten in gleicher Menge in die Phosphorylierungs-Studie eingesetzt wurden (Abb. 3-14C, unten). Als Positivkontrolle wurde Pin-Cat-WT eingesetzt (Abb. 3-14C, Spur 1).

Diese *in vitro*-Versuche mit Partialklonen von Pin1 zeigen, daß Ser-65 innerhalb der katalytischen Domäne von Pin1 die Hauptphosphorylierungs-Stelle für Plk1 darstellt.

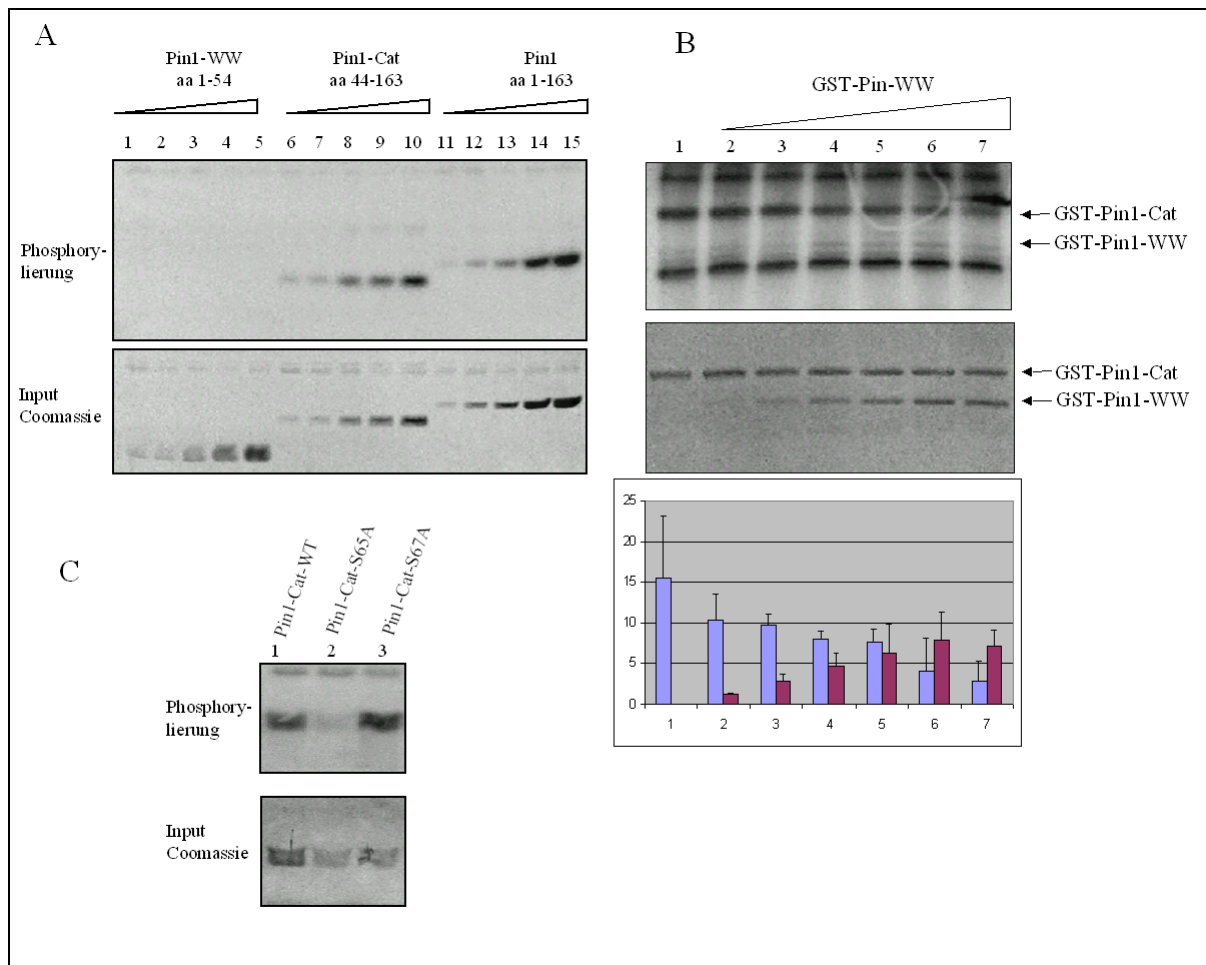


Abb. 3-14: Charakterisierung der Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1.

A: Pin1, seine WW-Domäne (AS 1-54) und die katalytische Domäne (Pin-Cat, AS 44-163) wurden aufgereinigt, der Fusionsanteil abgespalten, und die eluierten Proteine in steigenden Konzentrationen (0,5 bis 2,5 µg) in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt (oben). Zur Ladekontrolle wurde das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt (unten). B: Jeweils 2 µg GST-Pin1-Cat (AS 44-163) wurde in Plk1-Kinasetests eingesetzt (Spur 1). Zusätzlich wurde GST-Pin1-WW (AS 1-49) in steigenden Konzentrationen (0,25-3 µg) zugegeben (Spuren 2 bis 7). Das Autoradiogramm zeigt die Phosphorylierung (oben), das Coomassie-gefärbte Gel die Menge eingesetzter Proteine (mitte). Die Auswertung dreier Experimente ist im Balkendiagramm dargestellt (unten), wobei blaue Balken für die Phosphorylierungs-Intensität von Pin-Cat stehen und die roten Balken für die Intensität des Coomassie-gefärbten Pin-WW. C: Phosphorylierung der katalytischen Domäne und ihrer Mutanten. In Pin1-Cat (AS 44-163) wurde das Ser-65 oder Ser-67 zu Alanin ausgetauscht. Anschließend wurden die generierten Mutanten in Bakterien exprimiert, aufgereinigt, der Fusionsanteil abgespalten und die eluierten Proteine in Phosphorylierungs-Studien eingesetzt. Die Färbung des Gels in Coomassie zeigt, daß beide Mutanten in gleicher Menge eingesetzt wurden (unten).

3.3.8 Einfluß der Phosphorylierung an Ser-65 auf die katalytische Aktivität von Pin1 *in vitro*

Ausgehend von der Beobachtung, daß Plk1 die katalytische Domäne von Pin1 an Ser-65 phosphoryliert, wurde untersucht, welche Auswirkung diese Phosphorylierung auf die katalytische Aktivität der Isomerase hat. Für diese Untersuchung konnte Prof. Dr. G. Fischer (Halle) als Kooperationspartner gewonnen werden. GST-Pin1, GST-Pin1-S65A und GST-

Pin1-S65E wurden in Bakterien exprimiert, mit Glutathion eluiert und gegen Isomerisierungspuffer dialysiert. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden von Prof. Dr. G. Fischer (Halle) in Isomerisierungs-Studien mit *Pintide*, einem Peptid, welches das optimale Substrat für Pin1 darstellt, eingesetzt.

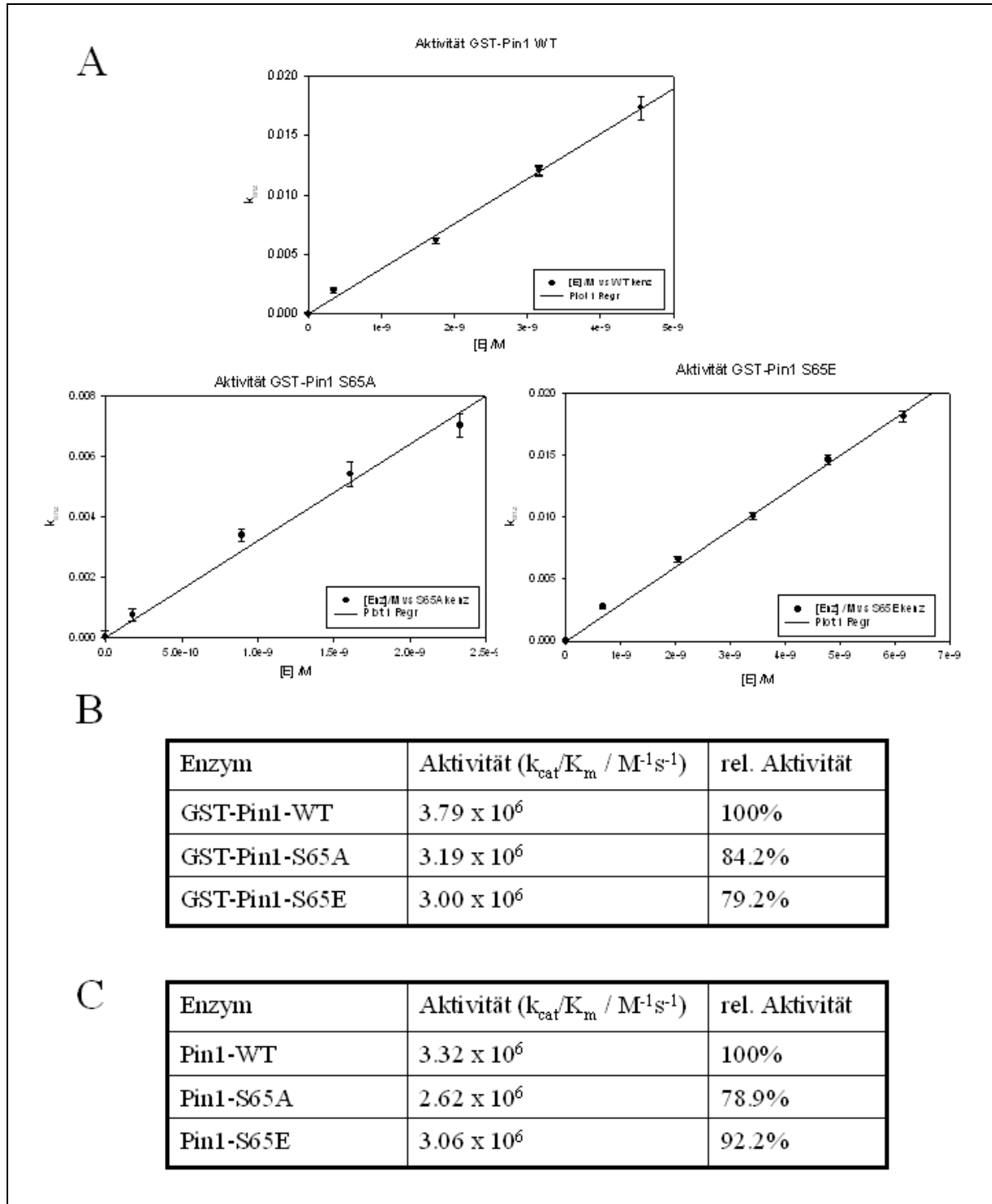


Abb. 3-15: Isomerisierungs-Studie mit GST-Pin1 und den gezeigten Mutanten.

GST-Pin1 Wildtyp, S65A und S65E wurden aufgereinigt und gegen Isomerisierungs-Puffer dialysiert. Die aufgereinigten Proteine wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Fischer (Halle) in Isomerisierungs-Studien eingesetzt. A: Kinetik der Isomerisierung von *Pintide* durch GST-Pin1, GST-Pin1-S65A und GST-Pin1-S65E. B: Tabellarische Darstellung der Daten aus A. C: Tabellarische Darstellung der Isomerisierungs-Studie wie in B unter Verwendung von Pin1-Konstrukten ohne GST-Fusionsanteil.

In Abb. 3-15A ist eine Kinetik der relativen katalytischen Aktivität der angegebenen Pin1-Proteine gezeigt. Zum Vergleich der verschiedenen Pin1-Aktivitäten wurde die enzymatische Aktivität des Wildtyps auf 100% gesetzt. Die Aktivitäten der Mutanten wurden dazu in Relation gesetzt (Abb. 3-15B). Es ist festzuhalten, daß die Mutante Pin1-S65A eine Reduktion ihrer katalytischen Aktivität um 15,8% aufweist. Die Mutante, die einen phosphorylierten Zustand vortäuschen soll (Pin1-S65E), zeigt eine Reduktion ihrer katalytischen Aktivität um 20,8% (siehe Abb. 3-15A und B). Das gleiche Experiment wurde mit Pin1-Proteinen ohne GST-Fusionsanteil wiederholt. Diesmal konnte durch den Austausch von Ser-65 zu Glu und die damit eingeführte negative Ladung, welche eine Phosphorylierung an Ser-65 vortäuschen sollte, keine deutliche Reduktion der enzymatischen Aktivität festgestellt werden (Abb. 3-15C). Mit der hier durchgeführten Untersuchung konnte nicht gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1 an Ser-65 die enzymatische Aktivität der Isomerase deutlich beeinflußt.

3.3.9 Einfluß der Phosphorylierung an Ser-65 auf die Stabilität von Pin1

Phosphorylierungen können neben Aktivität und Bindungsverhalten auch die Stabilität eines Proteins beeinflussen. In Western-Blot-Studien mit Pin1 und verschiedenen Pin1-Mutanten wurde beobachtet, daß Pin1-S65E meist in größerer Menge in transfizierten HeLa-Zellen zu detektieren war, als der Wildtyp oder Pin1-S65A (nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtung wurde zum Anlaß genommen, die Stabilität der Pin1-Proteine in HeLa-Zellen zu untersuchen. Bisher wurde lediglich gezeigt, daß in Taxol-behandelten Zellen Pin1 nach zusätzlicher Behandlung mit MG132 angereichert wird, dies jedoch nicht durch Inkubation der Zellen mit MG132 allein erreicht werden kann (Basu et al., 2002). Diese Arbeitsgruppe führte ihre Versuche in Anwesenheit von Taxol aus, einem Mikrotubuli-Destabilisator, durch den Zellen in der G₂/M-Phase angereichert werden, um die Interaktion von Pin1 mit Bcl2 zu induzieren, mit dem Ziel, den Abbau von Bcl2 durch das Proteasom zu untersuchen.

