

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

Molekulare Mechanismen der Spindel-Kontrollpunkt- Inhibierung und der chromosomalen Instabilität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der



vorgelegt

von

Aline Katharina Stolz

aus Euskirchen

Marburg, März 2010

Vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität als Dissertation am 25.06.2010
angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent:	PD Dr. Holger Bastians
1. Korreferent:	Prof. Dr. Ralf Jacob

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Stolz, A.*, Vogel, C.*, Schneider, V., Ertych, N., Kienitz, A., Yu, H. und Bastians, H. (2009). Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Research*, **69**, 3874-3883.

Stolz, A.*, Ertych, N.*, Kienitz, A., Vogel, C., Schneider, V., Fritz, B., Jacob, R., Dittmar, G., Weichert, W., Petersen, I. und Bastians, H. (2010). The *CHK2-BRCA1* tumor suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. *Nature Cell Biology*, im Druck.

*: gleichberechtigte Erstautoren

Zur Erinnerung an meine Mama

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	1
EINLEITUNG	5
DER EUKARYOTISCHE ZELLZYKLUS.....	5
DIE REGULATION DES EUKARYOTISCHEN ZELLZYKLUS DURCH CDKS UND CYCLINE	7
Die Regulation der G2/M-Transition	9
DIE REGULATION DER MITOSE DURCH DEN UBIQUITIN-VERMITTELTEN PROTEINABBAU .	9
Der SCF-Komplex	11
Der Anaphase-fördernde Komplex oder Cyclosom (APC/C).....	11
MIKROTUBULI UND DIE DYNAMIK DER MITOTISCHEN SPINDEL.....	12
MITOTISCHE KINASEN ALS SCHLÜSSELENZYME DER MITOSE.....	15
Plk1	15
Aurora A.....	15
Mitotischer Eintritt und Zellzyklusregulation	16
Assemblierung einer bipolaren mitotischen Spindel	17
Aurora B.....	18
Aurora C.....	20
DIE ZELLZYKLUS-KONTROLLPUNKTE.....	20
Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt.....	21
Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion des Spindel-Kontrollpunktes ..	23
Die Mitose als Zielstruktur der Chemotherapie	26
Mikrotubuli-bindende Inhibitoren	26
Eg5/KSP-Inhibitoren	27
Aurora-Inhibitoren.....	28
Plk-Inhibitoren.....	29
Der DNA-Schaden-Kontrollpunkt	29
Der Replikationskontrollpunkt.....	31
DIE CHECKPOINT KINASEN CHK1 UND CHK2	31
MOLEKULARE MECHANISMEN DER CHROMOSOMALEN INSTABILITÄT	34
Defekte im Spindel-Kontrollpunkt.....	36
Defekte in der Mikrotubuli-Kinetochor-Dynamik und in der Zentrosomen-Anzahl als Ursache isolierter Anaphase-Chromosomen	37
Defekte in der Zellzyklus-Regulation	40

MATERIALIEN UND METHODEN.....	41
MATERIALIEN	41
Chemikalien	41
Antikörper	42
Oligonukleotide.....	44
Plasmide	46
Puffer und Lösungen	48
Bakterienstämme	48
Humane Zelllinien.....	48
Arbeitsmaterialien	49
Arbeitsgeräte	49
METHODEN	51
Molekularbiologie	51
Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	51
Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	51
Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)	52
Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	52
Ligation von DNA-Fragmenten	53
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
Sequenzspezifische <i>in vitro</i> Mutagenese.....	55
Proteinbiochemie.....	56
Herstellen von Proteinlysaten für Westernblot-Analysen	56
Proteinbestimmung.....	56
Immunpräzipitation von Proteinen (IP).....	56
IP-Kinase-Reaktionen.....	57
<i>In vitro</i> Kinase-Reaktionen.....	58
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
Westernblot.....	59
Coomassiefärbung	59
Immundetektion.....	60
Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	60
Zellkultur.....	63
Kultivierung humaner Zellen	63
Zellzyklus-Synchronisation humaner Zellen.....	64

Transfektion und Infektion humaner Zellen mit Plasmid-DNA.....	65
Karyotyp-Analysen.....	67
Untersuchungen der Zellapoptose	68
Kolonie-Formations-Assay.....	68
Durchflusszytometrie (FACS)	68
Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe von PI (PI-FACS).....	69
Bestimmung des mitotischen Index durch Detektion des MPM2-Epitops (MPM2-FACS).....	69
Immunfluoreszenz-Färbung und Mikroskopie.....	70
Immunfluoreszenz-Färbung.....	70
Mikroskopie.....	71
Lebendzell-Analysen	71
ERGEBNISSE.....	72
1. DER MITOTISCHE SPINDEL-KONTROLLPUNKT UND SEINE INHIBIERUNG DURCH Gö6976	72
Gö6976 ist ein Inhibitor des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes.....	72
Eine Behandlung mit Gö6976 induziert Defekte in der Spindelstruktur und der Chromosomen-Aufreihung	76
Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert die mitotischen Kinasen Aurora A und Aurora B <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	80
Die Gö6976-induzierte aberrante mitotische Progression resultiert in Apoptose.....	86
Inhibierung des Spindel-Kontrollpunktes als Voraussetzung für die Gö6976- Effektivität.....	90
2. DIE ROLLE DES TUMORSUPPRESSORS CHK2 FÜR DEN ERHALT EINER CHROMOSOMALEN STABILITÄT	92
<i>CHK2</i> wird für die Aufrechterhaltung einer chromosomalen Stabilität benötigt	92
Die Chk2 Kinase ist in der Mitose aktiv	93
<i>CHK2</i> wird für die normale Progression durch die Mitose benötigt	95
Der Verlust von <i>CHK2</i> induziert eine mitotische Verzögerung.....	95
Nachweis einer mitotischen Verzögerung bei <i>CHK2</i> -Verlust durch Lebendzell- Analysen	97
Die Spindelmorphologie in Lebendzell-Untersuchungen	99
Der Verlust von <i>CHK2</i> induziert aberrante Spindelstrukturen und Chromosomen-Fehlverteilungen	101

Der Verlust von <i>CHK2</i> induziert einen abnormalen Spindelaufbau nach dem Auflösen eines Monastrol oder Nocodazol-vermittelten mitotischen Arrests.....	104
Der partielle <i>CHK2</i> -Verlust induziert asymmetrische monopolare Spindeln in Gegenwart des Eg5/KSP-Inhibitors Monastrol in HeLa-Zellen	108
Eine <i>CHK2</i> -Defizienz induziert keine DNA-Schäden <i>per se</i>	109
Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die mitotische Progression notwendig	112
Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die zeitgenaue Progression der Mitose notwendig	113
Merotelische Kinetochor-Anheftung als Ursache für CIN	114
Der <i>CHK2</i> -Verlust induziert merotelische Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore.....	115
Die <i>MCAK</i> -Expression supprimiert merotelische Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore	118
<i>MCAK</i> supprimiert CIN in Zellen mit geringer <i>CHK2</i> -Expression	120
DISKUSSION	123
1. DER MITOTISCHE SPINDEL-KONTROLLPUNKT ALS ZIELSTRUKTUR FÜR DIE.....	123
KREBSTHERAPIE	123
2. DIE ROLLE DES TUMORSUPPRESSORS <i>CHK2</i> FÜR DEN ERHALT EINER	135
CHROMOSOMALEN STABILITÄT	135
LITERATURVERZEICHNIS	146
ANHANG	179
ABKÜRZUNGEN.....	179
LEBENSLAUF.....	182
PUBLIKATIONSLISTE	184
AKADEMISCHE LEHRER	186
DANKSAGUNG.....	187
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	189

Zusammenfassung

Während der Mitose werden die Schwesterchromatiden gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt, was für den Erhalt einer Euploidie essentiell ist. Eine chromosomale Instabilität, die fortwährende Fehlverteilung von Chromosomen, als Grundlage der Aneuploidie, ist jedoch ein Hauptkennzeichen von Tumorzellen. Dies deutet auf häufige Tumor-assoziierte Defekte in der Mitose hin. In der Tat wurde gezeigt, dass eine chromosomale Instabilität direkt zur Tumorgenese beitragen kann. Es ist daher von größter Bedeutung, die molekularen Mechanismen der chromosomalen Instabilität zu verstehen und die Gene zu identifizieren, deren Veränderung zu einer aberranten Progression der Mitose beitragen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde *CHK2* als ein Tumorsuppressorgen identifiziert, das für den Erhalt einer chromosomalen Stabilität essentiell ist und in meiner Arbeit habe ich eine neue mitotische Funktion von Chk2 charakterisiert. Die Chk2 Kinase, der zuvor eine Funktion im DNA-Beschädigungs-Signalweg zugeschrieben wurde, wird nicht nur nach einer DNA-Beschädigung, sondern auch während der Mitose aktiviert. Ich konnte zeigen, dass Chk2 für die normale Progression der Mitose und für die ordnungsgemäße Ausbildung einer mitotischen Spindel erforderlich ist. Eine Mindereexpression oder der Verlust der Kinasefunktion von *CHK2* führen zu Defekten in der Spindelstruktur, welche mit einer zeitlichen Verzögerung in der Prometaphase assoziiert sind. In Folge dieser transienten Spindeldefekte wird die Ausbildung von isolierten, sogenannten „lagging“ Chromosomen in der Anaphase, die nicht ordnungsgemäß auf die Tochterzellen segregiert werden können, gefördert. Sowohl das Auftreten dieser isolierten Chromosomen als auch die chromosomale Instabilität konnte durch eine ektopische Expression von *MCAK*, einer Mikrotubuli-Depolymerase, die eine zentrale Funktion bei der Korrektur fehlerhafter Anheftungen von Chromosomen an die mitotische Spindel erfüllt, unterdrückt werden. Bemerkenswerterweise werden diese nicht korrekt an die mitotische Spindel angehefteten Chromosomen, die durch den Verlust von *CHK2* induziert werden, nicht von einem mitotischen Kontrollmechanismus, dem sogenannten Spindel-Kontrollpunkt, erkannt und tragen damit direkt zur Ausbildung der Aneuploidie bei. Meine Ergebnisse zeigen, dass Chk2 überraschenderweise eine zentrale Funktion bei der Ausbildung der mitotischen Spindel erfüllt, die eine Voraussetzung für die ordnungsgemäße Anheftung der Chromosomen und für den Erhalt der chromosomalen

Stabilität darstellt. Somit könnte diese neue mitotische Funktion von Chk2 zu dessen Tumorsuppressor-Funktion beitragen, die bislang wenig verstanden ist.

Neben ihrer fundamentalen Rolle für den Erhalt einer chromosomalen Stabilität stellt die Mitose eine wichtige Zielstruktur für die anti-Tumor Therapie dar. Anti-mitotisch wirksame Chemotherapeutika wie das Taxol und verschiedene *Vinca*-Alkaloide, die seit langem in der Klinik eingesetzt werden, binden an Mikrotubuli und hemmen die Spindeldynamik. Dies führt zu einer gestörten Chromosomen-Aufreihung, die der Spindel-Kontrollpunkt detektiert und in Folge die weitere mitotische Progression hemmt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Spindel-Kontrollpunkt nicht nur eine zentrale Rolle zur Vermittlung des mitotischen Arrests, sondern auch für die Chemotherapie-aktivierte Apoptose spielt. Da Krebszellen häufig Fehlfunktionen des Spindel-Kontrollpunktes aufweisen, können diese somit sowohl zu Chromosomen-Fehlverteilungen als auch zu Chemotherapie-Resistenzen führen. Um solche Therapie-resistenten Tumorzellen anzugreifen, könnte die in verschiedenen Maus- und Zellkulturmodellen gezeigte Essentialität des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes als Grundlage eines neuen Therapiekonzeptes genutzt werden. Dabei könnte der Signalweg des Spindel-Kontrollpunktes direkt als Zielstruktur für die Tumor Therapie dienen.

Unsere Arbeitsgruppe hat die Indolokarbazol-Verbindung Gö6976 als einen Inhibitor des Spindel-Kontrollpunktes identifiziert, der Apoptose in Tumorzellen induziert. In meiner Arbeit habe ich diesen pharmakologischen Inhibitor des Spindel-Kontrollpunktes charakterisiert. Dabei habe ich gezeigt, dass Gö6976 *in vitro* und *in vivo* die mitotischen Kinasen Aurora A und Aurora B hemmt. Die Hemmung von Aurora A durch Gö6976 verursacht dabei Defekte im Spindelaufbau und der Chromosomen-Aufreihung während die gleichzeitige Hemmung von Aurora B zu einer Aufhebung der Spindel-Kontrollpunkt-Funktion führt, was schließlich den mitotischen Austritt der beschädigten Zelle bewirkt. Diese duale Hemmung zweier mitotischer Kinasen, die am Spindel-Kontrollpunkt beteiligt sind, führt letztendlich zu einer effizienten und Tumor-selektiven Induktion von Apoptose und dies erfolgt unabhängig von der Spindel-Kontrollpunkt-Aktivität. Daraus ergibt sich ein neues, vielversprechendes Therapie-Konzept, in dem der mitotische Spindel-Kontrollpunkt und seine assoziierten mitotischen Kinasen als neue Zielstruktur genutzt werden und in dem Resistenz-Mechanismen vermieden werden, die sich aufgrund von Fehlfunktionen des Spindel-Kontrollpunktes ergeben.

Summary

During mitosis, sister chromatids are equally segregated onto two daughter cells, thus ensuring euploidy. Chromosomal instability, the perpetual missegregation of whole chromosomes, is closely associated with aneuploidy and a major hallmark of human cancer. Therefore, it is most important to understand the molecular mechanisms contributing to chromosomal instability and to identify those genes that contribute to an aberrant progression of mitosis in cancer cells.

We identified *CHK2* as a tumoursuppressor gene that is essential for the maintenance of chromosomal stability and my work characterizes a novel mitotic function of Chk2. The Chk2 kinase, which has been implicated in the DNA-damage signaling pathway before, is activated not only in response to DNA damage but also during mitosis. Moreover, Chk2 is essential for the normal and timely progression of mitosis and for the accurate assembly of mitotic spindles. Depletion of *CHK2* or abrogation of its kinase activity causes abnormal mitotic spindle assembly, which is associated with a transient delay in prometaphase. The transient spindle defects upon loss of *CHK2* promote subsequently the generation of isolated, so called „lagging“ chromosomes during anaphase that are not correctly segregated onto daughter cells. Significantly, both, lagging chromosomes and chromosomal instability could be suppressed by ectopic expression of *MCAK*, which acts as a microtubule depolymerase involved in correcting faulty attachments of chromosomes to the mitotic spindle. Remarkably, chromosomes that were not correctly attached to the mitotic spindle due to the loss of *CHK2* can evade detection by a mitotic control mechanism, known as the spindle assembly checkpoint. Thus, loss of *CHK2* can induce CIN in the presence of a functional spindle checkpoint. My results show that Chk2 plays unexpectedly a key role in mitotic spindle assembly, which is a requirement for accurate chromosome attachment and for maintenance of chromosomal stability. Therefore, this new mitotic function of Chk2 might contribute to its tumoursuppressor function, which is so far little understood.

In addition to its fundamental role for the maintenance of chromosomal stability, mitosis is an important target for anti-cancer therapy. Anti-mitotic drugs including various Taxanes or *Vinca* alkaloids, which are used in the clinic for many years, bind to microtubules and interfere with the spindle dynamics. This leads to impaired

chromosome alignment and to the activation of the spindle checkpoint resulting in a mitotic cell cycle arrest.

Previously, our lab could demonstrate that the spindle checkpoint is not only important for the mitotic arrest in response to spindle damaging drugs but also for the chemotherapy-induced apoptosis. Hence, malfunctions of the spindle checkpoint as observed in human cancer not only lead to chromosome missegregation but also to chemotherapy resistance. To target such therapy resistant tumor cells, the spindle checkpoint itself could be exploited as a new therapeutic target, because it is essential for cell viability.

In fact, our lab has identified the indolocarbazol compound Gö6976 as an inhibitor for the spindle checkpoint that induces apoptosis in various tumor cells. In my work, I have characterized this pharmacological inhibitor of the spindle checkpoint and I could show that Gö6976 inhibits the mitotic kinases Aurora A and Aurora B *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of Aurora A by Gö6976 causes defects in spindle assembly and chromosome alignment and the concomitant inhibition of Aurora B causes an override of the spindle checkpoint, which leads to an exit from an aberrant mitosis. This concomitant inhibition of two mitotic kinases, which might both be involved in spindle checkpoint function, finally leads to an efficient, tumor-selective and spindle checkpoint independent induction of apoptosis. Thus, the mitotic spindle checkpoint and its associated mitotic kinases are indeed attractive new chemotherapeutic targets that avoid mechanisms of resistance due to malfunction of the spindle checkpoint.

Einleitung

Der eukaryotische Zellzyklus

Der eukaryotische Zellzyklus kann in vier Hauptphasen unterteilt werden (Abb.1). Die G1-Phase (gap; engl. „Lücke“), die S-Phase (Synthesephase), die G2-Phase (insgesamt als Interphase bezeichnet) und die M-Phase. Die M-Phase besteht wiederum aus Mitose (Kernteilung) und Zytokinese (Zellteilung); (Howard und Pelc 1953; Lodish *et al.* 2008).

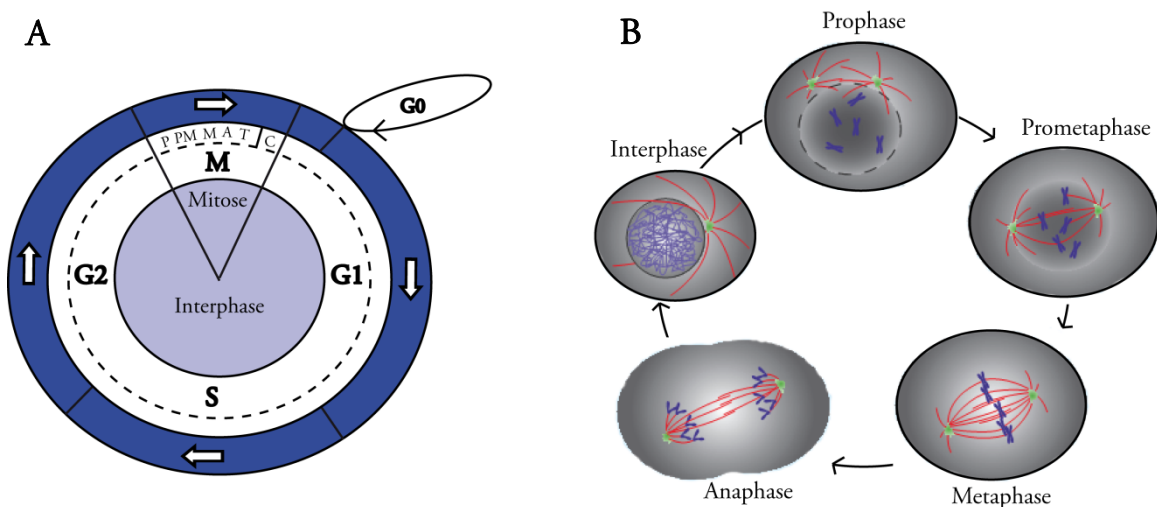


Abbildung 1: Der eukaryotische Zellzyklus. A) Der eukaryotische Zellzyklus kann in die vier Hauptphasen unterteilt werden. Dabei lässt sich die Interphase in G1 („gap; engl.: „Lücke“)-, S (Synthese)-, und G2-Phase unterteilen. Die M-Phase besteht aus Kern- (Mitose) und Zellteilung (Zytokinese, C) und lässt sich in Pro (P)-, Prometa (PM)-, Meta (M)-, Ana (A)- und Telophase (T) unterteilen. Die G0-Phase ist eine Ruhephase in der frühen G1-Phase. B) In der Prophase erfolgt die Trennung der duplizierten Zentrosomen, die Kondensation der Chromosomen und die Auflösung der Kernmembran. In der Prometaphase bildet sich der mitotische Spindelapparat aus und die Chromosomen werden in einem stochastischen Prozess mit ihren Kinetochoren an Mikrotubuli geheftet. In der Metaphase werden die Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle aufgereiht und in der Anaphase zu den beiden entgegengesetzten Zellpolen transportiert. In der Telophase decondensieren die Chromosomen und während der Zytokinese bildet sich eine neue Kernmembran um die beiden Tochterzellen aus. Die Zelle verlässt die Mitose und tritt in die G1-Phase ein. (B, Modifiziert nach Gadde *et al.* 2004.)

Die G1-Phase dient dem Zellwachstum und als Vorbereitung für die DNA-Replikation. Bei einem Fehlen von Wachstumsfaktoren oder bei der Differenzierung können Zellen aus der G1-Phase in eine Ruhephase, G0, eintreten. Dieser Austritt kann vorübergehend sein und Zellen können durch Stimulation wieder in die G1-Phase des Zellzyklus

eintreten. Während der zellulären Seneszenz können Zellen nicht mehr auf Wachstumssignale reagieren und verbleiben permanent in der G0-Phase. In der S-Phase erfolgen DNA-Replikation sowie die Duplikation der Zentrosomen. Auf die S-Phase folgt die G2-Phase, in der sich die Zelle auf die Mitose vorbereitet. Es erfolgt eine räumliche Orientierung (Polarisierung) der Zelle und die Festlegung der Teilungsebene. Desweiteren reifen die duplizierten Zentrosomen durch Modifizierungen der Mutterzentriole und durch eine Anreicherung von γ -TuRC in die PCM (Sankaran und Parvin 2006). Der erhöhte Anteil an γ -TuRC ist dabei mit einer erhöhten Aktivität der Mikrotubuli-Keimung am Zentrosom verbunden.

Während der Zellzyklus etwa 19-40 Stunden dauert, ist die Mitose mit 20 bis 60 Minuten die kürzeste aller Zellzyklus-Phasen. Die Mitose kann in verschiedene Subphasen unterteilt werden: in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Sluder *et al.* 2004). Die Prophase ist das erste Stadium der Mitose. Dabei finden die Kondensation der Chromosomen sowie die Migration der duplizierten Zentrosomen zu den entgegengesetzten Spindelpolen statt (Blangy *et al.* 1995; Nigg 2001). An den Zentrosomen beginnen die Polymerisierung der Mikrotubuli und das Auswachsen des mitotischen Spindelapparates (Hirota *et al.* 2003; Marumoto *et al.* 2005; Lukasiewicz und Lingle 2009).

In der Prometaphase erfolgen die Auflösung der Kernmembran und die Assemblierung der Kinetochore an die zentromerische DNA der Chromosomen. Zentromerische Proteine (Cenp- A, Cenp-B, Cenp-C, Cenp-E etc.) formieren dabei ein Protein-Netzwerk an der DNA (Cheeseman und Desai 2008). Kinetochore sind große, proteinhaltige Superkomplexe (Cheeseman *et al.* 2006; Cheeseman und Desai 2008), welche die Anheftung von Mikrotubuli des mitotischen Spindelapparates an die Chromosomen vermitteln (Maiato und Sunkel 2004; Przewloka und Glover 2009; Sakuno *et al.* 2009).

Während der Metaphase werden die Chromosomen in der Äquatorialebene der mitotischen Zelle aufgereiht, so dass diese sich genau zwischen den beiden Zellpolen befinden. Dieser Prozess wird durch das Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine reguliert, die die Stabilität und Dynamik der mitotischen Spindel regulieren und die Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore koordinieren (Schuyler und Pellman 2001; Gadde und Heald 2004; van der Vaart *et al.* 2009). Die Kohäsion der Schwester-Chromatiden wird durch das Zusammenspiel des Cohesin-Komplexes und der Topoisomerase II gewährleistet (Peters *et al.* 2008; Przewloka und Glover 2009). Dabei lokalisiert Cohesin entlang der gesamten Schwester-Chromatiden und hält diese bis zum

Eintritt in die Anaphase zusammen. Die Entfernung des Cohesin-Komplexes von den mitotischen Chromosomen erfolgt in höheren Eukaryoten in zwei Schritten. Der größte Anteil des Cohesins dissoziiert während der Pro- und Prometaphase von den Chromosomenarmen während der Zentromer nahe Cohesin-Ring bis zum Übergang in die Anaphase erhalten bleibt, wodurch die vorzeitige Trennung der Schwester-Chromatiden verhindert wird (Michaelis *et al.* 1997). Wenn alle Chromosomen vollständig in der Äquatorialebene aufgereiht und bipolar an die mitotische Spindel angeheftet sind, wird das Enzym Separase (extra spindle pole bodies homolog 1, ESPL1) durch Abbau seines Inhibitors Securin (*PTTG1*, pituitary tumor-transforming 1) aktiviert und spaltet den Cohesin-Komplex (Nasmyth *et al.* 2000; Peters 2006; Pines 2006; Peters *et al.* 2008). Durch die Cohesin-Spaltung in der frühen Anaphase (Anaphase A) und die Verkürzung der Kinetochor-Mikrotubuli werden die Schwester-Chromatiden auseinander gerückt.

Die Zytokinese beginnt bereits in der frühen Anaphase mit der Ausbildung eines Aktin/MyosinII-Filament-Ringes und der Einschnürung des Zytoplasmas.

In der Telophase reformieren sich Kernmembranen um die beiden Tochterzellkerne und es findet die Dekondensierung der Chromosomen statt. Ferner elongiert die Spindel weiter, wobei die Distanz zwischen den Polen vergrößert wird. In der späten Telophase depolymerisiert die mitotische Spindel schließlich.

Die Regulation des eukaryotischen Zellzyklus durch CDKs und Cycline

Der koordinierte Ablauf des eukaryotischen Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen, (CDKs, cyclin-dependent kinases) reguliert (Murray 2004; Malumbres und Barbacid 2005). CDKs sind Serin/Threonin-spezifische Kinasen, die viele Zellzyklus-regulierende Proteine phosphorylieren und damit deren Aktivität, Funktion, subzelluläre Lokalisation und Stabilität modulieren. Die oszillierende Aktivität der CDKs während der Progression durch den Zellzyklus wird dabei durch die Bindung an regulatorische Untereinheiten, den Cyclinen, gewährleistet (Johnson und Walker 1999); (Abb. 2). Es gibt verschiedene Cycline und CDKs, die in Abhängigkeit der jeweiligen Zellzyklusphase miteinander komplexieren.

Die G1-Phase des Zellzyklus ist durch die Expression und Aktivierung von Komplexen, die aus CDK4/Cyclin D oder CDK6/Cyclin D zusammengesetzt sind, charakterisiert. Am Übergang von der G1- in die S-Phase wird der Komplex CDK2/Cyclin E, in der S-Phase

CDK2/Cyclin A und am Übergang zur Mitose CDK1/Cyclin A und CDK1/Cyclin B aktiviert (Abb. 2A). Der sogenannte Mitose fördernde Faktor (MPF; mitosis oder maturation promoting factor) ist der erste CDK/Cyclin-Komplex, der entdeckt wurde und setzt sich bei Vertebraten aus CDK1/Cyclin B zusammen (Hunt *et al.* 1992).

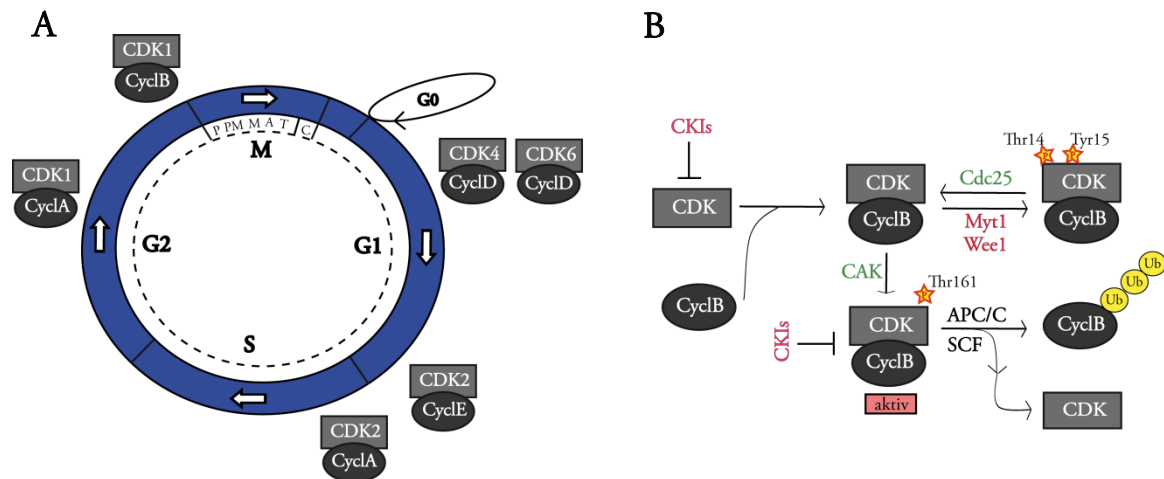


Abbildung 2: Die Regulation des eukaryotischen Zellzyklus. A) Die geordnete Abfolge der Zellzyklus-Phasen wird durch die koordinierte Aktivierung Zellzyklus-spezifischer Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) und ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen (Cycl), gewährleistet. Die M-Phase lässt sich unterteilen in Mitose, Pro (P)-, Prometa (PM)-, Meta (M)-, Ana (A)- und Telophase (T) und Zytokinese (C). B) Die katalytische Aktivität der CDKs wird durch die oszillierende Synthese und den Ubiquitin (Ub)-vermittelten Abbau der Cycline über den Anaphase-fördernden Komplex (APC/C) oder den SCF-Komplex, die Hemmung durch CDK-Inhibitoren (CKIs), Phosphorylierungen (CAK, Wee1, Myt1) und Dephosphorylierungen (Cdc25) reguliert. (Modifiziert nach Malumbres und Barbacid 2005.)

CDK/Cyclin-Komplexe unterliegen komplexen Regulationen (Abb. 2B). Zum einen werden die regulatorischen Cycline Zellzyklus-spezifisch exprimiert und degradiert. Zum anderen wird die Aktivität der CDKs mittels aktivierender (z.B. durch CAK (Cyclin activating complex, bestehend aus CDK7, Cyclin H und MAT1 (ménage à trois 1)); (Lolli und Johnson 2005) und inaktivierender Phosphorylierungen (z.B. durch Wee1 und Myt1 (PKMYT1; protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1)) sowie durch Dephosphorylierungen durch Cdc25 (cell division cycle 25)-Phosphatasen moduliert. Darüber hinaus können CDK/Cyclin-Komplexe durch Bindung von CDK-Inhibitoren (CKIs, cyclin dependent kinase inhibitor) inhibiert werden (Cheng *et al.* 1999; Sherr und Roberts 1999). Die INK4-Familie (inhibitor of CDK4) der CKIs inhibiert spezifisch CDK4 und CDK6 und umfasst die vier Mitglieder p16^{INK4a}, p15^{INK45}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} (Canepa *et al.* 2007). Die CIP/KIP-Familie (CDK inhibitory polypeptides/kinase

inhibitory proteins) umfasst die Mitglieder p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} und hemmt die CDKs 1, 2, 4 und 5 (Dymlacht *et al.* 1997; Nakayama 1998; Denicourt und Dowdy 2004).

Die Regulation der G2/M-Transition

Die Akkumulation von Cyclin A und Cyclin B und die Assoziation zu einem aktiven Kinase-Komplex mit CDK1 ermöglichen den Eintritt in die Mitose. Dazu muss zunächst die Translokation von CDK1/Cyclin B in den Zellkern und die Inhibierung von Wee1 erfolgen (Fung *et al.* 2007; Gong *et al.* 2007). Im Zellkern katalysiert Wee1 die Phosphorylierung von CDK1 an Tyrosin-15, woraufhin CDK1 aus dem Kern exportiert und durch Assoziation mit 14-3-3 σ -Proteinen ins Zytoplasma sequestriert wird. Im Zytoplasma phosphoryliert die Membran gebundene Myt1 Kinase in geringem Maße Tyrosin-15 sowie Threonin-14, wodurch die ATP-Bindung verhindert und die CDK1-Aktivität gehemmt wird (Malumbres und Barbacid 2005; Squire *et al.* 2005). Die beiden inhibitorischen Phosphorylierungen an Threonin-14 und Tyrosin-15 werden beim Beginn der Mitose durch die Phosphatasen Cdc25B und Cdc25C entfernt (Golsteyn *et al.* 1994; Golsteyn *et al.* 1995).

Nukleäres CDK1/Cyclin B kann verschiedene Substrate, wie Lamine und verschiedene Motor-Proteine phosphorylieren und so die Fragmentierung der Kernlamina, die Kondensation der Chromosomen, die Trennung der Zentrosomen, die Reorganisation des Zytoskeletts und den Aufbau der mitotischen Spindel induzieren (Nigg 2001; Malumbres und Barbacid 2005).

Der Austritt aus der Mitose wird durch den proteasomalen Abbau von Cyclin B und damit Inaktivierung von CDK1 gewährleistet (Glutzer *et al.* 1991; Noton und Diffley 2000).

Die Regulation der Mitose durch den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau

Der regulierte zelluläre Abbau von Proteinen, insbesondere auch von Zellzyklus-regulierenden Proteinen erfolgt durch den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg. Dabei werden die Zielproteine zunächst durch Ubiquitin markiert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut. Eine Polyubiquitinierung durch Konjugation über Lysin-48 (K48) dient dabei der Markierung für den proteasomalen Abbau von Proteinen. Da das Proteasom konstitutiv aktiv ist und Substrate daher während des gesamten Zellzyklus für einen proteasomalen Abbau markiert werden können, erfolgt die Regulation der

Ubiquitinierung auf Substrat-Ebene. Die Polyubiquitinierung benötigt die Aktivität von drei Enzymen, das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1), das Ubiquitin-konjugierende Enzym (UBC, ubiquitin-conjugating enzyme; E2) sowie die Ubiquitin-Ligase (E3). Zunächst wird das Ubiquitin-Molekül mittels E1-vermittelter Thioveresterung aktiviert und auf das E2-Enzym übertragen, welches, zusammen mit der E3-Ligase das Ubiquitin-Molekül auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat überträgt. Bislang sind nur relativ wenige Ubiquitin-konjugierende Enzyme bekannt (20-30), wohingegen es mehr als 600 E3 Ubiquitin-Ligasen gibt, wodurch eine hohe Substratspezifität erreicht wird (Pray *et al.* 2002; Pickart und Eddins 2004).

