

Zusammenfassung

Mittels eines neuartigen Hefe-Interaktions-Systems (engl.: **Ras-Recruitment-System**, RRS) wurde ein Protein isoliert, welches mit dem Proto-Onkogen Pim-1 interagiert. Dabei handelte es sich um die Serin/Threonin-Kinase C-TAK1 (**CDC twenty-five associated Kinase 1**). C-TAK1 phosphoryliert die Phosphatase CDC25C an der AS Ser216, wodurch diese durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert wird. Pim-1 war ebenfalls in der Lage, im herkömmlichen Hefe-System (engl.: Yeast two hybrid) mit C-TAK1 zu interagieren. Das RRS-System wurde weiterhin zur Erzeugung einer nicht-interagierenden Punktmutante (C-TAK1-L128P) genutzt. Neben dem schon bekannten C-TAK1-wt-Protein konnten zusätzlich noch zwei weitere humane Spleiß-Varianten, C-TAK1- α und β , beschrieben werden.

Die Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1 wurde in GST-Interaktions-Experimenten, Immunopräzipitationen und Immunfluoreszenzen bestätigt. Dies war unabhängig von der Verwendung des Pim-1-wt-Proteins oder der inaktiven Pim-1-K67M-Mutante. Die zwei C-TAK1-Spleiß-Varianten zeigten dabei keinen Unterschied zum isolierten C-TAK1-wt-Protein. Es konnte auch endogenes Pim-1-Protein mit C-TAK1 in einem Komplex nachgewiesen werden.

In den biochemischen Studien stellte sich heraus, dass Pim-1 nicht nur mit C-TAK1, sondern auch mit der Phosphatase CDC25C interagiert. Die Pim-1/CDC25C-Interaktion konnte ebenfalls in endogenen Komplexen nachgewiesen werden.

In Kinase-Experimenten stellte sich heraus, dass sowohl C-TAK1 als auch CDC25C von Pim-1-wt, aber nicht von der Pim-1-inaktiven Mutante, phosphoryliert wurden. Durch Deletions-Mutanten konnte nicht nur die Pim-1-Interaktions-Domäne in dem C-TAK1- und CDC25C-Protein, sondern ebenfalls mögliche Phosphorylierungs-Bereiche bestimmt werden. In den beiden NLS-Sequenzen im C-Terminus des C-TAK1-Proteins ist ein abgewandeltes und ein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv enthalten. Allerdings liegen die Pim-1-Phosphorylierungs-Stellen in dem C-TAK1-Protein sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus. CDC25C wird an einem oder mehreren Serinen oder Threoninen durch Pim-1 phosphoryliert, nicht aber an der AS Ser216. CDC25C besitzt allerdings kein gegenwärtiges postuliertes Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv.

In einem C-TAK1-Inaktivierungs-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von C-TAK1 durch die Pim-1-Phosphorylierung herabgesetzt wird. Die Phosphatase-Aktivität von CDC25C im Phosphatase-Experiment wurde dagegen durch Pim-1-Phosphorylierung erhöht. Demzufolge übt Pim-1 sowohl eine indirekte (über C-TAK1) als auch eine direkte Aktivierung auf CDC25C aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pim-1-Kinase eine wichtige Rolle am G₂/M-Kontrollpunkt einnimmt und dass Pim-1 ein wichtiges Bindeglied zwischen Zytokin-/Wachstumssignalwegen und Proliferation darstellt.