Das Proteasom ist ein ATP-abhängiger Protease-Komplex, der ubiquitinierte Proteine degradiert. Ubiquitin wird durch Ubiquitin-Ligase-Komplexe (wie z.B. APC) kovalent an Lysin-Reste von Proteinen transferiert. Die Ubiquitinierung kann durch Phosphorylierung eines Proteins gesteuert werden (Weissman, 2001). Folglich kann über Phosphorylierung die Ubiquitinierung und damit die Degradierung durch das Proteasom reguliert werden. Bislang wurde nicht gezeigt, ob die Stabilität von Pin1 durch Ubiquitinierung reguliert wird. Eine

Möglichkeit, dies zu untersuchen, ist der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren. Wird ein Protein durch den Ubiquitin-Signalweg reguliert und durch das Proteasom degradiert, so sollte es sich durch Verwendung des Proteasom-Inhibitors in den Zellen anreichern.

Um den Einfluß des Proteasom-Inhibitors MG132 auf Pin1 und dessen Mutanten zu studieren, wurden HeLa-Zellen mit Pin1, Pin1-S65A und Pin1-S65E transient transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 Stunden mit 10 μ M MG132, inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine der transfizierten Konstrukte über den Pin1-Antikörper (Prof. Vincent; Quebeck/Can) nachgewiesen (Abb. 3-16A, unten). Zur Standardisierung diente β -Aktin, welches als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung diente (Abb. 3-16A, mitte). Um die Wirkung des Proteasom-Inhibitors MG132 zu belegen, wurde gleichzeitig die Proteinmenge von β -Catenin untersucht (Abb. 3-16A, oben). Es ist bekannt, daß β -Catenin nach Markierung mit Ubiquitin durch das Proteasom abgebaut wird und sich durch Inhibierung des Proteasoms in den Zellen anreichert (Aberle et al., 1997). In Abb. 3-16A (oben) ist zu sehen, daß Pin1 nach Inkubation der HeLa-Zellen mit MG132 stabilisiert werden kann, da der Abbau durch das Proteasom verhindert wurde (Abb. 3-16A, vgl. Spuren 3 und 4). Auch Pin1-S65A und Pin1-S65E wurden durch MG132 stabilisiert und in den HeLa-Zellen angereichert (Abb. 3-16A, vgl. Spuren 5 bis 8). Es ist deutlich zu erkennen, daß Pin1-S65E bereits ohne MG132-Behandlung in höherer Menge in den Zellextrakten zu finden ist, als das Wildtyp-Protein oder Pin1-S65A (Abb. 3-16A, vgl. Spuren 3 und 5 mit Spur 7). Nach Behandlung mit MG132 liegt Pin1-S65E jedoch in etwa der gleichen Menge vor, wie die Pin1-S65A. Dies spricht dafür, daß Pin1-S65E nicht mehr effizient durch das Proteasom abgebaut werden kann.

Da in den Leervektor-transfizierten HeLa-Zellen keine Bande zu detektieren ist, kann davon ausgegangen werden, daß der Antikörper spezifisch die exprimierten Pin1-Proteine detektiert (Abb. 3-16A, Spuren 1 und 2). Die gleichmäßige Proteinbeladung wird durch den Nachweis von β -Aktin dokumentiert (Abb. 3-16A, mitte). Ferner ist zu sehen, daß β -Catenin gut durch den Proteasom-Inhibitor angereichert werden kann (Abb. 3-16A, oben). Dieser Befund dient als Kontrolle dafür, daß die Behandlung der HeLa-Zellen mit MG132 zu einer effizienten Stabilisierung von Proteinen führte, die durch das Proteasom abgebaut werden.

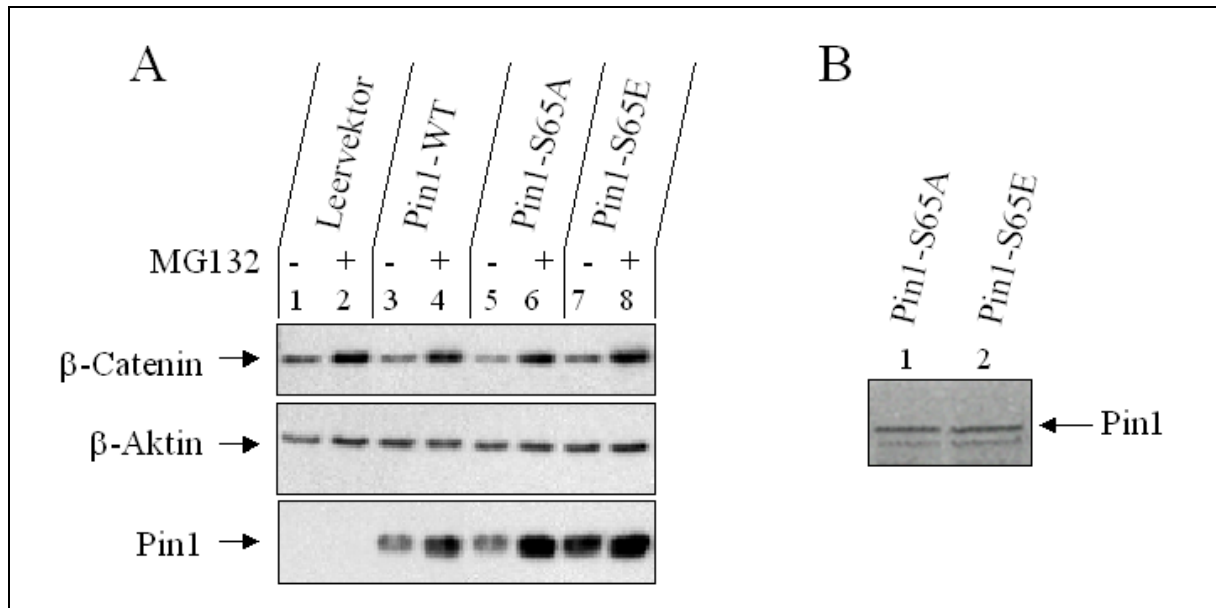


Abb. 3-16: Untersuchung der Stabilität von Pin1.

A: Einen Tag nach der Transfektion mit pCMV-Pin1 und den pCMV-Pin1-Mutanten wurden die HeLa-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (10 μ M) inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die exprimierten Pin1-Proteine mit einem Pin1-Antikörper (Prof. Vincent; Quebeck/Can) detektiert (unten). Beta-Aktin diente als Ladekontrolle (mitte). Der Nachweis von β -Catenin belegt die Protein-stabilisierende Wirkung von MG132 (oben). B: Die in den Vektor pET-30C klonierten Konstrukte Pin1-S65A und Pin1-S65E wurden in Anwesenheit von 35 S-Methionin *in vitro* translatiert und nach SDS-PAGE mittels Fluorographie visualisiert.

Um zu belegen, daß der stabilisierende Effekt der Vortäuschung einer Phosphorylierung an Ser-65 auf den Ubiquitin-Signalweg und damit auf das Proteasom zurückzuführen ist, und nicht durch andere Ereignisse, wie z.B. eine effizientere Transkription/Translation von Pin1-S65E zu erklären ist, wurden Pin1-S65A und Pin1-S65E mit Hilfe des TNT-Quick coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega, Mannheim) in einem eukaryontischen System unter gleichen Bedingungen *in vitro* transkribiert und translatiert. Dieses System hat den Vorteil, daß hier keine effiziente Ubiquitinierung und damit gezielte Degradierung von Proteinen durch das Proteasom stattfinden kann. Folglich kann hiermit die Effizienz der Transkription und Translation dokumentiert werden.

Abb. 3-16B zeigt die Detektion der durch den Einbau von von 35 S-Methionin markierten *in vitro* translatierten Konstrukte. Eine unterschiedlich effiziente Translation der beiden Konstrukte konnte nicht nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, daß unter gleichen Bedingungen beide Mutanten in gleichem Maße transkribiert und translatiert werden. Dieses Kontrollexperiment impliziert, daß der Austausch zu Alanin oder Glutamat an Position Ser-65 keinen Einfluß auf die Translation der Konstrukte im eukaryontischen *in vitro*-System hat. Da die Glutamat-Mutante jedoch in HeLa-Zellen angereichert vorliegt, muß angenommen werden, daß sie nicht mehr effizient durch das Proteasom degradiert werden kann.

4 DISKUSSION

4.1 Regulation der Zellteilung

Während des komplexen Prozesses der somatischen Zellteilung wird durch verschiedene ineinandergreifende Mechanismen sichergestellt, daß beide Tochterzellen je einen kompletten Chromosomensatz erhalten. Wird dieser Prozeß fehlerhaft durchgeführt und das genetische Material wird illegitim aufgeteilt, können onkogenetische Ereignisse akkumulieren. Kontrollmechanismen dienen dem Schutz vor solchen Ereignissen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene darüber zu gewinnen, wie Protein-Phosphorylierung die Progression des Zellzyklus kontrolliert. Schließlich können durch Fehlregulation der Phosphorylierungs-Signale die normalen Zellzyklus-Kontrollpunkte umgangen werden, was zur Krebsentstehung beiträgt.

Mitotische Kinasen sind Schlüsselenzyme für den Einstieg und das Durchlaufen der Mitose. Eine solche Kinase ist die *Polo-like Kinase 1* (Plk1). Die Charakterisierung neuer Plk1-Interaktionspartner und deren Funktion in der Mitose war Gegenstand der hier aufgeführten Untersuchung.

4.2 Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Cyclin B1

4.2.1 Korrelation der Expression und Lokalisation von Plk1 und Cyclin B1 in der frühen Mitose

Untersucht wurde die heterologe Lokalisation von Plk1 während dem Durchlaufen der M-Phase in HeLa S3-Zellen. HeLa S3-Zellen eignen sich gut für Synchronisations-Experimente und wurden deshalb für einen Großteil der hier aufgeführten Experimente verwendet. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Plk1 auch in HeLa S3-Zellen an mitotischen Strukturen zu finden ist, und wie die Plk1 in den verschiedenen Mitosephasen in HeLa S3-Zellen verteilt ist. Die Lokalisation von Plk1 an mitotischen Strukturen verändert sich auffallend während des Durchlaufens der Mitose. Ist Plk1 in der G₂-Phase im perinukleären Raum und im Kern lokalisiert (Abb. 3-2A und B), so ist es in frühmitotischen Zellen an den Centrosomen konzentriert zu finden (Abb. 3-1A und B), an deren Reifungsprozeß Plk1 beteiligt ist. Nach dem Eintritt in die Anaphase wandert Plk1 entlang der mitotischen Spindelfasern zur Teilungsfurche, wo es in der Telophase am Mittelkörper akkumuliert (Abb. 3-1C und D). Diese Veränderung der Plk1-Lokalisation spricht für zeitlich und örtlich regulierte

Interaktionen mit unterschiedlichen Substraten. Dies ist von Bedeutung für die Suche nach mitotischen Interaktionspartnern, die zur gleichen Zeit an denselben Strukturen lokalisieren müßten. Ein Kandidat für eine Interaktion mit Plk1 ist Cyclin B1, denn für *Xenopus*-Plx1 wurde gezeigt, daß Plx1-Aktivität nötig ist, um den MPF (Cyclin B1/Cdk1), nicht aber den Cyclin A/Cdk1-Komplex zu aktivieren (Abrieu et al., 1998). Daher darf angenommen werden, daß diese Aktivierung über die Cyclin-Untereinheit auf eine noch nicht bekannte Art und Weise vermittelt wird. Durch Expressions-Studien von Plk1 und Cyclin B1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß beide Proteine nur in mitotischen Zellen mit hoher Frequenz exprimiert werden, wobei Cyclin B1 zeitlich vor Plk1 wieder abgebaut wird (Abb. 3-3). Die Beobachtung, daß beide Proteine in G₂-Phase Zellen um den Kern herum akkumulieren (Abb. 3-2A) und zu Beginn der Prophase – also noch vor dem Auflösen der Kernmembran – in den Kern übertreten (Abb. 3-2B) zeigt, daß beide Proteine zeitlich in den gleichen Kompartimenten lokalisieren. In Metaphase-Zellen kolokalisieren beide Proteine an den Spindelpolen. Sowohl Plk1 als auch Cyclin B1 werden in frühen Mitosestadien exprimiert und befinden sich zur gleichen Zeit am gleichen Ort innerhalb der Zelle. Aufgrund der Korrelation der Kinetik beider Proteine wurde in dieser Arbeit postuliert, daß Plk1 und Cyclin B1 überlappende Funktionen ausüben, die durch die Interaktion beider Proteine vermittelt werden könnten.

Mikroinjektion von Plk1-Antikörpern führt zu monopolen Spindeln sowie verkleinerten und unseparierten Centrosomen (Lane und Nigg, 1996; Sunkel und Glover, 1988). *Drosophila* *Polo* reguliert das Mikrotubuli-assoziierte Asp (*abnormal spinde*) dessen Funktion es ist, γ -Tubulin-Ring-Komplexe am Centrosom zu halten (do Carmo et al., 2001). Während die Lokalisation von Plk1 an den Centrosomen damit erklärt werden kann, daß es essentielle Funktionen für die Centrosomenreifung erfüllt, ist bislang nicht geklärt, welche Funktionen Cyclin B1 an den Centrosomen erfüllt. Es gibt allerdings Hinweise, daß MPF-Aktivität indirekt in die Formation des Spindel-Apparates involviert ist (Lamb et al., 1990), und daß MPF Motorproteine phosphoryliert, die essentiell für die Centrosomenreifung sind (Blangy et al., 1995). Plk1 und Cyclin B1 kolokalisieren an den Centrosomen in HeLa S3-Zellen und könnten damit gemeinsam zur Centrosomenreifung beitragen und die Funktionen des Spindelfaser-Apparates in Metaphase-Zellen unterstützen.

Die Beobachtung, daß der Großteil des Cyclin B1- und Plk1-Proteins in der G₂-Phase gleichermaßen im perinukleären Raum lokalisieren und in der Prophase in den Kern übertreten (Abb. 3-2), läßt eine frühmitotische Interaktion hier wahrscheinlich erscheinen.