Es können zwei Zellzyklus-spezifische Ubiquitin-Ligasen voneinander unterschieden werden (Abb. 3): Der sogenannte SCF-Komplex (Skp, Cullin, F-box containing complex); (Tyers und Jorgensen 2000; Ang und Wade Harper 2005) und der Anaphase-fördernde Komplex oder Cyclosom (APC/C, Anaphase promoting complex/ cyclosome); (Peters 1998; Acquaviva und Pines 2006; Peters 2006).

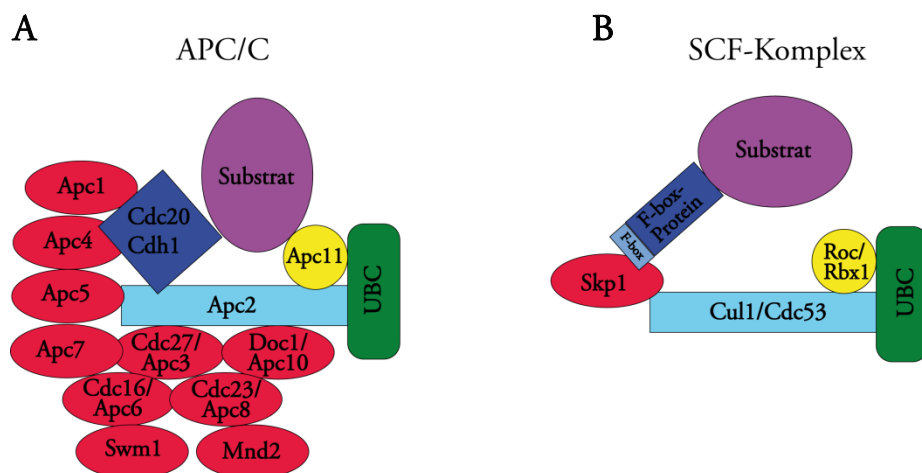


Abbildung 3: Die Ubiquitin-Ligase Komplexe APC/C und SCF. Der Anaphase-fördernde Komplex oder Cyclosom (APC/C) und der SCF (Skp1/Cullin/F-Box Protein)-Komplex besitzen beide eine zentrale katalytische Domäne, die aus einem Cullin-ähnlichen Protein (APC/C2 im APC/C bzw. Cul1/Cdc53 im SCF-Komplex) und einem RING-Finger Protein (APC/C11 im APC/C und Roc1/Rbx1 im SCF-Komplex) besteht. Diese beiden Untereinheiten interagieren mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (Ubc), das aktiviertes Ubiquitin für die Reaktion anbietet. A) Der APC/C besitzt zwei alternative Spezifität-Faktoren für die Substratbindung: Cdc20 und Cdh1. Die anderen Untereinheiten (rot) bilden eine Art Gerüst für den katalytischen Kern und regulieren vermutlich den Zugang zu Substraten und Cofaktoren. B) Bei SCF-Ligasen wird die Substratbindung und Spezifität durch ein bestimmtes F-Box-Protein gewährleistet. Die Skp1-Untereinheit verbindet das F-Box-Protein mit dem katalytischen Kern. (Modifiziert nach Reed 2003.)

Der SCF-Komplex

Der SCF-Komplex (Abb. 3B) setzt sich aus den Komponenten Skp1, Cullin (Cul1/Cdc53), Roc1/Rbx1/Hrt1 und einem F-Box-Protein zusammen (Deshaies 1999; Koepp *et al.* 1999).

In Mammalia gibt es über 70 F-Box-Proteine, wobei die F-Box-Proteine Skp2, hCdc4/FBW7/SEL-10 und β -TrCP bislang am besten charakterisiert sind. Der SCF-Komplex hat eine zentrale Rolle für den G1/S-Übergang des Zellzyklus und ubiquitiniert hauptsächlich Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) wie p27^{Kip1} (Carrano *et al.* 1999; Shirane *et al.* 1999) und p21^{CIP1} (Bornstein *et al.* 2003) sowie den Transkriptionsfaktor E2F-1 (Marti *et al.* 1999). Darüber hinaus wird Cyclin E über den SCF-Komplex abgebaut (Koepp *et al.* 2001; Strohmaier *et al.* 2001). Somit reguliert der SCF-Komplex die Zellzyklus-Progression von der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus (Nakayama und Nakayama 2005).

Der Anaphase-fördernde Komplex oder Cyclosom (APC/C)

Der APC/C (Abb. 3A) ist ein hochmolekularer 20S E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex, der in Vertebraten aus mindestens 12 Untereinheiten besteht (APC1-8, APC10-11, APC13 und Cdc26) und Zellzyklus-Proteine für eine Degradation durch das 26S Proteasom markiert (Zachariae *et al.* 1998; Castro *et al.* 2005; Acquaviva und Pines 2006; Pines 2006). Der APC/C ist an der Ubiquitinierung verschiedener mitotischer Substrate beteiligt wie u.a. Motorproteine (Kid/Kif22a), mitotische Kinasen (Plk1, Aurora A, Aurora B), Cycline (Cyclin A, Cyclin B) und Securin (Reed 2003; Pines 2006). Ähnlich wie beim SCF besteht der katalytische Kern des APC/C ebenfalls aus einem Cullin-ähnlichen Protein (APC/C2) und einem RING-Finger Protein (APC/C11), die zusammen mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) interagieren (Reed 2003). Der APC/C kann mit dem E2-Enzym UBCH10 zusammenwirken (Aristarkhov *et al.* 1996; Yu *et al.* 1996; Bastians *et al.* 1999).

Die Substratspezifität des APC/C wird durch die Cofaktoren Cdc20 und Cdh1 vermittelt (Visintin *et al.* 1997; Castro *et al.* 2005). Cdc20 bindet während der Prometa- und Metaphase an den APC/C und erlaubt die Erkennung von Substraten mit einer D-Box (destruction box); (Yamano *et al.* 2004; Stewart und Fang 2005). Die Bindung von Cdh1 erfolgt hingegen in späteren Mitose-Stadien (Ana- und Telophase) sowie in der G1-Phase und vermittelt die Erkennung von Substraten mit D-Box, KEN-Box (Pfleger und

Kirschner 2000), A-Box (Littlepage und Ruderman 2002) oder doppeltem Motiv aus D-Box und DAD-Box (D box activated domain); (Castro *et al.* 2002). Die Aktivierung des APC/C erfolgt neben Bindung der Cofaktoren Cdc20 oder Cdh1 auch zusätzlich durch Phosphorylierungen verschiedener Untereinheiten durch CDK1 und Plk1 (Zachariae und Nasmyth 1999; Kraft *et al.* 2003).

In den frühen Phasen der Mitose wird der APC/C durch die Spindelkontrollpunkt-Proteine Mad2 und BubR1 gehemmt, die direkt an den APC/C binden können und dadurch die Assoziation mit dem Aktivator Cdc20 verhindern (Li *et al.* 1997; Fang *et al.* 1998; Sudakin *et al.* 2001; Tang *et al.* 2001; Fang 2002). Bub1, ein weiteres Spindelkontrollpunkt-Protein phosphoryliert Cdc20 und inhibiert dadurch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von APC/C^{Cdc20} (Tang *et al.* 2004).

Mikrotubuli und die Dynamik der mitotischen Spindel

Mikrotubuli stellen einen essentiellen Bestandteil des Zytoskeletts dar und bilden während der Mitose den mitotischen Spindelapparat aus. Mikrotubuli sind hochdynamische Polymere, die aus globulären α/β -Tubulin-Heterodimeren zusammengesetzt sind (Mollinedo und Gajate 2003; Wade 2009); (Abb. 4). Während die Minus-Enden mit dem Zentrosom verbunden sind, werden an den dynamischen, wachsenden Plus-Enden die Tubulin-Untereinheiten angefügt (Wiese und Zheng 1999; Moritz *et al.* 2000).

Es gibt zwei Arten von Mikrotubuli-Dynamik, die nicht im Gleichgewicht stehen: Die sogenannte dynamische Instabilität und das „Treadmilling“ (engl.: „Tretmühle“); (Abb. 4). Die dynamische Instabilität beschreibt einen Prozess, bei dem die individuellen Mikrotubuli zwischen Phasen des Wachstums und der Kürzung wechseln. Das „Treadmilling“ beschreibt das netto Wachstum am Plus-Ende und die netto Kürzung am Minus-Ende des Mikrotubulus (Margolis und Wilson 1998; Grego *et al.* 2001).

Mitotische Mikrotubuli weisen eine 20 bis 100-fach höhere Dynamik als Interphase-Mikrotubuli auf (Mitchison und Kirschner 1984; Saxton *et al.* 1984; Belmont *et al.* 1990; Hayden *et al.* 1990; Piehl *et al.* 2004). Dadurch wird ein rascher Wechsel zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli und dem Auswachsen und Schrumpfen der Spindelfasern ermöglicht. In einem stochastischen, als Suchen und Finden („search and capture“) bezeichneten Prozess, findet schließlich die Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore statt (Gadde und Heald 2004).

Pharmakologische Inhibitoren können die dynamische Instabilität der Mikrotubuli beeinträchtigen. *Vinca* Alkaloide (Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin) und Nocodazol binden direkt an das β -Tubulin und destabilisieren die mitotische Spindel durch Depolymerisierung der Mikrotubuli (De Brabander *et al.* 1976; De Clerck und De Brabander 1977; Jordan und Wilson 2004). Taxane wie Taxol (ein Alkaloid aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*) und Epothilone (aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*) wirken Mikrotubuli stabilisierend (Wani *et al.* 1971; Gerth *et al.* 1996). Diese Substanzen werden wegen ihrer Fähigkeit, mit der Spindeldynamik zu interferieren, nicht nur in der Forschung als experimentelle Werkzeuge eingesetzt, sondern dienen ebenfalls als Chemotherapeutika in der Krebs-Therapie, wo sie gezielt in der Mitose wirken (Schmidt und Bastians 2007).

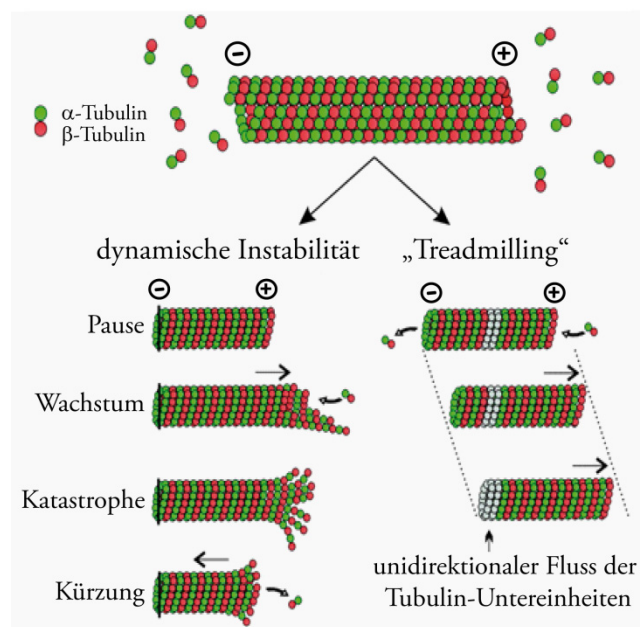


Abbildung 4: Dynamische Instabilität und „Treadmilling“. Mikrotubuli (MT) sind Polymere aus α/β -Tubulin-Dimeren, die sich zu 12-15 Protofilamenten zu einer hohlen Röhre arrangieren. Mikrotubuli (MT) wechseln zwischen Phasen des Wachstums und des Schrumpfens. Dieser Prozess wird als dynamische Instabilität bezeichnet. Dabei wächst (polymerisiert) und schrumpft (depolymerisiert) das Plus-Ende schneller als das Minus-Ende. Der Übergang vom Wachstum oder pausierendem Zustand zum Schrumpfen wird als Katastrophe und der Übergang von der Schrumpfung zum Wachstum oder Pausieren des MT als Rettung (Wachstum bzw. „rescue“) bezeichnet. „Treadmilling“ bezeichnet das Netto-Wachstum an einem MT-Ende und die netto-Kürzung des anderen MT-Endes. Dabei besteht ein intrinsischer Fluss von Tubulin-Untereinheiten vom Minus-Ende zum Plus-Ende, der von der Konzentration frei löslichen Tubulins an den MT-Enden abhängt. (Modifiziert nach Dixit *et al.* 2004.)

Eine Vielzahl von Proteinen kann die Mikrotubuli-Dynamik regulieren. Dazu gehören z.B. als MAPs (Microtubule Associated Proteins) bezeichnete Proteine sowie Motorproteine wie Dyneine und Kinesine, die für den ATP-abhängigen Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind (Hirokawa 1998). Kinesin-verwandte Proteine regulieren unter anderem die Interaktion zwischen Mikrotubuli und den Kinetochoren (z.B. das Kinetochor-assoziierte Mikrotubuli Motorprotein Cenp-E (Wood *et al.* 1997; Yao *et al.* 2000), die Trennung der Zentrosomen (z.B. das Kinesin-verwandte Motorprotein Eg5/KSP (Blangy *et al.* 1995) oder die Orientierung und Aufreihung der Chromosomen mit Hilfe der Polstrahlung (z.B. das Chromokinesin Kid/Kif22; (Levesque und Compton 2001). Zu den MAPs gehören ebenso regulatorische Proteine wie Stathmin/Op18, ch-TOG, MCAK, Tau, EB1 oder Dynactin, welche die Dynamik der Mikrotubuli verändern.

MAPs können, je nach ihrer Funktion, in zwei Klassen unterteilt werden: Mikrotubuli stabilisierende oder Mikrotubuli destabilisierende Proteine. Zu den Mikrotubuli stabilisierenden MAPs gehören u.a. MAP1, MAP2, MAP4, EB1, ch-TOG, TCTP, Tau und HURP (Gadde und Heald 2004). Ein wichtiger Regulator einer bipolaren Spindel ist das ch-TOG (humanes Homolog von XMAP215/Dis1), das eine Funktion zur Fokussierung der Minus-Enden von Mikrotubuli an den Zentrosomen ausübt.

Zu den Mikrotubuli destabilisierenden Proteinen gehören u.a. OP18 (Onkoprotein 18)/Stathmin (Belmont *et al.* 1996; Rubin und Atweh 2004), Katanin und die Mitglieder der KinI-Familie Kif2A (Ganem und Compton 2004; Manning *et al.* 2007) und MCAK/Kif2C (Moore und Wordeman 2004; Wordeman *et al.* 2007; Cooper *et al.* 2010). MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) ist ein Mikrotubuli destabilisierendes Kinesin der KinI Familie, das sowohl an Zentromeren als auch an Zentrosomen lokalisiert ist und eine wichtige Funktion in der Mikrotubuli-Dynamik, der Assemblierung der mitotischen Spindel und der Segregation der Chromosomen erfüllt (Moore und Wordeman 2004). An den Spindelpolen reguliert MCAK die Mikrotubuli-Dynamik durch Fokussierung der Mikrotubuli-Aster und stellt damit den Gegenspieler von ch-TOG dar.

Zentromer lokalisiertes MCAK ist an der Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen beteiligt, die während der frühen Pro- und Prometaphase oft entstehen (Gorbsky 2004; Kline-Smith *et al.* 2004; Bakhoun *et al.* 2009).

Mitotische Kinasen als Schlüsselenzyme der Mitose

Zu den zentralen mitotischen Kinasen, die an der Regulation des mitotischen Eintritts, der Duplikation und Reifung der Zentrosomen, der Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel sowie an der Trennung der Schwester-Chromatiden und der Zytokinese beteiligt sind, zählen unter anderem Plk1 und die zur Aurora-Familie gehörenden Kinasen Aurora A, Aurora B und Aurora C.

Plk1

Plk1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die an der Regulation der Zentrosomen-Reifung, dem Aufbau des mitotischen Spindelapparates und der Kontrolle des mitotischen Eintritts involviert ist (Golsteyn *et al.* 1995; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2001; Sumara *et al.* 2004; van Vugt und Medema 2005; Seki *et al.* 2008). Plk1 lokalisiert während der G2-, Pro- und Metaphase an den Zentrosomen und Kinetochoren kondensierter Chromosomen sowie in der Ana- und Telophase an der Zentralspindel und dem Mittelkörper (Golsteyn *et al.* 1995; Arnaud *et al.* 1998). In der G2-Phase und Mitose wird Plk1 durch Phosphorylierung aktiviert, wobei die Kinase-Aktivität in der Mitose am höchsten ist (Mundt *et al.* 1997). Es wurde gezeigt, dass der Cofaktor Bora an der Aurora A-vermittelten Aktivierung von Plk1 beteiligt ist (Seki *et al.* 2008); (Abb. 7A). Plk1 weist eine Vielzahl an mitotischen Substraten auf, welche z.B. für die Progression und Regulation der Mitose benötigt werden. Dazu zählen Myt1, Wee1, Cdc25, Cyclin B, sowie APC/C und Cohesin (Lane und Nigg 1996; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2002; van Vugt und Medema 2005) sowie Proteine, die an der Spindeldynamik und Zentrosomenreifung beteiligt sind.

Aurora Kinasen

Mammalia besitzen drei Aurora Kinasen, Aurora A, Aurora B und Aurora C (Giet und Prigent 1999), die strukturell ähnlich sind und wichtige Funktionen in der Mitose erfüllen.

Aurora A

Aurora A ist in der späten G2-Phase an den Zentrosomen und in der Mitose zusätzlich an den Spindelpolen sowie entlang der Spindel-Mikrotubuli lokalisiert (Vader und Lens

2008) und erfüllt essentielle Funktionen zum Aufbau einer bipolaren mitotischen Spindel sowie bei dem Eintritt in die Mitose.

Mitotischer Eintritt und Zellzyklusregulation

Aurora A fördert die Progression in die Mitose durch Regulation der initialen Aktivierung von CDK1/Cyclin B am Zentrosom (Hirota *et al.* 2003; Satinover *et al.* 2006); (Abb. 5A). Während der G2-Phase phosphoryliert Aurora A Plk1 im Komplex mit dem Cofaktor Bora (Macurek *et al.* 2008; Seki *et al.* 2008). Aktive Plk1-Kinase kontrolliert die Aktivität von CDK1/Cyclin B durch Phosphorylierung der Cdc25B Phosphatase und Degradierung der CDK1 inhibitorischen Kinase Wee1 (van Vugt *et al.* 2004; van Vugt *et al.* 2005). Zusätzlich phosphoryliert und aktiviert Aurora A Cdc25B an den Zentrosomen (Cazales *et al.* 2005), wodurch die initiale zentrosomale Aktivierung von CDK1/Cyclin B durch Cdc25B erfolgen kann (Lindqvist *et al.* 2005); (Abb. 5A).

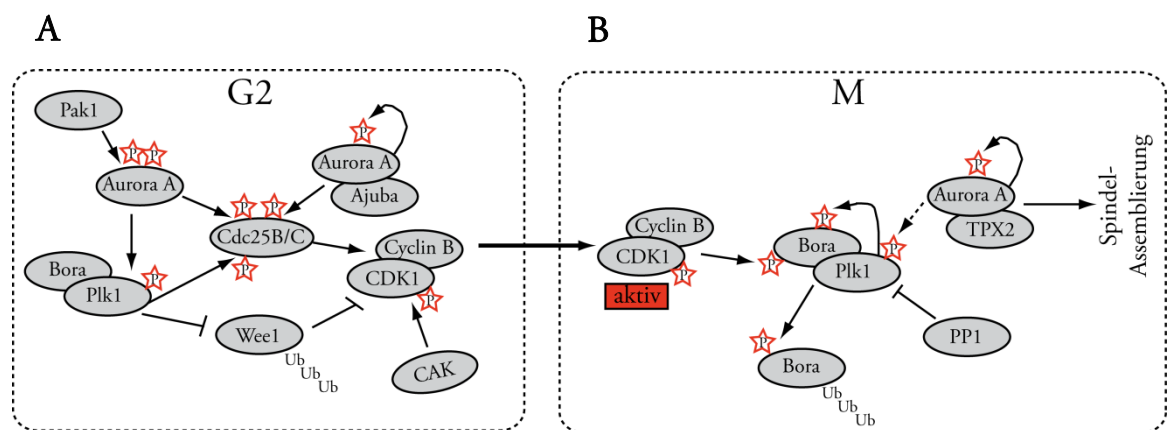


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen des mitotischen Eintritts. A) Während der G2-Phase phosphoryliert Aurora A im Komplex mit Bora Plk1 an Threonin-210. Aktiviertes Plk1 phosphoryliert Cdc25C und Wee1, was zur Aktivierung von CDK1/Cyclin B und dem mitotischen Eintritt führt. Aurora A kann ebenso Cdc25B durch Phosphorylierung an Serin-353 direkt aktivieren (Dutertre *et al.* 2004; Cazales *et al.* 2005). B) Während der Mitose phosphoryliert aktives CDK1 Bora, was zur Interaktion mit und Phosphorylierung durch Plk1 führt, wodurch der proteasomalen Abbau von Bora induziert wird. Aurora A kann dadurch mit TPX2 interagieren und als Komplex die Assemblierung der bipolaren Spindel regulieren. Die Phosphorylierung von Plk1 an Threonin-210 während der Mitose, wird durch bislang unbekannte Kinasen aufrecht erhalten (gestrichelter Pfeil). Umgekehrt wird pThreonin-210-Plk1 durch die Phosphatase PP1 entfernt. (Modifiziert nach Macurek *et al.* 2009.)

Während der Mitose wird Bora von CDK1 und Plk1 phosphoryliert (Chan *et al.* 2008; Seki *et al.* 2008); (Abb. 5B). Die Phosphorylierung von Bora durch Plk1 schafft dabei ein

Phosphodegron, welches von der β -TrCP-Untereinheit der SCF-Ubiquitin-Ligase erkannt wird und Bora für den proteasomalen Abbau markiert (Chan *et al.* 2008; Seki *et al.* 2008). Da Bora mit TPX2 (targeting protein for Xklp2) um die Bindung an Aurora A konkurriert, (Chan *et al.* 2008) könnte der Abbau von Bora während der Mitose den Switch zur Formierung des Aurora A/TPX2-Komplexes initiieren (Abb. 5B). TPX2 rekrutiert aktiviertes Aurora A an die mitotische Spindel und ist an der Polymerisation der Mikrotubuli und der Organisation der Spindelpole beteiligt (Wittmann *et al.* 2000; Gruss *et al.* 2002; Kufer *et al.* 2002).

Assemblierung einer bipolaren mitotischen Spindel

Zur Etablierung einer bipolaren, mitotischen Spindel ist die Aurora Kinase essentiell. Aurora A reguliert dabei die Assemblierung der bipolaren Spindel durch Koordinierung der Wirkungsweisen der verschiedenen Motorproteine und der verschiedenen zentrosomalen Proteinen. In verschiedenen Studien mit *D. melanogaster* (Glover *et al.* 1995), *C. elegans* (Hannak *et al.* 2001) oder *Xenopus* (Giet und Prigent 2000) konnte weiterhin gezeigt werden, dass Aurora A für die Separierung und Reifung der Zentrosomen sowie für die Stabilität einer bipolaren mitotischen Spindel erforderlich ist. Desweiteren wurde die Aktivität von Aurora A im Ran-GTPase-Signalweg für die Regulation der Zentrosomen-unabhängigen Spindelassemblierung gezeigt (Abb. 6). Dabei setzt GTP gebundenes Ran TPX2 vom inhibitorischen Importin α/β -Komplex frei, welches an Aurora A binden und dadurch die Autophosphorylierung und Aktivierung an Threonin-288 von Aurora A stabilisiert (Eyers *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003) und vor Dephosphorylierung und Inhibierung durch Phosphatase 1 (PP1) schützt (Bayliss *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003). Aktivierte Aurora A Kinase kann dann die Spindelbipolarität durch Bindung an und Phosphorylierung von Substraten wie Eg5 oder TACC3 regulieren (Giet *et al.* 1999; Wilde *et al.* 2001; Giet *et al.* 2002; Kinoshita *et al.* 2005); (Abb. 6). Zur Kontrolle der Spindeldynamik trägt auch die Aurora A-abhängige Phosphorylierung von HURP bei. HURP assoziiert dabei mit den Mikrotubuli und reguliert Ran-GTP-abhängig den Spindelaufbau und die Spindelstabilität (Wong und Fang 2006; Wong *et al.* 2008).

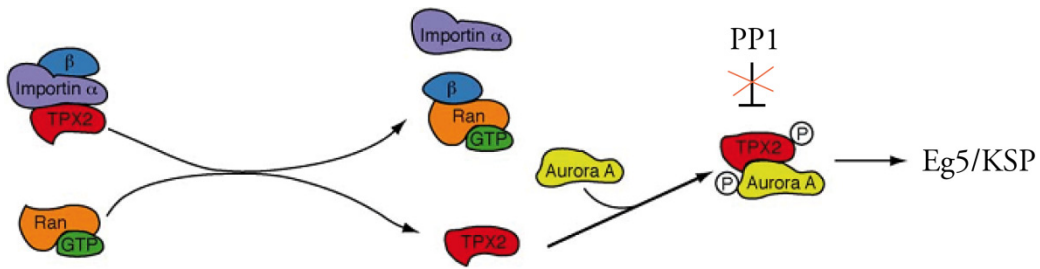


Abbildung 6: Regulation von Aurora A über den Ran-GTPase-Signalweg. Ran-GTP und Aurora A sind involviert in der Assemblierung einer bipolaren Spindel über den Ran-GTPase-Signalweg. Dabei stimuliert Ran-GTP die Dissoziation von TPX2 vom inhibitorischen Importin α/β -Komplex. TPX2 kann daraufhin Aurora A binden und durch Phosphorylierung aktivieren. Die Bindung von TPX2 an Aurora A generiert eine aktive Konformation, die Aurora A vor einer Dephosphorylierung und Inhibition durch Phosphatase 1 (PP1) beschützt. Aktive Aurora A Kinase reguliert die Spindel-Bipolarität vermutlich über Substrate wie Eg5/KSP. (Modifiziert nach Ducat *et al.* 2004.)

Aurora B

Die Aurora B Kinase ist eine Komponente des „chromosomalen Passagier“-Komplexes (CPC, chromosomal passenger complex), welcher während der Prophase entlang der Chromosomen, während der Prometa- und Metaphase am inneren Zentromer, in der Anaphase an der Zentralspindel und in der Telophase am Mittelkörper lokalisiert ist (Ducat und Zheng 2004; Bolanos-Garcia 2005).

In humanen Zellen besteht der CPC aus der Aurora B Kinase, (Terada *et al.* 1998) und drei weiteren Untereinheiten, INCENP (Cooke *et al.* 1987; Adams *et al.* 2000), Survivin und Borealin/Dasra-B (Li *et al.* 1998; Honda *et al.* 2003; Gassmann *et al.* 2004; Klein *et al.* 2006); (Abb. 7).

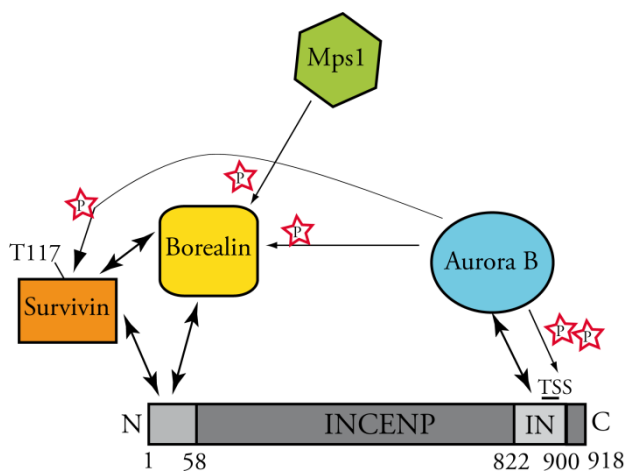


Abbildung 7: Interaktionen des CPC. Schematische Darstellung direkter Interaktionen zwischen den „chromosomalen Passagier“-Komplex (CPC)-Proteinen und Aurora B-Phosphorylierungen. Survivin und Borealin interagieren mit dem N-Terminus von INCENP, wohingegen Aurora B an die C-terminale IN-Box von INCENP bindet. Die Mps1-vermittelte Phosphorylierung von Borealin resultiert in einer gesteigerten Aurora B-Aktivität. (Modifiziert nach Vader *et al.* 2006.)

Diese Proteine kontrollieren die Rekrutierung, enzymatische Aktivität und Stabilität von Aurora B (Lens *et al.* 2006). INCENP bildet eine Art Gerüst, welches mit allen anderen drei Komponenten des CPC interagiert (Kim *et al.* 1999; Adams *et al.* 2000; Wheatley *et al.* 2001; Bolton *et al.* 2002; Gassmann *et al.* 2004). Survivin ist ein Mitglied der IAP (Inhibitor of apoptosis Protein) Familie (Okada und Mak 2004), das die anderen drei Komponenten des CPC binden kann und von Aurora B phosphoryliert wird (Carvalho *et al.* 2003; Wheatley *et al.* 2004). Ob Survivin die Aktivität von Aurora B reguliert (Bolton *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Honda *et al.* 2003), ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde aber gezeigt, dass Survivin Aurora B zum inneren Zentromer rekrutiert (Vader *et al.* 2006), wobei Survivin indirekt, über eine Bindung an INCENP, mit Aurora B interagiert (Bolton *et al.* 2002; Vader *et al.* 2006). Borealin wird von Aurora B (Gassmann *et al.* 2004) und von Mps1 (Jelluma *et al.* 2008) phosphoryliert. Die Mps1-vermittelte Phosphorylierung von Borealin resultiert dabei in einer Erhöhung der Aurora B-Aktivität.

Der CPC erfüllt Funktionen bei der Kondensierung der Chromosomen (Crosio *et al.* 2002; Goto *et al.* 2002; Fischle *et al.* 2005; Hirota *et al.* 2005) sowie der Assemblierung und Stabilisierung der mitotischen Spindel (Gassmann *et al.* 2004; Ohi *et al.* 2004; Sampath *et al.* 2004; Gadea und Ruderman 2005) und der Regulation der mitotischen Progression und Zytokinese (Vader *et al.* 2006; Ruchaud *et al.* 2007). Aurora B trägt zur Kondensation der Chromosomen bei, indem es Untereinheiten des Condensin I-Komplexes phosphoryliert und zu den mitotischen Chromosomen rekrutiert (Maddox *et al.* 2006; Lipp *et al.* 2007; Takemoto *et al.* 2007). Die Aurora B-vermittelt Phosphorylierung von Histon H3 an Serin-10 während der späten G2/Prophase, wurde ebenfalls mit der Kondensation der Chromosomen in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass diese Phosphorylierung die Dissoziation von HP-1 (heterochromatin protein 1) vom Heterochromatin in der Mitose bewirkt (Fischle *et al.* 2005; Hirota *et al.* 2005), wodurch die Kondensation der Chromosomen erleichtert und die Bindung des Cohesin-Komplexes ermöglicht wird (Bernard *et al.* 2001; Nonaka *et al.* 2002). Aurora B ist ebenfalls, zusammen mit Plk1, an der Entfernung des Cohesin-Komplexes von den Chromosomen-Armen während der Prophase beteiligt (Sumara *et al.* 2002; Gimenez-Abian *et al.* 2004). Desweiteren reguliert Aurora B die Chromatin-induzierte Spindelassemblierung über die beiden Mikrotubuli depolymerisierenden Substrate MCAK (Sampath *et al.* 2004; Tulu *et al.* 2006) und Stathmin/OP18 (Gadea und Ruderman 2006; Kelly *et al.* 2007). Die Aurora B-vermittelte Regulation von MCAK und

die Fähigkeit, Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen auflösen zu können, spielen eine große Rolle bei der Korrektur fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen (Adams *et al.* 2001; He *et al.* 2001; Murata-Hori und Wang 2002; Tanaka *et al.* 2002; Hauf *et al.* 2003; Gassmann *et al.* 2004).

Die Aktivität von Aurora B ist ebenfalls für die korrekte Ausführung der Anaphase und Zytokinese notwendig (Terada *et al.* 1998; Severson *et al.* 2000; Adams *et al.* 2001; Giet und Glover 2001; Kaitna *et al.* 2002; Ditchfield *et al.* 2003; Hauf *et al.* 2003). Dabei reguliert Aurora B die korrekte Funktion und Lokalisation von Centralspindlin (Kaitna *et al.* 2000; Minoshima *et al.* 2003; Guse *et al.* 2005), ein GTPase aktivierendes Protein und Kinesin, das seinerseits zum Teil die Aktivität von RhoA, eine GTPase mit essentieller Funktion für den kontraktilen Ring (Piekny *et al.* 2005) beeinflusst (Tatsumoto *et al.* 1999; Yuce *et al.* 2005; Zhao und Fang 2005; Nishimura und Yonemura 2006). Aurora B phosphoryliert weiterhin mehrere Proteine, die in der Zytokinese involviert sind wie Vimentin (Goto *et al.* 2003), Myosin II (Murata-Hori *et al.* 2000) und Desmin (Kawajiri *et al.* 2003).

Aurora C

Über die Kinase Aurora C ist bislang wenig bekannt. Aurora C ist nur in den Keimzellen des Hodens, nicht aber in ausdifferenzierten Geweben oder Krebszellen detektiert worden (Tang *et al.* 2006), weshalb eine Funktion während der Spermatogenese vermutet wird (Sasai *et al.* 2004; Kimmins *et al.* 2007). Es wird vermutet, dass die Kinase-Funktion von Aurora C mit Aurora B überlappt und die Aurora B Kinase-Funktion in der Mitose von Aurora C komplementiert wird (Sasai *et al.* 2004). Aurora C kann deshalb als chromosomales Passagier Protein angesehen werden, das in frühen Phasen der Mitose an den Zentromeren und später an der Mittelzone lokalisiert und mit Aurora B kooperiert, um die Segregation der Chromosomen und die Zytokinese zu regulieren.

