

SPOC1: Characterization of a Novel Human Nuclear Protein with Implications for a Functional Role in Mitotic Chromosome Condensation

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Sarah Kinkley

aus Hamburg

Hamburg, im August 2007

Zusammenfassung / Abstract

Im Zentrum der Arbeit steht das Protein SPOC1 (Survival time associate PHD-finger protein in Ovarian Cancer 1), dessen Expression bisher nur von einem kürzlich entdeckten Gen vorhergesagt ist, bisher aber nicht nachgewiesen wurde. Im Rahmen der Arbeit sollte die Expression des SPOC1-Proteins erstmals nachgewiesen werden, dessen molekulare Eigenschaften charakterisiert und mögliche Funktionen aufgeklärt werden.

Es gelang zu zeigen, dass SPOC1 ein nukleäres Protein ist, welches in den meisten Zellzyklusphasen weitgehend in fest an Chromatin gebundener Form vorliegt. Für das nukleoplasmatische SPOC1-Protein wurde eine Halbwertszeit von ca. 15 min ermittelt, wohingegen es sich in Chromatin gebundener Form als stabil erwies. Immunoblotanalysen und Immunfluoreszenzstudien offenbarten sowohl eine dynamische Regulation des SPOC1-Proteins als auch seiner subzellulären Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus. Während des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase sowie in der frühen S-Phase löst sich das SPOC1-Protein offensichtlich vom Chromatin ab und findet sich nur in geringen Mengen in der löslichen Fraktion von Kernlysaten, vermutlich weil es nach Ablösung vom Chromatin weitgehend degradiert wird. Während der Mitose hingegen kumuliert das SPOC1-Protein und zeigt dabei eine biphasische Lokalisation mit kondensierten Chromosomen, ein Hinweis für entsprechende Funktionen des Proteins bei der Chromatinkondensation und im Zellzyklus. In Übereinstimmung hiermit sind die beobachtete globale Chromosomenkondensation nach hoher SPOC1-Überexpression als auch die mit der siRNA vermittelten SPOC1-Expressionsreduktion assoziierten Defizite von Zellen mitotische Chromosomen ausreichend zu kondensieren. Letzteres verzögerte bei den Zellen den Eintritt in die Mitose und verursachte Probleme bei den nachfolgenden chromosomalen Vorgängen, einschließlich von Defiziten bei der Anordnung der Chromosomen in der Metaphase, dem Auftreten von sogenannten „lagging chromosomes“ und von „chromosome bridges“. Des Weiteren verursachte bereits eine 2-fache Überexpression von SPOC1 über eine längere Zeit die Polyploidisierung von U2OS-Zellen.

Diese Befunde zeigen, dass eine strikte Regulation der Menge an SPOC1-Protein für eine normale Zellteilung und die Homeostase notwendig ist und dies impliziert, dass SPOC1 sehr wahrscheinlich ein Tumorprotein ist. In Übereinstimmung damit ist der publizierte Befund von signifikant erhöhten Mengen an SPOC1 RNA in Patienten mit Eierstockkrebs und deren Korrelation mit einer schlechten Prognose.

Zusammengefasst gelang es zu zeigen, dass das SPOC1-Protein ein strikt in Expression und subzellulärer Lokalisation reguliertes, weitgehend mit Chromatin assoziiertes Protein ist, das

die Architektur von Chromatin modulieren kann und eine Rolle bei der mitotischen Chromatinkondensation sowie dessen Fortschreiten und damit bei der Zellteilung spielt.

Bei Berücksichtigung aller hier erhaltenen Ergebnisse und in Übereinstimmung mit der publizierten Korrelation zwischen erhöhter SPOC1-RNA-Menge und Kurzzeitüberleben von Eierstockkrebspatienten ist es sehr gut vorstellbar, dass erst bei der Fehlregulation des SPOC1-Proteins, das sowohl für die Stabilität und Architektur der Chromosomen als auch für die Zellteilung funktionell bedeutsam ist, dessen onkogenes Potential offenbar wird und es zur malignen Transformation kommt.

Abstract

Survival time associated PHD finger in Ovarian Cancer 1 (SPOC1) is a novel protein that has not been investigated before. The objective of this research was to investigate and identify endogenous SPOC1 at the cellular level, to characterize its molecular features and to try and identify its putative biological functions. In this study I have been able to show that SPOC1 is a nuclear localized protein that is tightly associated with chromatin in most cell cycle phases. SPOC1 was found to be a very labile protein in the soluble phase with a half-life of approximately 15 minutes, whereas it was stable over hours when associated with chromatin. SPOC1 shows a dynamic regulation in both its expression levels and its chromatin localization through out the cell cycle. During S-phase transition and early S-phase SPOC1 is released from the chromatin and found to localize in the soluble fraction of nuclear lysate and is significantly decreased in its expression levels suggesting that it is degraded. Conversely, SPOC1 expression levels climaxed during mitosis, where it further showed biphasic localization to the condensed mitotic chromosomes, arguing for a potential functional role in this phase. Consistent with this possibility, SPOC1 over expression resulted in massive global chromosome condensation, with implications of endoreduplication or endomitosis, whereas its siRNA mediated reduction significantly impaired the cells ability to condense its mitotic chromosomes, delaying mitosis and resulting in downstream chromosome abnormalities, such as failed metaphase alignment, lagging chromosomes and chromosome bridges. Furthermore, a prolonged 2-fold over expression of SPOC1 resulted in 100% polyploidization of U2OS cells. These findings demonstrate that a tight regulation of SPOC1 expression levels is necessary for proper cellular division and homeostasis and implicate that SPOC1 is a novel oncoprotein. In line with this is the previous observations from our group that showed SPOC1 mRNA levels were significantly increased in a subset of ovarian cancer patients, which was statistically correlated with a poorer prognosis. In summary, I have been able to show that SPOC1 is a tightly regulated, chromatin associated protein, that is capable of modulating chromatin architecture and that has a potential functional role in mitotic condensation, progression and therefore cellular division. From these observations it is easily conceivable that a protein with functions in both chromosome stability/architecture and in cellular proliferation when misregulated could have oncogenic potential and favour oncogenic transformation, as was observed for SPOC1.