4.2.2 Interaktion von Plk1 und Cyclin B1

In Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, daß Plk1 und Cyclin B1 miteinander interagieren (Abb. 3-4). Cyclin B1 interagiert sowohl mit endogenem Plk1 aus mitotischen Zellextrakten (Abb. 3-4A) als auch mit rekombinalem Plk1 aus Bakterien (Abb. 3-4B). Daß auch in der Aktin-Präzipitation eine geringe Menge Cyclin B1 zu finden war (Abb. 3-4A, Spur 2) kann darauf zurückgeführt werden, daß dritte Proteine die Assoziation indirekt vermitteln, denn bislang ist eine direkte Interaktion von Cyclin B1 mit Aktin nicht bekannt. Daß es sich um eine direkte Interaktion von Cyclin B1 und Plk1 handelt, zeigt die Interaktionsstudie mit rekombinalem GST-Plk1 aus Bakterien (Abb. 3-4B, Spur 4). Da keine mitotischen Extrakte eingesetzt wurden kann hier ausgeschlossen werden, daß die Interaktion über dritte Proteine vermittelt wird. Ferner wurde hier gezeigt, daß Plk1 nicht erst durch mitotische Ereignisse sekundär modifiziert sein muß, um mit Cyclin B1 zu interagieren, da auszuschließen ist, daß in Bakterien solche Mitose-regulierten Modifikationen durchgeführt werden.

4.2.3 Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1

Phosphorylierung von Cyclin B1 ist essentiell für die Funktionen des MPF *in vivo* (Li et al., 1995). Die direkte Assoziation von Cyclin B1 mit Plk1 warf die Frage auf, ob Cyclin B1 ein Substrat von Plk1 sein könnte. In Kinasetests konnte gezeigt werden, daß Cyclin B1 von Plk1 phosphoryliert wird (Abb. 3-5A). Für Cyclin B1 aus *Xenopus* war bekannt, daß die Phosphorylierung innerhalb der CRS von Cyclin B1 dessen nukleäre Translokation beschleunigt (Hagting et al., 1999; Li et al., 1997). Es war bekannt, daß Phosphorylierungen in dieser Region durch MAPK und durch Autophosphorylierung des MPF durchgeführt werden können (Borgne et al., 1999)(Izumi und Maller, 1991). Es wurde allerdings vermutet, daß weitere Kinasen in die Regulation der CRS involviert sind. Die Translokation von Cyclin B1 in den Kern findet in der Prophase statt. Zu diesem Zeitpunkt erreicht Plk1 sein Aktivitätsmaximum (Lee et al., 1995). Daher wurde untersucht, ob die Plk1-vermittelte Phosphorylierung innerhalb der CRS zu finden ist. Die CRS stellte ein sehr gutes Substrat (besser als Casein) für Plk1 *in vitro* dar (Abb. 3-5B). Mit steigender Substratkonzentration wurde unter gleichen Bedingungen mehr Substrat umgesetzt – ein Charakteristikum für eine Enzym-Substrat-Reaktion (Michaelis-Menten) (Abb. 3-5B).

Es ist bekannt, daß die nukleäre Translokation von Cyclin B1 durch Phosphorylierung an vier Serin-Resten innerhalb der CRS beschleunigt wird (Li et al., 1997; Hagting et al., 1999). Diese Serine entsprechen im humanen Cyclin B1 den Positionen Ser-126, Ser-128, Ser-133

und Ser-147. Durch einzelne Aminosäure-Substitutionen (Ser → Ala) wurden GST-CRS-Mutanten hergestellt, die an der jeweiligen Position unphosphorylierbar waren (Abb. 3-6A). Mit Hilfe dieser Konstrukte konnte gezeigt werden, daß CRS-S133A nicht mehr von Plk1 phosphoryliert werden konnte (Abb. 3-6B, Spur 5). Dies impliziert, daß das Ser-133 die Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 darstellt. Der Austausch an Position Ser-147 führte zu keiner veränderten Phosphorylierung durch Plk1. Sowohl der Austausch an Position Ser-126 als auch an Position Ser-128 führte zu einer verringerten Phosphorylierung, wodurch demonstriert wird, daß der Phosphorylierungs-Status an dieser Position die Phosphorylierung an Ser-133 beeinflusst. Somit wurde gezeigt, daß die CRS des humanen Cyclin B1 am Ser-133 von Plk1 phosphoryliert wird.

Dies wurde auch für das Gesamtlängen-Protein gezeigt, bei dem der Austausch an Position Ser-133 zu Alanin zu einer erheblichen Reduktion des Phosphorylierungs-Signals führte (Abb. 3-9A). Zusätzlich konnte diese reduzierte Phosphorylierung des Cyclin B1-S133A auch *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 3-9B).

Die Beobachtung, daß CRS-S128A viel schwächer von Plk1 phosphoryliert wurde als der Wildtyp oder die Mutante CRS-S147A (Abb. 3-6B), führte zu der Hypothese, daß Modifikationen aminoterminal vom Ser-133 gelegen zu einer veränderten Substraterkennung führen könnten. Auch das Protein CRS-S126A zeigte eine leichte Reduktion des Phosphorylierungs-Signals. Da der Austausch von Ser-126 und Ser-128 zu Alanin zu einer Reduktion der Phosphorylierungs-Intensität führte, und da bekannt war, daß in *Xenopus laevis*-Cyclin B1 die diesen Aminosäuren entsprechenden Serine von MPF und MAPK phosphoryliert werden, wurde im folgenden untersucht, ob auch im humanen Cyclin B1 diese Positionen von MAPK und MPF phosphoryliert werden. Es konnte bestätigt werden, daß MAPK die Positionen Ser-126 und Ser-128 im humanen Cyclin B1 phosphorylieren kann (Abb. 3-6C).

Für MAPKs wurde gezeigt, daß sie durch konzertierte Aktionen Signale verschiedener Signalwege verknüpfen. So wurde demonstriert, daß zwei Wachstums-regulierte Kinasen, die Ribosomale S6-Kinase und die MAPK (Erk1) die Transrepressions-Domäne von c-Fos in einer kooperativen Weise phosphorylieren (Chen et al., 1993). Aufgrund der Beobachtung, daß Plk1 und MAPK (Erk2) die CRS des Cyclin B1 an unterschiedlichen, aber benachbarten Serin-Resten phosphorylieren, wurde untersucht, ob die Phosphorylierung durch beide Kinasen in einer kooperativen Weise durchgeführt wird. Es konnte gezeigt werden, daß beide Kinasen kooperativ wirken, da durch die Vorbehandlung mit MAPK die Phosphorylierung

der CRS durch Plk1 verstärkt wurde (Abb. 3-7A). Dieses Phänomen könnte zwei Ursachen haben:

- a) durch Vorphosphorylierung verstärkt sich die Phosphorylierung an Ser-133, da die Substraterkennung verbessert wird (additiver Effekt), und
- b) es entsteht eine neue Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 (synergistischer Effekt).

Um dies zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment mit CRS-S133A durchgeführt, welches zuvor nicht durch Plk1 zu phosphorylieren war (Abb. 3-6B, Spur 5). Nach Vorbehandlung mit MAPK war Plk1 in der Lage, auch diese Mutante zu phosphorylieren (Abb. 3-7B). Dies spricht dafür, daß durch die Vorphosphorylierung mit MAPK eine neue, zusätzliche Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 generiert wird. Ein ähnlicher Effekt wurde für die Regulation der subzellulären Lokalisation des Transkriptionsfaktors NFATc beschrieben, bei der die Phosphorylierung durch JNK/MAPK zu einer idealen Erkennungs-Sequenz für CK1 führt (Porter et al., 2000). Deren Phosphorylierung läßt wiederum weitere Erkennungs-Stellen für CK1 entstehen. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Phosphorylierung der CRS durch Plk1 und MAPK gezeigt werden. Dies demonstriert, daß es sich nicht nur um eine additive, sondern um eine synergistische Wirkung beider Kinasen handelt. Diese Daten zeigen, daß nach Vorbehandlung mit MAPK eine neue Erkennungsstelle für Plk1 generiert wurde.

Dies ist von besonderem Interesse, da zu dem Zeitpunkt, als diese Ergebnisse erzielt wurden, in der Zeitschrift *Nature* eine Publikation der Arbeitsgruppe von Prof. Nishida erschien (Toyoshima-Morimoto et al., 2001). In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Cyclin B1 und Plk1 beschrieben. Es wurde auch die Phosphorylierung innerhalb der CRS durch Plk1 dokumentiert, allerdings im Widerspruch zu unseren eigenen Daten. Toyoshima-Morimoto und Mitarbeiter beschrieben das Serin an Position Ser-147 in Cyclin B1 als Phosphorylierungs-Stelle für Plk1. Dieses Serin liegt auch innerhalb der CRS, befindet sich aber zusätzlich innerhalb der NES. Toyoshima-Morimoto und Kollegen verwendeten in ihren Phosphorylierungs-Studien immer Cyclin B1-Mutanten, bei denen drei Serin-Reste gleichzeitig (Ser-126, Ser-128 und Ser-133/Ser-147) zu Alaninen ausgetauscht waren (Toyoshima-Morimoto et al., 2001). Die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Daten belegen, daß ein Austausch N-terminal von Ser-133 gelegen (Ser-126 und Ser-128 zu Ala) zu einer reduzierten Phosphorylierung an Ser-133 durch Plk1 führen (Abb. 3-6b, Spur 3 und 4). Vor allem der Austausch von Ser-128 zu Ala führt zu einer erheblich schwächeren Phosphorylierung durch Plk1 (Abb. 3-6b, Spur 4). Es darf daher angenommen werden, daß diese Veränderungen der CRS aminoterminal von Ser-133 die Substrat-Erkennung durch Plk1

verändern. Dies würde bedeuten, daß die von der Arbeitsgruppe Nishida verwendeten Mutanten, bei denen selbige Serin-Reste zu Alaninen ausgetauscht wurden, die enzymatische Aktivität von Plk1 im Kontext dieser dreifach Mutanten nur bedingt wiedergeben.

Diese veränderte Substraterkennung kann nicht darauf zurückgeführt werden, daß Plk1 nicht mehr gut an sein Substrat binden kann. Durch Pulldown-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die CRS von Cyclin B1, die zwar ein sehr gutes Phosphorylierungs-Substrat für Plk1 *in vitro* darstellt, nicht die Bindung an Plk1 vermittelt. Die CRS eignete sich als äußerst schlechter Bindungspartner für Plk1 im Gegensatz zum Cyclin B1-Gesamtprotein (Abb. 3-8). Infolge dessen wurde die Bindung von Plk1 an die CRS oder das Gesamtprotein auch nicht von Aminosäure-Substitutionen innerhalb der CRS gehemmt (Abb. 3-8). Diese Daten lassen darauf schließen, daß durch den Austausch von Ser-128 zu Ala (und auch Ser-126 zu Ala) nicht die Bindung an das Substrat gehemmt wird, sondern vielmehr die Übertragung des Phosphats nicht mehr in der gleichen Effizienz stattfinden kann, wie im Wildtyp-Protein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Modifikationen aminoterminal vom Ser-133 gelegen die Phosphorylierung der CRS durch Plk1 beeinflussen. Dabei können MAPK und Plk1 in einer synergistischen Weise die CRS phosphorylieren, wodurch eine neue Phosphorylierungs-Stelle (möglicherweise Ser-147) für Plk1 entstehen kann. Die Phosphorylierungs-Stelle in humanem Cyclin B1 für Plk1 ist das Ser-133.

Diese in dieser Arbeit charakterisierte Phosphorylierung am Ser-133 (entspricht Ser-101 in *Xenopus*-Cyclin B1) konnte nach der Veröffentlichung dieser Daten (Yuan et al., 2002b) von zwei weiteren Arbeitsgruppen, sowohl im Säuger- als auch im *Xenopus*-Cyclin B1, bestätigt werden (Jackman et al., 2003; Walsh et al., 2003). Beide Arbeiten widersprechen dezidiert der von Toyoshima-Morimoto und Mitarbeitern gefundenen Phosphorylierung an Ser-147. Auch die Arbeiten mit *Xenopus laevis*-Cyclin B1 legen den Schluß nahe, daß nach Vorphosphorylierung durch MAPK das Plk1-vermittelte Phosphorylierungs-Signal verstärkt wird (Walsh et al., 2003). Nach Jackman und Mitarbeiter findet die Ser-133-Phosphorylierung von humanem Cyclin B1 zu erst im Cytoplasma an den Centrosomen statt. Somit wurde nach uns von zwei weiteren Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen die Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1 an Ser-133 (bzw. Ser-101 für *Xenopus*) charakterisiert (Jackman et al., 2003; Walsh et al., 2003; Yuan et al., 2002b).

4.2.4 Funktion der Phosphorylierung von Cyclin B1 durch Plk1

Cyclin B1 und Plk1 zeigen eine ähnliche Expressionskinetik (Abb. 3-3) und sind in der G₂-Phase gleichermaßen im perinukleären Raum verteilt (Abb. 3-2). Beide Proteine interagieren *in vitro* (Abb. 3-4). Ferner kolokalisieren Cyclin B1 und Plk1 an den Centrosomen in Metaphase-Zellen (Abb. 3-2). Eine kooperative Wirkung von Cyclin B1 und Plk1 zur Reifung und Erhaltung der Centrosomen bzw. des Spindelfaser-Apparates wurde bislang nicht gezeigt. Es wurde allerdings angenommen, daß an Centrosomen, die Organisationszentren für den Spindelfaser-Apparat darstellen, die Cyclin B1-Aktivierung durch Plk1 initiiert werden könnte (Jackman et al., 2003). Dabei ist anzumerken, daß sich nur ein geringer Teil des Cyclin B1-Proteins an den Centrosomen befindet. Die Akkumulation von Cyclin B1 als auch Plk1 an den Centrosomen dürfte dafür verantwortlich sein, daß Jackman und Mitarbeiter die initiale Ser-133-Phosphorylierung am Centrosom detektiert haben. Von dieser Arbeitsgruppe konnte auch gezeigt werden, daß der Kernimport erst nach der Phosphorylierung an Ser-133 zu beobachten war, es konnte jedoch experimentell nicht gezeigt werden, daß Plk1-Überexpression die nukleäre Translokation von Cyclin B1 beschleunigt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Plk1 Cyclin B1 innerhalb seiner CRS phosphoryliert (Abb. 3-5). Hauptphosphorylierungs-Stelle für Plk1 ist in humanem Cyclin B1 das Ser-133 (Abb. 3-6B, Abb. 3-9). Es ist bekannt, daß Phosphorylierung innerhalb der CRS des Cyclin B1 dessen nukleäre Translokation beschleunigt (Yang et al., 2001). Folglich wurde untersucht, ob die Phosphorylierung des Ser-133 im humanen Cyclin B1 zu dessen Kern-Import beiträgt. Cyclin B1 wird permanent über CRM1 aus dem Kern exportiert (Yang et al., 1998). Um den reinen Import zu untersuchen, wurde die Lokalisation der verschiedenen Cyclin B1-Mutanten unter LMB (Leptomycin B)-Einfluß studiert, welches durch Bindung an CRM1 den Kern-Export von Cyclin B1 verhindert (siehe Kap. 1.2.2.1, Abb. 1-4). Es konnte gezeigt werden, daß bereits der Austausch des Ser-133 zu Alanin die Kern-Lokalisation um ca. 10% verringert (Abb. 3-10B, S133A). Der gleichzeitige Austausch der beiden Serine Ser-126 und Ser-128 zu Alanin hatte nur einen sehr geringen Effekt (Abb. 3-10B, S126,128A). Erst der Austausch aller drei Serin-Reste bewirkte, daß ca. 25% weniger Zellen eine Kernlokalisierung von Cyclin B1 aufwiesen (Abb. 3-10B, S126,128,133A). Die Studie unter Einsatz der Cyclin B1-Mutanten zeigt die Auswirkung der Inhibierung von Phosphorylierungen an den jeweiligen Serin-Resten. Da Plk1 die einzige bisher bekannte Kinase ist, die Cyclin B1 am Ser-133 phosphoryliert, kann daraus abgeleitet werden, daß Plk1 am beschleunigten Kernimport von Cyclin B1 beteiligt ist. Somit konnte gezeigt werden, daß

Plk1 durch Phosphorylierung von Cyclin B1 an Ser-133 dessen nukleäre Translokation beschleunigt.