Die Zellzyklus-Kontrollpunkte

Zellzyklus-Kontrollpunkte stellen wichtige Kontrollmechanismen dar, die die fehlerfreie und koordinierte Progression durch den Zellzyklus überwachen. Treten Störungen innerhalb der einzelnen Zellzyklus-Phasen auf, lösen die entsprechenden Zellzyklus-Kontrollpunkte eine verzögerte Progression oder einen Zellzyklus-Arrest aus, der Zeit für die Reparatur der Schäden schafft. Bei irreparablen Schäden können apoptotische

Signalwege aktiviert werden, die beschädigte Zellen entfernen. Damit stellen Zellzyklus-Kontrollpunkte wichtige Mechanismen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität dar. Fehlerhafte Signalwege innerhalb dieser Kontrollmechanismen können die Tumorigenese fördern und die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika beeinflussen.

Abhängig vom Zeitpunkt und der Art des Schadens lassen sich verschiedene Zellzyklus-Kontrollpunkte voneinander unterscheiden: Einen mitotischen Spindel-Kontrollpunkt und DNA-Schaden-Kontrollpunkte in der S-Phase, G1/S-Phase und in der G2-Phase.

Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt

Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt (SCP, spinde checkpoint oder SAC, spinde assembly checkpoint) ist ein Signalweg, der die korrekte, bipolare Anheftung der Chromosomen an die mitotische Spindel überwacht und die Segregation der Schwester-Chromatiden auf die Tochterzellen sicher stellt (Bharadwaj und Yu 2004; Musacchio und Salmon 2007). Der SCP wird während der Prophase einer normalen Mitose oder nach der Behandlung von Zellen mit antimitotisch wirkenden Substanzen, die mit der Ausbildung einer mitotischen Spindel interferieren (z.B. Taxane, *Vinca* Alkaloide und Kinesin Inhibitoren) aktiviert (Jordan und Wilson 2004). Dabei wird der Eintritt in die Anaphase inhibiert, bis alle Kinetochore korrekt an die Spindel-Mikrotubuli angeheftet sind und in der Metaphase unter Spannung stehen (Campbell und Gorbsky 1995; Rieder *et al.* 1995; Pinsky und Biggins 2005).

Eine Aktivierung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes ist mit der Rekrutierung von SCP-Proteinen an Kinetochore assoziiert und resultiert in der Inhibierung der E3 Ubiquitin-Ligase APC/C, welche mitotische Proteine für eine Degradation durch das 26S Proteasom markiert (Yu 2002). Schlüsselsubstrate des APC/C sind Securin und Cyclin B, deren Degradation für den Eintritt in die Anaphase bzw. für den mitotischen Austritt notwendig ist (Hagting *et al.* 2002; Peters 2002; Musacchio und Salmon 2007). Daher verhindert ein aktivierter SCP den Eintritt in die Anaphase durch Aufrechterhaltung der Chromatid-Kohäsion und Inhibierung der Protein-Proteolyse (Abb. 8).

Der SCP-Signalweg involviert die Funktion mehrerer hoch konservierter Proteine wie Mad1, Mad2, Mad3/BubR1, Bub1, Bub3 und Mps1 sowie einige andere weniger gut charakterisierte Proteine wie der RZZ-Komplex, die Tao1-Kinase und das mRNA-bindende Protein Rae1 (Li und Benezra 1996; Taylor und McKeon 1997; Jablonski *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1998; Bharadwaj und Yu 2004).

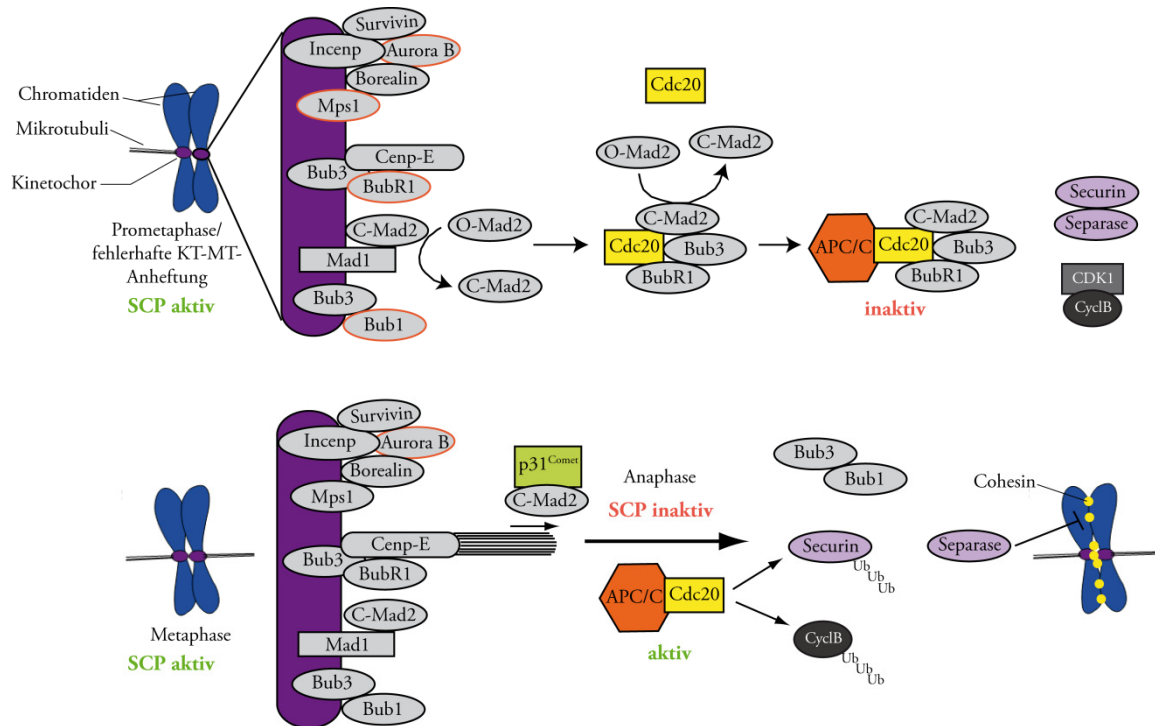


Abbildung 8: Die molekularen Mechanismen des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes. In der Prometaphase werden durch fehlende bipolare Anheftung der Chromosomen an die Mikrotubuli und durch fehlende Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren die SCP-Proteine an die Kinetochore rekrutiert. Es erfolgt die Ausbildung eines quartären inhibitorischen mitotischen Checkpoint-Komplexes (MCC), der sich aus Mad2, Bub3, BubR1 und dem APC/C-Aktivator Cdc20 zusammen setzt. Bei Erreichen eines Metaphase-Alignments, wird der SCP inaktiviert. Das Effektorprotein Mad2 wird vermutlich durch Bindung von p31^{COMET} inaktiviert und die Komponenten des SCP werden entlang der Mikrotubuli zu den Spindelpolen transportiert. Dadurch wird die inhibitorische Wirkung des MCC aufgehoben und die APC/C^{Cdc20}-Ubiquitin-Ligase kann den Abbau von Securin und Cyclin B initiieren. Dies führt zum Beginn der Anaphase und durch Spaltung der Cohesin-Komplexe zur Trennung der Schwester-Chromatiden. Aktive Kinasen sind in Rot hervorgehoben.

Die SCP-Komponenten Mad1-3 (mitotic arrest defcient) und Bub1-3 (budding uninhibited by benomyl) wurden ursprünglich in *S. cerevisiae* identifiziert (Hoyt *et al.* 1991; Li und Murray 1991).

Mad1 stellt einen Koaktivator von Mad2 dar und der Mad1/Mad2-Komplex ermöglicht die weitere Rekrutierung von Mad2 an das Kinetochor (Chen *et al.* 1999; Chung und Chen 2002; Luo *et al.* 2002; Sironi *et al.* 2002). Mad2 existiert dabei in einer „geschlossenen“ Konformation (C-Mad2; closed-Mad2), bei der Mad2 an den Kinetochor-Rezeptor Mad1 oder an das Ziel-Protein im SCP, Cdc20, bindet und einer „offenen“ Konformation (O-Mad2; open-Mad2), bei der Mad2 nicht an diese Liganden bindet (Abb. 8). In einem sogenannten „Mad2 template“-Model bildet die C-Mad2-

Konformation, welche konstitutiv an Mad1 gebunden ist dabei eine Art Matrize für die Umwandlung von O-Mad2 in C-Mad2, welches dabei Cdc20 bindet und somit den APC/C inhibiert (De Antoni *et al.* 2005). Durch die fortwährende Katalyse der Konversion von O-Mad2 in C-Mad2/Cdc20-Komplexe, die wiederum als Matrize für weitere C-Mad2/Cdc20-Komplexe dienen, wird dabei das SCP-Signal amplifiziert.

Die SCP-Kinasen Bub1 und BubR1 besitzen neben ihrer SCP-Funktion auch eine Funktion bei der Regulation der Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore (Lampson und Kapoor 2005; Meraldi und Sorger 2005). Außerdem reguliert Bub1 die Lokalisierung von Shugoshin ans Zentromer, welches für die Erhaltung der Scc1-Untereinheit des Cohesin-Komplexes und der Kohäsion der Schwester-Chromatiden erforderlich ist (Kitajima *et al.* 2005; McGuinness *et al.* 2005). Mps1 (monopolar spinde l) ist eine Kinetochor-lokalisierte Kinase mit dualer Spezifität (Tyrosin- oder Serin/Threonin-Phosphorylierung); (Mills *et al.* 1992), welche für die korrekte Aufreihung und Segregation der Chromosomen in der Mitose sowie für die Rekrutierung von SCP-Proteinen an Kinetochore, die nicht an Mikrotubuli angeheftet oder nicht unter Spannung stehen, benötigt wird (Abrieu *et al.* 2001; Stucke *et al.* 2002; Vigneron *et al.* 2004; Jelluma *et al.* 2008).

Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion des Spindel-Kontrollpunktes

Bereits ein einziges, nicht korrekt an die mitotische Spindel angeheftetes Kinetochor reicht aus, um den SCP zu aktivieren und die Segregation aller Schwester-Chromatiden zu verhindern (Rieder *et al.* 1994; Rieder *et al.* 1995). Die molekularen Mechanismen, die eine fehlende Anheftung der Kinetochore an die Mikrotubuli oder eine fehlende Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren detektieren und in ein aktives SCP-Signal übersetzen, ist noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise, dass das transient am Kinetochor lokalisierte Kinesin Cenp-E (Yen *et al.* 1991) als Sensor für die korrekte Anheftung der Kinetochore an die Mikrotubuli fungiert (Abrieu *et al.* 2000; Yao *et al.* 2000; Weaver *et al.* 2003). Dabei interagiert Cenp-E mit den Mikrotubuli und BubR1 und trägt so zur Aktivierung von BubR1 bei (Yao *et al.* 2000; Mao *et al.* 2003); (Abb. 8). Ebenso wurde bei fehlender Spannung zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli die Plk1-vermittelte Phosphorylierung von BubR1 an Serin-676 gezeigt, wodurch BubR1 Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktionen stabilisiert (Elowe *et al.* 2007). Desweiteren aktiviert der chromosomale Passagier-Komplex möglicherweise den

mitotischen SCP selektiv bei fehlender Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren und den Mikrotubuli (Kallio *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2003; Ditchfield *et al.* 2003; Lens *et al.* 2003). So konnte in *S. cerevisiae* die direkte Involvierung von Aurora B im Spindelkontrollpunkt über eine Aurora B-vermittelte Phosphorylierung von Mad3 (Ortholog des humanen BubR1) bei Abwesenheit korrekt angehefteter Kinetochore und daher fehlender Spannung zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli nachgewiesen werden (King *et al.* 2007). Obwohl Aurora B die Kinetochor-Retention von BubR1 in humanen Zellen beeinflusst (Ditchfield *et al.* 2003; Hauf *et al.* 2003; Becker *et al.* 2010), wurde noch keine direkte Phosphorylierung von BubR1 durch Aurora B in humanen Zellen nachgewiesen (Elowe *et al.* 2007; Vader *et al.* 2007). Eine indirekte Funktion von Aurora B für den SCP-Signalweg resultiert aus der Funktion, Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen auflösen zu können, wodurch der SCP aktiviert wird (Pinsky *et al.* 2006). Diese Aktivität von Aurora B spielt eine große Rolle bei der Korrektur fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen (Adams *et al.* 2001; He *et al.* 2001; Murata-Hori und Wang 2002; Tanaka *et al.* 2002; Hauf *et al.* 2003; Gassmann *et al.* 2004).

Nach der Aktivierung des SCP führt die koordinierte Rekrutierung von SCP-Proteinen an die Kinetochore zur Bildung eines diffundierbaren APC/C-Inhibitors (Musacchio und Salmon 2007). Dabei wurde gezeigt, dass Mad2 und BubR1 unabhängig voneinander an den APC/C-Aktivatoren Cdc20 binden und dessen Aktivität hemmen (Fang *et al.* 1998; Fang 2002). Ebenso wurden Komplexe aus BubR1, Bub3 und Cdc20 beschrieben, die den APC/C inhibieren (Tang *et al.* 2001; Chen 2002). Darüber hinaus existiert auch ein quartärer mitotischer Kontrollpunkt-Komplex, der MCC (mitotic checkpoint complex), welcher aus Mad2, Bub3, BubR1 und Cdc20 zusammengesetzt ist, und den APC/C effizienter inhibiert als Mad2 und BubR1 allein (Hardwick *et al.* 2000; Sudakin *et al.* 2001; Chen 2002) (Abb. 8). Daher wird postuliert, dass der MCC-Komplex den molekularen Inhibitor des APC/C darstellt, wobei Mad2 das terminale Effektor-Protein des Spindel-Kontrollpunkt-Signalweges ist (Fang *et al.* 1998; Yu 2002).

Der mitotische SCP ist neben der Regulierung der Trennung der Schwester-Chromatiden und der Zytokinese ebenfalls an der Regulation des zeitlich koordinierten Ablaufs der Mitose (mitotisches „Timing“) beteiligt. So wurde gezeigt, dass die Inhibierung von Mad2 oder BubR1 zur Verkürzung der Prometaphase und zu einer Beschleunigung der mitotischen Progression führt (Gorbsky *et al.* 1998; Meraldi *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005). Mad1 und Bub3 sind hingegen nicht für das mitotische „Timing“ sondern

lediglich für die Rekrutierung von Mad2 bzw. BubR1 an die Kinetochore erforderlich (Taylor *et al.* 1998; Luo *et al.* 2002). Dadurch kann von einer Kinetochor-unabhängigen Funktion von Mad2 und BubR1 für den zeitgerechten Ablauf der Mitose gesprochen werden. Die genauen molekularen Mechanismen für diese Funktion sind bisher aber nicht verstanden.

Die molekularen Mechanismen, die zur Inaktivierung des mitotischen SCP führen sind bisher ebenfalls wenig charakterisiert. Es existieren Hinweise, dass SCP-Komponenten wie Mad2 und BubR1 vom Kinetochor entlang der Mikrotubuli zu den Spindelpolen transportiert werden (Howell *et al.* 2001). Desweiteren wurde gezeigt, dass Mad2 an multiplen Serin-Resten phosphoryliert und dadurch die Interaktion mit Mad1 oder dem APC/C inhibiert wird (Wassmann *et al.* 2003). Außerdem wurde die Bindung von Cmt/p31^{COMET} an Mad1- oder Cdc20-gebundenes Mad2 gezeigt (Abb. 8), wodurch Mad2 nicht aktiviert werden kann und es zur Dissoziation des Mad2-Cdc20-Komplexes kommt (Xia *et al.* 2004; Yang *et al.* 2007).

Ein fehlerhafter SCP-Signalweg führt sowohl zur frühzeitigen Trennung der Schwester-Chromatiden als auch zu einem vorzeitigen mitotischen Austritt der Zelle und kann schließlich zur Generierung aneuploider Tochterzellen beitragen (Bharadwaj und Yu 2004; Musacchio und Salmon 2007). In der Tat weisen humane Krebszellen häufig eine partielle Dysfunktion des SCP auf (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hernando *et al.* 2004; Perez de Castro *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008), die zur Tumorgenese beitragen kann (Cahill *et al.* 1998; Takahashi *et al.* 1999; Saeki *et al.* 2002; Shichiri *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002; Yoon *et al.* 2002; Weaver und Cleveland 2006). So zeigen Mäuse mit heterozygoten oder hypomorphen SCP-Genen eine erhöhte Rate an Aneuploidie und Karzinogen-induzierter oder spontaner Tumorgenese (Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008). So entwickeln Mäuse mit heterozygoten *MAD2*-Allelen Lungentumore (Michel *et al.* 2001) und Mäuse mit hypomorphen *BUB1*-Allelen maligne Hepatome, Lungenadenokarzinome, Sarkome und Lymphome (Jeganathan *et al.* 2007). Das Auftreten von Tumoren in diesen transgenen Mausmodellen zeigt, dass eine Korrelation zwischen einem deregulierten SCP-Signalweg, Aneuploidie und Tumorgenese besteht. Andererseits gibt es Daten, die zeigen, dass eine erhöhte Aneuploidie, in Abhängigkeit des Gewebe-Kontext, auch Tumor suppressive Folgen haben kann (Weaver *et al.* 2007).

Während eine verminderte Expression von SCP-Genen mit dem Überleben vereinbar ist, konnte im transgenen Mausmodell und in humanen Tumorzelllinien gezeigt werden, dass

eine homozygote Deletion verschiedener SCP-Gene wie Mad1, Mad2, Bub1, BubR1 und Bub3 zu massiven Chromosomen-Fehlverteilungen führt und in der Folge embryonal letal ist (Dobles *et al.* 2000; Kalitsis *et al.* 2000; Kops *et al.* 2004; Michel *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Iwanaga *et al.* 2007; Jeganathan *et al.* 2007). Dies zeigt, dass der SCP essentiell für die Entwicklung und Lebensfähigkeit ist und inaktivierende Mutationen oder der homozygote Verlust von SCP-Genen in Tumoren nicht erwartet werden kann.

In humanen Tumoren kommen Mutationen in SCP-Genen relativ selten vor (Cahill *et al.* 1998; Nomoto *et al.* 1999; Hernando *et al.* 2001). In einigen wenigen Kolon und Brustkarzinom-Zelllinien konnten Mutationen in *BUB1* und *MAD2* (Cahill *et al.* 1998; Percy *et al.* 2000; Kienitz *et al.* 2005; Seki *et al.* 2008) identifiziert werden. Häufiger als Mutationen treten Deregulationen der Expression von SCP-Genen auf, welche vermutlich auf transkriptionelle bzw. epigenetische Mechanismen zurückzuführen sind (Shichiri *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002). So wurde in verschiedenen humanen Tumoren die Überexpression von Genen nachgewiesen, die für Proteine kodieren, welche direkt oder indirekt im SCP-Signalweg beteiligt sind. Diese Proteine umfassen u.a. Bub1, BubR1, Bub3 und Mad2 sowie Plk1, Aurora A, TPX2, Aurora B, Securin, Separase, Hec1/Ndc80 und Cenp-E (Schvartzman *et al.* 2010). Eine verminderte Expression wurde für Gene nachgewiesen, die u.a. für die Proteine Mad1, Mad2 und BubR1 kodieren (Perez de Castro *et al.* 2007; Schvartzman *et al.* 2010).

Die Mitose als Zielstruktur der Chemotherapie

Die meisten Chemotherapeutika, die in der Krebstherapie eingesetzt werden, beeinträchtigen eine normale Progression der Mitose. Sie interferieren dabei mit der DNA-Replikation oder induzieren Schäden an der DNA oder an der mitotischen Spindel, mit dem Ziel, die Tumorzellen in die Apoptose zu überführen (Lee und Schmitt 2003).

Mikrotubuli-bindende Inhibitoren

Mikrotubuli-bindende Substanzen werden seit 50 Jahren mit großem Erfolg in der Klinik eingesetzt (Mollinedo und Gajate 2003; Zhou und Giannakakou 2005). So werden Mikrotubuli stabilisierende Substanzen wie Paclitaxel/Taxol[®] oder Docetaxel/Taxotere[®] zur Behandlung von Brust-, Ovarien- und Lungenkarzinomen eingesetzt (Ganey *et al.* 2005; Larkin und Kaye 2006). Epothilone (Larkin und Kaye 2006) wirken durch eine

reduzierte Zugänglichkeit für Efflux-Pumpen potenter als Taxane (Nettles *et al.* 2004). Mikrotubuli destabilisierende *Vinca* Alkaloide wie Vinblastin und Vincristin werden bereits seit den 60er Jahren in der Klinik eingesetzt (Johnson *et al.* 1960). Die semi-synthetischen Analoga Vinorelbin, Vindesin und Vinflunin sind in der klinischen Entwicklung als Chemotherapeutika für Leukämien, Lymphome und solide Tumoren (Mollinedo und Gajate 2003, Jordan und Wilson 2004, Zhou und Giannakakou 2005, Schmidt und Bastians 2007). Nocodazol wird aufgrund der hohen Toxizität nicht in der Krebstherapie eingesetzt. Colchicin findet bei der Therapie von Gichtkrankheiten seine Anwendung.

In geringen, klinisch relevanten Konzentrationen können diese Substanzen mit der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli interferieren (Jordan *et al.* 1996; Jordan und Wilson 2004; Yvon *et al.* 1999). Dadurch können in der Mitose Kinetochore nicht korrekt an die mitotische Spindel angeheftet werden, was zu Aufreihungs-Fehlern der Chromosomen in der Metaphase führt. In der Folge wird der mitotische SCP aktiviert, der wiederum einen transienten Prometaphase-Arrest induziert. Nach einer verlängerten Behandlung der Zellen kommt es zum vorzeitigen mitotischen Austritt (mitotisches „slippage“) multinukleärer Zellen, die einen 4N DNA-Gehalt aufweisen. Diese tetraploiden Zellen induzieren den postmitotischen, p53-vermittelten G1-Kontrollpunkt, der die Zellen vor einer weiteren Polyploidisierung schützt (Lanni und Jacks 1998; Margolis *et al.* 2003; Vogel *et al.* 2004) oder begehen Apoptose.

Da diese Agenzien an Mikrotubuli proliferierender und nicht-prolierender Zellen gleichermaßen binden, wird ebenfalls die Funktion des Zytoskeletts inhibiert und z.B. der neuronale Transport verhindert, wodurch Neuropathien induziert werden (Trudeau 1996; Zhou und Giannakakou 2005). Deshalb besteht ein großes Interesse in der Entwicklung neuer, anti-mitotisch wirkender Substanzen mit anderen mitotischen Zielstrukturen als den Mikrotubuli.

Eg5/KSP-Inhibitoren

Eg5/KSP (Blangy *et al.* 1995) ist ein mitotisches Kinesin, dessen Inhibierung die Trennung der Zentrosomen verhindert. Es entstehen monoastrale Spindeln (Kapoor *et al.* 2000), die aufgrund der fehlenden Spannung zwischen den Schwester-Kinetochoren einen SCP-vermittelten mitotischen Arrest induzieren. Monastrol stellt den Prototyp von Eg5/KSP-Inhibitoren dar und findet gegenwärtig Anwendung in der experimentellen

Forschung (Mayer *et al.* 1999). Nachfolgende Eg5/KSP-Inhibitoren, die in der klinischen Entwicklung sind, umfassen u.a. Ispinesib (SB-715992; Davis *et al.* 2006), SB-743921 (GlaxoSmithKline), MK-0731 (Merck; Stein *et al.* 2006) und ARRY-520 (Array Biopharma; Woessner *et al.* 2007). Ähnlich wie nach einer Taxol-Behandlung kommt es bei einer verlängerten Behandlung mit Eg5/KSP-Inhibitoren zum mitotischen „slippage“ und zur Initiierung von Apoptose. Für die effiziente Aktivierung proapoptotisch wirkender Signalwege, die zur Induktion von Apoptose führen, wird eine Aktivierung des SCP sowie das mitotische „slippage“ benötigt (Tao *et al.* 2007; Dissertation Dr. C. Vogel 2008). Der Vorteil gegenüber Mikrotubuli-bindenden Substanzen liegt in der ausschließlichen Wirksamkeit in der Mitose und in der Proliferationsspezifität.

Aurora-Inhibitoren

Hesperadin (Boehringer Ingelheim; Hauf *et al.* 2003) und ZM447439 (AstraZeneca; Ditchfield *et al.* 2003) gehören zusammen mit AZD1152 (AstraZeneca) zu den spezifischen Aurora B-Inhibitoren, die einen Verlust der Histon H3-Phosphorylierung und Defekte im Chromosomen-Alignment und in der Zytokinese induzieren. Die Inhibierung von Aurora B durch ZM447439 führt zu einer Aufhebung des SCP-vermittelten mitotischen Arrests und erlaubt, trotz Aktivierung des p53-abhängigen postmitotischen G1-Kontrollpunktes, eine Endoreduplikation und Polyploidisierung, wobei letztere Voraussetzung für die Effizienz von ZM447439 ist (Kaestner *et al.* 2009). VX-680 (Vertex; Harrington *et al.* 2004) stellt einen dualen Aurora-Inhibitor dar, wohingegen MLN8054 (Millenium; Manfredi *et al.* 2007) in geringen Konzentrationen spezifisch Aurora A und in hohen Konzentrationen ebenfalls Aurora B inhibiert. Eine Aurora A-Inhibierung induziert Defekte bei der Assemblierung einer mitotischen Spindel, was einen transienten, SCP-vermittelten mitotischen Arrest induziert (Manfredi *et al.* 2007; Kaestner *et al.* 2009). Durch die MLN8054-induzierte gleichzeitige Inhibierung des SCP, wird dieser Zellzyklus-Arrest aber nicht aufrecht erhalten. So treten MLN8054-behandelte Zellen aus der Mitose aus und aktivieren den p53-abhängigen postmitotischen G1-Kontrollpunkt, was zur Induktion von p21 und Bax führt und damit einen G1-Arrest und anschließend Apoptose induziert (Kaestner *et al.* 2009).

Plk-Inhibitoren

Während Plk1, 2 und 4 mitotische Funktionen erfüllen, spielt Plk3 eine Rolle bei dem DNA-Schaden-Signalweg (Eckerdt *et al.* 2005, Takai *et al.* 2005, Winkles und Alberts 2005). Plk1 ist die bislang am besten charakterisierte Polo-Kinase und die Entwicklung von Plk-Inhibitoren für die Chemotherapie konzentriert sich auf Plk1. Eine pharmakologische Inhibierung oder Depletion von Plk1 induziert monopolare Spindeln und dadurch zu einem mitotischen Arrest (van Vugt *et al.* 2004, McInnes *et al.* 2006). Pharmakologische Inhibitoren gegen Plk1, die in der Klinik eingesetzt werden, umfassen u.a. BI2536 (Boehringer Ingelheim; Steegmaier *et al.* 2007) und GSK461364A (GlaxoSmithKline).

Der DNA-Schaden-Kontrollpunkt

Die DNA-Schaden-Kontrollpunkte in der S-Phase und am G1/S bzw. G2/M-Übergang detektieren DNA-Schäden und verhindern ein Fortschreiten des Zellzyklus.

Sensorproteine, die DNA-Schäden erkennen und die den DNA-Schaden-Signalweg einleiten beinhalten den MRN-Komplex (Mre11 (meiotic recombination 11 homolog), Rad50, Nbs1), der DNA Doppelstrangbrüche erkennt, den Rad17-RFC (replication factor C)-Komplex und den 9-1-1 (Rad9, Rad1 und Hus1)-Komplex, der an DNA-Läsionen lokalisiert, die durch Replikationsstress entstanden sind (Parrilla-Castellar *et al.* 2004; Lee und Paull 2007); (Abb. 9). Nach der Erkennung des DNA-Schadens werden die Serin/Threonin Kinasen ATM (ataxia-telangiectasia mutated) und ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) aktiviert (Cimprich *et al.* 1996; Shiloh 2001; Shiloh 2003; Shiloh 2003), welche Mitglieder der PIKK (PI-3K like kinase)-Familie sind und zentrale Signalüberträger darstellen (Abb. 9). ATM und ATR fördern die Aktivierung von Signalüberträgern und Effektoren wie z.B. Chk1, Chk2, p53, Mdm2, Nbs1/Nibrin (nijmegen breakage syndrome 1) und Brca1 (breast cancer associated 1); (Banin *et al.* 1998; Canman *et al.* 1998; Cortez *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000; Bakkenist und Kastan 2003; Shiloh 2003; Lee und Paull 2007).

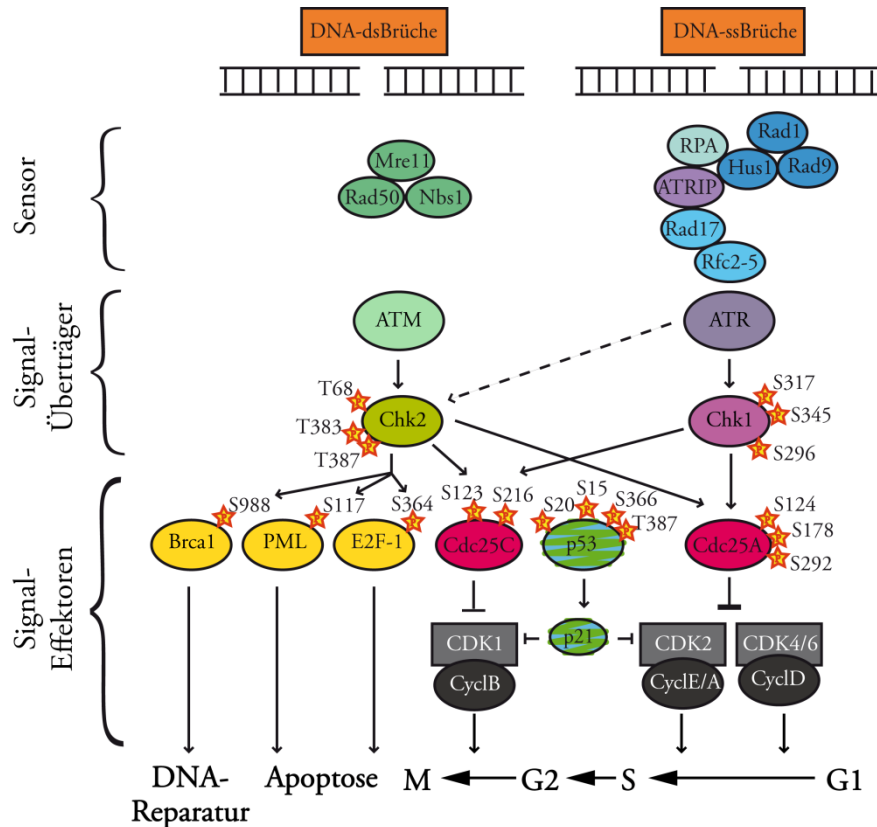


Abbildung 9: Schematische Übersicht des DNA-Schaden-Signalweges. DNA-Schäden führen zur Rekrutierung spezifischer Sensor-Proteine zur beschädigten DNA. Einerseits wird der MRN (MRE11–RAD50–NBS1)-Komplex für die Aktivierung von ATM (ataxia telangiectasia mutated) nach Doppelstrang-Brüchen (DSBs) benötigt. Andererseits wird der ATR (ATM- and Rad3-related)-interagierende Protein (ATRIP)-Komplex an Stellen einzelsträngiger DNA (ssDNA) rekrutiert und aktiviert ATR. Der Chk2-Signalweg wird durch DSBs infolge von γ -Strahlung oder bei Replikationsstress aktiviert, wohingegen der Chk1-Signalweg durch ssDNA-Brüche initiiert wird. In Abhängigkeit des DNA-Schadens phosphorylieren Chk1 und Chk2 eine Vielzahl von Effektor-Proteinen, was in der Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen, Zellzyklus-Arrest oder Apoptose resultiert. (Modifiziert nach Antoni *et al.* 2007.)

DNA-Schäden in der G1-Phase werden von den Kinasen ATM und ATR detektiert, die zusammen mit dem MRN-Komplex Chk2 bzw. Chk1 aktivieren, die wiederum Cdc25A durch Phosphorylierung inaktivieren (Bartek und Lukas 2003). Dadurch wird die Aktivierung von CDK2/Cyclin E und CDK2/Cyclin B verhindert und ein transienter G1/S-Arrest induziert (Abb. 9). In einem parallelen Signalweg wird p53 durch ATM oder ATR (Banin *et al.* 1998; Tibbetts *et al.* 1999) bzw. durch Chk1 oder Chk2 (Hirao *et al.* 2000) phosphoryliert. P53 induziert anschließend die Expression von *CDKN1A* (p21), wodurch CDK4/Cyclin D und CDK2/Cyclin E gehemmt werden und infolge ein G1/S Arrest induziert wird (Kastan und Bartek 2004); (Abb. 9).

DNA-Schäden am G2/M-Übergang werden von ATM, ATR und Rad17-RFC detektiert. Die Aktivierung des Chk1/Chk2-vermittelten Signalweges führt zur Phosphorylierung und Sequestrierung von Cdc25C ins Zytoplasma (Peng *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 1997; Matsuoka *et al.* 1998; Ahn und Prives 2002), wodurch CDK1 inaktiv bleibt und ein G2/M-Arrest induziert wird (Peng *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 1997). Die Aktivierung von p53 führt zur Induktion der Genexpression von *CDKN1A* (p21), *14-3-3* σ und *GADD45a* (growth arrest and DNA-damage-inducible 45) und damit zur Repression von *CDK1*, *CCNB1* (Cyclin B) und *CDC25C*. Dadurch wird die Aufrechterhaltung des G2-Arrests gewährleistet (Taylor und Stark 2001).

Der Replikationskontrollpunkt

Der Replikationskontrollpunkt oder auch Intra-S-Phase-Kontrollpunkt genannt, kontrolliert den ordnungsgemäßen Ablauf und Abschluss der DNA-Replikation. Störungen in der S-Phase oder pharmakologische Inhibitoren der DNA-Replikation aktivieren den Replikationskontrollpunkt. Blockierte Replikationsgabeln werden dabei durch den 9-1-1-Komplex (Rad9, Rad1 und Hus1), und einem Komplex aus ATR und ATRIP detektiert (Bao *et al.* 2004; Bartek *et al.* 2004; Petermann und Caldecott 2006). Aktivierte ATR-Kinase phosphoryliert daraufhin Chk1, die ihrerseits CDC25A phosphoryliert (Abb. 9). Dadurch wird Cdc25A abgebaut und CDK2/Cyclin E und CDK2/Cyclin A bleiben inaktiv, wodurch eine Verzögerung oder ein Arrest in der S-Phase induziert wird (Sanchez *et al.* 1997; Zhao *et al.* 2002; Jin *et al.* 2008). DNA-Doppelstrangbrüche hingegen, induzieren die ATM-vermittelte Phosphorylierung von Chk2, wodurch Cdc25A ebenfalls degradiert und ein S-Phase Arrest induziert wird (Falck *et al.* 2001; Jin *et al.* 2008).

Die Checkpoint Kinasen Chk1 und Chk2

Die Checkpoint Kinasen Chk1 (Sanchez *et al.* 1997) und Chk2 (Matsuoka *et al.* 1998) erfüllen zentrale Funktionen als Signalüberträger im DNA-Schaden-Signalweg. Beide Kinasen besitzen zwar hochkonservierte Kinase-Domänen, sind aber strukturell und funktionell verschieden. Während Chk1 durch blockierte Replikationsgabeln, DNA-Quervernetzungen sowie nach UV- und ionisierender Strahlung durch ATR an Serin-317 und Serin-345 phosphoryliert und aktiviert wird (Abraham 2001; Zhao und Piwnicka-Worms 2001), wird Chk2 nach Doppelstrangbrüchen vor allem durch ATM-vermittelte

Phosphorylierung an Threonin-68 aktiviert (Ahn *et al.* 2000; Melchionna *et al.* 2000). Während die homozygote Deletion von *CHK1* in transgenen Mäusen embryonal letal ist (Liu *et al.* 2000; Takai *et al.* 2000), ist *CHK2* nicht essentiell für die Lebensfähigkeit und Entwicklung. So sind Mäuse mit homozygoter *CHK2*-Deletion lebensfähig, obgleich sie eine erhöhte Sensitivität für die Entwicklung Karzinogen-induzierter Tumoren aufweisen sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Röntgenstrahlung (Hirao *et al.* 2002; Takai *et al.* 2002).

Die Aktivierung von Chk2 nach Einwirkung von γ -Strahlung erfordert die ATM-vermittelte Phosphorylierung von Threonin-68 im SQ/TQ-Motif (Ahn *et al.* 2000; Melchionna *et al.* 2000); (Abb. 12), wobei kürzlich gezeigt wurde, dass dieser Rest auch durch Plk1 phosphoryliert werden kann (Tsvetkov *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde die TTK/hMps1-vermittelte Phosphorylierung von Chk2 an Threonin-68 beschrieben (Wei *et al.* 2005), dessen Bedeutung aber unklar ist (Yeh *et al.* 2009). Die Phosphorylierung von Chk2 an Threonin-68 fördert die Dimerisierung der Kinase, wobei die SCD-Domäne (SQ/TQ cluster domain) eines Chk2-Moleküls an die FHA-Domäne (forkhead associated domain) eines weiteren Chk2-Moleküls bindet. Diese Dimerisierung wird für die vollständige Aktivierung von Chk2 durch *trans*-Autophosphorylierungen von Threonin-383 und Threonin-387 in der T-Schleife der Kinase benötigt (Lee und Chung 2001; Ahn *et al.* 2002; Xu *et al.* 2002; Schwarz *et al.* 2003); (Abb. 10).

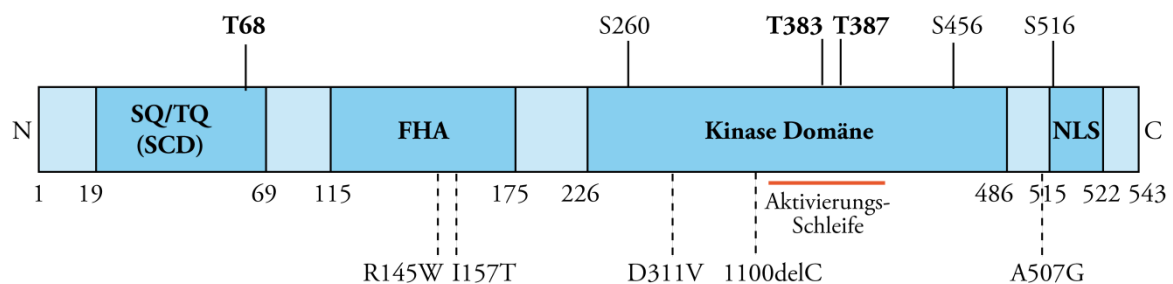


Abbildung 10: Die Proteinstruktur von Chk2. Chk2 besitzt eine N-terminale SQ/TQ-reiche regulatorische Domäne, eine FHA-Domäne zur Phosphopeptid-Erkennung, eine Kinase-Domäne und ein C-terminales Kernlokalisationsignal (NLS). Die Positionen der spezifischen Domänen und die häufig auftretenden Mutationen R145W, I157T, D311V, 1100delC und A507G sowie wichtige Phosphorylierungsstellen sind dargestellt. Zentrale Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung von Chk2 sind fettgedruckt. (Modifiziert nach Antoni *et al.* 2007.)

Obwohl die Phosphorylierung an Threonin-68 für die initiale Aktivierung von Chk2 benötigt wird, ist sie nicht für die anschließende Kinase-Aktivität erforderlich (Ahn und

Prives 2002; Schwarz *et al.* 2003; Wu und Chen 2003; Buscemi *et al.* 2006; King *et al.* 2006).

Zu den Substraten von Chk2 zählen wichtige Regulatoren des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Chromatin-Remodellierung, der Transkription und der Apoptose (O'Neill *et al.* 2002; Seo *et al.* 2003). So wird z.B. Cdc25A durch eine Chk2-vermittelte Phosphorylierung destabilisiert und Cdc25C durch Phosphorylierung an Serin-216 durch 14-3-3-Protein-Bindung ins Zytoplasma sequestriert (Matsuoka *et al.* 1998; Blasina *et al.* 1999), wodurch der Eintritt in die S-Phase bzw. Mitose verhindert wird. Die Phosphorylierung von E2F-1 an Serin-364 nach Behandlung mit dem DNA-schädigenden Agens Etoposide, reguliert sowohl die Stabilität als auch die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors (Stevens *et al.* 2003). Weitere Substrate von Chk2 stellen PML (promyelocytic leukemia) und Brca1 (breast cancer 1) dar, die an Serin-117 (Yang *et al.* 2002) bzw. Serin-988 (Lee *et al.* 2000) infolge von γ -Bestrahlung phosphoryliert werden (Abb. 9). Brca1 und Chk2 co-lokalisieren an nukleären Foci nach radioaktiver Bestrahlung und die Chk2-vermittelte Phosphorylierung von Brca1 trägt zur DNA Reparatur bei. Die Chk2-vermittelte Phosphorylierung von p53 an Serin-20 führt zur Dissoziation von der Ubiquitin-Ligase MDM2 und fördert dadurch die Stabilität von p53 (Chehab *et al.* 2000; Shieh *et al.* 2000), obwohl diese Funktion in humanen Zellen in Frage gestellt wurde.

Ein Chk2-Funktionsverlust wurde in verschiedenen humanen Tumoren, wie z.B. Kolon- (Bell *et al.* 1999), Ovarien- (Miller *et al.* 2002), Brust- (Sullivan *et al.* 2002) und Lungenkarzinome (Matsuoka *et al.* 2001; Miller *et al.* 2002) nachgewiesen. Desweiteren sind *CHK2*-Gendefekte mit Brust-, Ovarien-, Prostata- und Kolonkarzinomen assoziiert (Bartek und Lukas 2003; Antoni *et al.* 2007) sowie mit dem Li-Fraumeni-Syndrom (Bell *et al.* 1999). Bei dem Li-Fraumeni-Syndrom handelt es sich um eine seltene autosomal dominante Erkrankung, die durch das Auftreten multipler Tumore in jungem Alter gekennzeichnet ist. Somatische Mutationen von *CHK2* werden auch in sporadischen Tumoren beobachtet, wobei vor allem Punktmutationen oder Verkürzungs-Mutationen auftreten (Bartek und Lukas 2003). Die beiden Hauptmutationen in humanen Tumoren sind die 1100DelC und I157T-Mutation (Abb. 10). Das *CHK2*-Allel, welches die 1100DelC-Mutation in der Kinase-Domäne trägt, kodiert ein C-terminal verkürztes, instabiles Chk2-Protein mit verringerter oder fehlender Kinase-Aktivität und erhöht das Brustkrebsrisiko (Meijers-Heijboer *et al.* 2003; Varley und Haber 2003). Die Punktmutation I157T in der FHA-Domäne von Chk2 (Abb. 10) wurde mit einem

erhöhten Risiko für sporadisch auftretenden Kolorektal-Krebs in Zusammenhang gebracht (Kleibl *et al.* 2009). Weitere Mutationen sind R145W (FHA-Domäne), D311V (Kinase-Domäne) und A507G (NLS); (Bartek *et al.* 2001); (Abb. 10).

Interessanterweise werden gleichzeitige Mutationen von *CHK2* und *TP53* beobachtet, was auf einen selektiven Vorteil bei der Tumorgenese und folglich auf eine zusätzliche p53-unabhängige Tumorsuppressor-Funktion von Chk2 hinweisen könnte (Falck *et al.* 2001). Außerdem wurde im transgenen Mausmodell gezeigt, dass eine *CHK2*-Defizienz zur verhinderten p53-Stabilisierung nach Bestrahlung führt (Hirao *et al.* 2000), wohingegen die Einführung von *CHK2*-siRNA in humanen Zellen oder Gendisruption durch homologe Rekombination nur zu geringen oder keiner Destabilisierung von p53 nach DNA-Schaden führt (Ahn *et al.* 2003; Jallepalli *et al.* 2003). Dies lässt auf grundlegende Unterschiede zwischen dem humanen und murinen System hinsichtlich der Aktivierung von p53 durch Chk2 schließen.

Die ersten Hinweise für eine mögliche zusätzliche mitotische Funktion von Chk2 oder eine Verbindung zwischen den DNA-Schaden-Signalwegen und der Regulation der Mitose stammen aus einer Studie von Tsvetkov und Kollegen (Tsvetkov *et al.* 2003). Sie konnten zeigen, dass phosphorylierte Subpopulationen von Chk2 (pChk2-Threonin-68, -Threonin-26 und -Serin-28) zusammen mit der mitotischen Kinase Plk1 an Zentrosomen und am Mittelkörper mitotischer Zellen lokalisieren.

Molekulare Mechanismen der chromosomalen Instabilität

Chromosomale Instabilität (CIN; chromosomal instability); (Lengauer *et al.* 1997) ist ein Hauptmerkmal humaner Tumore und kann direkt zur Tumorgenese beitragen (Rajagopalan und Lengauer 2004; Holland und Cleveland 2009). CIN repräsentiert einen fortlaufenden Prozess an Gewinnen oder Verlusten von Chromosomen. Dabei kann zwischen gesamter (W-CIN; whole chromosome instability) und segmentaler chromosomaler Instabilität (S-CIN; segmental chromosomal instability) unterschieden werden, wobei W-CIN Veränderungen in der Gesamt-Chromosomenzahl umschreibt, wohingegen S-CIN strukturelle Änderungen von Chromosomen wie Translokationen, Deletionen und Inversionen umfasst (Ricke *et al.* 2008). Chromosomale Instabilität resultiert in Aneuploidie, einem Zustand, der von der euploiden Chromosomenzahl abweicht und den Status des zellulären Karyotyps beschreibt. Aneuploidie wurde bereits vor über 100 Jahren als Kennzeichen von malignen Tumoren beschrieben. Hansemann

und seine Kollegen zeigten bereits im Jahre 1890 multipolare und bipolare, asymmetrische Zellteilungen in Epitheltumoren (Hansemann 1890). Der Zoologe Theodor Boveri studierte multipolaren Zellteilungen und zeigte, dass Aneuploidie einen nachteiligen Effekt für die Zelle und die gesamte Physiologie des Organismus hat (Boveri 1902). Aus diesen ersten Studien wurde abgeleitet, dass eine Aneuploidie die Tumorgenese fördern könnte (Boveri 1914). Aneuploidie ist in humanen Tumoren mit CIN assoziiert und korreliert mit einer erhöhten Aggressivität und einer schlechten klinischen Prognose (Carter *et al.* 2006; Perez de Castro *et al.* 2007). Es ist jedoch bislang nicht vollständig geklärt, ob CIN die Ursache oder die Folge maligner Transformation ist. Allerdings deutet die erhöhte Tumorinzidenz in transgenen Mausmodellen mit deregulierten SCP-Genen (Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008) auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Aneuploidie, CIN und Tumorgenese hin. Es ist daher ein zentrales Thema der molekularen Onkologie, die molekularen Mechanismen der chromosomalen Instabilität zu verstehen.

CIN kann durch multiple Mechanismen induziert werden, die mit dem normalen Ablauf einer Mitose interferieren (Holland und Cleveland 2009). Dazu zählen z.B. die Amplifikation von Zentrosomen und Defekte im SCP-Signalweg, in der Chromosomen-Kohäsion, in der dynamischen Anheftung von Mikrotubuli an die Kinetochore sowie der Regulation des Zellzyklus. Obwohl mit Hilfe direkter Messungen von chromosomaler Instabilität in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden konnte, dass aneuploide Zelllinien alle ein bis fünf Zellteilungen ein Chromosom fehlverteilen (Thompson und Compton 2008), scheint dies die höchste zu tolerierende Rate an CIN zu sein. Höhere Raten an Chromosomen-Fehlverteilungen durch eine Deregulation der Mitose, die durch starke Defekte im SCP-Signalweg (Kops *et al.* 2004; Michel *et al.* 2004) oder durch Anwesenheit multipolarer Spindeln (Ganem *et al.* 2009) induziert werden, sind letal und können sogar Tumor-suppressiv wirken (Weaver *et al.* 2007). Daher ist zu erwarten, dass subtile mitotische Defekte CIN zugrunde liegen, die zu einem tolerablen Maß an Aneuploidie führen, welche ein Überleben der Krebszelle erlauben.

Eine Möglichkeit, eine Chromosomen-Fehlverteilung in der Mitose zu induzieren, ist eine verfrühte Auflösung der Chromosomen-Kohäsion, was zu einer vorzeitigen Trennung der Schwester-Chromatiden führen kann. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Cohesinen oder die Fehlexpression von Genen, welche die Chromatid-Kohäsion regulieren wie z.B. Shugoshin und Separase (Jallepalli *et al.* 2001; Yu *et al.* 2003; Wirth *et al.* 2006; Barber *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008; Iwaizumi *et al.*

2009) in humanen Zellen Tetraploidie erzeugen kann. Eine direkte Korrelation zwischen erhöhter Expression von Separase und Tumorgenese konnte in Brust-Tumoren beobachtet werden (Zhang *et al.* 2008), wobei eine frühzeitige Trennung der Schwester-Chromatiden zu Fehlverteilungen der Chromosomen führen könnte.

Defekte im Spindel-Kontrollpunkt

Defekte im SCP-Signalweg erlauben den frühzeitigen Eintritt von Zellen in die Anaphase und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit von Chromosomen-Fehlverteilungen. In der Tat besitzen viele Tumorzellen eine eingeschränkte SCP-Funktion mit einem deregulierten SCP-Signal (Weaver und Cleveland 2006). Transgene Mausmodelle zeigen eine Korrelation zwischen CIN und Tumorgenese. Mäuse mit heterozygoten oder hypomorphen SCP-Genen zeigen dabei eine erhöhte Rate an Aneuploidie und Tumorzinzidenz in späten Entwicklungsstadien (Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008). So entwickeln *MAD2*^{+/-}-Mäuse und Mäuse mit hypomorphen *BUB1*-Allelen Tumore erst nach 18 oder 19 Monaten (Michel *et al.* 2001; Jeganathan *et al.* 2007). Das Auftreten von Tumoren erst in späten Entwicklungsstadien der Mäuse, obwohl Aneuploidie vermutlich bereits zu Beginn der Embryogenese vorhanden war, legt die Vermutung nahe, dass Aneuploidie als einziger Mechanismus für die Tumorgenese nicht ausreichend ist, diese jedoch aktiv fördert. Dabei könnte CIN den Verlust der Heterozygotie (LOH; loss of heterozygosity) von verschiedenen Tumorsuppressor-Genen fördern (Baker *et al.* 2009), wodurch die Tumorgenese unterstützt werden kann.

Interessanterweise besitzen aber die meisten chromosomal instabilen Krebszellen einen funktionsfähigen SCP und zeigen nach Behandlung mit Spindel-beschädigenden Agenzien einen robusten mitotischen Arrest (Tighe *et al.* 2001) und keinen vorzeitigen Eintritt in die Anaphase (Gascoigne und Taylor 2008). Dies lässt darauf schließen, dass der SCP in vielen CIN Zelllinien, ähnlich wie in normalen Zellen, den Eintritt in die Anaphase verhindert bis alle Kinetochore an Mikrotubuli angeheftet sind und unter Spannung stehen. Demnach gibt es weitere, SCP-unabhängige Mechanismen, die chromosomale Instabilität in CIN Zelllinien induzieren können.

Defekte in der Mikrotubuli-Kinetochor-Dynamik und in der Zentrosomen-Anzahl als Ursache isolierter Anaphase-Chromosomen

Ein weit verbreiteter Mechanismus von CIN ist die Persistenz fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen und das Auftreten einzelner, „lagging“ Chromosomen in der Äquatorialebene einer Anaphase (Cimini *et al.* 2001; Cimini 2008; Thompson und Compton 2008; Bakhoun *et al.* 2009; Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009). Dabei repräsentieren diese mitotischen Defekte einzelne Chromatiden, deren Kinetochor an Mikrotubuli entgegengesetzter Spindelpole in einer merotelischen Konformation angeheftet sind und deshalb nicht segregieren können (Abb. 11D); (Thompson und Compton 2008). Da eine merotelische Kinetochor-Orientierung ein Äquivalent zu biorientierten Chromosomen darstellt werden diese fehlerhaften Anheftungen nicht vom SCP detektiert (Cimini *et al.* 2001).

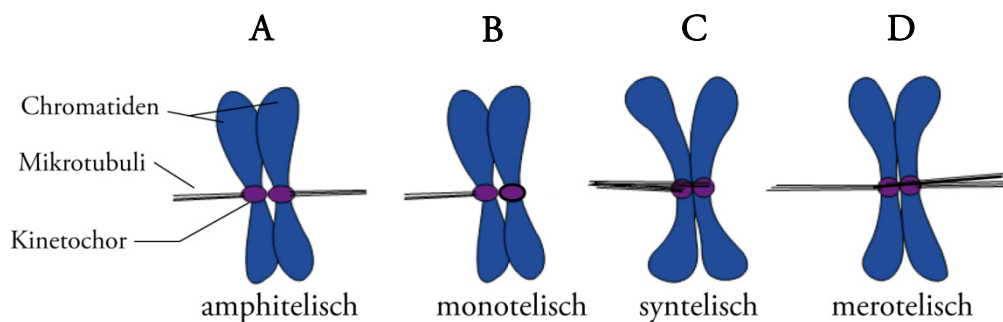


Abbildung 11: Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen. A) Korrekt an die Mikrotubuli angeheftete Chromosomen besitzen Schwesterkinetochore, die an Mikrotubuli beider Spindelpole angeheftet sind (amphitelisch). Fehlerhafte Kinetochor-Anheftungen können entstehen, wenn beide Kinetochore mit Mikrotubuli eines Pols verbunden sind (syntelisch) oder wenn ein Schwesterkinetochor an Mikrotubuli beider Spindelpole angeheftet ist (merotelisch). Bei einer monotelischen Kinetochor-Anheftung ist lediglich ein Schwesterkinetochor mit Mikrotubuli eines Pols verbunden. (Modifiziert nach Ducat *et al.* 2004).

Die sogenannte Rücken-an-Rücken-Orientierung der Schwester-Kinetochore favorisiert eine amphitelische Anheftung und eine Chromosomen-Biorientierung (Indjeian und Murray 2007; Loncarek *et al.* 2007). Dennoch treten natürlicherweise in frühen Phasen der Mitose, aufgrund der stochastischen Interaktion zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli, syntelische Anheftungen beider Kinetochore an Mikrotubuli eines Pols (Abb. 11C) und merotelische Anheftungen eines Kinetochors an Mikrotubuli beider Pole (Abb. 11D) auf (Cimini *et al.* 2003). Dabei ist das Stadium zwischen Prometa- und Metaphase besonders kritisch, in der die Chromosomen in einem dynamischen Prozess

der Mikrotubuli-Assoziation bzw. Dissoziation an Kinetochoren, in der Äquatorialebene der Zelle aufgereiht werden. Um zu verhindern, dass Schwester-Chromatiden zum selben Spindelpol segregiert werden, müssen diese fehlerhaften Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen vor dem Eintritt in die Anaphase korrigiert werden.

Die am Zentromer lokalisierte Kinase Aurora B erfüllt zentrale Funktionen bei der Korrektur fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen (Adams *et al.* 2001; He *et al.* 2001; Murata-Hori und Wang 2002; Tanaka *et al.* 2002; Hauf *et al.* 2003; Gassmann *et al.* 2004). Ein zentrales Substrat von Aurora B am Kinetochor ist dabei der Hec1/Ndc80-Komplex (Abb. 12A), der als eine Komponente des KMN-Komplexes (KNL-1 (Kinetochore NuL-1), Mis12-Komplex und Hec1/Ndc80-Komplex), für die Bindung von Mikrotubuli an die Kinetochore essentiell ist (Percy *et al.* 2000; Ciferri *et al.* 2005; Kienitz *et al.* 2005; Cheeseman *et al.* 2006; Ciferri *et al.* 2007; Cheeseman und Desai 2008). Die Aurora B-vermittelte Phosphorylierung des Hec1/Ndc80-Komplexes resultiert dabei in der Auflösung der Mikrotubuli-Bindung durch das KMN-Netzwerk (Cheeseman *et al.* 2006; Cheeseman und Desai 2008); (Abb. 12A).

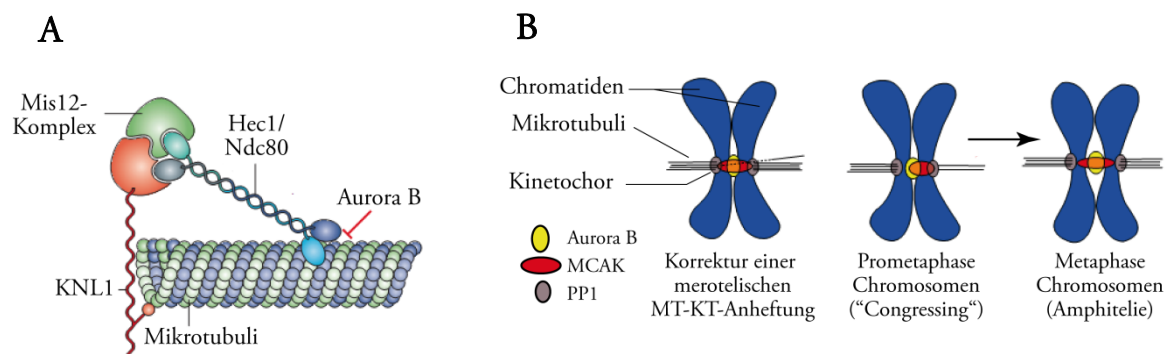


Abbildung 12: Die Funktion von Aurora B (A) und MCAK (B) bei der Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen. A) Die Komponenten des KMN (KNL1-Mis12-Hec1/Ndc80)-Komplex bilden die zentrale Anheftungsstelle der Kinetochore an die Mikrotubuli. Die Assoziation des Mis12-Komplexes mit KNL1 generiert eine Bindestelle für den Hec1/Ndc80-Komplex. Aurora B phosphoryliert den N-Terminus des Hec1/Ndc80-Komplexes und bewirkt dadurch die Ablösung des Komplexes von den Mikrotubuli. Modifiziert nach Cheeseman *et al.* 2008. B) Aurora B und MCAK colokalisieren am inneren Zentromer nicht angehefteter Chromosomen, wodurch die inhibierende Phosphorylierung von MCAK durch Aurora B aufrecht erhalten wird. Nach Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore und bestehender Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren, lokalisiert MCAK in Bereiche hoher Proteinphosphatase 1 (PP1)-Konzentration, wird durch Dephosphorylierung aktiviert und kann fehlerhafte Mikrotubuli-Anheftungen auflösen. (Modifiziert nach Ducat *et al.* 2004.)

Neben Aurora B sind ebenfalls die Motorproteine Kif2b und MCAK an der Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen beteiligt.

Bei einer fehlenden Spannung zwischen den Schwester-Kinetochoren lokalisiert Aurora B in räumlicher Nähe zu MCAK und kann dessen Aktivität durch Etablierung eines Aurora B-vermittelten Phosphorylierungsgradienten hemmen (Fuller *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009) und gleichzeitig Kif2b zum äußeren Kinetochor rekrutieren (Gorbsky 2004; Knowlton *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007); (Abb. 12B). Nach korrekter Biorientierung der Chromosomen in der Metaphase wird Spannung zwischen den Kinetochoren der Schwester-Chromatiden aufgebaut und es kommt zur Dissoziation von Kif2b vom Kinetochor und zur räumlichen Trennung von Aurora B und MCAK (Andrews *et al.* 2004; Bakhom *et al.* 2009). MCAK lokalisiert daraufhin in Kinetochor- oder perizentromerische Bereiche mit hoher Protein-Phosphatase 1 (PP1)-Konzentration. PP1 wirkt der Aurora B Kinase-Aktivität entgegen (Hsu *et al.* 2000; Murnion *et al.* 2001) und kann daher zur Aktivierung von MCAK beitragen (Abb. 12B). Aktiviertes MCAK kann seine Funktion als Mikrotubuli-depolymerisierendes Kinesin erfüllen und die fehlerhaften Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen auflösen.

Merotelische Anheftungen von Kinetochoren an die Mikrotubuli können auch experimentell durch eine kurzzeitige Behandlung der Zellen mit Nocodazol oder Monastrol induziert werden. Nach Auswaschen der Substanzen durchlaufen die Zellen dabei eine Mitose mit multipolaren oder monopolaren Spindelintermediaten, die eine hohe Rate an merotelischen Anheftungen und isolierten Anaphase-Chromosomen induzieren (Cimini *et al.* 1999; Cimini *et al.* 2003; Knowlton *et al.* 2006; Tulu *et al.* 2006).

Ein weiterer Mechanismus, durch den die Inzidenz an Merotelie und dadurch die Rate an Chromosomen-Fehlverteilungen erhöht wird, besteht in der Anwesenheit zusätzlicher Zentrosomen, die transient multipolare Spindeln als Intermediat induzieren können, wodurch, merotelische Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen erzeugt werden (Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009); (Abb. 13). Diese merotelischen Kinetochor-Anheftungen führen zu nicht-segregierbaren, „lagging“ Chromosomen in der Anaphase.

Dieser Mechanismus erklärt somit den Zusammenhang zwischen zusätzlichen Zentrosomen und Aneuploidie in vielen Tumoren.

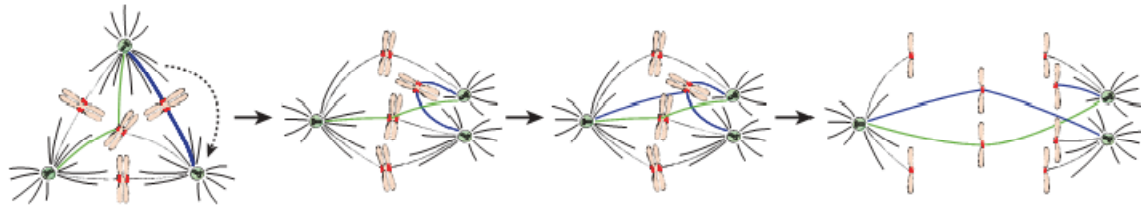


Abbildung 13: Multipolare Spindelintermediate fördern merotelische Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen. Zusätzliche Zentrosomen fördern merotelische Anheftungen der Kinetochore an die Mikrotubuli (grün) durch Veränderung der Spindelgeometrie. Darüber hinaus akkumulieren syntelische Anheftungen (blaue Mikrotubuli) ebenfalls nach Vereinigung der Zentrosomen und können die Merotelie weiter verstärken. Unaufgelöste merotelische Anheftungen verursachen isolierte, „lagging“ Chromosomen in der Anaphase. (Modifiziert nach Ganem *et al.* 2009.)

Defekte in der Zellzyklus-Regulation

Eine Vielzahl an Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind wurde mit der Erzeugung von CIN in Verbindung gebracht, wie z.B. Brca1, Brca2, Rb, hCdc4/Fbw7, Cyclin E, FoxM1, p53, REST, Mdm2 und RanBP1 (Thompson *et al.* 2010, im Druck). Der genaue molekulare Mechanismus, wie diese Proteine CIN generieren ist unklar, aber eine Beteiligung an der Regulation der Chromosomen-Segregation, der Deregulation von Mechanismen außerhalb der Mitose (z.B. Zentrosomen-Duplikation in der S-Phase) oder eine Störung von Zellzyklus-Kontrollpunkten wäre denkbar.

hCdc4/Fbw7 kontrolliert die Progression in die S-Phase über den Abbau von Cyclin E und ist in 12% aller Kolorektalkarzinomen mutiert (Rajagopalan *et al.* 2004). Ein homozygoter „Knockout“ resultiert in CIN in chromosomal stabilen Krebszelllinien. Cyclin E reguliert die Duplikation der Zentrosomen (Hinchcliffe *et al.* 1999) und ist dadurch, im Falle einer Überexpression, direkt in der Generierung zusätzlicher Zentrosomen involviert, die CIN induzieren können. Der Transkriptionsfaktor REST (repressor-element-1-silencing transcription factor) ist ein transkriptioneller Repressor von *MAD2* (Guardavaccaro *et al.* 2008), der β -TrCP-abhängig in der G2-Phase abgebaut werden muss, um die Mad2-Expression zu ermöglichen. Die Expression einer REST-Mutante, die nicht an β -TrCP binden kann, führt zu geringen Mad2-Konzentrationen und Chromosomen-Segregations-Defekten (Guardavaccaro *et al.* 2008). Ebenfalls ist das Tumorsuppressor-Protein Rb über die Regulation des transkriptionellen Aktivators E2F1 (Hernando *et al.* 2004) an der Generierung von CIN beteiligt. So führt ein Rb-Verlust zur E2F1-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von *MAD2*, was zu dessen Überexpression führt und CIN induziert (Hernando *et al.* 2004; Sotillo *et al.* 2007).

Materialien und Methoden

Materialien

Chemikalien

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), GE Healthcare (Uppsala, Schweden), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Beverly, Massachusetts, USA), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), sowie VWR International (West Chester, PA, USA) bezogen.