In jüngerer Zeit wurden verschiedene Plk1-basierende Anti-Krebs-Strategien entwickelt. Diese Ansätze basieren auf Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) (Spankuch-Schmitt et al., 2002b), RNA-Interferenz (RNAi) (Liu und Erikson, 2002; Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Liu und Erikson, 2003) und inhibitorischen Polo-Box-Peptiden (Yuan et al., 2002a). In all diesen Untersuchungen führte die Inhibierung von Plk1 zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation und zur Anreicherung der Tumorzellen in der G₂/M-Phase. Der Einfluß der Plk1-Inhibierung auf den MPF wurde bislang nur in spätmitotischen Zellen untersucht und führte zu einer gesteigerten Cdk1-Kinaseaktivität, die durch die Hemmung der Cyclin B-Degradierung am Meta-Anaphase-Übergang verursacht wurde (Liu und Erikson, 2002). Die Auswirkung der Plk1-Hemmung auf die MPF-Aktivierung in der Prophase wurde bislang nicht untersucht. Plk1 fördert die Progression der Mitose einerseits in der Prophase durch die Aktivierung von Cyclin B1 und andererseits die Meta-Anaphase-Transition durch die Aktivierung des APC, welcher Mitose-regulierende Proteine (u.a. Cyclin B1) ubiquitiniert und damit für die Degradierung markiert (siehe Abb. 1-7).

Mit Hilfe der Technik der RNAi sollte in weiterführenden Studien die Auswirkung der Plk1-Hemmung auf die MPF-Translokation in frühmitotischen Tumorzellen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch dominant-negative Ansätze, bei denen CRS-gerichtete Peptide gezielt die Phosphorylierung von Cyclin B1 und damit dessen Translokation in den Kern hemmen könnten. Ziel dieser Untersuchungen wäre die spezifische Anreicherung schnell proliferierender Tumorzellen in der G₂-Phase, indem verhindert wird, daß aktiver MPF in den Kern gelangt.

4.3 Charakterisierung der Interaktion von Plk1 und Pin1

4.3.1 Lokalisation von Plk1 und Pin1

Während die Plk1-Expression in der späten S-Phase beginnt und das Plk1-Protein vor allem in G₂- und M-Phase in der Zelle zu finden ist, fluktuiert die Pin1-Expression nicht in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Plk1 lokalisiert während der Mitose an verschiedenen mitotischen Strukturen (Abb. 3-1). Dagegen ist Pin1 vorwiegend kernständig, wobei ein geringer Anteil des Proteins auch im Cytoplasma zu finden ist (Abb. 3-11, oben). Eine Interaktion beider Proteine kann also nicht auf mitotische Strukturen begrenzt werden. Sie ist vielmehr sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus möglich.

4.3.2 Bindungsverhalten von Plk1 und Pin1

Es wurde bereits demonstriert, daß Pin1 mit Plk1 aus mitotischen Zellextrakten interagiert (Crenshaw et al., 1998; Shen et al., 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die WW-Domäne, nicht aber die katalytische Domäne von Pin1 ausreichend ist für die Interaktion mit Plk1 (Abb. 3-12A, Spur 3 und 4). Damit wurde gezeigt, daß die Bindung an Pin1 über dessen WW-Domäne vermittelt wird. Es ist bekannt, daß die WW-Domäne die Bindung an die Substrate von Pin1 vermittelt, wohingegen die katalytische Domäne keine hohe Affinität zu Phosphoproteinen besitzt (Zhou et al., 2000). Dies würde implizieren, daß sich Plk1 im Pulldown-Experiment ähnlich verhält, wie bereits beschriebene Pin1-Substrate. Um dieses Bindungsverhalten näher zu untersuchen, wurde eine Pin1-Mutante eingesetzt, bei der die beiden Arginine (Arg-68 und Arg-69) zu Leucinen ausgetauscht wurden (Konstrukt von Dr. Schnapp, Boehringer Mannheim). Diese Mutante besitzt nur noch 0,25% der Isomerase-Aktivität des Wildtyp-Proteins (Rippmann et al., 2000). Darüber hinaus kann diese Mutante auch *in vivo* nicht mehr die Pin1-vermittelten Funktionen erfüllen. Diese Mutation führt auch bei Überexpression der katalytischen Domäne nicht zu massiver Apoptose, verursacht also keinen dominant-negativen Phänotyp, wie dies für andere katalytisch inaktive PPIase-Konstrukte gezeigt wurde (Rippmann et al., 2000). Aus diesen Beobachtungen wurde abgeleitet, daß diese Mutante nicht mehr mit endogenem Pin1 um die Substrate konkurriert, da sie nicht mehr in der Lage ist, die Bindung phosphorylierter Substrate zu koordinieren (Rippmann et al., 2000). Das Bindungsverhalten dieser Mutante wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Schnapp jedoch nicht untersucht. Allerdings zeigt die Arbeitsgruppe von Prof. K.P. Lu, daß ein Austausch der beiden Arginin-Reste zu Alaninen nicht zu dem Verlust der Bindung von MPM-2 Antigenen führt (Zhou et al., 2000). Dies ist erstaunlich, denn der Austausch des stark basischen Arginins zu unpolaren Aminosäuren wie Alanin oder Leucin sollte einen ähnlichen Effekt haben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß die Mutation der beiden Arginine (Arg-68, Arg-69) zu Leucinen zu einem Verlust der Bindung an Plk1 führt (Abb. 3-12A, Spur 5). Da zuvor gezeigt werden konnte, daß die WW-Domäne alleine für die Bindung an Plk1 ausreichend ist (Abb. 3-12A, Spur 3), zeigt diese Studie erstmals, daß Mutationen in der PPIase-Domäne die Bindung des Interaktionspartners an die WW-Domäne stören. Es ist also davon auszugehen, daß die WW-Domäne alleine als unabhängiges Modul Bindungen vermitteln kann, daß aber ein intaktes Gesamtlängen-Protein nötig für eine effiziente Substratbindung ist. Diese Annahme wird unterstützt von der Beobachtung, daß das Gesamtlängen-Pin1 mehr Plk1 aus mitotischen Extrakten bindet als die WW-Domäne alleine

(Abb. 3-12A, vergl. Spur 6 und 3). Da bislang nicht geklärt werden konnte, in welcher Konformation die WW-Domäne mit der PPIase-Domäne über den Linker verbunden ist (Ranganathan et al., 1997), darf davon ausgegangen werden, daß die Stellung der beiden Domänen zueinander wichtig für die Substratbindung ist, da beide Domänen in einer kooperativen Art und Weise Phosphoproteine binden.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Annahme, daß es sich bei Plk1 nicht um ein klassisches Pin1-Substrat handelt. Beide Proteine besitzen enzymatische Aktivität und werden durch sekundäre Modifikationen reguliert. Demzufolge könnte die Bindung beider Proteine aneinander reziprok ausfallen. Pin1 bindet seine Substrate nur, wenn diese in phosphorylierter Form vorliegen (Shen et al., 1998). Liegen Pin1-Substrate in dephosphorylierter Form vor, so können sie nicht mehr von Pin1 gebunden werden. Allerdings führt die Dephosphorylierung von Plk1 nicht zu einer deutlichen Inhibierung der Interaktion, wie dies für Cdc25C gezeigt werden kann (Abb. 3-12B, Spuren 3 und 4). Für Plx1 wurde gezeigt, daß nur eine einzige Phosphorylierung zu einem veränderten Migrationsverhalten führt (Kelm et al., 2002). Da diese Phosphorylierungs-Stelle in humanem Plk1 nicht konserviert ist, muß die Dephosphorylierung von Plk1 nicht zu einem veränderten Laufverhalten führen. Zwar konnte für Cdc25C gezeigt werden, daß die Phosphatase (CIP) die Proteine in den Zellextrakten dephosphorylieren konnte, damit ist jedoch nicht bewiesen, daß Plk1 vollständig dephosphoryliert wurde. Die Beobachtung, daß CIP-Behandlung der Extrakte zwar die Interaktion von Pin1 mit Cdc25C beeinträchtigt, nicht aber die Interaktion mit Plk1, liefert einen Hinweis darauf, daß die Plk1-Pin1-Interaktion nicht ausschließlich vom Plk1-Phosphorylierungs-Status abhängig ist. Die erfolgreiche Dephosphorylierung von Plk1 durch CIP-Behandlung der HeLa-Zellextrakte sollte in weiterführenden Experimenten bestätigt werden. Dies könnte durch Immunpräzipitation von Plk1 und anschließender Detektion mit Antikörpern, die gegen Phosphoserin- und Phosphothreonin-Reste gerichtet sind, durchgeführt werden.

Allerdings ist auch unphosphoryliertes Plx1 aus *Xenopus* Interphase-Extrakten in der Lage, an Pin1 zu binden (Crenshaw et al., 1998). Es ist möglich, daß die Phosphorylierung von Plk1 zwar die Pin1-Interaktion verstärken kann, es darf aber nicht außer acht gelassen werden, daß die Interaktion auch von Plk1 vermittelt werden könnte und damit Phosphorylierungs-unabhängig wäre. Dies führt zu der Annahme, daß auch Pin1 Substrat von Plk1 sein kann.

4.3.3 Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1

In Phosphorylierungs-Studien wurde gezeigt, daß Plk1 aus Sf9-Zellen in der Lage ist, bakteriell exprimiertes Pin1 zu phosphorylieren (Abb. 3-13A). Untersuchungen mit C-terminalen Pin1-Deletionskonstrukten zeigten, daß eine Phosphorylierungs-Stelle zwischen AS 62 und AS 70 zu suchen ist. Innerhalb dieser Region befinden sich zwei Serin-Reste (Ser-65 und Ser-67) und keine Threonin-Reste. Auffällig ist, daß die längeren Pin1-Konstrukte sich schlechter *in vitro* phosphorylieren lassen als die Konstrukte Pin1-1-70 und Pin1-1-87. Ein ähnliches Phänomen ist auch für die CRS von Cyclin B1 zu beobachten gewesen, denn auch hier ließ sich die CRS alleine weitaus effektiver phosphorylieren als das Gesamtlängen-Protein (vgl. Abb. 3-5A und B). Somit kann angenommen werden, daß für Plk1-Substrate die Phosphorylierungs-Stellen im Gesamtlängen-Protein in *in vitro* Studien schlechter zugänglich sind als in deletierten Proteinen.

4.3.3.1 Phosphorylierung der katalytische Domäne von Pin1 durch Plk1

Da die WW-Domäne, nicht aber die PPIase-Domäne ausreichend ist für die Bindung an Plk1, die Phosphorylierungsstelle aber innerhalb der PPIase-Domäne liegt, wurde untersucht, ob die WW-Domäne wichtig für die Phosphorylierung von Pin1 ist. Zu diesem Zweck wurden die WW-Domäne, die PPIase-Domäne oder Pin1 in Bakterien exprimiert, der Fusionsanteil abgespalten und die Proteine in steigenden Konzentrationen in Phosphorylierungs-Studien mit Plk1 aus Sf9-Zellen eingesetzt.

Mit steigender Substratkonzentration stieg unter ansonsten gleichen Bedingungen die Bandentintensität als Referenz für die Phosphorylierung von Pin1 an (Abb. 3-14A). Dies spricht für eine spezifische Enzym-Substrat-Reaktion *in vitro*. Auch wird die Phosphorylierung des Gesamtproteins ohne Fusionsanteil effizienter durchgeführt, als bei Proteinen mit Fusionsanteil (vergl. Abb. 3-14A, Spuren 11 bis 14 mit Abb. 3-13B, Spur 9).

Obwohl die WW-Domäne im Pulldown-Experiment an Plk1 binden konnte (Abb. 12A, Spur 3), war sie unphosphorylierbar (Abb. 3-14A, Spuren 1 bis 5). Die katalytische Domäne, die im Pulldown-Experiment nicht an Plk1 binden konnte (Abb. 3-12A, Spur 4), diente als gutes Substrat für Plk1 (Abb. 3-14A, Spuren 6 bis 10). Dies zeigt, daß die Bindung an Plk1, die über die WW-Domäne vermittelt wird, nicht essentiell für die *in vitro*-Phosphorylierung von Pin1 ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die durch die WW-Domäne vermittelte Interaktion mit Plk1 *in vivo* doch nötig ist, damit Pin1 das aktivierte Plk1 in der Zelle binden kann.