Tabelle 1: Inhibitoren

Inhibitor	Finale Konzentration	Wirkung	Firma
Adriamycin (Doxorubicin-Hydrochlorid)	300 nM (HCT116) bzw. 750 nM (HeLa)	Inhibiert Topoisomerase II und verursacht DNA-Schaden	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ALLN (Calpain inhibitor I)	200 μ M	Inhibiert Calpain (Calcium-abhängige Cysteinprotease) I	Alexis, Plymouth Meeting, PA USA
Blastizidin	2,5 μ g/ml	Inhibiert die Translation (interferiert mit der Peptid gebunden Form in der Ribosomen-Untereinheit)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
G418 (Neomycin)	300 μ g/ml	Inhibiert die Polypeptidsynthese (Elongationsschritt)	PAA Laboratories, Pasching, Australien
Gö6976	2-20 μ M	Inhibiert PKC, PDK1, S6K1, MSK1, Chk1, MAPKAP-K16, PHK	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
MG132	20-30 μ M	Inhibiert das Proteasom	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
MLN8054	0,1-2 μ M	Inhibiert in geringen Konzentrationen (0,1-2 μ M) Aurora A und in höheren Konzentrationen (2 μ M) Aurora B	Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA
Monastrol	68 μ M (HCT116) bzw. 100 μ M (HeLa)	Inhibiert das Eg5/KSP-Kinesin (Zentrosomen Migration, Formierung einer bipolaren Spindel)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Neocarzinostatin	0,5 μ g/ml	Induziert DNA-Doppelstrangbrüche	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Inhibitor	Finale Konzentration	Wirkung	Firma
Nocodazol	300 nM	Interferiert mit der Mikrotubuli-Dynamik, depolymerisiert Mikrotubuli	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Puromycin	1 µg/ml	Inhibiert die Translation (durch frühzeitige Freisetzung der wachsenden Polypeptidkette)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Purvalanol A	10 µM	Inhibiert Cdk1	Alexis, Plymouth Meeting, PA USA
Roscovitin	20 µM	Inhibiert Cdk1, Cdk2, Cdk5	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Taxol	150 nM	Bindet N-terminal an das β-Tubulin von Mikrotubuli; interferiert mit der Mikrotubuli-Dynamik; stabilisiert Mikrotubuli	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Thymidin	2 mM	Blockiert DNA-Synthese durch Inhibierung der Nukleotid-Neusynthese	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
UCN-01	100 nM	Inhibiert Chk1 (partiell auch: PKC, cTAK1, Cdk1, PAK4, PDK1, MAPKAP-K2)	NCI (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA)
Zeocin	200 µg/ml	DNA-Interkalator	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
ZM447439	2 µM	Inhibiert Aurora B	AstraZeneca Pharmaceuticals, London, England und Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA

Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Protein (Klon oder Phosphorylierungsstelle)	Spezies	Antikörpertyp	Verwendung	Bezugsquelle
β-Aktin (AC-15)	Maus	monoklonal	WB (1:4000)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aurora-A (H130)	Kaninchen	polyklonal	WB (1:2000), IP (2µg/500µg Lysat), IF (1:500)	Santa Cruz, CA, USA
Aurora-A (35C1)	Maus	monoklonal	WB (1:800), IP (2µg/500µl Lysat), IF (1:800)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Aurora-B	Kaninchen	polyklonal	WB (1:2000)	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Aurora-B (AIM-1)	Maus	monoklonal	IF (1:1000)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bub1 (14H5)	Maus	monoklonal	IF (1:500)	Chemikon
Bub1	Kaninchen	polyklonal	WB (1:2000); IF (1:800)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Material und Methoden

Protein (Klon oder Phosphorylierungsstelle)	Spezies	Antikörpertyp	Verwendung	Bezugsquelle
Bub3 (31)	Maus	monoklonal	WB (1:1000)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BubR1 (8G1)	Maus	monoklonal	IF (1:450) WB (1: 800)	Millipore, Billerica, Massachusetts und Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX , USA
BubR1	Kaninchen	polyklonal	IF (1:400)	Millipore, Billerica, Massachusetts und Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX , USA
Chk2 (Klon-7)	Maus	monoklonal	WB (1: 1000), IP (2 µg/500 µg Lysat)	Millipore, Billerica, Massachusetts
Chk2 (DCS-270)	Maus	monoklonal	WB (1:2000), IP (2 µg/500 µg Lysat)	Santa Cruz, CA, USA
Chk2 (A-12)	Maus	monoklonal	WB (1:1000), IP (2 µg/500 µg Lysat)	Santa Cruz, CA, USA
Cyclin B (GNS-1)	Maus	monoklonal	WB (1:2000)	Santa Cruz, CA, USA
GFP	Kaninchen		WB (1:2000)	PD Dr. Heike Krebber, IMT, Marburg
γ-H2AX (S319) (JBW301)	Maus	monoklonal	WB (1:8000), IF (1:300)	Millipore, Billerica, Massachusetts
Human Nuclear ANA-Centromere (CREST)	Human	polyklonal	IF (1:600)	Europa Bioproducts, Wicken, Ely, UK
Mad2 (48)	Maus	monoklonal	WB (1:1000)	BD Transduction Laboratories, USA
MPM2 (mitotic protein monoclonal 2)	Maus	monoklonal	FACS (1:1600)	Millipore, Billerica, Massachusetts
Mps1(TTK; C-19)	Kaninchen	polyklonal	WB (1:2000)	Santa Cruz, CA, USA
PARP (7D3-6)	Maus	monoklonal	WB (1:2000)	Pharmlingen, USA
Phospho-Aurora-A (pT288)	Kaninchen	monoklonal	WB (1:2000)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Phospho-Aurora-B (pT232)	Kaninchen	monoklonal	WB (1:2000)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Phospho-Aurora-C (pT198)	Kaninchen	monoklonal	WB (1:2000)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Phospho-CenpA (S7)	Kaninchen	polyklonal	IF (1:700)	Millipore, Billerica, Massachusetts
Phospho-Chk2 (T68)	Kaninchen	monoklonal	WB (1:1000)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA und Epitomics, USA
Phospho-Histon H3 (S10)	Kaninchen	Polyklonal	WB (1:1000), IF (1: 500)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Phospho-Histon H3 (S19) (6G3)	Maus	monoklonal	WB (1: 800), IF (1:400), FACS (1:500)	Cell-Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Plk1(F-8)	Maus	monoklonal	WB (1:1000)	Santa Cruz, CA, USA
Securin	Maus	polyklonal	WB (1:1000)	NeoMarkers, Fremont, CA, USA
Survivin	Kaninchen	polyklonal	WB (1:800)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Protein (Klon oder Phosphorylierungsstelle)	Spezies	Antikörpertyp	Verwendung	Bezugsquelle
α-Tubulin (B-5-1-2)	Maus	monoklonal	WB (1:1000), IF (1:650)	Santa Cruz, CA, USA
γ-Tubulin (GTU88)	Kaninchen	IgG Antiserum- Fraktion	IF (1:700)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TPX2 (18D5)	Maus	monoklonal	IF (1:1000)	Santa Cruz, CA, USA

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Konjugiert mit	Verwendung	Bezugsquelle
Anti-Human	Esel, polyklonal	Rhodamin RedX	IF (1:800)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore Pike, PA, USA
Anti-Human	Ziege, polyklonal	AlexaFluor594	IF (1:1000)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore Pike, PA, USA
Anti-Maus	Ziege, polyklonal	AlexaFluor488	IF (1:1000), FACS (1:2000)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Maus	Ziege, polyklonal	AlexaFluor594	IF (1:1000), FACS (1:1000)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti- Kaninchen	Ziege, polyklonal	AlexaFluor488	IF (1:1000)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti- Kaninchen	Ziege, polyklonal	AlexaFluor594	IF (1:1000), FACS (1:1000)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Maus	Ziege, polyklonal	HRP	WB (1: 10000)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore Pike, PA, USA
Anti- Kaninchen	Ziege, polyklonal	HRP	WB (1: 10000)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore Pike, PA, USA

Oligonukleotide

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA exprimierenden Plasmiden und für Mutagenese-PCRs wurden von der Firma Biospring (Frankfurt, Deutschland) synthetisiert. Zum Sequenzieren von Plasmiden wurden Standard-Oligonukleotide von Eurofins MWG Operon oder AGOWA Genomics (Berlin,

Deutschland; z.B. „pEGFP C1_for“ von MWG) oder eigene Oligonukleotide verwendet.
Fwd: vorwärts (3' -> 5'-Richtung); *rev*: rückwärts (5' -> 3'-Richtung). Nt: Nukleotid.

Tabelle 4: Oligonukleotide

Nukleotid-Name (Plasmid)	Sequenz	Information	Verwendungszweck
Aurora A-WT-fwd	5'-GCT CAG CTG GAG AAA GC-3'	Start-Nukleotid 499 in der humanes Aurora A kodierenden Sequenz; läuft 3' in die Plasmidsequenz.	Sequenzierung von pRSET- <i>AURORA A- WT</i>
Aurora A-WT-rev	5'-GCT CTC CAG CTG ATC C-3'	Start-Nukleotid 808 in der humanes Aurora A kodierenden Sequenz; läuft 5' in die Plasmidsequenz.	Sequenzierung von pRSET- <i>AURORA A- WT</i>
Chk2-shRNA-235-fwd (pSuper-Chk2-235ff)	5'-GAT CCC CGA ACC TGA GGA CCA AGA ACT TCA AGA GAG TTC TTG GTC CTC AGG TTC TTT TTG GAA A-3'	shRNA gegen die Position 235-253 in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz. (Haoudi <i>et al.</i> 2003)	Generierung eines Oligonukleotids für Klonierung in ein pSuper-Plasmid. Für transiente und stabile Expression in humanen Zellen
Chk2-shRNA-235-rev pSuper-Chk2-235ff)	5'-AGC TTT TCC AAA AAG AAC CTG AGG ACC AAG AAC TCT CTT GAA GTT CTT GGT CCT CAG CTT CGG G-3'	shRNA gegen die Position 235-253 in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz. (Haoudi <i>et al.</i> 2003)	Generierung eines Oligonukleotids für Klonierung in ein pSuper-Plasmid. Für transiente und stabile Expression in humanen Zellen.
Chk2-shRNA-1436-fwd (pSuper-Chk2-1436ff)	5'-GAT CCC CGC CTT AAG ACA CCC GTG GCT TCA AGA GAG CCA CGG GTG TCT TAA GGC TTT TTG GAA A-3'	shRNA gegen die Position 1436-1458 in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz.	Generierung eines Oligonukleotids für Klonierung in ein pSuper-Plasmid. Für transiente und stabile Expression in humanen Zellen.
Chk2-shRNA-1436-rev (pSuper-Chk2-1436ff)	5'-AGC TTT TCC AAA AAG CCT TAA GAC ACC CGT GGC TCT CTT GAA GCC ACG GGT GTC TTA AGG CGG G-3'	shRNA gegen die Position 1436-1458 in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz.	Generierung eines Oligonukleotids für Klonierung in ein pSuper-Plasmid. Für transiente und stabile Expression in humanen Zellen.
Chk2-sh-resistente Mutante-235-fwd (pcDNA-Chk2-si-res)	5'-GGC TCC TCA GGT TCC TGA TCT TCG GGT TCT TGG TCC TCA GG-3'	shRNA-resistentes Oligonukleotid durch vier stille Mutationen in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz	Expression einer shRNA-resistenten cDNA von <i>CHK2</i>
Chk2-sh-resistente Mutante-235-rev (pcDNA-Chk2-si-res)	5'-CCT GAG GAC CAA GAA CCC GAA GAT CAG GAA CCT GAG GAG CC-3'	shRNA-resistentes Oligonukleotid durch vier stille Mutationen in der humanes Chk2 kodierenden Sequenz	Expression einer shRNA-resistenten cDNA von <i>CHK2</i>

Plasmide

Tabelle 5: Leervektoren

Plasmid-Name	Informationen
pcDNA3.1	Eukaryotisches Expressionsplasmid mit CMV (Cytomegalievirus)-Promotor (Invitrogen) und einem Neomycin-Resistenzgen.
pBabe puro	Eukaryotisches retrovirales Expressionsplasmid mit 5'-LTR*-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Morgenstern und Land 1990).
pWZL neo	Eukaryotisches retrovirales Expressionsplasmid mit 5'-LTR*-Promotor, einem Neomycin-Resistenzgen und dem Gen für den murinen ekotrophen Rezeptor (Morgenstern und Land, 1990).
pSuper	Eukaryotisches Expressionsplasmid für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp <i>et al.</i> 2002).
pRetro-Super	Eukaryotisches retrovirales Expressionsplasmid für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp <i>et al.</i> 2002).
pRetro-Super-blast	Eukaryotisches retrovirales Expressionsplasmid für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Blastizidin-Resistenzgen (Brummelkamp <i>et al.</i> 2002).
pMSCV-blast/-puro	Humanes retrovirales Expressionsplasmid für shRNAs; Blastizidin/Puromycin-Resistenzgen. Freundlicherweise von M. Eilers (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt.
pRSET A, B, C	Bakterielles Expressionsplasmid zur Generierung rekombinanten Proteins in BL21(DE3)-Zellen. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenz und ermöglicht die Expression eines N-terminalen Fusionsproteins in drei unterschiedlichen Leserahmen.

*long terminal repeat

Tabelle 6: Expressionsplasmide für GFP-markierte Fusionsproteine

Plasmid-Name	Informationen
pEGFP-C1	Humanes Expressionsplasmid mit CMV-Promotor und <i>EGFP</i> exprimierend (Clontech, Palo Alto, CA, USA).
pBabe-H2B-GFP	Humanes retrovirales Expressionsplasmid unter der Kontrolle eines SV-40-Promotors. Exprimiert die GFP-markierte Histon-Variante <i>H2B</i> . Zur Kontrolle der Effizienz von Transfektion oder Infektion verwendet (Voorhoeve und Agami 2003).
pcDNA3-EGFPno stop	Humanes Expressionsplasmid. Exprimiert ein <i>EGFP</i> ohne Stop-Codon, das vor der Multi-Klonierungsstelle liegt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
pEGFP-H2B	Humanes Expressionsplasmid. Exprimiert die EGFP-markierte Histon-Variante <i>H2B</i> unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Kanda <i>et al.</i> 1998).

Tabelle 7: *AURORA A* Expressionsplasmide

Plasmid Name	Informationen
pET28-AURORA A, -B, -C	Bakterielles Expressionsplasmid zur Generierung rekombinanter, humaner Aurora A, Aurora B bzw. Aurora C Kinase in BL21(DE3)-Zellen (Crosio <i>et al.</i> 2002).
pRSET-AURORA A-WT	Bakterielles Expressionsplasmid zur Generierung rekombinanter, humaner Aurora A Kinase in BL21(DE3)-Zellen (Briassouli <i>et al.</i> 2006).

Tabelle 8: *CHK2* Expressionsplasmide

Plasmid Name	Informationen
pcEF-hCHK2-WT	Humanes Expressionsplasmid zur Expression humaner <i>Chk2 Kinase</i> in humanen Zellen, unter Kontrolle eines EF1-Promotors; Puromycin-Resistenzgen.
pcEF-hCHK2-D347A	Humanes Expressionsplasmid zur Expression einer humanen, <i>CHK2</i> Kinase inaktiven Mutante in humanen Zellen, unter Kontrolle eines EF1-Promotors; Puromycin-Resistenzgen.
pcDNA-CHK2-si-res	Humanes Expressionsplasmid zur Expression einer siRNA-resistenten Mutante der humanen <i>CHK2</i> Kinase, deren kodierende Sequenz in der siRNA-Zielsequenz (Nukleotid 235ff) vier Stille Mutationen besitzt.
pET15b-CHK2-WT	Bakterielles Expressionsplasmid zur Generierung rekombinanter, GST-markierter, humaner Chk2 Kinase in BL21(DE3)-Zellen.
pET15b-CHK2-KD	Bakterielles Expressionsplasmid zur Generierung rekombinanter, Kinase inaktiver (D368N), GST-markierter, humaner Chk2 Kinase in BL21(DE3)-Zellen. Zur Verwendung in Kinase Untersuchungen.

Tabelle 9: *CHK2* shRNA Expressionsplasmide

Plasmid Name	Informationen
pSuper-CHK2-1436	Expressionsplasmid zur Expression eines shRNA-Oligonukleotids, das die Nukleotide 1436ff der humanen <i>CHK2</i> kodierenden Sequenz als Zielsequenz hat.
pRetro-Super-CHK2-235	Retrovirales Expressionsplasmid zur Expression eines shRNA Oligonukleotids, das die Nukleotide 235ff der humanen <i>CHK2</i> kodierenden Sequenz als Zielsequenz hat.
pRetro-Super-CHK2-1436	Retrovirales Expressionsplasmid zur Expression eines shRNA Oligonukleotids, das die Nukleotide 1436ff der humanen <i>CHK2</i> kodierenden Sequenz als Zielsequenz hat.

Tabelle 10: Sonstige Plasmide

Plasmid Name	Informationen
pSuper-BUBR1-2925; pSuper-MAD2-501	Expressionsplasmide zur Expression eines shRNA-Oligonukleotids, das die Nukleotide 2925ff des humanen <i>BUBR1</i> kodierenden Sequenz bzw. die Nukleotide 501ff des humanen <i>MAD2</i> kodierenden Sequenz als Zielsequenz hat.
pEGFP-α-TUBULIN	Humanes Expressionsplasmid zur Expression GFP-markierten α -Tubulin in humanen Zellen (Wordeman <i>et al.</i> 2007).
pEGFP-MCAK	Humanes Expressionsplasmid zur transienten und stabilen Transfektion humaner Zellen mit humanem MCAK (Wordeman <i>et al.</i> 2007).
pGEX-Cdc25C (Fragment 200-256)	Humanes Expressionsplasmid zur Expression eines Cdc25C-Fragments (200-256) in Bakterien, als Substrat für die Chk2 Kinase in Kinase-Reaktionen.

Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in VE- (voll entsalztes) Wasser angesetzt und entweder im Autoklav (Biomedis Laborservice) Hitze-inaktiviert (120°C, 20 Minuten) oder steril-filtriert (Porengröße der Membran: 0,2 oder 0,45 µm). Plastikmaterialien wurden autoklaviert (120°C, 20 Minuten). Die Glaswaren wurden durch Erhitzen auf 140-170°C über Nacht sterilisiert. Die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer und Lösungen sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Bakterienstämme

DH5α *E.coli* F⁻φ80dlacZΔM15Δ(lacZYAaegF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_K, m_K⁺) *phoA supE44λλ-thi-1 gyrA96 relA1* (Hanahan 1985)

BL21 (DE3) F⁻, *dcm, ompT, hsdS(rB- mB-), galλ* (DE3)

Humane Zelllinien

Als nicht-transformierte, immortalisierte Zelllinie wurden diploide humane BJ-h Tert Fibroblasten verwendet (Voorhoeve und Agami 2003).

Tabelle 11 : Humane Krebszelllinien

Name	Organ	Eigenschaften	Medium	Quelle
HCT116 Wildtyp	Kolon	SCP normal, MIN, <i>RAS</i> mutiert, kein ARF, keine <i>CHFR</i> -Expression	RPMI-1640 (Invitrogen, Deutschland)	Bert Vogelstein, Baltimore, MD, USA
HCT116- <i>CHK2</i> ^{-/-}	Kolon	SCP normal, MIN, CIN (diese Arbeit), <i>RAS</i> mutiert, kein ARF, keine <i>CHFR</i> -Expression	RPMI-1640 (Invitrogen, Deutschland)	Bert Vogelstein, Baltimore, MD, USA (Jallepalli <i>et al.</i> 2003)
HCT116- <i>MAD1</i> ^{kd}	Kolon	SCP beeinträchtigt, MIN, <i>RAS</i> mutiert, kein ARF, keine <i>CHFR</i> -Expression	RPMI-1640 (Invitrogen, Deutschland)	(Kienitz <i>et al.</i> 2005)
HCT116- <i>MAD2</i> ^{+/-}	Kolon	SCP beeinträchtigt, MIN, CIN, <i>RAS</i> mutiert, kein ARF, keine <i>CHFR</i> -Expression	RPMI-1640 (Invitrogen, Deutschland)	Robert Benezra, New York, USA (Michel <i>et al.</i> 2001)
HCT116- <i>TP53</i> ^{-/-}	Kolon	SCP normal, MIN, <i>RAS</i> mutiert, kein ARF, keine <i>CHFR</i> -Expression	RPMI-1640 (Invitrogen, Deutschland)	Bert Vogelstein, Baltimore, MD, USA (Bunz <i>et al.</i> 1998)
HeLa	Cervix	SCP normal	DMEM (Invitrogen, Deutschland)	ATCC, USA

Name	Organ	Eigenschaften	Medium	Quelle
HT29	Kolon	SCP stark, CIN	DMEM (Invitrogen, Deutschland)	ATCC, USA
Phoenix	Niere	Verpackungs-Zelllinie (Phoenix-Eco) für MoMuLV- Retroviren; von der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK-293 abstammend	DMEM (Invitrogen, Deutschland)	(Kinsella und Nolan, 1996)

SCP: Spindel-Kontrollpunkt (SCP: Spinde checkpoint). Normal: voll funktionsfähig.
Beeinträchtigt: eingeschränkt funktionsfähig.

CIN: Chromosomale Instabilität. CIN umschreibt einen dynamischen Prozess, bei dem Chromosomen verloren gehen oder dazugewonnen werden, wobei Aneuploidie entsteht.

MIN: Mikrosatelliten Instabilität. MIN umschreibt das Auftreten ungewöhnlich langer oder kurzer Mikrosatelliten in einem Individuum, verursacht durch DNA-Reparaturfehler.

Arbeitsmaterialien

Arbeitsmaterialien, wie z.B. Reaktionsgefäße oder Zellkulturschalen und -flaschen, Papierfilter und Einwegspritzen, wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Germany) und Millipore (Schwalbach, Deutschland) bezogen.

Arbeitsgeräte

Alle verwendeten Arbeitsgeräte sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Informationen über den Einsatz der verwendeten Arbeitsgeräte können dem jeweiligen Methodenteil dieser Arbeit entnommen werden.

Tabelle 12: Arbeitsgeräte

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Firma
Blotter für Westernblot	PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter	BioRad, Hercules, CA, USA und Peqlab, Erlangen, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Elektroporationsgerät	GenePulser X cell™	BioRad, Hercules, CA, USA
Feinwaage	Sartorius Research R200D	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Material und Methoden

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Firma
Geltrockner	Model 583 Gel Dryer BioRad	BioRad, Hercules, CA, USA
Heizblöcke	Ori-Blok OB3	Techne/Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland
Horizontal-Gelelektrophorese	Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Inkubator für die Zellkultur	Cytoperm 8080 oder BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator für Bakterien	Heraeus B6120	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kamera für DNA Gelfotos	GelDoc EQ System Kamera	BioRad, Hercules, CA, USA
Lebendzell-Mikroskopie	Nikon BioStation IM v2.1.0.131	Nikon, Tokio, Japan
Magnetrührer	Ikamag Ret	IKA Labor Technik, Staufen, Deutschland
Mikroskop, Fluoreszenzmikroskop	Fluoreszenzmikroskop Leica DM6000B	Leica, Wetzlar, Deutschland) mit der Kamera Hamamatsu 1394 ORCA-II ER (Herrsching am Ammersee, Deutschland
Mikroskop, Durchlichtmikroskop	Lichtmikroskop Leitz Biomed Typ 020-507-010	Leica, Wetzlar, Deutschland
Netzgerät	Power Pac 3000 Power Supply	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Netzgerät	Power Supply Model 100/200	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Netzgerät	Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PCR-Geräte	Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Phosphoimager	Fujifilm FLA-3000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Photometer, DNA	NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer und Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Photometer, Proteine, ELISA plate reader	Spectra Max 340PC384	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000	Gilson International B. V. Deutschland, Limburg-Offheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy plus oder aku	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Reaktionsgefäß Schüttler	Thermomixer Comfort R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilmentwickler	X-OMAT 2000 Processor	Kodak, Rochester, New York, USA
Sonifizieren	W-250 D	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Sterilarbeitsbank (Zellkultur)	Heraeus LaminAir HA 2448	Heraeus, Osterode, Deutschland
UV-Leuchttisch	Transilluminator	Bio-Rad
Vertikale Gelelektrophorese	Mini-Protran 3 Electrophoresis Cell	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Vertikale Gelelektrophorese	Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Model V15.17)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	VF2 und IKA-Vibrax-VXR	IKA Labor Technik, Staufen, Deutschland
Zentrifuge, mittelgroß	Beckmann GP Zentrifuge	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifuge, mittelgroß, kühlend	Multifuge 3 L-R	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge, Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge, Tischzentrifuge, kühlend	Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, Deutschland

Methoden

Molekularbiologie

Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH5 α (Inoue *et al.* 1990) wurden auf Eis aufgetaut. Ein Aliquot von 50 μ l wurde mit 0,5 μ g der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. einem Ligationsansatz (etwa 5 μ l) vorsichtig gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation des Plasmid-Bakteriengemisches auf Eis, wurde ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C durchgeführt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden 500 μ l LB-Medium (1% (w/v) Baktotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) hinzugegeben und die Bakterien 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf eine Petrischale mit Selektions-Agar (LB-Medium mit Zusatz von 3% (w/v) Bakto-Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden am nächsten Tag entweder in Röhrchen mit 5 ml Selektionsmedium oder in einen Glaskolben mit 150 ml überführt und diese über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Flüssig- (LB-Medium) und Festmedium (LB-Agar) für Bakterien wurden hitzeinaktiviert (120°C, 20 Minuten), auf etwa 50°C abgekühlt und dann mit entsprechenden Selektions-Antibiotika (100 μ g/ml Ampicillin oder 20 μ g/ml Kanamycin) versehen.

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolierung kleinerer Plasmid-DNA-Mengen (z.B. von Mini-Präparations-Kulturen) wurden 4 ml einer Übernachtskultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Zellrückstand in 200 μ l Resuspensionspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM Glukose (20% (w/v)), 10 mM Na₂-EDTA, pH 8,0) durch 30-sekündiges Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lysepuffer (1% (w/v) SDS, 0,2 M NaOH) und vorsichtigem Durchmischen, wurde der Ansatz 1-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 μ l Neutralisierungspuffer (2,5 M Kaliumacetat, 9,6% (v/v) Essigsäure) hinzugegeben und 3 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 Minuten, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein

neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 400 µl Isopropanol versetzt und 10 bis 20 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4°C). Der DNA-Niederschlag wurde mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und anschließend in 40 µl H₂O gelöst.

Für eine Midi-Präparation (Isolation mittlerer Mengen des Plasmides) wurden 100-200 ml der Übernachtskultur verwendet. Die Isolation erfolgte mit dem Nucleobond Plasmid DNA Purification kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany) entsprechend den Angaben des Herstellers. Das aufgereinigte Plasmid wurde schließlich in H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Invitrogen oder Fermentas) mit den entsprechenden Reaktionspuffern (Invitrogen oder Fermentas) und der zu hydrolysierenden DNA für 1-2 Std. bei 37°C inkubiert.

Restriktionsansatz: 1 µg DNA
5 U Restriktionsendonuklease 1
5 U Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls)
2 µl 10 x Reaktionspuffer
Add 20 µl H₂O

Für präparative Reaktionsansätze wurden bis zu 10 µg DNA in einem Volumen von 50 µl eingesetzt und die Volumina der restlichen Komponenten des Reaktionsansatzes entsprechend der DNA-Menge angeglichen.

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese unter Nutzung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (EtBr) durchgeführt (Sharp *et al.* 1973). Das in die DNA interkalierende EtBr fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm (Kemp *et al.*, 1989). Bei der Gelelektrophorese werden die negativ geladenen DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld separiert. In Abhängigkeit der erwarteten Größen der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1-2% (w/v) TAE-Agarosegele mit 0,5

$\mu\text{g/ml}$ EtBr verwendet. Eine Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCL, pH 7,5, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8,0, 0,2% (v/v) CH_3COOH) bei 120 V für 30-60 Minuten. Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Leuchttisch visualisiert und mittels einer Videokamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines DNA-Größenstandards (GeneRuler™ 100 bp DNA-Marker oder Lambda-DNA EcoRI+HindIII Marker; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bestimmt.

Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung eines DNA-Fragments wurde dieses mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und das DNA-Fragment mit Hilfe des NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) entsprechend der Angaben des Herstellers extrahiert und aufgereinigt.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch, gegen VE- (voll entsalztes) Wasser als Referenz, mit dem NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Dabei entspricht eine Extinktion bei 260 nm von 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, bei einzelsträngiger RNA 40 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm sollte dabei für DNA bei 1,8 liegen, für RNA bei 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

Hybridisierung von Oligonukleotiden

Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide wurden für die Herstellung der shRNA-Vektoren vor der Ligation zunächst in geeignete Expressionsplasmide hybridisiert. Dies erfolgte in einem Hybridisierungsansatz durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten und einem langsamen Abkühlen bis auf Raumtemperatur.

Hybridisierungsansatz:

Oligonukleotid 1: 150 pmol
Oligonukleotid 2: 150 pmol
25 μl Hybridisierungspuffer (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA)
Add 50 μl H_2O

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde das zu ligierende DNA-Fragment sowie 50-100 ng des entsprechenden Plasmids in einem molarem Verhältnis von 2:1 bzw. 4:1 zusammengegeben und mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase miteinander verbunden. Der Ligationsansatz wurde 12 bis 16 Std. bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz:

- 100 ng linearisiertes Plasmid
- x ng DNA-Fragment
- 1 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
- 1 µl T4 DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs)
- Add 10 µl H₂O


Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden DNA-Fragmente für Klonierungszwecke amplifiziert.

PCR-Ansatz:

- Plasmid-DNA 10-100 ng x µl
- Taq DNA-Polymerase-Puffer (10×, NEB) 5 µl
- Primer fwd (10 pmol/µl) 1 µl
- Primer rev (10 pmol/µl) 1 µl
- dNTP (10 mM) 1 µl
- 2,5-5 U Taq DNA-Pol (5 U/µl, NEB) 5 µl
- Add 50 µl H₂O

Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200)-Bedingungen für konventionelle PCR:

95°C	3-5 min	 x 25-40
95°C	1 min	
50-60°C	1 min	
72°C	1 min/kb	
72°C	10 min	
4°C	∞	


Sequenzspezifische in vitro Mutagenese

Mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, CA, USA) können gezielt Punktmutationen an spezifischen Stellen der DNA-Sequenz gesetzt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer PCR mit Hilfe der Pfu Turbo[®] DNA Polymerase. Dabei wird das vollständige als Matrize dienende Plasmid amplifiziert. Für die PCR wurden Oligonukleotide ausgewählt, die komplementär zum jeweils entgegengesetzten Strang des Plasmids sind, der das zu mutagenisierende Insert trägt. Die Inkorporation des Oligonukleotids generierte dabei Punktmutationen durch Austausch von 1-4 Nukleotiden während der PCR. Sofort nach Beendigung der Amplifikation wurde das PCR-Produkt für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Durch anschließende Zugabe von 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) zum Amplifikat und einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C, wurde der Verdau des methylierten Parentalstranges gewährleistet. Das nicht methylierte, mutagenisierte Amplifikat wurde bis zur Hitzeschocktransformation bei 4 °C gelagert oder für eine längere Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

Mutagenese-PCR-Ansatz:

10x Reaktionspuffer (Stratagene)	5 µl
Doppelsträngige DNA-Matrize 5 -10 ng	x µl
Oligonukleotid-Primer fwd (10 pmol/µl) 125 ng	x µl
Oligonukleotid-Primer rev (10 pmol/µl) 125 ng	x µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Add 50 µl H ₂ O	
Pfu Turbo [®] DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200)-Bedingungen für die Mutagenese PCR:

95 °C	30 sec	
95 °C	30 sec	
55 °C	1 min	
68 °C	1 min/kb Plasmidlänge	

x 14-18

Proteinbiochemie

Herstellen von Proteinlysaten für Westernblot-Analysen

Für eine Isolation von Proteinen aus human Zellen wurde das Zellmaterial zunächst mit Trypsin/EDTA oder PBS/EDTA (PBS: 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7,25, 0,5 mM EDTA pH 8,0) abgelöst, mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Boehringer Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% (v/v) NP-40, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% Na-Desoxycholat, 20 mM Na₃VO₄, 25 mM β-Glycerophosphat, 50 mM NaF, 5 mM Na₂MoO₄, 0,5 μM Microcystin LR, komplette Protease-Inhibitoren (EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt) resuspendiert. Zur weiteren Prozessierung der Proteinlysate wurde das Zelllysat zweimal für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und mit Hilfe einer Proteinbestimmung für eine Westernblot-Analyse vorbereitet. Diese Lysate wurden zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 705 nm mit Hilfe eines Spectramax 340 Microplate Readers (Molecular Devices Co., Sunnyvale, Ca., USA; Softmax Pro 1.1 Software) unter Verwendung des DIC Protein Assay Kits (BioRad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben.

Immunpräzipitation von Proteinen (IP)

Zur Anreicherung eines Proteins oder zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wird eines der interagierenden Proteine durch einen an Sepharose-Kügelchen gebundenen spezifischen Antikörper zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern aus dem Zelllysat isoliert.

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA oder PBS/EDTA gerntet und die Zellen anschließend in 500-1000 μl IP-Lysepuffer (50 mM Tris/HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 μg/ml Aprotinin, 2 mM NaVO₄, 5 μM Cantharidin, 0,5 μM Microcystin LR, komplette Protease-Inhibitoren (EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt) resuspendiert. Nach 30-minütiger

Lyse auf Eis und Sonifizierung mit einem Branson Sonic Power Sonifier Model S125 (Branson, Danbury, CT, USA) wurden die Lysate zweimal für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und von den Lysat-Überständen die Protein-konzentration bestimmt.

Für die IP wurden 0,1-1mg Lysat mit 1 bis 4 µg des entsprechenden Antikörpers auf ein finales Volumen von 500-800 µl mit IP-Lysepuffer eingestellt und 2-4 Std. bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Protein-Antikörpergemisch mit 10-20 µl einer 50%-igen (w/v) Suspension von Protein G-Sepharose versetzt und weitere 1,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Proben wurden anschließend einmal mit IP-Lysepuffer bzw. jeweils zweimal mit den unterschiedlich stringenten IP-Waschpuffern I-III gewaschen. Der Sepharose-Rückstand wurde mit 10-20 µl 5 x SDS-Probenpuffer (15% (w/v) SDS, 15% (v/v) β-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerol, 0.25% (w/v) Bromophenolblau) versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Der komplette Überstand sowie 5% des eingesetzten Lysats (Input) wurden für eine Analyse mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) und Westernblot verwendet oder für die Bestimmung der Kinase-Aktivität prozessiert.

IP-Waschpuffer I: 50 mM Tris/HCL, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,2% NP-40, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 µg/ml Aprotinin, 2 mM NaVO₄, 5 µM Cantharidin, 0,5 µM Microcystin LR, komplette Protease-Inhibitoren (EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt.

IP-Waschpuffer II: 50 mM Tris/HCL, pH 7,5, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 µg/ml Aprotinin, 2 mM NaVO₄, 5 µM Cantharidin, 0,5 µM Microcystin LR, komplette Protease-Inhibitoren (EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt.

IP-Waschpuffer III: 50 mM Tris/HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 15 µg/ml Aprotinin, 2 mM NaVO₄, 5 µM Cantharidin, 0,5 µM Microcystin LR, komplette Protease-Inhibitoren (EDTA-frei, Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt.

IP-Kinase-Reaktionen

Für IP-Kinase Untersuchungen wurden die nach einer IP pelletierten Sepharose-Kügelchen mit dem daran gebundenen Antikörper-Protein-Komplex in 40 µl Kinase-Reaktionspuffer (25 mM HEPES, pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 80 mM EGTA, 1mM DTT, 100 µM ATP) mit 6 µCi radioaktivem γ-³²P-ATP (6000Ci/mmol; Amersham) versetzt und

zusammen mit 5 µg eines spezifischen Kinasesubstrats GST-Cdc25C (Fragment 200-256) 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 5x SDS-Probenpuffer. Nach einer SDS-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Eine anschließende Autoradiographie ermöglichte die Detektion der Substrat-Phosphorylierung, die mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji) quantifiziert werden konnte.

In vitro Kinase-Reaktionen

In vitro Kinase-Reaktionen wurden mit den folgenden rekombinanten Kinasen durchgeführt: 520 nM Aurora A, Aurora B oder Aurora C (Prof. Dr. Paolo Sassone-Corsi, CA, USA) und Expression und Reinigung: Ailine Stolz), 140 nM Bub1/Bub3-Komplex, 460 nM Plk1 T210D (konstitutiv aktive Mutante), 210 nM Mps1, 460 nM p38 und 140 nM AuroraB/Incenp-C-Komplex (Prof. Dr. Hongtao Yu, Dallas, TX). Diese rekombinanten Kinasen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren Gö6976 und ZM447439 für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 11,5 µl Kinasepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 50-2000 µM ATP) vorinkubiert. Danach wurden 7 µg eines Kinase spezifischen Substrats (MBP: myline basic protein; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) oder Casein als Substrat für Plk1; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zusammen mit 1 µCi radioaktivem γ -³²P-ATP (6000Ci/mmol; Amersham) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Substrat-Phosphorylierung wurde anschließend durch Autoradiographie detektiert und mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji) quantifiziert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli 1970). Das SDS-Gel besteht aus einem 10 bis 15%-igen Trenngel (Trenngel-Puffer: 3 M Tris/HCl, 27,7 mM SDS, pH 8,8, 7 Volumeneinheiten Acrylamid, verdünnt in H₂O bis zur gewünschten Prozentigkeit) und einem 5%-igen Sammelgel (Sammelgel-Puffer: 313 mM Tris/HCl, 6,9 mM SDS, pH 6,8, 1 Volumeneinheit Acrylamid).

Für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 50 µg Proteinlysate oder die Überstände einer Immunpräzipitation verwendet. Proteinlysate wurden zunächst mit 0,2 Volumeneinheiten 5 x SDS-Probenpuffer 15% (w/v) SDS, 15% (v/v) β -Mercapto-

ethanol, 50% (v/v) Glycerol, 0.25% (w/v) Bromophenolblau) gemischt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden sie in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamidgels geladen. Zum Größenvergleich wurden 10 µl eines Protein-Größenstandards (PageRuler Unstained protein ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCL, pH 6,8, 192 mM Glycin, 0,15% (w/v) SDS) bei 26 mA für 1 Std. und danach bei 30 mA für weitere 2 Std. aufgetrennt.

Westernblot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgten entweder eine Coomassie-Färbung oder ein Transfer und eine Immobilisierung auf eine Nitrocellulose-Membran mittels „Semi-Dry“ (Halbtrocken)-Blot. Das Gel wurde auf die Membran und beides zwischen zwei Filterpapiere gelegt. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer (0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris/HCl, 192 mM (v/v) Glycin, 20% Methanol, pH 8,3) in einem „Semi-Dry“-Blotter bei 200 mA für 1,5 Stunden. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) 2 Minuten inkubiert, um den elektrophoretischen Transfer der Proteine zu kontrollieren, die durch Ponceau S angefärbt werden. Nach einer 1-stündigen Blockierung der Membran mit 5% (w/v) Milchpulverlösung (in TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2, 160 mM NaCl), wurde die Membran mit Primärantikörper, verdünnt in 3% (w/v) BSA (Fraktion V; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in TBS, bei 4°C über Nacht schwenkend inkubiert. Nach 4 Waschschritten zu je 5 Minuten mit TBST (0,1% Tween-20 in TBS) erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen HRP-konjugierten Sekundärantikörper, verdünnt in 3% (w/v) Milchpulver in TBS, für 2 Std. bei Raumtemperatur. Nach weiteren 4 Waschschritten zu je 5 Minuten mit TBST wurde eine Immundetektion der Proteine durch Chemolumineszenz durchgeführt.

Coomassiefärbung

Um mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine im Gel nachzuweisen, wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue verwendet (Neuhoff *et al.* 1988). Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dafür kurz in Wasser geschwenkt und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) H₂O) und anschließend 10 Minuten in einer Coomassie-

Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) H₂O) geschwenkt. Zur Entfernung des überschüssigen und ungebundenen Farbstoffs wurde das SDS-Polyacrylamidgel in einer Entfärbelösung (5% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, 88% (v/v) H₂O) unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Entfärbelösung wurde alle 10-15 Minuten gewechselt, bis die Proteinbanden im Gel sichtbar wurden und deutlich hervortraten. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

Immunodetektion

Für die Detektion wurde eine Luminol-Substratlösung verwendet. Dafür wurden die frisch angesetzten Lösungen (Lösung A: 0,1 M Tris (pH 8,5), 0,4 mM β -Cumarsäure, 2,5 mM Luminol (Biomol, Hamburg, Deutschland); Lösung B: 0,1 M Tris (pH 8,5), 0,03% (v/v) H₂O₂) zu gleichen Teilen miteinander gemischt. Die Membran wurde mit der Luminol-Substratlösung für 1-2 Minuten unter Schwenken inkubiert. Die Chemolumineszenz der Substratreaktion wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms für verschiedene Expositionszeiten dokumentiert.

Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression von rekombinantem Protein wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) verwendet, der zuvor mit dem entsprechenden Plasmid (pET28a-Aurora A-, B-, C (Crosio *et al.* 2002); pRSET-Aurora A-WT (Briassouli *et al.* 2006) oder pGEX-Cdc25C, Fragment 200-256) transformiert wurde.

I Expression und Aufreinigung von pET28a-Aurora A-, B-, C-Plasmiden:

Ein Einzelklon der transformierten Bakterien wurde in 40 ml Selektions-LB-Medium (20 μ g/ml Kanamycin) inokuliert und über Nacht bei 30°C geschüttelt (180 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit Selektions-LB-Medium (20 μ g/ml Kanamycin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 2 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) für weitere 5 Std. bei 30°C. Die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension (20 Minuten 4000 rpm, 4°C) erfolgte entweder

die sofortige Aufreinigung oder der Zelniederschlag wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Aufreinigung wurde der Zelniederschlag zunächst in 3 ml Resuspensionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, Protease Inhibitoren (komplett EDTA-frei; Roche, Basel, Schweiz) 1:25 verdünnt, 0,5 µM Microcystin LR) aufgenommen und nach Resuspension der Bakterien, die Zellen durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und anschließender Sonifizierung (Branson Sonic Power sonifier Model S125, Branson, Danbury, CT, USA) aufgeschlossen. Nach 3 Zentrifugationsschritten (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurde der Überstand mit 100-200 µl Ni²⁺-NTA Agarosekugeln (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und rotierend für 2-4 Std. bei 4°C inkubiert. Die Kugeln mit dem daran gebundenen, rekombinanten Protein wurden nacheinander zweimal mit 1 ml eiskaltem Resuspensionspuffer, zweimal mit Waschpuffer I (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, Protease Inhibitoren, 1:25 verdünnt) und zweimal mit Waschpuffer II (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, Protease Inhibitoren, 1:25 verdünnt) gewaschen. Das rekombinante Protein wurde durch Zugabe von 3 x 200 µl Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, Protease Inhibitoren 1:25 verdünnt) bei 4°C von den Kugeln eluiert. Die Reinheit des rekombinanten Proteins wurde durch eine Coomassie-Färbung nach Lauf eines Polyacrylamidgels und zusätzlich mittels Westernblot, analysiert. Die Umpufferung des Eluats zur Entfernung des Imidazols und zur Aufkonzentrierung des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe von Sephadex G5-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben.

II Expression und Aufreinigung von pRSET-Aurora A-WT-Plasmiden:

Ein Einzelklon der transformierten Bakterien wurde in 50 ml Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) für weitere 4 Std. bei 30°C. Die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension (20 Minuten 4000 rpm, 4°C) erfolgte entweder die sofortige Aufreinigung (entsprechend der Aufreinigung I) oder der Zelniederschlag wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

III Expression und Aufreinigung von pGEX-Cdc25C (Fragment 200-256):

Ein Einzelklon der transformierten Bakterien wurde in 50 ml Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit 1 L Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (37°C, 200 rpm). Nach Erreichen dieser OD₆₀₀ wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,8 mM zum LB-Medium für 2,5 h bei 25°C induziert. Nach dem Induktionsende wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 20 min bei 4000 rpm geerntet und in 10 ml PBS mit 1% (v/v) Triton X-100 und Protease Inhibitoren (1:25 verdünnt) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizierung Branson Sonic Power sonifier Model S125, Branson, Danbury, CT, USA) auf Eis. Nach 3 Zentrifugationsschritten (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurde das Lysat mit 600 µl Glutathion-Sepharose (äquibriert in NETN-Puffer) vermischt. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose erfolgte rotierend für 4 h bei 4°C. Dann wurde das Lysat-Glutathion-Sepharose Gemisch abzentrifugiert (2000 rpm, 1 min, 4°C) und viermal mit 20 ml PBS/1% (v/v) Triton-Puffer gewaschen. Die an Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsproteine wurden anschließend einmal mit PBS ohne Detergenz gewaschen (2000 rpm, 1 min, 4°C). Das rekombinante Protein wurde durch Zugabe von 3 x 200 µl Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 25 mM reduziertes Glutathion) bei 4°C von den Kugeln eluiert. Lösliches Glutathion wurde mit Hilfe einer Umpufferung in Kinase-Puffer (50 mM HEPES, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 1mM DTT, 10 µM β-Glycerophosphat, 1mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 0,1 mM PMSF; Buscemi *et al.* 2004) mit NAP-5-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt. Das rekombinante Protein wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend in *in vitro* Kinase-Reaktionen eingesetzt.

Zellkultur

Kultivierung humaner Zellen

Einfrieren von humanen Zellen

Zum Einfrieren humaner Zellen wurden die mit Trypsin abgelösten Zellen einer zu 80% konfluenten Zellkulturschale bei 5 Minuten bei 1000 rpm, (Raumtemperatur) zentrifugiert und anschließend der Zellrückstand in 500 µl Einfriermedium (70% (v/v) Kulturmedium, 20% (v/v) FKS (fötale Kälberserum; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Nach Überführung in Kryogefäße, wurden diese einen Tag bei -80 °C gelagert und schließlich in einen Tank mit flüssigem Stickstoff endgelagert.

Auftauen von humanen Zellen

Die bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden im Wasserbad oder im Inkubator bei 37°C schnell aufgetaut und anschließend in Zellkulturschalen mit Zelllinien-spezifischen Kulturmedium transferiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Allgemeinen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Passagieren von humanen Zellen

Die Zellen wurden bei Erreichen einer etwa 80%-igen Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 1 ml warme Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen sich abzulösen begannen, wurden die restlichen Zellen durch Zugabe von PBS von der Platte abgespült und eine definierte Zellmenge in eine neue Zellkulturschale überführt.

Für die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Medien verwendet. RPMI-1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute 1640, 10% (v/v) FKS (PAA, Deutschland), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, PAA, Deutschland), L-Glutamin (584 mg/l)) wurde für die Kultivierung HCT116-abgeleiteter Zelllinien verwendet. DMEM-Medium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) wurde für die Kultivierung von HeLa-Zellen und Phoenix-Zellen verwendet. BJ-hTert-Fibroblasten wurden in DMEM-Medium mit 15% FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000

U/ml, PAA, Deutschland), L-Glutamin (584 mg/l) kultiviert. Das Serum (FKS) wurde vor der Verwendung 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

Zellzyklus-Synchronisation humaner Zellen

Für die Synchronisierung humaner Zellen am G1/S-Übergang des Zellzyklus, wurden die Zellen zunächst 16 Stunden mit 2 mM Thymidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in der S-Phase blockiert, anschließend mit vorgewärmten PBS sechsmal für 5 Minuten (insgesamt 30 Minuten) gewaschen, um das Thymidin zu entfernen, und in frisches Medium für weitere 8 Std. kultiviert. Durch einen erneuten Thymidinblock für 16 Std. wurde eine Synchronisierung am G1/S-Übergang des Zellzyklus erzielt.

Für eine Synchronisierung in der Mitose (Prometaphase) wurden doppelt Thymidin geblockte Zellen 30 Minuten mit PBS gewaschen und in Medium mit 300 nM Nocodazol für 11 Std. entlassen.

Um Zellen in der Metaphase der Mitose zu synchronisieren, wurden zweimal mit Thymidin geblockte humane Zellen für 6 Std. in frisches Medium entlassen und anschließend mit 30 µM MG132 für zusätzliche 2,5 Stunden behandelt. MG132 ist ein Proteasomen-Inhibitor, der den Austritt aus der Metaphase u. a. durch Inhibierung des Cyclin B Abbaus verhindert.

Zur synchronisierten Progression der Zellen durch die Mitose hindurch wurden die Zellen mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert, anschließend, zur Entfernung des Thymidins für 30 Minuten mit PBS gewaschen und dann in Medium ohne Thymidin für bis zu 14 Std. weiter kultiviert. Dabei traten die Zellen etwa 7,5 Std. nach Auswaschen des Thymidins in die Mitose ein und vollendeten nach etwa 8,5-9 Std. die Zytokinese.

Um einen mitotischen Arrest und eine mitotische Spindelkontrollpunkt (SCP, spinde checkpoint)-Aktivierung zu induzieren, wurden asynchron wachsende, humane Zellen entweder mit 300 nM Nocodazol, 150 nM Taxol oder 68-100 µM Monastrol für 16 Std. behandelt.

Durch eine Behandlung humaner Zellen mit 350-700 nM Adriamycin (Sigma-Aldrich, Steinheim) oder mit 0,5 µg/ml Neocarcinostatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 0,5 Std. wurde DNA-Schaden induziert.

Transfektion und Infektion humaner Zellen mit Plasmid-DNA

Transiente Transfektionen mit Plasmid-DNA erfolgten entweder durch Komplexierung der DNA mit Kalziumphosphat, durch PEI (Polyethylenimin), durch Metafectene® (Biontix Laboratories GmbH, Martinsried, Deutschland) oder mit Elektroporation unter Verwendung eines BioRad Elektroporators (Hercules, CA, USA).

Transfektion mit Hilfe von Kalziumphosphat

Für eine transiente Transfektion mit Kalziumphosphat wurden Phoenix-Zellen 24 Std. vor der Transfektion so ausplattiert, dass am Tage der Transfektion eine 70%ige Konfluenz der Zellen vorlag. Eine Stunde vor der Transfektion wurde ein Waschschrift mit PBS und ein Mediumwechsel mit frischem DMEM-Medium vorgenommen. Kurz vor der Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl einer DNA-Kalziumchlorid-Mischung angesetzt. Dazu wurden 20 µg des zu transfizierenden Plasmids mit 62 µl einer frischen, 2,5 M Kalziumchlorid-Lösung gemischt und auf ein finales Volumen von 500 µl H₂O eingestellt. Nach guter Durchmischung wurde das DNA-Kalziumchlorid-Gemisch auf 500 µl 2 x HBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) getropft, wobei eine gleichzeitige intensive Durchmischung durch das Einblasen von Luft mittels einer Pasteurpipette erfolgte. Unmittelbar darauf wurde dieses Kalziumphosphatgemisch tropfenweise auf die Zellen verteilt. Schließlich wurden die Zellen 4 Std. im Inkubator inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die weiteren Analysen erfolgten 48 Std. nach der Transfektion.

Transfektion mit Hilfe von PEI (Polyethylenimin)

Für Transfektionen von Plasmid-DNA mit PEI wurden die Zellen 24 Stunden zuvor in einer geeigneten Zellzahl ausplattiert, so dass am Tage der Transfektion eine 70%ige Konfluenz der Zellen vorlag. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel mit frischem Kultur-Medium vorgenommen. Der Transfektionsansatz wurde nach folgendem Schema gemischt.

Transfektionsansatz:

A	15 µg Plasmid-DNA
	Add 90 µl H ₂ O
B	44,5 µg PEI
	Add 156 µl H ₂ O

Reaktionsansatz B wurde zu A gegeben und vorsichtig 10-mal auf- und ab pipettiert. Das Plasmid-PEI-Gemisch wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen geben. Nach 24 Std. bei 5% CO₂ und 37°C wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel vorgenommen. Die weiteren Analysen erfolgten 48 Std. nach der Transfektion.

Elektroporation

Elektroporationen wurden mit dem BioRad Elektroporator (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Dazu wurden 1,6 Mio. HeLa oder 3 Mio. HCT116-Zellen in 400 µl Medium aufgenommen, mit 20 µg Plasmid-DNA gemischt und bei 200 V und 950 µF (HeLa) oder 300 V und 500 µF (HCT116) in 4 mm Küvetten (BioRad, Hercules, CA, USA) elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in Zellkulturschalen ausplattiert und nach 4-stündiger Inkubation mit PBS dreimal gewaschen. Eine weitere Analyse der Zellen erfolgte 24 Std. nach Elektroporation mittels FACS- und/oder Westernblot oder Immunfluoreszenz-Analysen.

Transfektion mit Hilfe von Metafectene[®]

Transfektionen mit Hilfe von Metafectene[®] (Biontex Laboratories GmbH, Martinsried, Deutschland) erfolgten nach Angaben des Herstellers. Nach 4 Std. bei 5% CO₂ und 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach 24 Std. erfolgten Zell- und Protein-Analysen mittels FACS und/oder Westernblot oder Immunfluoreszenzen.

Retrovirale Infektion

24 Std. vor der Transfektion wurden 7×10^5 Phoenix-Zellen in eine 10 cm-Kulturschale ausplattiert, so dass sie am Tag der Transfektion 70-80% Konfluenz erreicht hatten. Das retrovirale-Plasmid wurde mittels Kalziumphosphat-Transfektion in die Phoenix-Zellen eingebracht und nach einer 24-stündigen Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C, ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation der Zellen wurde das Medium vollständig abgenommen und bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Zugabe von 5 µg/ml Polybren wurden 8 ml des Virusüberstandes zur Infektion von humanen immortalisierten BJ-hTert-Fibroblasten eingesetzt, die einen

ekotrophen Rezeptor exprimieren, eingesetzt. 72 Std. nach der Infektion wurden die BJ-hTert-Zellen in Selektionsmedium mit 2,5 µg/ml Blastizidin im Verhältnis 1:2 subkultiviert.

Selektion humaner Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien

Für eine stabile Selektion wurden die Zellen 48 Std. nach der Transfektion in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) in Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika (1 µg/ml Puromycin, 300 µg/ml G418 oder 2,5 µg/ml Blastizidin) ausplattiert. Dabei erlaubt ein Zytostatika-Resistenzgen des transfizierten Plasmids eine Selektion von Zellen, die das Plasmid permanent in das Genom integrieren konnten. Nach einer etwa 4-wöchigen Selektion wurden einzelne Zellklone generiert, die in eine 24-Lochplatte überführt und weiter kultiviert wurden.

Karyotyp-Analysen

Für Analysen des Karyotyps wurden humane Zellen für 4 Std. mit 300 nM Nocodazol behandelt, mit Trypsin/EDTA geerntet, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 3 ml auf 37°C vorgewärmtes, 40%-iges RPMI überführt. Nach vorsichtigem Durchmischen, wurden die Zellen bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Eine Vorfixierung erfolgte durch Zugabe von 1 ml eiskaltes modifiziertes Carnoy's Fixativ (Mehlhop und Gardner 1982) (3 Volumeneinheiten Methanol (v/v) und 1 Volumeneinheit Eisessig (v/v)) und gutem Durchmischen. Danach wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und vorsichtig 2 ml Fixativ tropfenweise hinzugegeben. Nach dreimaliger Wiederholung von Zentrifugation und Fixativ-Zugabe erfolgte entweder die Lagerung der Lösungen bei -20°C oder die weitere Prozessierung.

Dazu wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Zellrückstand in etwa 500 µl 100%-iger (v/v) Essigsäure aufgenommen. Es wurden, nach vorsichtiger und gründlicher Durchmischung, je 50-100 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Pasteurpipette auf die zuvor mit Ethanol gereinigten und im 4°C kühlen Wasser aufbewahrten Objektträger getropft. Das Tropfen (etwa eine Armlänge vom Objektträger entfernt) erfolgte auf noch feuchte Objektträger, die sofort für einige Minuten in einer 37°C vorgewärmten, feuchten Kammer inkubiert wurden. Dadurch wurden der vollständige Aufschluss der Zellen und ein flächiges Verteilen der Chromosomen gewährleistet.

Nach Trocknen der Objektträger bei Raumtemperatur wurden diese mit einer 8%-igen (v/v) Giemsa Färbelösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 15 Minuten gefärbt, danach mit Wasser gewaschen und erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger mit 20 µl Euparal (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)-Medium eingebettet. Die Langzeit-Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4°C. Die Zählung der Chromosomen erfolgte anschließend mit Hilfe des Leica DM6000B Mikroskops.

Untersuchungen der Zellapoptose

Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als apoptotische Analysemethode, wurden behandelte Zellen mit PBS/EDTA geerntet, einmal mit PBS gewaschen und der Zellrückstand in 135 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde als Triplikat (40 µl) in eine weiße Mikrotiterplatte Greiner (Frickenhausen, Germany) pipettiert und dann 10 µl einer 125 µM Stammlösung des fluoreszierenden Caspase 3-Substrats, Ac-DEVD-AMC (Alexis, Grünberg, Deutschland), zu einer finalen Konzentration von 25 µM hinzugegeben. Infolge einer proteolytischen Spaltung des Substrats wurde Fluoreszenz frei, die proportional zur Menge der aktivierten Caspase-3 war und bei 485 nm gemessen werden konnte. Die Mikrotiterplatte wurde dazu bei 37°C inkubiert und die Proben alle 30 Minuten, über einen Zeitraum von 3 h, bei einer Emission von 485 nm mit Hilfe des Victor² 1420 Multilabel Counters (Wallac Oy, Turku, Finland) gemessen.

Kolonie-Formations-Assay

Für eine Beurteilung des Zellwachstums wurden 3000 Zellen in einer 12-Loch-Platte ausplattiert und für 96 Std. mit verschiedenen Konzentrationen eines spezifischen Inhibitors behandelt. Danach wurde das Medium gründlich abgesaugt und die Schalen getrocknet. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit 70% Ethanol fixiert. Die getrockneten Schalen wurden schließlich mit einer Kristallviolettlösung (Merck, Darmstadt Deutschland) (0,1% (w/v) in 20% Ethanol) 30 Minuten gefärbt und anschließend zwei-dreimal in einem Wasserbad gespült und danach getrocknet.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem FACS Calibur-Analysegerät (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe von PI (PI-FACS)

Zur Zellzyklus-Analyse eignet sich die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid (PI; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Der DNA-Gehalt lässt eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0 (DNA-Gehalt 2N), S ($> 2N$, $< 4N$) und G2/M (4N) zu. Darüber hinaus können polyploide Zellen ($> 4N$), sowie apoptotische Zellen („sub-G1“, $< 2N$) identifiziert werden.

Die zu analysierenden Zellen wurden mit Trypsin/EDTA oder PBS/EDTA geerntet und mit 70%-igem, eiskalten EtOH unter Vortexen fixiert und anschließend mindestens über Nacht bei 4°C gelagert. Der in EtOH fixierte Zellrückstand wurde zweimal mit PBS gewaschen, in Abhängigkeit der Zellmenge, in 100-400 µl RNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1 µg/ml in PBS verdünnt) resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 50 µg/ml PI, in PBS verdünnt, hinzu gegeben. Die Messung erfolgte mit einem 585 ± 21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) für Propidiumiodid (Emission 617 nm). Die Auswertung der DNA-Verteilung erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences).

Bestimmung des mitotischen Index durch Detektion des MPM2-Epitops (MPM2-FACS)

Der MPM2 Antikörper ist gegen Mitose-spezifische Phosphoepitope am Kinetochor, auf den Chromosomenarmen, dem Mittelkörper und den Spindel-Polen gerichtet (Tapia *et al.* 2006). Ein positives MPM2-Signal ist bei Zellen der frühen Prophase bis zur Anaphase zu detektieren.

Für eine MPM2-FACS-Analyse wurden die Zellen zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm, 4°C) und mit MPM2-Waschpuffer (0.05% Triton X-100 in PBS) zweimal gewaschen. Der Zellrückstand wurde in 50-100 µl Färbelösung (2% FKS, 0,2% Triton-X-100 in PBS) mit anti-MPM2 Antikörper (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA; 1 µg/µl 1:1600 verdünnt) 2 Std. bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit MPM2-Waschpuffer gewaschen und mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (AlexaFluor488, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 2µg/µl 1:2000 verdünnt) eine weitere Stunde inkubiert. Nach einer 30-minütigen RNase-Behandlung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1 µg/ml in PBS verdünnt) konnte die Messung der Proben bei 488 nm Anregungswellenlänge erfolgen. Die Auswertung der mitotischen Zellen (4N) erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences).

Immunfluoreszenz-Färbung und Mikroskopie

Alle mikroskopischen Studien wurden an einem Leica AF6000 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe der ORCA ERA Kamera von Hamamatsu (Hamamatsu, Japan) sowie der LAS AF 1.6.2 bzw. der 2.2.0 Software von Leica (Wetzlar, Deutschland). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe® Photoshop® CS3 Extended, Version 10.0 (Adobe, München, Deutschland).

Immunfluoreszenz-Färbung

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen einen Tag vor der Behandlung auf Deckgläschen ausgesät. Zur besseren Anheftung der Zellen wurden die Deckgläschen mit 0,3% (w/v) Polylysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) überschichtet. Nach der Fixierung der Zellen mit 2% PFA (Paraformaldehyd) in 1x PHEM (60 mM PIPES pH 7.0, 27 mM HEPES, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO₄) für 5 Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte ein Permeabilisations- und Extraktionsschritt mit eiskaltem Methanol bei -20°C für 5 Minuten (für Spindel- und Spindelpolfärbungen) bzw. mit 0,5% Triton-X-100 oder mit 1% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat; Appli-Chem, Darmstadt, Deutschland; für Kinetochor-assoziierte Proteine) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer 30-minütigen Blockierung der fixierten Zellen mit 5% FKS (fötale Kälberserum; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) erfolgte die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern in 2% FKS für jeweils 2 Std. bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen können den Tabellen 2 und 3 entnommen werden. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA mit Hilfe des Farbstoffs DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 20 mg/ml) 1:15000 verdünnt in PBS, für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit den verschiedenen Antikörpern bzw. mit dem Farbstoff DAPI erfolgten 3 Waschschrte mit PBST (PBS mit 0,75% (v/v) Tween). Nachdem ein letzter Waschschrte in PBS oder H₂O erfolgte, wurden die Deckgläschen auf Filter-Papier 10-15 Minuten getrocknet. Die Proben wurden in Vecta-Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingebettet und anschließend mit Nagellack versiegelt.

Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen fixierter Proben erfolgten mit einem Leica DM6000B Mikroskop (Wetzlar, Deutschland), das mit einer CCD-Kamera (Orca-ER, Hamamatsu, Japan) ausgestattet war. Einzelbilder wurden mit einem 100er Öl-Objektiv (HLX PL Apo), und 2-facher Vergrößerung, Übersichtsaufnahmen mit einem 60er Glycerin-Objektiv und 2-facher Vergrößerung generiert. Es wurden Aufnahmen in Z-Ebene mit Stapelabständen von 0,213 μm aufgenommen, anschließend dekonvolviert und die Maximal-Projektionen generiert. Gegebenenfalls wurden die Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe der Leica LAS-AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence)-Software, Version 1.6.1 bzw. 2.1, quantifiziert.

Lebendzell-Analysen

Für Zellzyklus-Analysen in Echtzeit, wurden mit Hilfe des BioStation-Systems der Firma Nikon (BioStation IM v2.1.0131, Tokio, Japan), das mit einem 40er Objektiv ausgestattet war, Bilder von pcDNA3-H2B-GFP transfizierten Zellen, die durch die Mitose progressierten, mit einem ein-minütigen Abstand generiert. Die Auswertung und Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software der BioStation (NIS Elements AR 3.1), mit Adobe[®] Photoshop[®] CS3 Extended, Version 10.0 (Adobe, München, Deutschland) und mit der VirtualDub Software-Version 1.9.1. Zur Visualisierung mitotischer Spindeln wurden die Zellen mit pEF-mCherry- α -tubulin (freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Brandeis, Jerusalem, Israel zur Verfügung gestellt) und pEGFP-H2B transfiziert und in 6 cm-Petrischalen mit Glasboden (IBIDI GmbH, Martinsried, Deutschland), in RMPI-Medium (mit 25 mM HEPES gepuffert) ausplattiert. Es wurden Bilder in Z-Ebene mit Stapelabständen von 2 μm im zwei-minütigen Abstand aufgenommen. Dazu wurde ein inverses Mikroskop der Firma Leica (Leica AF 6000 LX) mit beheizbarer Kammer und einer Leica DFC 350 FXRX-Kamera verwendet. Einzelaufnahmen wurden mit einem 100er Öl-Inversionsobjektiv (Leica, Wetzlar, Deutschland), Übersichtsaufnahmen mit einem 40er-Inversionsobjektiv (Leica, Wetzlar, Deutschland) generiert. Bilder und Videos wurden mit Hilfe der Leica LAS-AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence)-Software, Version 1.6.1 bzw. 2.1, prozessiert und dekonvolviert.

Ergebnisse

1. Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt und seine Inhibierung durch Gö6976

Eine partielle Dysfunktion des SCP in humanen Tumoren ist ein häufiges Ereignis (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hernando *et al.* 2004; Perez de Castro *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008) und trägt vermutlich zur Tumorgenese bei (Bharadwaj und Yu 2004; Musacchio und Salmon 2007). So zeigen heterozygote „Knockout-Mäuse“ verschiedener SCP-Gene eine erhöhte Aneuploidie und spontane oder eine Karzinogen-induzierte Tumorgenese (Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008). Homozygote „Knockout“-Mäuse hingegen, sind nicht lebensfähig, was zeigt, dass der mitotische SCP essentiell für die Vitalität der Zelle ist (Dobles *et al.* 2000; Kalitsis *et al.* 2000). Diese Beobachtungen gaben Anlass zur Adressierung des mitotischen SCP als eine mögliche neue Zielstruktur für die Chemotherapie.

Gö6976 ist ein Inhibitor des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes

Der vorliegenden Arbeit ging ein Zell-basierter „Screen“ voraus, in dem HCT116-Zellen zuerst mit Nocodazol behandelt wurden, um die Zellen SCP-abhängig in der Mitose zu arretieren. Danach wurden die Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren behandelt und der mitotische Index mittels FACS-Analysen ermittelt (Abb. 14).

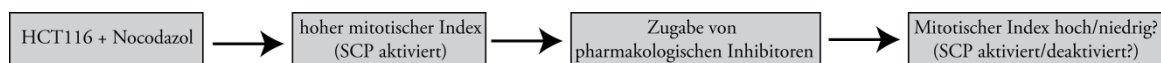


Abbildung 14: Ein Zell-basierter „Screen“ zur Identifizierung pharmakologischer Inhibitoren des mitotischen SCP. Zur Identifizierung pharmakologischer Inhibitoren des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes, wurden HCT116-Zellen mit 300 nM Nocodazol für 15 Std. behandelt, um den mitotischen SCP zu aktivieren. Danach wurden die Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren für 2 Std. behandelt und die potentielle Inaktivierung des SCP mittels FACS-Analysen detektiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit A. Kienitz, Dr. C. Vogel und V. Schneider generiert.

Da mehrere Kinasen im SCP-Signalweg involviert sind, hat unser Labor kommerziell erhältliche Protein-Kinase-Inhibitoren wie etablierte Inhibitoren für u.a. die Protein Kinase A (PKA), PKC, CDK, Chk1, p38, Raf und PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)

evaluiert (Daten nicht gezeigt; Stolz *et al.* 2009). Unter den getesteten Inhibitoren wurde die Indolokarbazol-Verbindung Gö6976 als ein Inhibitor identifiziert, der den induzierten mitotischen Arrest aufhebt (Daten nicht gezeigt; Stolz *et al.* 2009). HCT116 und HeLa-Zellen zeigten dabei eine halbmaximale Inhibierung nach Nocodazol oder Taxol von 0,8 oder 1,2 μM . Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Gö6976 einen durch Einführung von Spindel-Schaden induzierten mitotischen Arrest aufhebt und den frühzeitigen Abbau von Securin und Cyclin B, sowie die vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden induziert (Daten nicht gezeigt; Stolz *et al.* 2009). Diese beschriebenen Phänotypen sind Folgen einer Reaktivierung des APC/C nach Inhibierung des SCP (Musacchio und Salmon 2007). Die molekularen Mechanismen dieser Inhibierung des mitotischen SCP waren zu diesem Zeitpunkt aber wenig verstanden. Mit Hilfe umfassender Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die Gö6976-vermittelte Inhibierung des mitotischen SCP im Detail untersucht. Dabei wurde der Fokus auf die Identifizierung möglicher Zielstrukturen von Gö6976 gelegt.

Die Funktionalität des SCP wird vor allem durch die SCP-Komponenten Mad1, Mad2, Mps1, Bub1, Bub3 und BubR1 vermittelt (Chen *et al.* 1996; Li und Benezra 1996; Taylor und McKeon 1997; Chen *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1998; Chan *et al.* 1999; Abrieu *et al.* 2001; Winey und Huneycutt 2002; Kienitz *et al.* 2005). Aber auch Plk1 (Golsteyn *et al.* 1995; Barr *et al.* 2004) sowie Aurora A (Crane *et al.* 2004; Liu und Ruderman 2006) und Aurora B (Shannon und Salmon 2002; Ditchfield *et al.* 2003) stellen weitere mitotische Kinasen dar, die für die Regulation des SCP wichtig sind. Eine Aktivierung des SCP ist mit der Rekrutierung von SCP-Proteinen an Kinetochore, die nicht an Mikrotubuli angeheftet sind oder nicht unter Spannung stehen, assoziiert (Musacchio und Salmon 2007). Da gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung von Zellen mit Gö6976 einen SCP-induzierten mitotischen Arrest aufhebt, wurde die Lokalisierung der SCP-Proteine Bub1 und BubR1 an die Kinetochore nach einer Gö6976-Behandlung überprüft.

Dazu wurden HCT116-Zellen sequentiell mit 300 nM Nocodazol für 14 Stunden behandelt, um den SCP zu aktivieren und mit 30 μM des Proteasom-Inhibitors MG132 oder mit 200 μM ALLN für eine halbe Stunde inkubiert, um den mitotischen Austritt in Gegenwart von Gö6976 zu verhindern. Nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit 2 μM Gö6976 oder mit dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle, erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung der SCP-Proteine Bub1 und BubR1 sowie der Kinetochor-assoziierten Proteine mit dem anti-CREST Antikörper als Positivkontrolle sowie der DNA mit Hilfe des Farbstoffs DAPI (Abb. 15).