Sowohl bei Plk1 als auch bei Pin1 handelt es sich um enzymatisch aktive Proteine. Die Bindung beider Enzyme wird über die WW-Domäne von Pin1 vermittelt (siehe Abb. 3-12A). Dies läßt vermuten, daß Plk1 Substrat von Pin1 sein könnte. Allerdings wird die Bindung an Pin1 nicht deutlich durch Phosphatase-Behandlung von Plk1 gehemmt (Abb. 3-12B). Gleichzeitig wird Pin1 innerhalb seiner katalytischen Domäne von Plk1 phosphoryliert, wobei die Bindung über die WW-Domäne nicht nötig ist für eine effiziente Phosphorylierung der katalytischen Domäne (Abb. 3-14A). Ferner kann die Phosphorylierung von Pin1 durch die WW-Domäne inhibiert werden (Abb. 3-14B). Es ist möglich, daß die WW-Domäne die Bindung an Plk1 wie zu einem Substrat von Pin1 vermittelt, und daß durch die Assoziation von Plk1 mit der WW-Domäne dessen enzymatische Eigenschaften beeinträchtigt werden. Es müßte folglich in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob durch Anwesenheit der WW-Domäne nur die Phosphorylierung der katalytischen Domäne von Pin1 gehemmt wird, oder aber ob die WW-Domäne prinzipiell die enzymatischen Eigenschaften von Plk1 (auch gegenüber anderen Substraten) hemmt. Zusätzlich müßte diese Untersuchung mit WW-S16E durchgeführt werden, einem Konstrukt, das nicht mehr an Pin1-Substrate binden kann (Lu et al., 2002a). Wenn die WW-Domäne, nicht aber die WW-S16E-Mutante die Plk1-Kinaseaktivität hemmen sollte, so ist davon auszugehen, daß dies über die Bindung an Plk1 vermittelt wird. Da bekannt ist, daß die WW-Domäne die Bindung an pSer/Thr-Pro-Motive vermittelt, müßte durch Mutagenese-Ansätze festgestellt werden, wo die entsprechende Bindestelle in Plk1 zu finden ist. In humanem Plk1 gibt es zwei potentielle Binde- und Isomerisierungsstellen für Pin1: Pro-215 und Pro-499. Beiden Prolin-Resten geht jeweils ein Threonin voraus. Interessanterweise befindet sich Pro-215 in der Nähe zu Thr-210 in Plk1. Es ist bekannt, daß die Phosphorylierung von Plk1 an Thr-210 für die Aktivierung der Kinase verantwortlich ist (Jang et al., 2002b; Jang et al., 2002a). Ferner liegt Pro-215 in der Nähe des für Serin/Threonin-Kinasen typischen DFG-Motives, welches über Mg^{2+} -Wechselwirkung in die ATP-Bindung involviert ist (Hanks et al., 1988). Somit könnte eine Isomerisierung von Plk1 in der Nähe des DFG-Motives Auswirkungen auf die ATP-Bindung und damit auf die enzymatische Aktivität der Kinase haben. Eine Regulation von Plk1 durch Pin1-vermittelte Isomerisierung ist für die genannten Positionen zu untersuchen. Es muß davon ausgegangen werden, daß sich beide Enzyme gegenseitig beeinflussen können.

4.3.3.2 Phosphorylierung des Ser-65 von Pin1 durch Plk1

Die Phosphorylierungs-Stelle in Pin1 liegt zwischen den AS 62 und 70 (siehe Abb. 3-13B). Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zwei Serin-Reste an den Positionen Ser-65 und Ser-

67. Da sich die katalytische Domäne von Pin1 ohne Fusionsanteil als gutes Substrat für Plk1 erwies, wurden hierin die AS Ser-65 und Ser-67 gegen Alanine ausgetauscht, um die genaue Phosphorylierungs-Stelle zu determinieren. Ein Austausch von Ser-65 zu Ala führte zu dem Verlust des Phosphorylierungs-Signals, wohingegen der Austausch von Ser-67 zu Ala nicht zu einer Reduktion der Phosphorylierung führte (Abb. 3-14C). Dies zeigt, daß Plk1 das Ser-65 von Pin1 *in vitro* phosphoryliert. Dieses Serin liegt in Nachbarschaft zu den beiden Argininen (Arg-68 und Arg-69), die die Bindung an Phosphoproteine koordinieren und essentiell für die katalytische Aktivität von Pin1 sind. Für Ser-67 wurde bereits gezeigt, daß die Vortäuschung einer Phosphorylierung zum Verlust der Isomerase-Aktivität führt (Zhou et al., 2000). Daher war anzunehmen, daß das Einbringen einer negativen Ladung, wie dies durch Phosphorylierung geschieht, die Pin1-Funktionen durch Phosphorylierung an Ser-65 gehemmt werden.

4.3.4 Bedeutung der Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß Pin1 Substrat von Plk1 ist, und daß Plk1 Pin1 am Ser-65 phosphoryliert, sollte untersucht werden, ob diese Phosphorylierung Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität von Pin1 hat. Für Pin1 ist bekannt, daß durch die Vortäuschung einer Phosphorylierung die katalytische Aktivität gehemmt werden kann. Dies wurde gezeigt für Ser-67 (Zhou et al., 2000). Dieses Serin liegt in der Nähe der beiden Arginine (Arg-68, Arg-69), welche für die Substratumsetzung essentiell sind, da sie die Bindung des pSer/Thr-Pro-Motivs an die PPIase-Domäne koordinieren. So reduziert ein Austausch von Ser-67 zu Glutamat die katalytische Aktivität von Pin1 auf 0,3% (Zhou et al., 2000). Eine Kinase, die Pin1 an Ser-67 phosphoryliert, ist bislang jedoch nicht bekannt. Eine weitere Phosphorylierungs-Stelle, bei der die Vortäuschung einer Phosphorylierung die Pin1-Aktivität inhibiert, ist das Ser-16, welches von PKA phosphoryliert wird (Lu et al., 2002a). Hier wird durch die vorgetäuschte Phosphorylierung innerhalb der WW-Domäne die Bindung an phosphorylierte Substrate verhindert. In beiden Fällen hat das Einbringen einer negativen Ladung (durch Phosphorylierung oder Austausch zu Glutamat) zur Folge, daß die Bindung an Phosphoproteine gehemmt wird. Dagegen hat der Austausch zu Alanin (S16A und S67A) keinen inhibitorischen Einfluß auf die Pin1-Aktivität.

Um zu untersuchen, ob durch das Einbringen einer negativen Ladung an Ser-65 die Funktion von Pin1 inhibiert werden kann, wurden Pin1-Mutanten generiert, die entweder unphosphoryliertes Pin1 (Pin1-S65A) oder phosphoryliertes Pin1 (Pin1-S65E) vortäuschen. Diese Mutanten und der Wildtyp wurden in Bakterien exprimiert und zur Arbeitsgruppe von

Prof. Dr. G. Fischer nach Halle geschickt. Dort wurden *in vitro* Isomerisierungs-Studien mit den Pin1-Proteinen durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigten beide Pin1-Mutanten eine Reduktion der katalytischen Aktivität (Abb. 3-15). Verglichen mit dem Wildtyp-Protein führte die Vortäuschung eines phosphorylierten Zustandes an AS Ser-65 zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität um 20,8%, während das unphosphorylierte Protein nur eine Reduktion um 15,8% aufwies. Beide Mutanten wiesen also eine ähnliche enzymatische Aktivität auf. Dieses Ergebnis war überraschend, denn in Anlehnung an die erwähnten Studien (Lu et al., 2002a; Zhou et al., 2000) wurde erwartet, daß die Vortäuschung einer Phosphorylierung zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt, während das unphosphorylierte Protein enzymatisch aktiv sein sollte.

Um auszuschließen, daß der GST-Fusionsanteil die Isomerisierungs-Studie negativ beeinflußt, wurde die Isomeraseaktivität der Pin1-Konstrukte von der Arbeitsgruppe von Prof. G. Fischer (Halle) erneut mit Pin1-Proteinen untersucht, diesmal jedoch ohne GST-Fusionsanteil. Mit den eingesetzten Pin1-Proteinen ohne Fusionsanteil war die Inhibierung der Isomeraseaktivität nicht zu zeigen. Hier bewirkte das Einbringen einer negativen Ladung an Ser-65 nur eine Reduktion der katalytischen Aktivität um 7,8%. Der Austausch zu einem ungeladenen Alanin hingegen hemmte die Isomeraseaktivität um 21,1% (siehe Abb. 3-15C). Damit konnte mit diesem Experiment nicht gezeigt werden, daß die vorgetäuschte Phosphorylierung an Ser-65 die Isomeraseaktivität von Pin1 hemmt. Es ist davon auszugehen, daß die Vortäuschung einer Phosphorylierung an Ser-65 die katalytische Aktivität von Pin1 nicht signifikant beeinflußt.

Es ist jedoch festzuhalten, daß der Austausch eines Serin-Restes zu Glutamat nicht in jedem Fall eine Phosphorylierung ausreichend vortäuschen kann. Aus diesem Grund sollte Pin1 einer *in vitro*-Phosphorylierung durch Plk1 unterzogen werden und anschließend in Isomerisierungs-Studien eingesetzt werden.

Durch Phosphorylierungs-Ereignisse kann die Stabilität eines Proteins reguliert werden. So wurde z.B. für Cyclin E demonstriert, daß Phosphorylierung an Thr-380 zur Ubiquitinierung und damit zum Abbau des Proteins führt (Won und Reed, 1996). Jedoch kann die Phosphorylierung eines Proteins dieses auch stabilisieren, indem es die Ubiquitinierung und den Abbau durch das Proteasom verhindert. Ein solcher Mechanismus wurde z.B. für die Phosphatase Cdc25A gefunden (Mailand et al., 2002).

Ausgehend von der Tatsache, daß die Stabilität eines Proteins durch Phosphorylierung reguliert werden kann, wurde in dieser Arbeit die Stabilität von Pin1 und der Einfluß der

Phosphorylierung an Ser-65 durch Plk1 untersucht. Bislang wurde gezeigt, daß Pin1 durch Taxol-Behandlung abgebaut wird, und daß dieser Abbau durch MG132 inhibiert werden kann (Basu et al., 2002). Diese Arbeitsgruppe beobachtete allerdings, daß Pin1 durch Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 allein (ohne Taxol) in den Zellen nur noch in reduzierter Menge zu finden ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Pin1 durch Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 stabilisiert werden kann (siehe Abb. 3-16A). Dies steht im Widerspruch zu der Arbeit von Basu und Mitarbeitern, die nach Verwendung von MG132 allein kein Pin1-Protein mehr detektieren konnten (Basu et al., 2002). Einen stabilisierenden Effekt des Proteasom-Inhibitors konnte von dieser Arbeitsgruppe nur gezeigt werden, wenn die Zellen zuvor mit Taxol behandelt wurden. Möglicherweise kann dieser Unterschied auf die divergierenden Zellsysteme zurückgeführt werden, denn während Basu und Mitarbeiter mit PC-3-Zellen, einer Prostatakarzinomlinie arbeiteten, wurden die hier aufgeführten Untersuchungen in HeLa-Zellen, einer Cervixkarzinomlinie, durchgeführt, da ein Großteil der bekannten Pin1-Funktionen auf Untersuchungen in HeLa-Zellen beruhen. Ferner wurden die PC-3-Zellen für 24 Stunden mit 20 μM MG132 behandelt, eine Konzentration und Dauer, die in unserem Labor toxisch für die HeLa-Zellen waren (nicht gezeigte Daten). HeLa-Zellen wurden mit lediglich 10 μM MG132 für nur 16 Stunden behandelt, um die hier gezeigten Daten zu generieren.

In dieser Arbeit konnte durch den Nachweis von β -Catenin die Wirkung des Proteasom-Inhibitors dokumentiert werden (siehe Abb. 3-16A, oben). Diese Kontrolle der MG132-Wirkung wurde durchgeführt, da bekannt ist, daß β -Catenin durch das Proteasom abgebaut wird (Aberle et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich die Pin1-Proteine durch den Einsatz von MG132 in den Zellen bis zu einer maximalen Proteinmenge anreichern lassen. Obwohl Pin1-S65E in unbehandelten Zellen in höherer Menge vorlag, als der Wildtyp oder Pin1-S65A, lag es nach MG132-Behandlung in der gleichen Menge vor, wie Pin1-S65A. Da Pin1-S65E nach Behandlung mit MG132 nicht auch in höherer Menge vorlag, als Pin1-S65A, muß davon ausgegangen werden, daß die höhere Expression von Pin1-S65E in den unbehandelten Zellen nicht durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zustande kommt. Durch die Untersuchung der Transkription/Translation der Pin1-Mutanten *in vitro* konnte dies bestätigt werden. Hier konnten keine Unterschiede in der Effizienz der Translation beider Proteine gefunden werden (siehe Abb. 3-16B). Folglich darf die höhere Proteinmenge von

Pin1-S65E auf eine erhöhte Protein-Stabilität zurückgeführt werden, da diese Mutante nicht mehr effizient vom Proteasom abgebaut werden kann.

Somit ist Plk1 das erste Enzym, welches in der Lage ist, Pin1 innerhalb seiner katalytischen Domäne zu phosphorylieren und damit zu stabilisieren. Die Vortäuschung einer Plk1-vermittelten Phosphorylierung ist nicht in der Lage, die katalytische Aktivität von Pin1 zu hemmen. Im Gegenteil: Durch die Plk1-vermittelte Stabilisierung von Pin1 darf postuliert werden, daß Plk1 einen positiven Regulator für die Pin1-Aktivität darstellt.

Pin1 ist essentiell für das Durchlaufen der Mitose. Plk1 ist ein positiver Regulator der Mitose, der vom G₂/M-Übergang bis zur Cytokinese essentielle Funktionen übernimmt. Eine Stabilisierung des Pin1-Proteins durch Plk1 in der Mitose erscheint deshalb sinnvoll. Da eine Vortäuschung der Phosphorylierung von Pin1 durch Plk1 die enzymatische Aktivität von Pin1 nicht inhibiert und die Beobachtung, daß die Plk1-vermittelte Phosphorylierung von Pin1 zu einer Stabilisierung des Pin1-Proteins führt, legen den Schluß nahe, daß Plk1 Pin1 positiv reguliert, um das Durchlaufen der Mitose zu unterstützen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß Pin1 auch Plk1 reguliert.