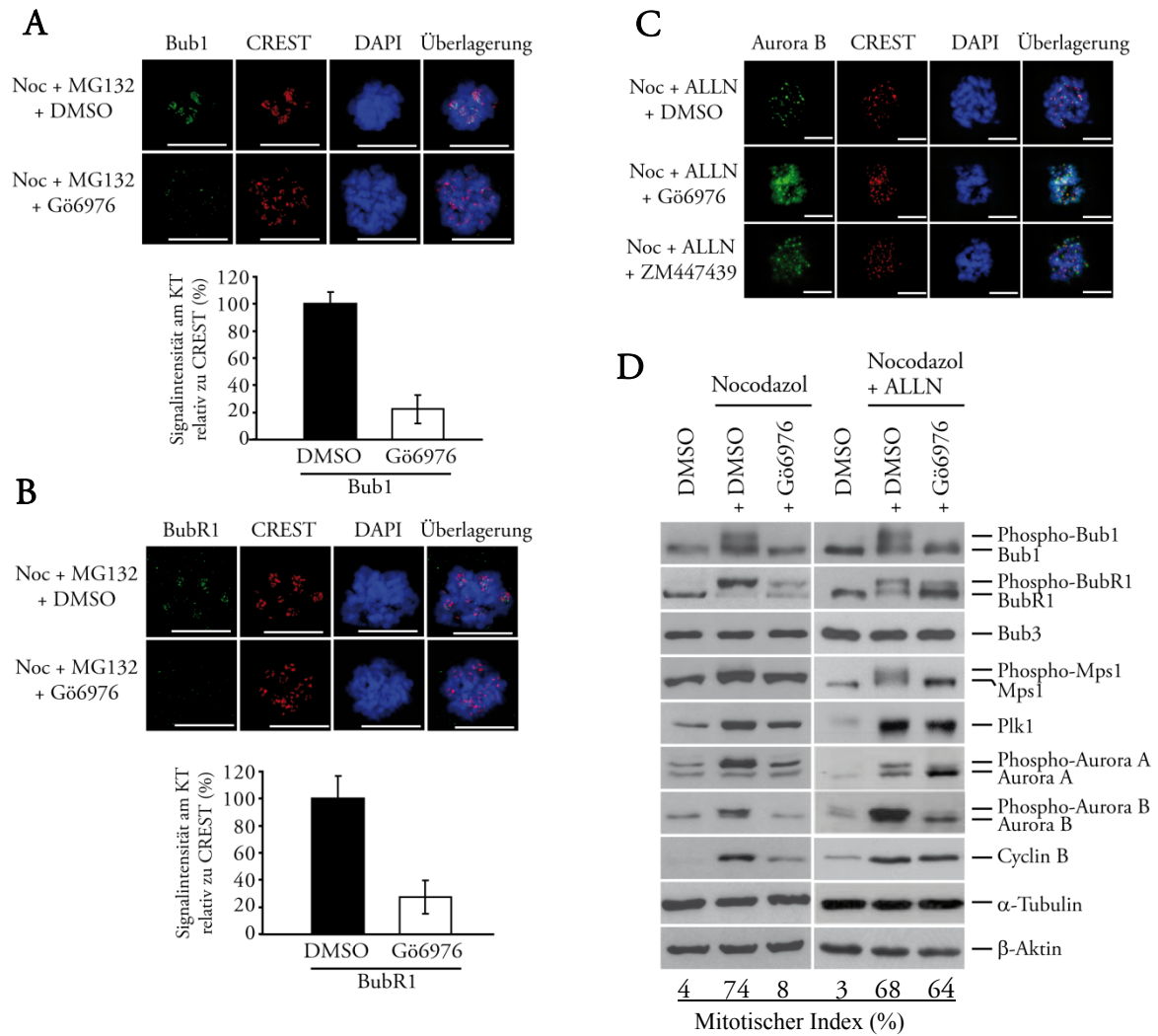


Abbildung 15: Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert den mitotischen SCP. A, B) HCT116-Zellen wurden sequentiell für 14 Std. mit 300 nM Nocodazol (Noc) und für 0,5 Std. mit 30 μ M MG132 oder 200 μ M ALLN (C) behandelt, um den Austritt der Zellen aus der Mitose in Gegenwart von Gö6976 zu verhindern. Nach einer 2 Std. Behandlung der Zellen mit 2 μ M Gö6976 oder DMSO als Negativkontrolle (A, B, C) oder 2 μ M ZM447439 (Ditchfield *et al.* 2003) als Positivkontrolle (C), wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz-Färbung die SCP-Proteine Bub1 (A grün), BubR1 (B grün) oder Aurora B (C, grün) sowie die Kinetochore (CREST, rot) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Es sind repräsentative Beispiele für Kontrollzellen, ZM44743- bzw. Gö6976-beandelter Zellen als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μ m. Pixel-Intensitäten von Bub1 (A) und BubR1 (B) am Kinetochor wurden relativ zur Intensität des CREST-Signals quantifiziert. (Mittelwert \pm SD; n = 80 Kinetochore (KT)). D) HCT116-Zellen wurden sequentiell für 14,5 Std. mit 300 nM Nocodazol und für 0,5 Std. mit 200 μ M ALLN inkubiert, um den mitotischen Austritt der Zellen zu verhindern bzw. mit DMSO als Kontrolle. Nach der zusätzlichen Inkubation der Zellen mit DMSO bzw. mit 2 μ M Gö6976 für 2 Std. wurden die Zellen lysiert und die aufgeführten Proteine im Westernblot detektiert. Es ist ein repräsentativer Westernblot mit β -Aktin und α -Tubulin als Ladekontrollen und Cyclin B als Marker für die Mitose dargestellt. Größenmarker: A) und B) 10 μ M; C) 5 μ m.

Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigten nach einer Behandlung von SCP aktivierten Zellen mit Gö6976 eine reduzierte Lokalisierung beider SCP-Proteine, Bub1 und BubR1, an die Kinetochore (Abb. 15A und 15B). Eine Quantifizierung der Menge von Bub1 und BubR1 an den Kinetochoren relativ zum Kinetochor-Marker (CREST) zeigte eine etwa 80%-ige Reduktion von Bub1 und BubR1 nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 (Abb. 15A unten und 15B unten), während das Gesamtlevel der SCP-Proteine Bub1 und BubR1 unverändert war (Abb. 15D). Die beobachtete reduzierte Kinetochor-Lokalisierung von Bub1 und BubR1 nach einer Gö6976-Behandlung der Zellen konnte ebenfalls nach einer ZM447439 und mit geringerer Effektivität, nach einer MLN8054-Behandlung detektiert werden (Kaestner *et al.* 2009). Dabei handelt es sich bei ZM447439 um einen bereits charakterisierten, spezifischen Aurora B-Inhibitor (Ditchfield *et al.* 2003) und bei MLN8054 um einen selektiven Aurora A-Inhibitor (Manfredi *et al.* 2007). Demnach könnte eine reduzierte Kinetochor-Lokalisierung von Bub1 und BubR1 nach einer Gö6976-Behandlung der Zellen auf eine Aurora B und im geringeren Maße auf eine Aurora A-Hemmung hindeuten. Immunfluoreszenz-Analysen von Aurora B zeigten eine Mislokalisierung der Kinase vom ursprünglichen Ort, den Zentromeren in der Prometaphase, auf die Chromosomen-Stränge (Abb. 15C, zweite Reihe). Eine ähnliche Mislokalisierung von Aurora B war nach einer Behandlung der Zellen mit dem Aurora B-Inhibitor ZM447439 als Kontrolle zu erkennen (Abb. 15 C, dritte Reihe). Die Lokalisierung von Aurora A, einem weiteren Familienmitglied der Aurora-Familie, war nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 hingegen unverändert und weiterhin an den Zentrosomen nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die reduzierte Lokalisierung von Bub1 an den Kinetochoren von Prometaphase-Zellen sowie die Mislokalisierung von Aurora B von der Zentromer-Region auf die Chromosomenstränge nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976, war auf Proteinebene mit einer Dephosphorylierung dieser Kinasen assoziiert (Abb. 15D). HCT116-Zellen wurden für 14 Stunden mit 300 nM Nocodazol behandelt, um den SCP zu aktivieren. Wie der Westernblot in Abbildung 15D zeigt, war der resultierende mitotische Arrest mit einer Hyperphosphorylierung der SCP-Proteine Bub1, BubR1 und Mps1 sowie der an der SCP-Regulation beteiligten Kinasen Aurora A und Aurora B verbunden. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit DMSO als Kontrolle oder mit 2 μ M Gö6976 für zwei Stunden in Abwesenheit von ALLN induzierte den Gö6976-vermittelten Austritt der Zellen aus der Mitose. Dieser war mit einem geringen mitotischen Index, mit der Degradierung von Cyclin B und der Dephosphorylierung der

SCP-Kinasen Bub1 und Mps1 und der SPC-assozierten Kinasen Aurora A und Aurora B verbunden (Abb. 15D). Auch Plk1, eine mitotische Kinase, die für die Zentrosomen-Reifung, den Aufbau des mitotischen Spindelapparates und an der Kontrolle des Eintritts in die Mitose beteiligt ist (Lane und Nigg 1996; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2002), zeigte ein erhöhtes Signal in mitotischen Zellen im Vergleich zu asynchron wachsenden oder Gö6976-behandelten Zellen (Abb. 15D). Wurden die Zellen durch eine Inkubation mit Nocodazol und dem Calpain Inhibitor I (ALLN) daran gehindert, aus der Mitose auszutreten, zeigten Kinasen, die in der SCP-Aktivierung direkt oder indirekt involviert waren, einen Verlust der mitotischen Phosphorylierung (Abb. 15D).

Der beobachtete Verlust der Hyperphosphorylierung von Bub1, Mps1, Aurora A und Aurora B nach Nocodazol und Gö6976-Behandlung der Zellen zeigt zusammen mit der reduzierten Kinetochor-Lokalisierung von Bub1 und BubR1 sowie der Mislokalisierung von Aurora B auf die Chromosomen-Stränge, dass Gö6976 direkt mit dem SCP-Signalweg interferiert.

Eine Behandlung mit Gö6976 induziert Defekte in der Spindelstruktur und der Chromosomen-Aufreihung

Aurora B ist Bestandteil des CPC (chromosomal passenger complex), der an der Kondensation der Chromosomen, der Überwachung und Korrektur fehlerhaft angehefteter Chromatiden an die Mikrotubuli (z.B. syntelische oder merotelische Bindungen) und an der Zytokinese beteiligt ist (Vader *et al.* 2008). Daher sollte die Mislokalisierung und Dephosphorylierung von Aurora B in Anwesenheit von Gö6976 die mitotische Progression der Zellen beeinträchtigen. Zur Überprüfung dessen wurden asynchron wachsende HCT116-Zellen mit 2 μ M Gö6976 inkubiert und der mitotische Index der Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden bestimmt (Abb. 16A).

Es war eine transiente Akkumulation mitotischer Zellen zu erkennen, die nach sechs Stunden mit etwa 10% ihr Maximum erreicht hatte und nach 24 Stunden mit etwa 3% wieder auf einen mitotischen Index unbehandelter, asynchron wachsender Zellen fiel (Abb. 16A). Korrelierend mit der Zunahme des mitotischen Index nach einer sechsstündigen Gö6976-Behandlung der Zellen war eine Zunahme des 4N DNA-Gehalts zu detektieren (Abb. 16A).

Die Analyse der Spindelstruktur nach einer sechs-stündigen Behandlung der Zellen mit 2 μ M Gö6976 wurde mittels Immunfluoreszenz-Analysen überprüft und ist in Abbildung 16B dargestellt. Diese Studien zeigten zylindrisch und flach ausgebildete Spindeln. Zusätzlich waren mehrere Chromosomen an den Zellpolen anstatt in der Äquatorialebene lokalisiert. Demnach ist die transiente Akkumulation mitotischer Zellen nach einer Gö6976-Behandlung mit Veränderungen der Spindelstruktur und Aufreihungsdefekten der Chromosomen in der Äquatorialebene verbunden, was auf eine Aurora B-Hemmung hindeuten könnte.

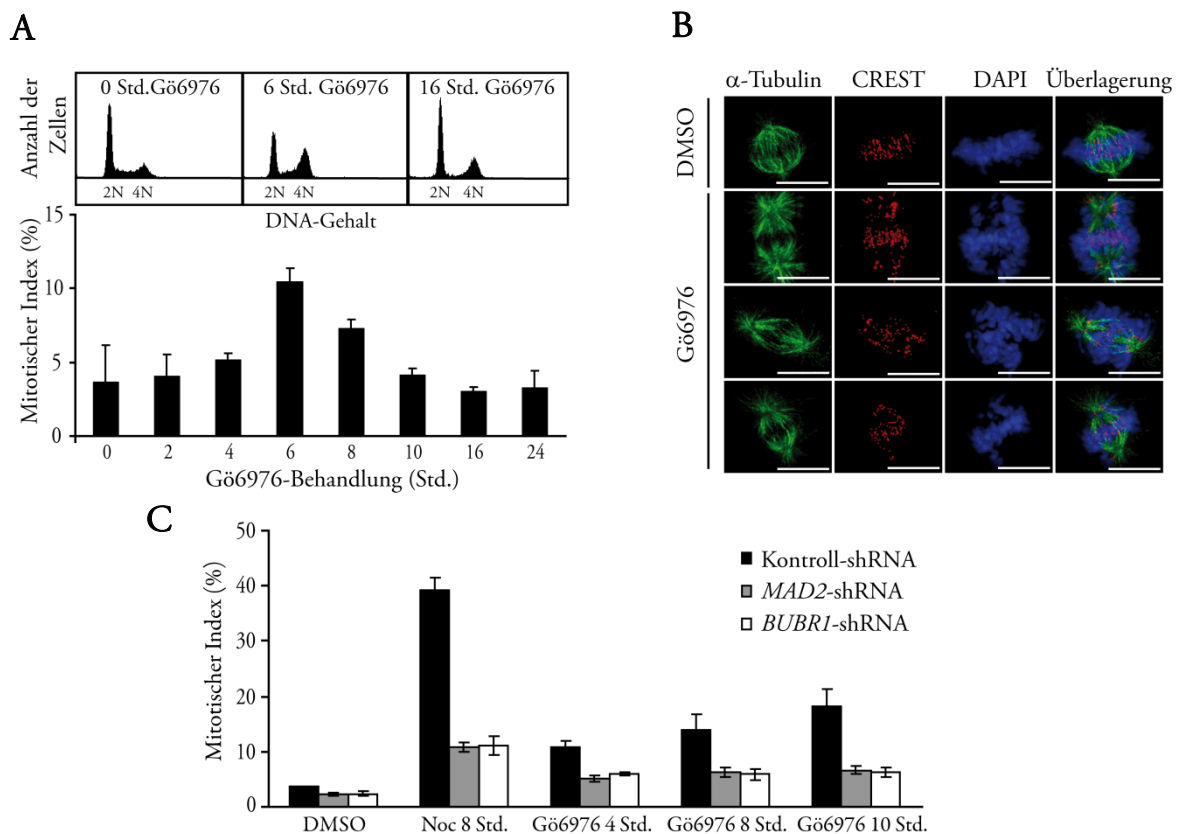


Abbildung 16: Eine Behandlung mit Gö6976 induziert eine transiente Akkumulation mitotischer Zellen und fehlerhafte Chromosomen-Aufreihungen in der Mitose. A) HCT116-Zellen wurden mit 2 μ M Gö6976 für insgesamt 24 Std. behandelt und der DNA-Gehalt sowie der mitotische Index mittels FACS-Analysen, zu den angegebenen Zeiten, ermittelt. (Mittelwert \pm SD; n = 3). B) HCT116-Zellen wurden für 6 Std. mit 2 μ M Gö6976 behandelt und anschließend mittels Immunfluoreszenz-Färbung für Aurora B (grün) und Kinetochore (CREST, rot) analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Es sind repräsentative Beispiele für Kontrollzellen bzw. für Gö6976-behandelte Zellen als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μ m. C) Die Gö6976-induzierte Akkumulation mitotischer Zellen ist abhängig vom SCP. HeLa-Zellen wurden mit einer Kontroll-shRNA, und mit einer shRNA, die gegen *MAD2* oder *BUBR1* gerichtet ist transfiziert und nach 24 Std. mit DMSO, 300 nM Nocodazol (Noc) oder 2 μ M Gö6976 für die angegebenen Zeiten behandelt. Der mitotische Index wurde mit Hilfe von FACS-Analysen ermittelt. (Mittelwert \pm SD; n = 3).

Der mitotische SCP wird durch Einführung von Spindel-Schäden durch Agenzien, die mit der Spindeldynamik interferieren, aktiviert. Die beobachteten Defekte im Spindelaufbau und in der Aufreihung der Chromosomen nach einer Gö6976-Behandlung (Abb. 16B) führten aber nicht zu einem mitotischen Arrest, sondern zu einer transienten und schwachen mitotischen Akkumulation mitotischer Zellen (Abb. 16A). Daher kann vermutet werden, dass der mitotische SCP in seiner Funktion, nach Spindel-Schaden einen Prometaphase-Arrest zu induzieren, durch eine Behandlung der Zellen mit Gö6976, eingeschränkt ist.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden HeLa Zellen mit einer Kontroll-shRNA oder einer shRNA, die gegen die SCP-Proteine Mad2 oder BubR1 gerichtet war, transfiziert und 24 Stunden später zunächst mit 300 nM Nocodazol für die angegebenen Zeiten behandelt. Da Mad2 und BubR1 essentielle SCP-Komponenten sind (Li *et al.* 1997; Chan *et al.* 1999; Skoufias *et al.* 2001; Vigneron *et al.* 2004), sollte die SCP-Aktivität in Zellen mit einem reduzierten Mad2 oder BubR1-Level im Vergleich zu Kontrollzellen, die eine Kontroll-shRNA exprimierten, geringer sein (Michel *et al.* 2001; Luo *et al.* 2002; Meraldi *et al.* 2004). Um dies zu überprüfen, wurde der mitotische Index überprüft.

Während Kontroll-transfizierte HeLa-Zellen einen mitotischen Index von etwa 40% aufwiesen, zeigten *MAD2* oder *BUBR1*-transfizierte HeLa-Zellen einen mitotischen Index von etwa 10% (Abb. 16C, Noc). Eine verminderte Expression der SCP-Proteine Mad2 und BubR1 resultierte demnach, wie zu erwarten, in einer reduzierten SCP-Aktivität. Im Weiteren wurden HeLa-Zellen mit wildtypischer oder verminderter SCP-Aktivität mit 2 µM Gö6976 für unterschiedliche Zeiten inkubiert und wiederum der mitotische Index als ein Maß für die SCP-Aktivität bestimmt. Während Kontroll-transfizierte HeLa-Zellen eine Akkumulation mitotischer Zellen von etwa 18% nach einer zehnstündigen Gö6976-Behandlung der Zellen aufwiesen, zeigten Zellen, die mit einer shRNA gegen *MAD2* oder *BUBR1* transfiziert wurden, einen geringeren mitotischen Index von etwa 5%.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass auch in einem unabhängigen Zellsystem eine Akkumulation mitotischer Zellen nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 beobachtet werden kann (Vgl. Abbildung 16A und 16C). Zum anderen zeigt die fehlende Akkumulation mitotischer Zellen in Anwesenheit eines eingeschränkt funktionalen SCP (Abb. 16C, *MAD2*-shRNA und *BUBR1*-shRNA) nach einer Gö6976-Behandlung, dass der transiente mitotische Arrest vom SCP abhängt. Eine Behandlung mit Gö6976 induziert vermutlich durch Defekte in der Spindelstruktur und der Chromosomen-Aufreihung eine transiente SCP-Aktivierung, die in einer transienten und schwachen

Akkumulation mitotischer Zellen resultiert. Eine Gö6976-vermittelte Inhibierung des SCP verhindert dann eine weitere Aktivierung des SCP, die den mitotischen Arrest aufrecht erhalten würde.

Da die beobachteten Phänotypen eine Aurora B-Hemmung vermuten ließen (Abb. 15 und 16) wurden zusätzliche Analysen durchgeführt, die diese Vermutung überprüfen sollten. Dazu wurden HCT116-Zellen nach einer vierstündigen Behandlung mit dem reversiblen Eg5/KSP-Inhibitor Monastrol mit PBS gewaschen und danach für zwei Stunden in Medium mit 30 μM MG132 und entweder DMSO als Negativkontrolle, 2 μM Gö6976 oder 2 μM ZM447439 als Kontrolle für eine Aurora B-Hemmung überführt (Abb. 17).

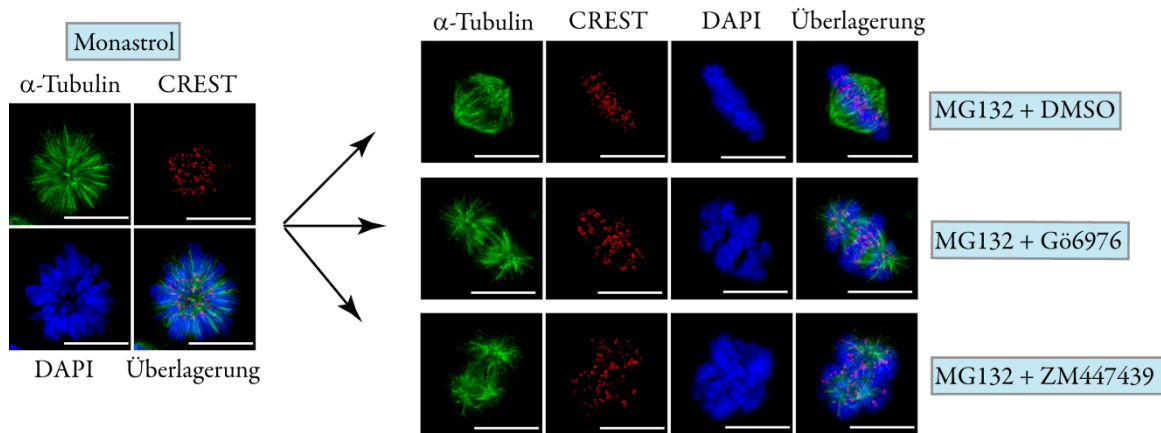


Abbildung 17: Eine Behandlung mit Gö6976 induziert Defekte in der Spindelstruktur und der Chromosomen-Aufreihung. HCT116-Zellen wurden für 4 Std. mit 68 μM Monastrol behandelt und anschließend für 2 Std. in Medium mit 30 μM MG132 in Ab- oder Anwesenheit von 2 μM Gö6976 bzw. 2 μM ZM447439 überführt. Danach wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz-Färbung gegen Spindeln (α -Tubulin, grün) und Kinetochore (CREST, rot) analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Es sind repräsentative Beispiele für Monastrol-behandelte Kontrollzellen bzw. nach Auswaschen von Monastrol mit 30 μM MG132 behandelte Zellen gezeigt, die zusätzlich entweder mit DMSO (Negativkontrolle), Gö6976 oder ZM447439 (Kontrolle für eine Aurora B-Hemmung) behandelt wurden. Es ist eine Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μm .

Das mitotische Kinesin und Motorprotein Eg5/KSP ist für die Trennung der duplizierten Zentrosomen verantwortlich (Blangy *et al.* 1995) und damit essentiell für die Etablierung einer bipolaren, mitotischen Spindel. Eine Inhibierung von Eg5/KSP mit Monastrol führt zur Formierung einer symmetrischen, monopolaren Spindel mit rosettenartig um die Spindel angeordneten Chromosomen (Abb. 17); (Mayer *et al.* 1999; Kapoor *et al.* 2000; Maliga *et al.* 2002). Dadurch wird ein Verlust der Spannung zwischen den Kinetochoren verursacht, wodurch der mitotische SCP aktiviert und ein Arrest der Zellen in der

Prometaphase des Zellzyklus verursacht wird. Monastrol ist ein reversibler Inhibitor, der durch Waschen der Zellen mit PBS aus der Zelle wieder entfernt werden kann. Kontrollzellen, die nach Auswaschen von Monastrol in Medium mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 und DMSO überführt wurden, arretierten in der Metaphase der Mitose mit normal ausgebildeten bipolaren Spindeln und Chromosomen, die vollständig in der Äquatorialebene aufgereiht waren (Abb. 17, MG132 + DMSO).

Zellen, die in Medium mit MG132 und dem Aurora B-Inhibitor ZM447439 überführt wurden, sollten Schwierigkeiten bei der Aufreihung und Segregierung ihrer Chromosomen haben, da die Korrekturfunktion von Aurora B bei fehlerhaft angehefteten Mikrotubuli an die Kinetochore und die Zytokinese inhibiert ist (Ditchfield *et al.* 2003; Vader *et al.* 2008).

Immunfluoreszenz-Analysen zeigten nach einer MG132 und ZM447439-Behandlung Zellen mit nicht korrekt in der Äquatorialebene aufgereihten, sondern diffus um die Spindel herum angeordneten Chromosomen. Auch die Spindeln sahen im Vergleich zu Kontrollzellen flacher und zylindrisch aus mit verstärkter Astralmikrotubuli-Ausbildung an den Zellpolen (Abb. 17). Zellen, die in Medium mit MG132 in Anwesenheit von Gö6976 überführt wurden zeigen, ähnlich wie bei einer Inkubation der Zellen mit MG132 und ZM447439, flache, bipolare Spindeln und neben korrekt in der Äquatorialebene aufgereichte Chromosomen, auch mehrere Chromosomen an den Zellpolen (Abb. 17).

Diese Beobachtungen spiegeln die Gö6976-induzierten Aufreihungsdefekte der Chromosomen und die Defekte der mitotischen Spindel wider (Abb. 16B und 17). Die Ähnlichkeiten zum ZM447439-vermittelten Phänotyp der mitotischen Zellen deuten dabei auf eine potentielle Hemmung von Aurora B durch Gö6976 hin.

Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert die mitotischen Kinasen Aurora A und Aurora B *in vitro* und *in vivo*

Da die vorangehenden Ergebnisse auf eine Gö6976-vermittelte Hemmung von Aurora B hindeuteten (Abb. 15-17) und Gö6976 als eine Indolokarbazol-Verbindung ATP-kompetitiv wirken könnte, sollte im nächsten Schritt der Fokus auf die Identifizierung mitotischer Zielkinase(n) von Gö6976 gelegt werden. Dazu wurden mitotische Kinasen, die bekannterweise in der SCP-Funktion involviert sind (Yu 2002; Anand *et al.* 2003; Ditchfield *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Bharadwaj und Yu 2004; Taylor *et al.* 2004;

Wysong *et al.* 2009), evaluiert. Da der Verlust der Hyperphosphorylierung der Kinasen Bub1, Mps1, Aurora A und Aurora B beobachtet wurde (Abb. 15D) und dies mit ihrer funktionellen Inaktivierung assoziiert war, wurden diese Kinasen detailliert untersucht.

Dazu wurden *in vitro* Kinase-Reaktionen mit den rekombinanten Kinasen Bub1, Mps1, Plk1, p38 und Aurora B in Anwesenheit aufsteigender Gö6976-Konzentrationen (0-1000 μM) für 30 Minuten bei 30°C durchgeführt und die Substratphosphorylierung quantifiziert. Während *in vitro* Kinase Untersuchungen keine Inhibierung von Bub1, Mps1, Plk1 oder p38 durch Gö6976 zeigten, war eine Inhibierung der Kinase-Aktivität von Aurora B erkennbar (Abb. 18).

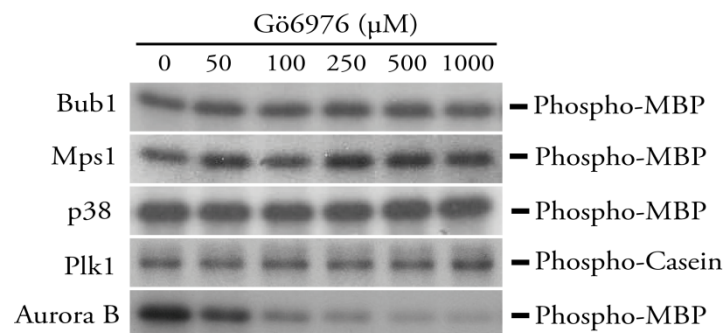


Abbildung 18: Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert die Aurora B Kinase *in vitro*. Es wurden *in vitro* Kinase-Reaktionen mit gereinigten, rekombinanten Kinasen (Bub1/Bub3-Komplex: 140 nM, Plk1 T210D: 460 nM, Mps1: 210 nM, p38:460 nM, AuroraB/Incenp-Komplex: 140 nM; (freundlicherweise von Prof. Dr. Hongtao Yu, Dallas, Texas, zur Verfügung gestellt) in Gegenwart aufsteigender Gö6976-Konzentrationen (0-1000 μM), 50 μM ATP, 1 μCi ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP und 7 μg MBP (Myline basic protein) als Substrat für 30 Minuten bei 30°C durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel einer Autoradiographie ist dargestellt.

Die Inhibierung der Aurora B Kinase gab, zusammen mit dem Verlust der Hyperphosphorylierung von Aurora A und Aurora B (Abb. 15D) und den beobachteten Defekten in der Spindelstruktur und der Chromosomen-Aufreihung (Abb. 16B und 17) Anlass zur detaillierteren Untersuchung der Aurora Kinase-Familie als mögliche Zielstruktur von Gö6976. Diese besteht aus den drei Familienmitgliedern Aurora A, Aurora B und Aurora C (Crane *et al.* 2004; Vader und Lens 2008). Die Kinase Aurora A reguliert sowohl die Trennung und Reifung der Zentrosomen als auch die Polymerisation der Mikrotubuli und Stabilität der Spindel (Marumoto *et al.* 2005; Liu und Ruderman 2006; Fu *et al.* 2007). Aurora C wurde das erste Mal in einem „Screen“ nach Kinasen, die im Maus-Sperma und in Eiern exprimiert werden, gefunden. Neuere Ergebnisse vermuten eine komplementierende Funktion von Aurora C für Aurora B im CPC (Yanai *et al.*

1996; Sasai *et al.* 2004; Tang *et al.* 2006). Alle drei Kinasen wurden in Bakterien exprimiert, gereinigt und *in vitro* Kinase-Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration von Gö6976 bzw. ZM447439 bestimmt, bei der eine halbmaximale Inhibition der drei Aurora Kinasen beobachtet werden konnte (IC₅₀-Wert: mittlere inhibitorische Konzentration). Dazu wurden 520 nM jeder Kinase mit verschiedenen Konzentrationen von Gö6976 oder ZM447439 (0-1000 µM) 30 Minuten bei 30°C inkubiert und die Substratphosphorylierung quantifiziert (Abb. 19A-C).

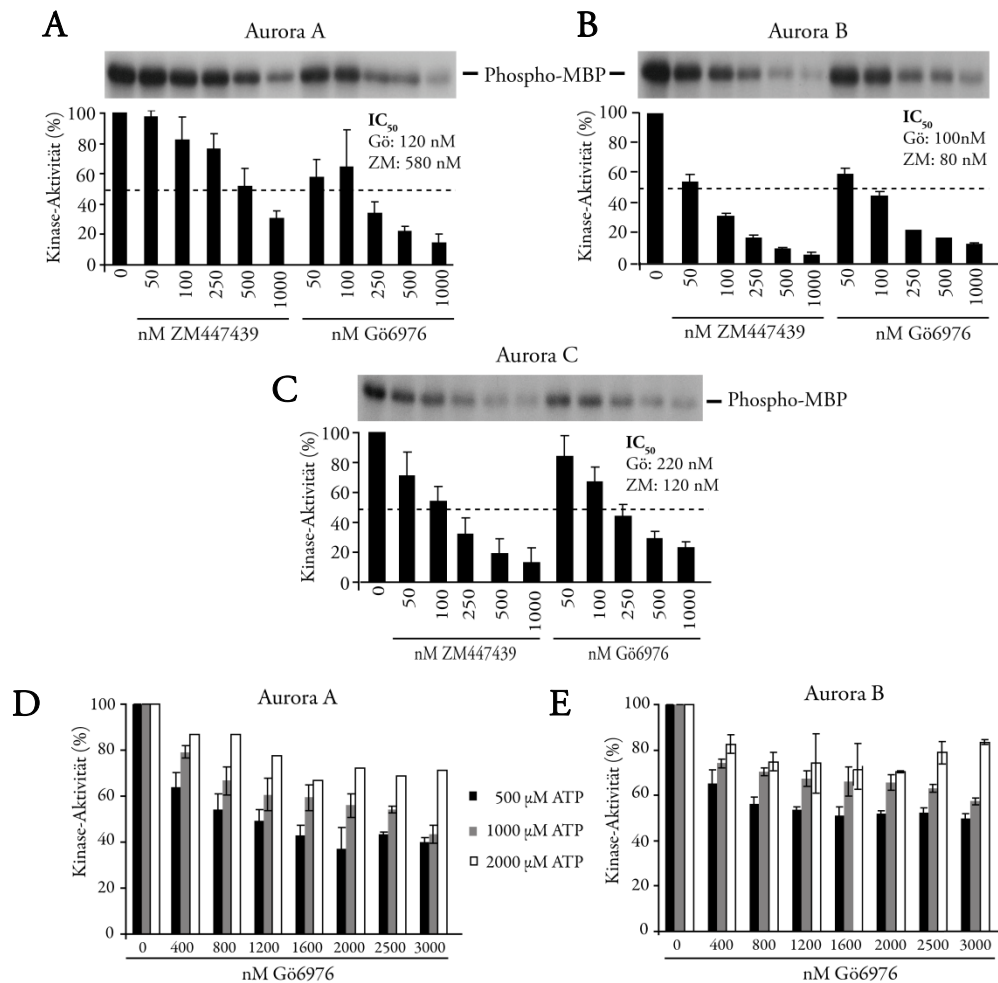


Abbildung 19: Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert die Aurora Kinase-Familie *in vitro*. Es wurden *in vitro* Kinase-Reaktionen mit je 520 nM der gereinigten, rekombinanten Aurora Kinasen, Aurora A (A), Aurora B (B) und Aurora C (C), (freundlicherweise von Prof. Dr. Paolo Sassone-Corsi, CA, USA zur Verfügung gestellt und selber exprimiert) in Gegenwart aufsteigender Gö6976 (Gö) bzw. ZM447439 (ZM)-Konzentrationen (0-1000 µM), 50 µM ATP, 1 µCi ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP und 7 µg MBP (Myeline basic protein) als Substrat für 30 Minuten bei 30 °C durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel einer Autoradiographie mit den jeweiligen Standardabweichungen aus insgesamt 3 Experimenten ist dargestellt. D) Kinase-Reaktionen für Aurora A und Aurora B wurden, wie unter Abb. 5A-C beschrieben, unter Verwendung variabler ATP-Konzentrationen (500 µM, 1000 µM oder 2000 µM ATP) durchgeführt. Für jede Aurora Kinase ist repräsentatives Beispiel einer Autoradiographie dargestellt. (Mittelwert \pm SD; n = 3).