Während die Plk1-vermittelte Phosphorylierung an Ser-65 Pin1 stabilisiert und somit positiv reguliert, wurde gezeigt, daß durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung an Ser-16 Pin1 inaktiviert wird. Es wird angenommen, daß PKA Pin1 während der Interphase in seiner inaktiven Form hält und erst in der Mitose die an Ser-16 dephosphorylierte Form auftaucht (Lu et al., 2002a). Damit wären Plk1 und PKA Gegenspieler in Bezug auf die Pin1-Aktivierung/Inaktivierung. Eine antagonistische Wirkung von Plk1 und PKA während der Mitose konnte bereits für die Aktivierung des APC demonstriert werden. Hier inaktiviert PKA Untereinheiten des APC in der frühen Mitose. Diese Hemmung wird erst aufgehoben, wenn die PKA-Aktivität absinkt, und die Plk1-Aktivität ansteigt. Ist das Gleichgewicht einmal auf der Seite der Plk1, so aktiviert diese durch Phosphorylierung den APC (Kotani et al., 1998). PKA hält den APC in der frühen Mitose in einem inaktiven Zustand, damit dieser nicht zu früh für die Degradierung von mitotischen Regulatorproteinen sorgt. Hohe APC-Aktivität ist aber Voraussetzung für den Eintritt in die Anaphase. Die antagonistische Wirkung beider Kinasen sorgt somit für eine zeitlich gut abgestimmte Aktivierung des APC. Ein ähnlicher Mechanismus kann für die Pin1-Regulation angenommen werden. Ein entsprechendes Modell ist in Abb. 4-1 dargestellt. In der Interphase kann PKA durch seine basale Aktivität den Großteil des Pin1-Proteins inaktiv halten, Plk1-Aktivität liegt in der Interphase nicht vor. Da

Pin1 ein negativer Regulator der G₂-Phase ist, müßte Pin1 hier noch von PKA in seiner inaktiven Form gehalten werden. Bevor die Plk1-Aktivität in der G₂-Phase ansteigt, erhöht sich die PKA-Aktivität, um Pin1 weiterhin zu inaktivieren. Gleichzeitig kann Plk1 in G₂- und M-Phase für die Stabilisierung und somit Akkumulation von Pin1 sorgen. Kurz nach dem Eintritt in die Mitose sinkt die PKA-Aktivität schnell ab, während die Plk1-Aktivität bis zum Ende der Cytokinese stabil bleibt. Beim Absinken der PKA-Aktivität in der Mitose kann das akkumulierte Pin1-Protein nun durch Dephosphorylierung aktiviert werden und seine mitotischen Substrate effizient umsetzen, wodurch das Fortschreiten der Mitose gefördert wird. Die Phosphatase, die Pin1 am Ser-16 dephosphoryliert ist bislang noch nicht bekannt. Am Ende der Mitose wird Pin1 einerseits nicht mehr durch Plk1 stabilisiert, und gleichzeitig durch PKA wieder inaktiviert (siehe Abb. 4-1).

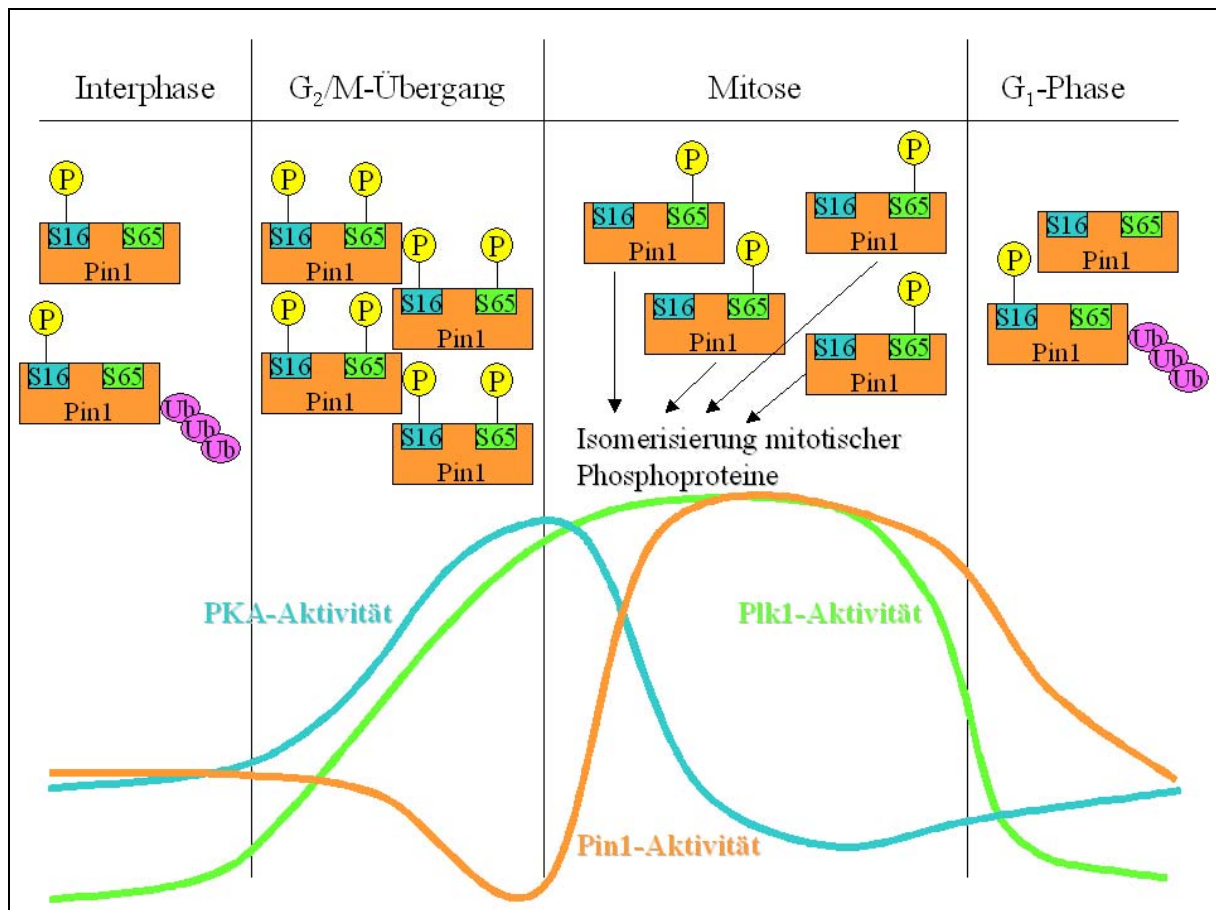


Abb. 4-1 Modell der Regulation von Pin1 durch PKA und Plk1.

In der Interphase halten sich Ubiquitinierung (Ub) und Neusynthese von Pin1 die Waage, Pin1 liegt an Ser-16 phosphoryliert und damit in seiner inaktiven Form vor. Am G₂/M-Übergang steigt die PKA-Aktivität vor der Plk1-Aktivität an. Weiterhin liegt Pin1 in seiner inaktiven Form vor, wird jetzt aber gleichzeitig von Plk1 an Ser-65 phosphoryliert und damit stabilisiert. Dies führt zur Anreicherung von Pin1. In der Mitose sinkt die PKA-Aktivität rapide ab, während die Plk1-Aktivität weiterhin ansteigt und die gesamte Mitose hindurch konstant bleibt. Dies führt dazu, daß Pin1 nach wie vor nicht ubiquitiniert wird. Durch das Absinken der PKA-Aktivität kann nun das angereicherte Pin1 durch Dephosphorylierung schnell in seine aktive Form überführt werden und mitotische Phosphoproteine enzymatisch umsetzen. In der G₁-Phase kann Pin1 durch das Absinken der Plk1-Aktivität nicht mehr durch Phosphorylierung stabilisiert werden. Abbau und Neusynthese halten sich wieder die Waage. Gleichzeitig sorgt die basale PKA-Aktivität für die Inaktivierung von Pin1.

In der hier aufgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß Plk1 in der Lage ist, Pin1 an Ser-65 zu phosphorylieren und dadurch dessen Stabilität in HeLa-Zellen zu erhöhen. Es lassen sich jedoch noch weitere Hypothesen bezüglich der Interaktion von Plk1 und Pin1 formulieren:

- a) Sowohl Plk1 als auch Pin1 sind Enzyme. Beide könnten sich gegenseitig enzymatisch umsetzen.
- b) Beide Proteine sind Teil eines Multienzym-Komplexes, in dem Isomerase und Kinase gemeinsame Substrate umsetzen.

Um die erste Hypothese zu untersuchen sollten die potentiellen Isomerisierungs-Stellen in Plk1 (Pro-215 und Pro-499) untersucht werden. Interaktions-Studien mit Plk1-Mutanten, bei denen Thr-214 und Thr-498 zu Alanin- oder Glutamat-Resten ausgetauscht wurden sollten erste Hinweise dafür liefern, ob die WW-Domäne von Pin1 in der Lage ist, die entsprechenden Mutanten zu binden und zu isomerisieren.

In diesem Fall würde die WW-Domäne die Bindung an die aktivierte Kinase vermitteln. Die Kinase wiederum würde das Substrat binden und phosphorylieren, und es anschließend direkt an die PPIase-Domäne überleiten.

Im Falle eines Multienzym-Komplexes müßte die WW-Domäne die Bindung an die aktivierte Kinase vermitteln. Die Kinase wiederum würde das Substrat binden und phosphorylieren, und es anschließend direkt an die PPIase-Domäne überleiten. Möglicherweise würde die Bindung und die Übergabe des Substrats von der Polo-Box vermittelt werden, die innerhalb des Komplexes die Substrat-bindende Funktion der WW-Domäne übernehmen müßte, da die WW-Domäne bereits die Bindung an Plk1 vermittelt. Daß die Polo-Box ähnliche Bindungseigenschaften aufweist wie die WW-Domäne wurde kürzlich erst gezeigt, denn auch die Polo-Box bindet MPM-2 Epitope (Elia et al., 2003). Ein solches Zusammenwirken von Pin1 und Plk1 in einem Multienzym-Komplex konnte bislang nicht gezeigt werden, wurde aber in einer neueren Arbeit in Erwägung gezogen (Jacobs et al., 2003).

In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob Plk1 Pin1 *in vivo* phosphoryliert. Zusätzlich könnte durch Dünnschichtchromatographie von tryptisch verdauten Pin1-Proteinen oder mit einem Antikörper, der spezifisch Pin1 in seiner Ser-65 phosphorylierten Form erkennt, untersucht werden, in welchen Zellzyklus-Phasen Pin1 an Ser-65 phosphoryliert vorliegt.

Diese Arbeit liefert Hinweise dafür, daß durch die Plk1-vermittelte Phosphorylierung an Ser-65 die Stabilität von Pin1 erhöht wird. Dieser Befund sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. Möglich wäre der Einsatz weiterer Proteasom-Inhibitoren, wie MG262 und aLLN, die wie MG132 ein breiteres Wirkungsspektrum haben, oder auch von Lactacystin, einem spezifischen Inhibitor des 20S-Proteasoms. Ferner sollte die Ubiquitinierung der verschiedenen Mutanten untersucht werden. Auch ist noch nicht untersucht worden, welcher Ubiquitin-Ligase-Komplex die Degradierung von Pin1 reguliert und ob dieser Komplex Zellzyklus-abhängig aktiv ist. Der Einsatz unterschiedlicher Proteasom-Inhibitoren und der Nachweis des ubiquinierten Pin1-Proteins durch einen Ubiquitin-gerichteten Antikörper sollten in künftigen Experimenten Informationen über die Kinetik der Pin1-Degradierung liefern.

Weiterhin sollte die Halbwertszeit der verschiedenen Pin1-Mutanten untersucht werden. Dies könnte durch den Einsatz von Cycloheximid, einem Inhibitor der Protein-Synthese geschehen, indem nach Hemmung der Neusynthese die zeitliche Kinetik der Abnahme des jeweiligen Pin1-Proteins im Western-Blot analysiert wird.

Ferner müssen weitere Evidenzen für das gezeigte Modell gesammelt werden. Die Kinetik der Pin1-Phosphorylierung an Ser-65 muß zellzyklusabhängig untersucht werden. Geeignet dafür wäre die Technik der Zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie, in der die Phosphorylierung von tryptisch verdautem Pin1 untersucht werden kann. Ferner sollte die Pin1-Phosphorylierung in Zellen untersucht werden, in denen die Plk1-Expression durch RNAi gehemmt wurde.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation des Zellzyklus wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert. Schlüsselenzyme sind dabei die Cdk/Cyclin-Komplexe. Für den Eintritt und das Durchlaufen der Mitose von besonderer Bedeutung ist die Polo-like Kinase 1 (Plk1). Zur Aufklärung Mitose-spezifischer Signalwege wurden in dieser Arbeit neue Interaktionspartner der Plk1 gesucht. Die Bedeutung dieser Interaktionen für Zellzyklus und Mitose sollten näher charakterisiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Plk1 direkt mit humanem Cyclin B1, der regulatorischen Untereinheit des *M-phase-promoting-factors* (MPF), interagiert. Dabei konnte festgestellt werden, daß Plk1 in der Lage ist, Cyclin B1 innerhalb dessen *cytoplasmic retention signals* (CRS) am Ser-133 zu phosphorylieren. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung der CRS in einer synergistischen Weise durch Plk1 und MAPK (Erk2) stattfindet. Vorphosphorylierung der CRS durch MAPK an Ser-126 und Ser-128 führt nicht nur zu einer 3-4 fach stärkeren Phosphorylierung durch Plk1, sondern auch zur Entstehung neuer Phosphorylierungs-Stellen für Plk1. Die hier aufgeführten Daten zeigen, daß durch synergistische Phosphorylierung der CRS, an der Plk1 beteiligt ist, der rapide nukleäre Import des Cyclin B1/Cdk1-Komplexes in der Prophase gesteuert wird. Dieser rapide Import in den Kern ist Voraussetzung für die Auflösung der Kernmembran in der Prometaphase. Damit konnte gezeigt werden, daß Plk1 dazu beiträgt, den MPF in den Kern (zu seinen Substraten) zu bringen, um früh-mitotische Ereignisse zu induzieren.

Mitotische Kinasen (wie MPF, aber auch MAPK) phosphorylieren ihre Substrate oft an Ser/Thr-Pro-Motiven. Sind diese Motive phosphoryliert (pSer/Thr-Pro), so können sie von Pin1, einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase isomerisiert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Plk1 mit Pin1 interagiert. Dabei bindet Plk1 an die Protein-Interaktionsdomäne (WW-Domäne) von Pin1, ist aber gleichzeitig in der Lage, Pin1 innerhalb seiner katalytischen Domäne (PPIase Domäne) zu phosphorylieren. Es konnte gezeigt werden, daß das Ser-65 in Pin1 eine Phosphorylierungs-Stelle für Plk1 darstellt. Da bekannt war, daß Vortäuschung einer Phosphorylierung an Ser-16 oder Ser-67 die Pin1-Aktivität hemmt, wurde ein ähnlicher Effekt für Ser-65 erwartet. Jedoch führte die Vortäuschung der Phosphorylierung an Ser-65 nicht zu einer Reduktion der PPIase-Aktivität von Pin1. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Pin1 über das Proteasom abgebaut wird. Die Vortäuschung der Ser-65-Phosphorylierung führt zur Stabilisierung des Pin1-Proteins. Damit ist Plk1 das erste bekannte Enzym, welches Pin1 durch Phosphorylierung stabilisiert.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
			X		beliebige Aminosäure

Nukleotide

dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotid-Triphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanidin
T	Thymidin

Sonstige Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung(en)
abs	absolut
Ac	Acetat
add	auf
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
antisense	Gegenstromrichtung
APC	Anaphase Promoting Complex
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ASO	Antisense-Oligonukleotid
Asp	Abnormal spindle protein
AT	Aminotriazol
b	Base(n)
bidest.	doppelt destilliert
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar(e)

BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C-	Carboxy-
ca.	Zirka
CFP	Cyano Fluorescent Protein
Ci	Curie
Cdc	Cyclin-division-cycle
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CRM1	chromosomal region maintenance
CRS	Cytoplasmic retention signal
CSPD	5-Chloradamantan-2-spiro-3'-[4'-methoxy-4'-(3phosphonooxyphenyl)-dioxetan] Dinatriumsalz-Lösung
d	Dicke
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DKFZ	Deutsches Krebs Forschungs Zentrum
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
DNAse	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescent Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMBL	European molecular biology laboratory
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
E _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell scanning (Durchflußcytometer)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP	Green Fluorescent Protein (aus <i>Aequoria victoria</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase (aus <i>Schistosoma japonicum</i>)
h	Stunde(n)
HBS	HEPES-buffered Saline
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
HRP	Meerrettichperoxidase
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase

k	Kilo
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
konz.	Konzentriert
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	Lauria broth
Lsg.	Lösung
m	Meter oder Milli
M	molar
μ	Mikro-
MAPK	mitogen-activated protein kinase
max.	maximal
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
min.	Minute(n)
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	millimol
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
MPF	M-Phase/Maturation-Promoting-Factor
mRNA	messenger RNA
N	normal
N-	Amino
n	Nano
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
NIMA	never in mitosis A
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	Pico
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
Pi	anorganisches Phosphat
PI	Propidium Iodid
Pin1	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase 1
PKA	cAMP-dependent protein kinase A
Plks	Polo-like Kinasen
Plk1	Polo-like Kinase 1
PMSF	Phenylmethansulfonylsäure
poly(A) ⁺ -RNA	polyadenylierte RNA
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RB	Running Buffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur (22-25°C)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s	Sekunde
sense	Stromrichtung
siRNA	small interfering RNA
s.o.	siehe oben
ssRNA	einzelsträngige RNA
s.u.	siehe unten
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametzyletzylamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit (Unit)
u.a.	unter anderem
ü/N	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
usw.	Und so weiter
UTR	nicht translatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
Vol.	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
w/w	Gewicht/Gewicht (<i>weight/weight</i>)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid
YFP	Yellow Fluorescent Protein
z.B.	zum Beispiel

7 LITERATUR

Aberle,H., Bauer,A., Stappert,J., Kispert,A., und Kemler,R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797-3804.

Abrieu,A., Brassac,T., Galas,S., Fisher,D., Labbe,J.C., und Doree,M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 12), 1751-1757.

Albert,A., Lavoie,S., und Vincent,M. (1999). A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 15), 2493-2500.

Alexandru,G., Uhlmann,F., Mechtler,K., Poupart,M.A., und Nasmyth,K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105, 459-472.

Arion,D., Meijer,L., Brizuela,L., und Beach,D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 55, 371-378.

Bailly,E., Pines,J., Hunter,T., und Bornens,M. (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J. Cell Sci.* 101 (Pt 3), 529-545.

Basu,A., Das,M., Qanungo,S., Fan,X.J., DuBois,G., und Haldar,S. (2002). Proteasomal degradation of human peptidyl prolyl isomerase pin1 - pointing phospho Bcl2 toward dephosphorylation. *Neoplasia.* 4, 218-227.

Blangy,A., Lane,H.A., d'Herin,P., Harper,M., Kress,M., und Nigg,E.A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.

Booher,R.N., Holman,P.S., und Fattaey,A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.* 272, 22300-22306.

Borgne,A., Ostvold,A.C., Flament,S., und Meijer,L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* 274, 11977-11986.

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.

Brandeis,M., Rosewell,I., Carrington,M., Crompton,T., Jacobs,M.A., Kirk,J., Gannon,J., und Hunt,T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1- null mice die in utero. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4344-4349.

Burke,B. und Ellenberg,J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 487-497.

Carrington,J.C., Cary,S.M., Parks,T.D., und Dougherty,W.G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8, 365-370.

Charles,J.F., Jaspersen,S.L., Tinker-Kulberg,R.L., Hwang,L., Szidon,A., und Morgan,D.O. (1998). The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 8, 497-507.

Chen,R.H., Abate,C., und 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. U. S. A* 90, 10952-10956.

Clay,F.J., McEwen,S.J., Bertoncello,I., Wilks,A.F., und Dunn,A.R. (1993). Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 4882-4886.

- Coqueret,O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35-55.
- Crenshaw,D.G., Yang,J., Means,A.R., und Kornbluth,S. (1998). The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *EMBO J.* 17, 1315-1327.
- Dai,W., Li,Y., Ouyang,B., Pan,H., Reissmann,P., Li,J., Wiest,J., Stambrook,P., Gluckman,J.L., Noffsinger,A., und Bejarano,P. (2000). PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 27, 332-336.
- Descombes,P. und Nigg,E.A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.* 17, 1328-1335.
- do Carmo,A.M., Tavares,A., und Glover,D.M. (2001). Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat. Cell Biol.* 3, 421-424.
- Doree,M. und Hunt,T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell Sci.* 115, 2461-2464.
- Draetta,G. und Eckstein,J. (1997). Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, M53-M63.
- Elia,A.E., Cantley,L.C., und Yaffe,M.B. (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299, 1228-1231.
- Fisher,R.P. und Morgan,D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.
- Fode,C., Binkert,C., und Dennis,J.W. (1996). Constitutive expression of murine Sak-a suppresses cell growth and induces multinucleation. *Mol. Cell Biol.* 16, 4665-4672.
- Fornerod,M., Ohno,M., Yoshida,M., und Mattaj,I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Fujimori,F., Takahashi,K., Uchida,C., und Uchida,T. (1999). Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 658-663.
- Galat,A. und Metcalfe,S.M. (1995). Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63, 67-118.
- Gallant,P. und Nigg,E.A. (1994). Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins. *EMBO J.* 13, 595-605.
- Gautier,J., Minshull,J., Lohka,M., Glotzer,M., Hunt,T., und Maller,J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60, 487-494.
- Gerez,L., Mohrmann,K., van Raak,M., Jongeneelen,M., Zhou,X.Z., Lu,K.P., und van Der,S.P. (2000). Accumulation of rab4GTP in the cytoplasm and association with the peptidyl-prolyl isomerase pin1 during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 11, 2201-2211.
- Glover,D.M., Hagan,I.M., und Tavares,A.A. (1998). Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12, 3777-3787.
- Golan,A., Yudkovsky,Y., und Hershko,A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.* 277, 15552-15557.
- Golsteyn,R.M., Schultz,S.J., Bartek,J., Ziemiecki,A., Ried,T., und Nigg,E.A. (1994). Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 6), 1509-1517.
- Hagting,A., Jackman,M., Simpson,K., und Pines,J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr. Biol.* 9, 680-689.

- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* *17*, 4127-4138.
- Hamamoto, T., Gunji, S., Tsuji, H., and Beppu, T. (1983). Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* *36*, 639-645.
- Hamanaka, R., Maloid, S., Smith, M.R., O'Connell, C.D., Longo, D.L., and Ferris, D.K. (1994). Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila* polo serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ.* *5*, 249-257.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.
- Hanes, S.D., Shank, P.R., and Bostian, K.A. (1989). Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *5*, 55-72.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* *241*, 42-52.
- Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* *74*, 463-474.
- Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W., and Murray, A.W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* *73*, 1393-1402.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* *114*, 193-197.
- Holtrich, U., Wolf, G., Brauning, A., Karn, T., Bohme, B., Rubsamen-Waigmann, H., and Strebhardt, K. (1994). Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 1736-1740.
- Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N., and Pease, L.R. (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* *8*, 528-535.
- Izumi, T. and Maller, J.L. (1991). Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol. Cell Biol.* *11*, 3860-3867.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.* *14*, 1646-1654.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., and Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* *5*, 143-148.
- Jacobs, D.M., Saxena, K., Vogtherr, M., Bernado, P., Pons, M., and Fiebig, K. (2003). Peptide binding induces large-scale changes in inter-domain mobility in human pin1. *J. Biol. Chem.*
- Jang, Y.J., Lin, C.Y., Ma, S., and Erikson, R.L. (2002a). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 1984-1989.
- Jang, Y.J., Ma, S., Terada, Y., and Erikson, R.L. (2002b). Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 44115-44120.
- Kapust, R.B. and Waugh, D.S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* *8*, 1668-1674.
- Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jesus, C., and Ozon, R. (1998). MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp. Cell Res.* *244*, 491-500.
- Karaiskou, A., Jesus, C., Brassac, T., and Ozon, R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 21)*, 3747-3756.

- Kelm,O., Wind,M., Lehmann,W.D., und Nigg,E.A. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J. Biol. Chem.* *277*, 25247-25256.
- King,R.W., Deshaies,R.J., Peters,J.M., und Kirschner,M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* *274*, 1652-1659.
- Kong,M., Barnes,E.A., Ollendorff,V., und Donoghue,D.J. (2000). Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J.* *19*, 1378-1388.
- Kotani,S., Tanaka,H., Yasuda,H., und Todokoro,K. (1999). Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J. Cell Biol.* *146*, 791-800.
- Kotani,S., Tugendreich,S., Fujii,M., Jorgensen,P.M., Watanabe,N., Hoog,C., Hieter,P., und Todokoro,K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* *1*, 371-380.
- Kumagai,A. und Dunphy,W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* *273*, 1377-1380.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lake,R.J. und Jelinek,W.R. (1993). Cell cycle and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase. *Mol. Cell Biol.* *13*, 7793-7801.
- Lamb,N.J., Fernandez,A., Watrin,A., Labbe,J.C., und Cavadore,J.C. (1990). Microinjection of p34cdc2 kinase induces marked changes in cell shape, cytoskeletal organization, and chromatin structure in mammalian fibroblasts. *Cell* *60*, 151-165.
- Lane,H.A. und Nigg,E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* *135*, 1701-1713.
- Lee,K.S., Grenfell,T.Z., Yarm,F.R., und Erikson,R.L. (1998). Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 9301-9306.
- Lee,K.S., Yuan,Y.L., Kuriyama,R., und Erikson,R.L. (1995). Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol. Cell Biol.* *15*, 7143-7151.
- Leung,G.C., Hudson,J.W., Kozarova,A., Davidson,A., Dennis,J.W., und Sicheri,F. (2002). The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 719-724.
- Li,B., Ouyang,B., Pan,H., Reissmann,P.T., Slamon,D.J., Arceci,R., Lu,L., und Dai,W. (1996). Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J. Biol. Chem.* *271*, 19402-19408.
- Li,J., Meyer,A.N., und Donoghue,D.J. (1995). Requirement for phosphorylation of cyclin B1 for *Xenopus* oocyte maturation. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1111-1124.
- Li,J., Meyer,A.N., und Donoghue,D.J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 502-507.
- Liou,Y.C., Ryo,A., Huang,H.K., Lu,P.J., Bronson,R., Fujimori,F., Uchida,T., Hunter,T., und Lu,K.P. (2002). Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 1335-1340.
- Liu,F., Stanton,J.J., Wu,Z., und Piwnicka-Worms,H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* *17*, 571-583.
- Liu,W., Youn,H.D., Zhou,X.Z., Lu,K.P., und Liu,J.O. (2001). Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Lett.* *496*, 105-108.

- Liu, X. und Erikson, R.L. (2002). Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 8672-8676.
- Liu, X. und Erikson, R.L. (2003). Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 5789-5794.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., und Sunkel, C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* *5*, 2153-2165.
- Lu, K.P., Hanes, S.D., und Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* *380*, 544-547.
- Lu, K.P., Liou, Y.C., und Zhou, X.Z. (2002b). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol.* *12*, 164-172.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., und Lu, K.P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* *399*, 784-788.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Liou, Y.C., Noel, J.P., und Lu, K.P. (2002a). Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J. Biol. Chem.* *277*, 2381-2384.
- Ma, S., Liu, M.A., Yuan, Y.L., und Erikson, R.L. (2003). The Serum-Inducible Protein Kinase Snk Is a G(1) Phase Polo-Like Kinase That Is Inhibited by the Calcium- and Integrin-Binding Protein CIB. *Mol. Cancer Res.* *1*, 376-384.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., und Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* *21*, 5911-5920.
- Maity, A., McKenna, W.G., und Muschel, R.J. (1995). Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells. *EMBO J.* *14*, 603-609.
- Maleszka, R., Lupas, A., Hanes, S.D., und Miklos, G.L. (1997). The dodo gene family encodes a novel protein involved in signal transduction and protein folding. *Gene* *203*, 89-93.
- Masui, Y. und Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* *177*, 129-145.
- May, K.M., Reynolds, N., Cullen, C.F., Yanagida, M., und Ohkura, H. (2002). Polo boxes and Cut23 (Apc8) mediate an interaction between polo kinase and the anaphase-promoting complex for fission yeast mitosis. *J. Cell Biol.* *156*, 23-28.
- Messenger, M.M., Saulnier, R.B., Gilchrist, A.D., Diamond, P., Gorbsky, G.J., und Litchfield, D.W. (2002). Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J. Biol. Chem.* *277*, 23054-23064.
- Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* *33*, 261-274.
- Moore, J.D., Yang, J., Truant, R., und Kornbluth, S. (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J. Cell Biol.* *144*, 213-224.
- Mulvihill, D.P. und Hyams, J.S. (2002). Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci.* *115*, 3575-3586.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., und Beppu, T. (1994). Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* *269*, 6320-6324.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* *344*, 503-508.

- Ohi,R. und Gould,K.L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 267-273.
- Ohkura,H., Hagan,I.M., und Glover,D.M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *pl*1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* *9*, 1059-1073.
- Ookata,K., Hisanaga,S., Okano,T., Tachibana,K., und Kishimoto,T. (1992). Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J.* *11*, 1763-1772.
- Ookata,K., Hisanaga,S., Okumura,E., und Kishimoto,T. (1993). Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *J. Cell Sci.* *105 (Pt 4)*, 873-881.
- Osmani,S.A., Pu,R.T., und Morris,N.R. (1988). Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* *53*, 237-244.
- Ouyang,B., Pan,H., Lu,L., Li,J., Stambrook,P., Li,B., und Dai,W. (1997). Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J. Biol. Chem.* *272*, 28646-28651.
- Pines,J. und Hunter,T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* *115*, 1-17.
- Pines,J. und Hunter,T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* *13*, 3772-3781.
- Porter,C.M., Havens,M.A., und Clipstone,N.A. (2000). Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J. Biol. Chem.* *275*, 3543-3551.
- Qian,Y.W., Erikson,E., Li,C., und Maller,J.L. (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* *18*, 4262-4271.
- Qian,Y.W., Erikson,E., Taieb,F.E., und Maller,J.L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1791-1799.
- Rahfeld,J.U., Schierhorn,A., Mann,K., und Fischer,G. (1994). A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *343*, 65-69.
- Ranganathan,R., Lu,K.P., Hunter,T., und Noel,J.P. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* *89*, 875-886.
- Reynolds,N. und Ohkura,H. (2003). Polo boxes form a single functional domain that mediates interactions with multiple proteins in fission yeast polo kinase. *J. Cell Sci.* *116*, 1377-1387.
- Rippmann,J.F., Hobbie,S., Daiber,C., Guilliard,B., Bauer,M., Birk,J., Nar,H., Garin-Chesa,P., Rettig,W.J., und Schnapp,A. (2000). Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth Differ.* *11*, 409-416.
- Roshak,A.K., Capper,E.A., Imburgia,C., Fornwald,J., Scott,G., und Marshall,L.A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal.* *12*, 405-411.
- Ryo,A., Nakamura,M., Wulf,G., Liou,Y.C., und Lu,K.P. (2001). Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat. Cell Biol.* *3*, 793-801.
- Saiki,R.K., Chang,C.A., Levenson,C.H., Warren,T.C., Boehm,C.D., Kazazian,H.H., Jr., und Erlich,H.A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.* *319*, 537-541.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1998). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez,Y., Bachant,J., Wang,H., Hu,F., Liu,D., Tetzlaff,M., und Elledge,S.J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.
- Schmid,F.X. (1995). Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr. Biol.* 5, 993-994.
- Seong,Y.S., Kamijo,K., Lee,J.S., Fernandez,E., Kuriyama,R., Miki,T., und Lee,K.S. (2002). A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant- negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells. *J. Biol. Chem.* 277, 32282-32293.
- Shen,M., Stukenberg,P.T., Kirschner,M.W., und Lu,K.P. (1998). The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 12, 706-720.
- Shirayama,M., Zachariae,W., Ciosk,R., und Nasmyth,K. (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 1336-1349.
- Simizu,S. und Osada,H. (2000). Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines. *Nat. Cell Biol.* 2, 852-854.
- Smith,M.R., Wilson,M.L., Hamanaka,R., Chase,D., Kung,H., Longo,D.L., und Ferris,D.K. (1997). Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 397-405.
- Smits,V.A., Klompaker,R., Arnaud,L., Rijksen,G., Nigg,E.A., und Medema,R.H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2, 672-676.
- Song,S., Grenfell,T.Z., Garfield,S., Erikson,R.L., und Lee,K.S. (2000). Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Mol. Cell Biol.* 20, 286-298.
- Spankuch-Schmitt,B., Bereiter-Hahn,J., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002a). Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1863-1877.
- Spankuch-Schmitt,B., Wolf,G., Solbach,C., Loibl,S., Knecht,R., Stegmuller,M., von Minckwitz,G., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002b). Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 21, 3162-3171.
- Steinmann,B., Superti-Furga,A., und Bruckner,P. (1991). Mechanism of action of FK 506 and cyclosporin. *Lancet* 337, 439.
- Sudakin,V., Ganoth,D., Dahan,A., Heller,H., Hershko,J., Luca,F.C., Ruderman,J.V., und Hershko,A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185-197.
- Sumara,I., Vorlauffer,E., Stukenberg,P.T., Kelm,O., Redemann,N., Nigg,E.A., und Peters,J.M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9, 515-525.
- Sunkel,C.E. und Glover,D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* 89 (Pt 1), 25-38.
- Taniguchi,E., Toyoshima-Morimoto,F., und Nishida,E. (2002). Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 277, 48884-48888.
- Toczyski,D.P., Galgoczy,D.J., und Hartwell,L.H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90, 1097-1106.
- Towbin,H., Staehelin,T., und Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Toyoshima-Morimoto,F., Taniguchi,E., Shinya,N., Iwamatsu,A., und Nishida,E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410, 215-220.

- Toyoshima,F., Moriguchi,T., Wada,A., Fukuda,M., und Nishida,E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint. *EMBO J.* *17*, 2728-2735.
- Tsvetkov,L., Xu,X., Li,J., und Stern,D.F. (2003). Polo-like Kinase 1 and Chk2 Interact and Co-localize to Centrosomes and the Midbody. *J. Biol. Chem.* *278*, 8468-8475.
- van Vugt,M.A., Smits,V.A., Klompmaker,R., und Medema,R.H. (2001). Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR- dependent fashion. *J. Biol. Chem.* *276*, 41656-41660.
- Walsh,S., Margolis,S.S., und Kornbluth,S. (2003). Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and plx. *Mol. Cancer Res.* *1*, 280-289.
- Weissman,A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 169-178.
- Wolf,G., Elez,R., Doermer,A., Holtrich,U., Ackermann,H., Stutte,H.J., Altmannsberger,H.M., Rubsamen-Waigmann,H., und Strebhardt,K. (1997). Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* *14*, 543-549.
- Won,K.A. und Reed,S.I. (1996). Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* *15*, 4182-4193.
- Wulf,G.M., Ryo,A., Wulf,G.G., Lee,S.W., Niu,T., Petkova,V., und Lu,K.P. (2001). Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* *20*, 3459-3472.
- Yaffe,M.B., Schutkowski,M., Shen,M., Zhou,X.Z., Stukenberg,P.T., Rahfeld,J.U., Xu,J., Kuang,J., Kirschner,M.W., Fischer,G., Cantley,L.C., und Lu,K.P. (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* *278*, 1957-1960.
- Yam,C.H., Fung,T.K., und Poon,R.Y. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol. Life Sci.* *59*, 1317-1326.
- Yamashiro,S. und Matsumura,F. (1991). Mitosis-specific phosphorylation of caldesmon: possible molecular mechanism of cell rounding during mitosis. *Bioessays* *13*, 563-568.
- Yang,J., Bardes,E.S., Moore,J.D., Brennan,J., Powers,M.A., und Kornbluth,S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* *12*, 2131-2143.
- Yang,J., Song,H., Walsh,S., Bardes,E.S., und Kornbluth,S. (2001). Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J. Biol. Chem.* *276*, 3604-3609.
- Yarm,F.R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell Biol.* *22*, 6209-6221.
- Yuan,J., Eckerdt,F., Bereiter-Hahn,J., Kurunci-Csacsco,E., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002b). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* *21*, 8282-8292.
- Yuan,J., Horlin,A., Hock,B., Stutte,H.J., Rubsamen-Waigmann,H., und Strebhardt,K. (1997). Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am. J. Pathol.* *150*, 1165-1172.
- Yuan,J., Kramer,A., Eckerdt,F., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002a). Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an Antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation. *Cancer Res.* *62*, 4186-4190.
- Zacchi,P., Gostissa,M., Uchida,T., Salvagno,C., Avolio,F., Volinia,S., Ronai,Z., Blandino,G., Schneider,C., und Del Sal,G. (2002). The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* *419*, 853-857.
- Zheng,H., You,H., Zhou,X.Z., Murray,S.A., Uchida,T., Wulf,G., Gu,L., Tang,X., Lu,K.P., und Xiao,Z.X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* *419*, 849-853.

Zhou,X.Z., Kops,O., Werner,A., Lu,P.J., Shen,M., Stoller,G., Kullertz,G., Stark,M., Fischer,G., und Lu,K.P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol. Cell* 6, 873-883.

8 ANHANG

8.1 Veröffentlichungen

Yuan,J., Eckerdt,F., Bereiter-Hahn,J., Kurunci-Csacsco,E., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene 21*, 8282-8292.

Yuan,J., Kramer,A., Eckerdt,F., Kaufmann,M., und Strebhardt,K. (2002). Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an Antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation. *Cancer Res. 62*, 4186-4190.

8.2 Veröffentlichte Abstracts

8.2.1 Vortrag

“Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1”, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in Düsseldorf vom 10.-14.09.2002 – veröffentlicht in: *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Volume 267, Supplement 1, September 2002.

8.2.2 Poster

“Polo-like kinase 1 (Plk1), a novel interacting protein of Cyclin B1 *in vitro* and *in vivo*”, SFB 474-Meeting im März 2000 in Mauloff.

“Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1”, EMBL/Salk/EMBO-Meeting in Heidelberg vom 20.-23.04.2002.

“Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1”, EORTC-NCI-AACR-Meeting vom 19.-22.11.2002 in Frankfurt.

8.3 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen dieses Themas. Seine hervorragende Betreuung und vor allem seine kritischen Fragen haben diese Arbeit erst ermöglicht. Dank schulde ich ihm auch für seine immerwährende Unterstützung, auf die ich auch in schweren Zeiten bauen konnte.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Anna Starzinski-Powitz möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Manfred Kaufmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel im Molekularbiologischen Labor am Zentrum für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt.

Herrn Prof. Dr. phil. nat. Jürgen Bereiter-Hahn danke ich für die Unterstützung am Konfokalen Laserscan-Mikroskop.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. med. Juping Yuan, die mich immer unterstützte und mir jederzeit zur Seite stand.

Frau Dipl. Ernährungswissenschaftlerin Andrea Krämer danke ich für ihre hervorragende Mitarbeit, ihren unglaublichen Fleiß und die vielen Überstunden.

Herrn Dr. phil. nat. Krishna Saxena danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und für inspirierende Diskussionen zum Thema Pin1 und Isomerisierung.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors danken, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Birgit Spänkuch-Schmitt, Lisa Kurunci-Csacsko, Jutta Bratengeier, Brigitte Hüls, Katharina Kourtis, Yves Matthes, Timo Faltus, Sven Kappelt, Annabelle Wiesner und Manfred Stegmüller. Ferner danke ich den Zivildienstleistenden Oskar Möbert und Florian Orth für Ihre technische Unterstützung. Besonderer Dank geht an Anne Greiner.

Ferner danke ich den von mir betreuten Praktikanten und Diplomanden Ali Tinazli, Steffen Naumann, Leonard Mada und Iris Nieratzky.

Herrn Dr. rer. nat. Bernd Martin danke ich für die langjährige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. phil. nat. Claudia Litterst für ihre fachliche, aber vor allem freundschaftliche Unterstützung. Darüber hinaus haben die anregenden Diskussionen mit ihr und ihre große Hilfsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch Herrn Marc Roller möchte ich besonderen Dank aussprechen. Auch ihm danke ich für anregende Diskussionen und seine besondere freundschaftliche Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank all jenen Freunden außerhalb des Labors, die mich während der Entstehungszeit dieser Arbeit begleiteten.

Aber vor allem danke ich meinen Eltern und meinen Großeltern, die mir mein Studium ermöglichten und mir in allen Zeiten zur Seite standen.

FRANK ECKERDT

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

- Geburtsdatum: 28.August 1969
- Geburtsort: Frankfurt am Main
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE UND UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1975 - 1976	Walt Disney Grundschule in Berlin/Neukölln
1976 - 1979	Freiligrathschule in Frankfurt (Grundschule)
1979 - 1988	Rudolf-Koch-Schule in Offenbach; Abschluß Abitur
1990 - 1992	Grundstudium der Biologie und der ev. Religion, Lehramt an Gymnasien an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt
1992 - 1993	Student der „licence de sciences naturelles“ an der Université de Provence in Marseille (Frankreich)
1993 - 1998	Hauptstudium der Biologie und der ev. Religion, Lehramt an Gymnasien an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt
Nov. 1998	Erstes Staatsexamen
seit Feb. 1999	Promotion im Fachbereich Biologie und Informatik am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Strebhardt (Abteilung Molekulare Gynäkologie und Geburtshilfe)

EXAMENSARBEIT

1997 - 1998	„Untersuchung zur Charakterisierung des LIM-Proteins mSLIM3 in Mausmuskelzellen“, durchgeführt am Institut für Anthropologie und Humangenetik bei Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz; Note: „sehr gut“
--------------------	--

AUßERUNIVERSITÄRE TÄTIGKEITEN

Juli 1988 - Jan. 1989	Tätigkeit bei IBM in Mainz (Operator)
Feb. 1989 - Sep. 1990	Zivildienst in der ev. Melanchthongemeinde in Frankfurt/Fechenheim