Die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} -Werte ergab, dass Gö6976 Aurora B mit vergleichbarer Potenz inhibiert wie ZM447439 (Abb. 19B: 100 nM Gö6976 bzw. 80 nM ZM447439). Gö6976 inhibierte Aurora A hingegen mit einer fünfmal höheren Potenz im Vergleich zu ZM447439 (Abb. 19A: 120 nM Gö6976 bzw. 580 nM ZM447439). Aurora C wurde ebenfalls von ZM447439 und Gö6976 *in vitro* inhibiert. Der IC_{50} -Wert für Aurora C lag bei etwa 220 nM für Gö6976 und bei 120 nM für ZM447439 (Abb. 19C). Da Aurora C wichtige Funktionen in der Spermatogenese erfüllt aber keine bekannten Funktionen in mitotischen Prozessen (Yanai *et al.* 1996), wurde dieses Aurora-Familienmitglied in weiteren Analysen nicht weiter berücksichtigt.

Da Gö6976 als Indolokarbazol-Verbindung ein ATP-kompetitiver Inhibitor sein könnte (Kohn *et al.* 2003; Kawabe 2004) kann erwartet werden, dass die inhibitorische Aktivität von Gö6976 mit steigender ATP-Konzentration fällt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden *in vitro* Kinase Untersuchungen mit rekombinanten Aurora A und Aurora B Kinasen in Anwesenheit verschiedener ATP-Konzentrationen (500 μ M, 1000 μ M oder 2000 μ M) durchgeführt und die Kinase-Aktivität gegenüber MBP als Substrat in Anwesenheit verschiedener Gö6976-Konzentrationen bestimmt (Abb. 19D, E). Dabei war eine Korrelation zwischen einer Abnahme der Kinase-Aktivität und einer Zunahme der ATP-Konzentration bei beiden Kinasen, Aurora A (Abb. 19A) und Aurora B (Abb. 19B) zu erkennen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Gö6976 mit dem mitotischen SCP-Signalweg vermutlich über eine Inhibierung der Aurora Kinasen, insbesondere Aurora A und Aurora B, interferiert. Da diese Gö6976-vermittelte Inhibierung der Aurora Kinasen auf Daten beruht, die *in vitro* generiert wurden, sollte im Weiteren überprüft werden, ob Gö6976 die Aurora Kinasen auch *in vivo* inhibiert. Dazu wurde einerseits die Auto-Phosphorylierungsstelle der Kinasen in mitotischen Lysaten von HCT116-Zellen nach einer Behandlung mit Gö6976 oder ZM447439 analysiert. Zum anderen wurde in Kinase-Reaktionen mit immunpräzipitierten Aurora Kinasen die Kinase-Aktivität gegenüber MBP als Substrat in Ab- oder Anwesenheit von Gö6976 oder ZM447439 *in vivo* überprüft (Abb. 20). Die Auto-Phosphorylierungsstellen pT288 und pT232 zeigen den Aktivierungsstatus von Aurora A (Ohashi *et al.* 2006) bzw. Aurora B (Yasui *et al.* 2004) an. ZM447439-behandelte Zellen zeigten eine spezifische Inhibierung der Auto-Phosphorylierungsstelle pT232 von Aurora B (Abb. 20A). Während die Auto-

Phosphorylierung von Aurora B durch eine ZM447439-Behandlung der Zellen zu 75% inhibiert wurde (Abb. 20B, pT232-Aurora B), war die Auto-Phosphorylierung von Aurora A weitgehend unverändert (Abb. 20A) und zu über 90% detektierbar (Abb. 20B, pT288-Aurora A). Nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 wurden die Auto-Phosphorylierungen beider Kinasen mit vergleichbarer Potenz inhibiert (60% Aurora A bzw. 58% Aurora B; Abb. 20B).

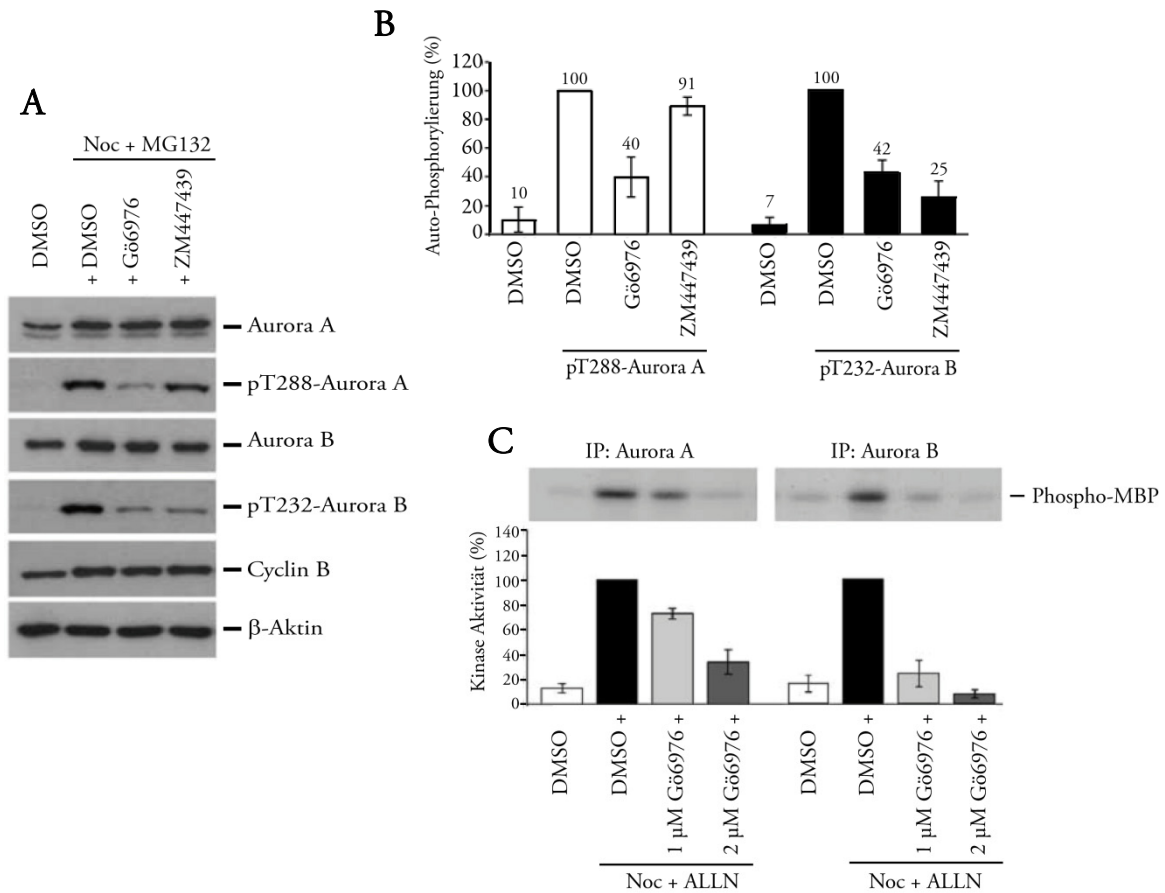


Abbildung 20: Eine Behandlung mit Gö6976 inhibiert Aurora A und Aurora B *in vivo*. HCT116-Zellen wurden sequentiell für 14 Std. mit 300 nM Nocodazol und 2 Std. mit 30 μ M MG132 plus 2 μ M Gö6976 bzw. 2 μ M ZM447439 behandelt. Die Auto-Phosphorylierungsstellen von Aurora A (pT288) bzw. von Aurora B (pT232) sowie die basale Menge dieser Proteine wurden im Westernblot detektiert. Ein repräsentatives Beispiel eines Westernblots (A) und die entsprechende Quantifizierung der Autophosphorylierung aus 3 Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen (B) sind dargestellt. Cyclin B: Marker für die Mitose; β -Aktin: Ladekontrolle. C) HeLa-Zellen wurden für 15 Std. mit 300 nM Nocodazol (Noc) behandelt und anschließend sequentiell für 0,5 Std. mit 200 μ M ALLN und 2 Std. mit 1 μ M oder 2 μ M Gö6976 inkubiert. Aurora A oder Aurora B wurden anschließend immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität gegen MBP als Substrat in Kinase-Reaktionen detektiert. Ein repräsentatives Beispiel einer Autoradiographie und die Quantifizierung der Kinase-Aktivitäten sind dargestellt. (Mittelwert \pm SD; n = 3).

Zusätzlich zur Bestimmung der Auto-Phosphorylierung im Westernblot, wurde die Kinase-Aktivität von Aurora A und Aurora B in direkten Kinase-Reaktionen mit MBP als Substrat bestimmt. Hierzu wurden HeLa-Zellen sequentiell für 15 Stunden mit 300 nM Nocodazol und einer halben Stunde mit 200 μ M ALLN inkubiert, um den mitotischen Austritt der Zellen zu verhindern. Danach wurden die Zellen zusätzlich mit 1 μ M oder 2 μ M Gö6976 inkubiert, Aurora A oder Aurora B immunpräzipitiert und mit MBP sowie radioaktiv markiertem 32 P- γ -ATP inkubiert.

Das Autoradiogramm zeigte nach einer Gö6976-Behandlung der Zellen einen geringeren Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das Substrat im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Quantifizierung des Autoradiogramms zeigte nach einer Behandlung der Zellen mit 2 μ M Gö6976 eine vergleichbare Inhibierung beider Kinasen, Aurora A und Aurora B, mit einer etwas höheren Sensitivität gegenüber Aurora B (Abb. 20C).

Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen der *in vitro*-Analysen von Aurora A und Aurora B nach einer Gö6976-Behandlung (Vgl. IC₅₀ (Aurora A): 120 nM bzw. IC₅₀ (Aurora B): 100 nM nach einer Gö6976-Inkubation der Kinasen, Abb. 18) und zeigen, dass Gö6976 die mitotischen Kinasen Aurora A und Aurora B *in vivo* inhibiert. Die Möglichkeit, dass Gö6976 weitere Kinasen mit mitotischer Funktion ebenfalls inhibiert, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass Gö6976 Aurora B *in vitro* und *in vivo* inhibiert, konnten Unterschiede zu einer spezifischen Inhibition von Aurora B mittels ZM447439 (Ditchfield *et al.* 2003) oder Hesperadin (Hauf *et al.* 2003) gefunden werden. Während ZM447439 und Hesperadin selektiv einen Taxol-induzierten SCP inhibierten, inhibierte Gö6976 gleichermaßen einen Taxol und Nocodazol-induzierten SCP (Daten von Dr. Celia Vogel, Anne Kienitz und Verena Schneider; Stolz *et al.* 2009). Darüber hinaus verursachte Gö6976 anders als ZM447439 oder Hesperadin, keine Defekte in der Zytokinese und induzierte keine Polyploidie (Abb. 21); (Hauf *et al.* 2003; Steigemann *et al.* 2009). Eine gleichzeitige Inhibierung von Aurora A durch Gö6976, die ebenfalls experimentell bestätigt werden konnte (Abb. 19 und 20) könnte diese Unterschiede erklären.

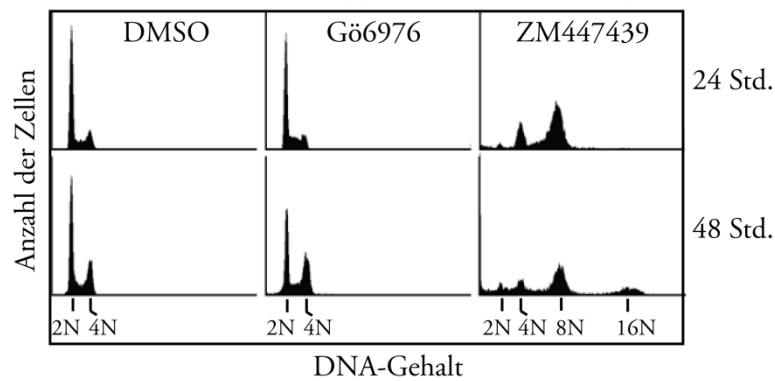


Abbildung 21: Eine Behandlung mit Gö6976 induziert anders als ZM447439, keine Polyploidie. Asynchron wachsende HCT116-Zellen wurden mit DMSO als Negativkontrolle, 2 μ M Gö6976 bzw. 2 μ M ZM447439 für 24 Std. bzw. 48 Std. behandelt und die DNA-Profile mittels FACS-Analysen ermittelt.

Die Gö6976-induzierte aberrante mitotische Progression resultiert in Apoptose

Die Überexpression von Aurora A bzw. von Aurora B wurde bisher in verschiedenen Tumoren der Brust, des Kolons, der Ovarien (Keen und Taylor 2004; Li und Li 2006) bzw. der Brust, des Kolons, der Prostata und in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Chieffi *et al.* 2006; Vischioni *et al.* 2006) detektiert. Anders als Spindelgifte, wie Taxane oder *Vinca*-Alkaloide, die seit über 40 Jahren erfolgreich in der Chemotherapie eingesetzt werden (Jordan und Wilson 2004; Schmidt und Bastians 2007), sind spezifische Aurora-Inhibitoren wie ZM447439 (Ditchfield *et al.* 2003) oder MLN8054 (Manfredi *et al.* 2007) allein in der Mitose wirksam. Nicht-proliferierende oder differenzierte Zellen werden, im Gegensatz zu einer Behandlung mit Spindelgiften, nicht adressiert. Daher stellen die Aurora Kinasen alternative Zielstrukturen für die Chemotherapie dar. Da die vorangehenden Daten gezeigt haben, dass die Kinasen Aurora A und Aurora B mögliche Zielstrukturen von Gö6976 repräsentieren (Abb. 19 und 20), könnte dieser Inhibitor als Ausgangsverbindung für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika dienen.

Dieser Arbeit vorausgehende Analysen zeigten, dass spezifische Apoptose-Marker, wie Caspase-3-Aktivität, PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung infolge einer Behandlung von HCT116-Zellen mit Gö6976 induziert wurden (Dr. Celia Vogel, Dissertation 2008). Ergänzend dazu sollte überprüft werden, ob die Gö6976-induzierte Apoptose durch eine gleichzeitige Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor, spezifisch unterdrückt werden konnte (Abb. 22).

Dazu wurden HCT116-Zellen für 24 oder 48 Stunden mit 20 μ M Gö6976 in Ab- oder Anwesenheit des Pan-Caspase Inhibitors Boc-D-FMK inkubiert und der DNA-Gehalt der

Zellen mit Hilfe eines PI-FACS bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen kann dem Histogramm als Zellpopulation entnommen werden, die kleiner als 2N ist („sub-G1“). Das Zellprofil (Abb. 22 oben) wie auch die dazugehörige Quantifizierung (Abb. 22 unten) zeigten, dass der Anteil apoptotischer Zellen mit zeitlicher Zunahme der Gö6976-Behandlung von etwa 7% nach 24 Stunden auf über 20% nach 48 Stunden stieg. Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Gö6976 *und* dem Pan-Caspase-Inhibitor Boc-D-FMK reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen auf das Niveau asynchron wachsender, DMSO-behandelter Zellen (Abb. 22).

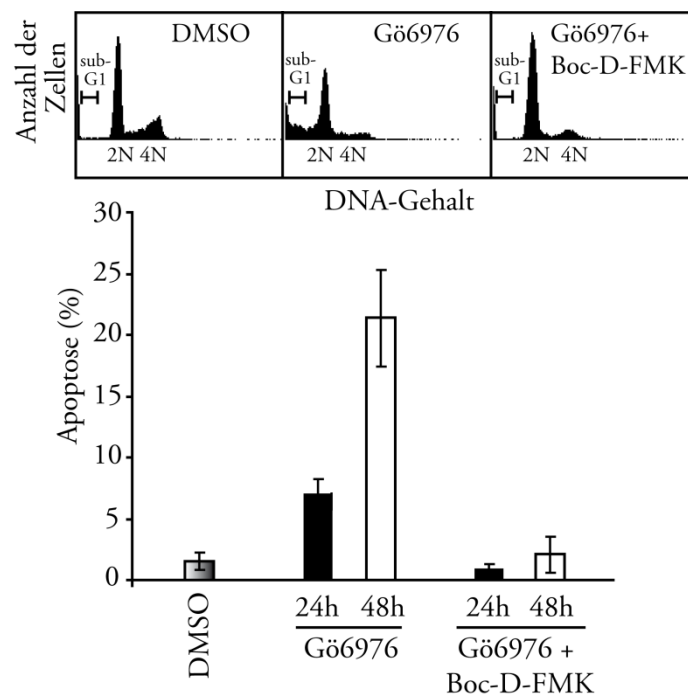


Abbildung 22: Die Gö6976-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig. HCT116-Zellen wurden für 24 oder 48 Std. mit 20 μM Gö6976 in Ab- oder Anwesenheit von 100 μM des Pan-Caspase-Inhibitors Boc-D-FMK inkubiert und der DNA-Gehalt bzw. der Anteil apoptotischer Zellen („sub-G1“) mit Hilfe von FACS-Analysen ermittelt. Ein repräsentatives DNA-Profil der Zellen nach jeder Behandlung und die Quantifizierung apoptotischer Zellen sind dargestellt. (Mittelwert \pm SD; n = 3). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit N. Ertych generiert.

Da in vorangehenden Analysen eine gegenüber nicht-transformierten humanen Zellen höhere Sensitivität verschiedener Krebszelllinien gegenüber Gö6976 beobachtet werden konnte (Dr. Celia Vogel, Dissertation 2008) wurde im Weiteren mittels Kolonie-Formierungs-Assays das Wachstumsverhalten einer Krebszelllinie (HeLa) und einer nicht-transformierten, humanen Fibroblasten-Zelllinie (BJ-hTert) nach einer 96-stündigen Gö6976 oder Taxol-Behandlung als Kontrolle überprüft (Abb. 23).

Die Kristallviolett-Färbung zeigte eine, im Vergleich zu nicht-transformierten BJ-hTert-Fibroblasten, stärkere Wachstumshemmung von HeLa-Zellen nach einer Gö6976-Behandlung. Die Kontroll-Behandlung mit Taxol verdeutlichte eine annähernd gleiche Sensitivität von HeLa und BJ-hTert-Zellen (Abb. 23).

Dieses Ergebnis zeigt eine, im Vergleich zu einer Taxol-Behandlung, *selektive* Wachstumshemmung der Krebszelllinie HeLa gegenüber nicht-transformierten BJ-Fibroblasten nach einer Gö6976-Behandlung. Damit werden die bereits bestehenden Daten einer erhöhten Gö6976-vermittelten Caspase-Induktion in Krebszellen gegenüber nicht-transformierten Zellen ergänzt.

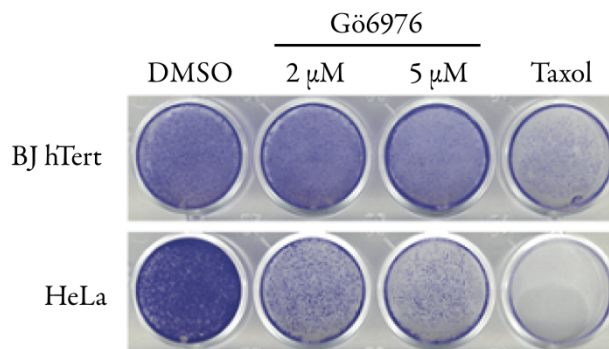


Abbildung 23: Eine Behandlung mit Gö6976 induziert Apoptose in Krebszellen, aber nicht in nicht-transformierten humanen Fibroblasten. HeLa-Zellen und BJ-hTert-Fibroblasten wurden in identischer Zellzahl (3000 Zellen pro Loch) ausplattiert, mit DMSO als Negativkontrolle, 2 μM bzw. 5 μM Gö6976 oder 150 nM Taxol als Positivkontrolle behandelt. Nach 96 Std. wurde die Koloniebildung mit Hilfe einer Kristallviolett-Färbung sichtbar gemacht. Ein repräsentatives Beispiel eines Kolonie-Formierungs-Assays mit den unterschiedlichen Behandlungen ist dargestellt. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit N. Ertych generiert.

Zur direkten Vergleichbarkeit der Sterberaten verschiedener Krebszelllinien und nicht-transformierten humanen Zellen nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 oder Taxol, wurden asynchron wachsende HCT116, HeLa und BJ-hTert-Zellen für 24 oder 48 Stunden mit 2 μM oder 5 μM Gö6976 oder mit 150 nM Taxol behandelt. Der DNA-Gehalt der Zellen und der Anteil apoptotischer Zellen („sub-G1“) wurde mittels FACS-Analysen bestimmt (Abb. 24).

Die DNA-Profile (Abb. 24A) und die entsprechenden Quantifizierungen (Abb. 24B) zeigten eine etwa gleiche Sensitivität von HCT116-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Taxol oder Gö6976. Bei beiden Behandlungen korrelierte eine lange Behandlung der Zellen (Abb. 24) mit einem zunehmenden „sub-G1-Gehalt. Dieser war mit 6,3 bis 14,9% nach einer Behandlung der Zellen mit Gö6976 vergleichbar mit einer Taxol-Behandlung

der Zellen, bei der ein „sub-G1“-Gehalt von 9,0 bis 21,7% detektiert werden konnte. HeLa-Zellen zeigten ebenfalls eine Korrelation zwischen einer zeitlich zunehmenden Behandlung mit Gö6976 oder Taxol und dem „sub-G1“-Gehalt. Diese Zellen wiesen aber mit 4,3 bis 28,9% eine etwas höhere Sensitivität gegenüber einer Taxol-Behandlung als gegenüber einer Gö6976-Behandlung auf, bei der der „sub-G1“-Gehalt 9,3 bis 19,0% betrug (Abb. 24A und B). Nicht-transformierte, humane BJ-Fibroblasten zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Taxol-Behandlung, die mit Zunahme der Behandlungszeit stieg („sub-G1“ nach 24 Std.: 4,2% vs. 48 Std.: 13,7%, Abb. 24A und B). Gegenüber einer Gö6976-Behandlung waren diese Fibroblasten jedoch weitgehend insensitive und wiesen einen im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien oder einer Taxol-Behandlung geringen „sub-G1“-Gehalt von 3,2 bis 3,4% auf.

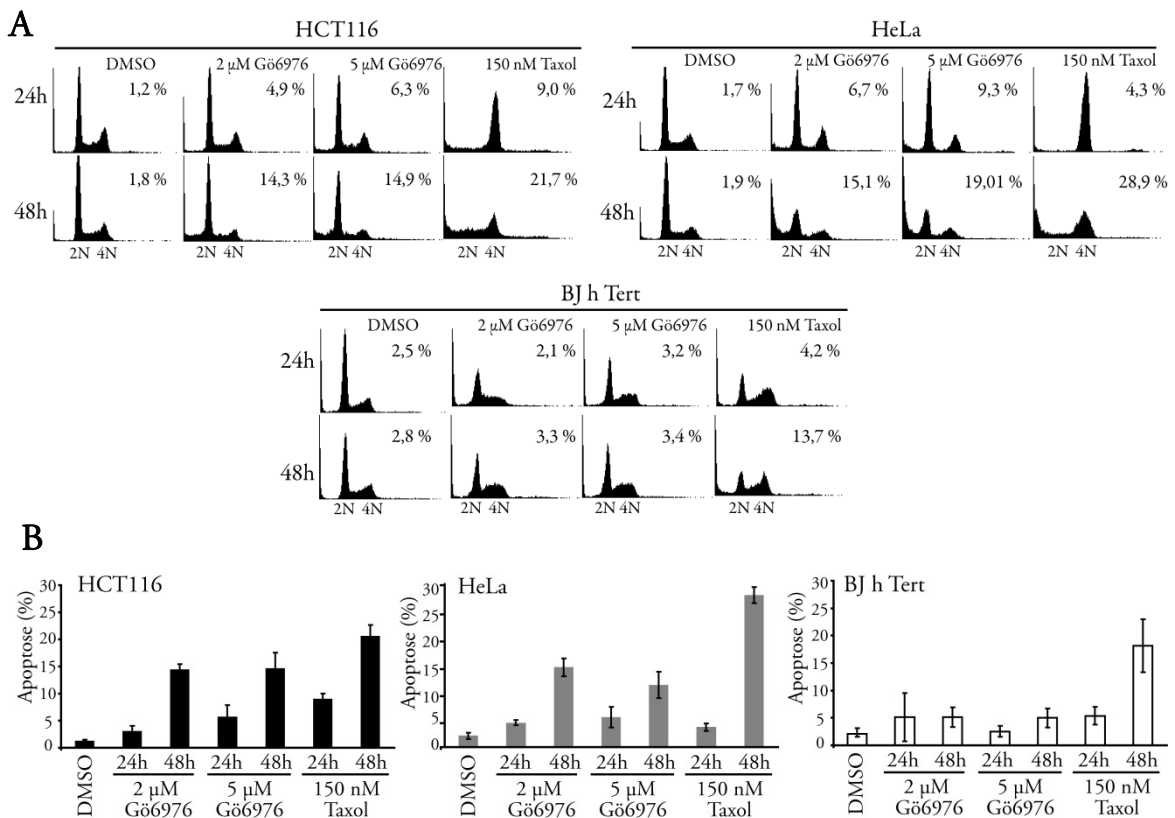


Abbildung 24: Eine Behandlung mit Gö6976 induziert Apoptose in Krebszell-Linien, nicht aber in nicht-transformierten, humanen Fibroblasten. HCT116-, HeLa-Zellen und humane, nicht-transformierte BJ-hTert Fibroblasten wurden 24 oder 48 Std. mit 2 µM oder 5 µM Gö6976 bzw. 150 nM Taxol behandelt, und der DNA-Gehalt (A) bzw. der Anteil an apoptotischen Zellen (B) mit Hilfe von PI-FACS-Analysen bestimmt. Es sind repräsentative DNA-Profile (A) und die entsprechende Quantifizierungen (B) dargestellt. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit N. Ertych generiert.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Gö6976 eine selektive Effektivität auf Krebszellen besitzt.

Inhibierung des Spindel-Kontrollpunktes als Voraussetzung für die Gö6976-Effektivität

Vorangehende Daten zeigten, dass die Progression durch die Mitose wichtig für die Induktion der Apoptose nach einer Behandlung mit Gö6976 ist (Dr. Celia Vogel, Dissertation 2008). Zusätzlich belegen mehrere Studien, dass der SCP für die effiziente Induktion von Apoptose nach einer Zellbehandlung mit antimitotisch wirkenden Agenzien in der Tumorthherapie benötigt wird (Kasai *et al.* 2002; Jordan und Wilson 2004; Sudo *et al.* 2004; Vogel *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Tao *et al.* 2005; Vogel *et al.* 2005). So konnte unser Labor zeigen, dass HCT116-Zellen mit einem eingeschränkten SCP (verringerte *MAD1*- oder *MAD2*-Expression), einen geringeren mitotischen Arrest als Kontrollzellen zeigten sowie eine geringere Caspase-3-Aktivität nach Nocodazol-Behandlung aufwiesen (Kienitz *et al.* 2005). Diese Zellen mit einem eingeschränkten SCP zeigten oft eine Resistenz gegenüber den in der Chemotherapie eingesetzten antimitotischen Agenzien. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, wie sich Krebszellen mit einem überdurchschnittlich *starken* SCP gegenüber einer Behandlung mit antimitotisch wirkenden Agenzien verhalten. Bei einem „Screen“ nach Kolonkarzinom-Zellen mit einem vergleichsweise starken SCP wurden HCT116 und HT29-Zellen für einen Zeitraum bis 72 Stunden mit 300 nM Nocodazol behandelt und der mitotische Index in FACS-Analysen alle acht Stunden ermittelt.

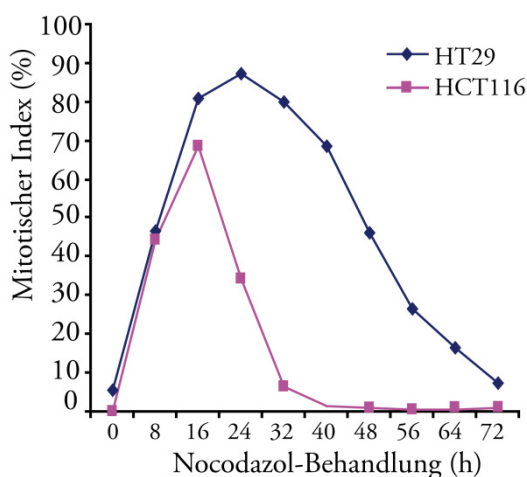


Abbildung 25: HT29-Zellen zeigen eine verlängerte SCP-Aktivierung und einen verlängerten mitotischen Arrest. HCT116 und HT29-Zellen wurden mit 300 nM Nocodazol für bis zu 72 Std. behandelt und der mitotische Index alle 8 Std. mit Hilfe von FACS-Analysen, ermittelt. Es ist ein repräsentatives Beispiel für den zeitlichen Verlauf des mitotischen Index für beide Zelllinien dargestellt.

Während HCT116-Zellen nach etwa 16 Stunden einen maximalen mitotischen Index von etwa 70% erzielten, zeigten HT29-Zellen einen vergleichsweise breiteren Bereich mit hohem mitotischen Index, der sich von 16 bis 32 Stunden erstreckte und mit etwa 90% deutlich höher war als bei HCT116-Zellen (Abb. 25).

Zur Analyse der Sensitivität von HT29-Zellen mit einem vergleichsweise starken SCP und HCT116-Zellen mit einem durchschnittlichen SCP gegenüber einer Gö6976-Behandlung der Zellen, wurden beide Zelllinien Caspase-3-Aktivitätsmessungen unterworfen (Abb. 26). Dazu wurden HCT116 und HT29-Zellen sequentiell für 16 Stunden mit 300 nM Nocodazol und unterschiedlichen Konzentrationen an Gö6986 für zwei Stunden behandelt und der mitotische Index mit Hilfe von FACS-Analysen ermittelt (Abb. 26A). Der vergleichsweise starke SCP von HT29-Zellen in Gegenwart von Nocodazol konnte lediglich mit, im Vergleich zu HCT116-Kontrollzellen, hohen Gö6976-Konzentrationen ($> 2 \mu\text{M}$) aufgehoben werden (Abb. 26A).

Ob diese verringerte Sensitivität von HT29-Zellen bezüglich einer Gö6976-vermittelten Inhibierung in einer geringen Induktion von Apoptose induziert, wurde mittels Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität im Detail untersucht (Abb. 26B).

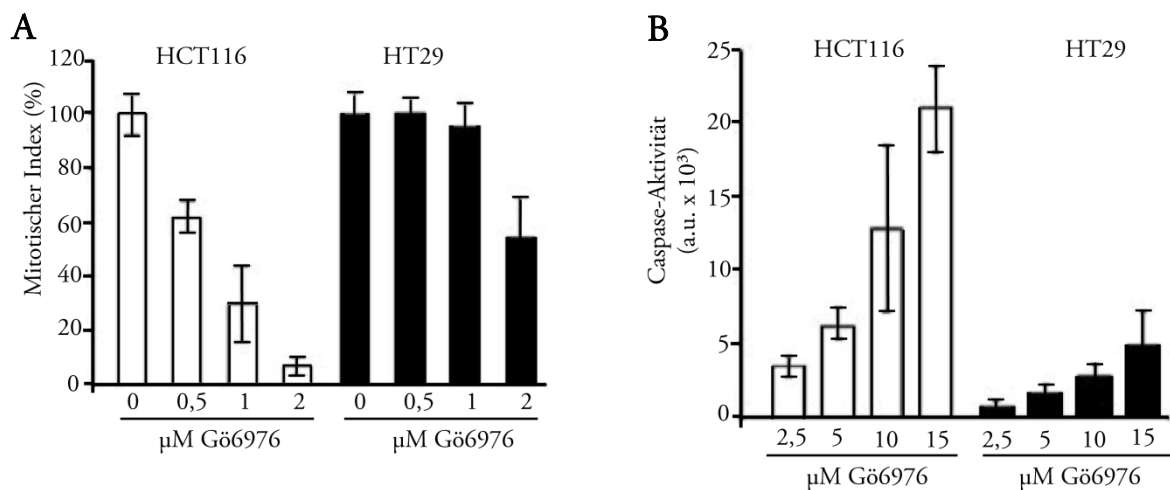


Abbildung 26: Der SCP-Status ist wichtig für die Effektivität von Gö6976. A) HCT116 und HT29-Zellen wurden sequentiell für 16 Std. mit 300 nM Nocodazol und verschiedenen Gö6976-Konzentrationen für 2 Std. behandelt und der mitotische Index mit Hilfe von FACS-Analysen ermittelt. (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). B) HCT116- und HT29-Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert, für 7 Std. in Medium ohne Thymidin überführt und für zusätzliche 7 Std. mit verschiedenen Gö6986-Konzentrationen behandelt. (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die Daten wurden zusammen mit Dr. C. Vogel generiert.

Dazu wurden HCT116 und HT29-Zellen mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert, für sieben Stunden in Medium ohne Thymidin überführt und dann für weitere sieben Stunden mit verschiedenen Gö6986-Konzentrationen behandelt. Die Analyse der Caspase-3-Aktivität ergab in der Tat eine geringere Sensitivität von HT29-Zellen gegenüber einer Gö6976-Behandlung im Vergleich zu HCT116-Zellen (Abb. 26B). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Status des SCP über die Sensitivität von Zellen gegenüber einer Behandlung mit Gö6976 entscheidet.

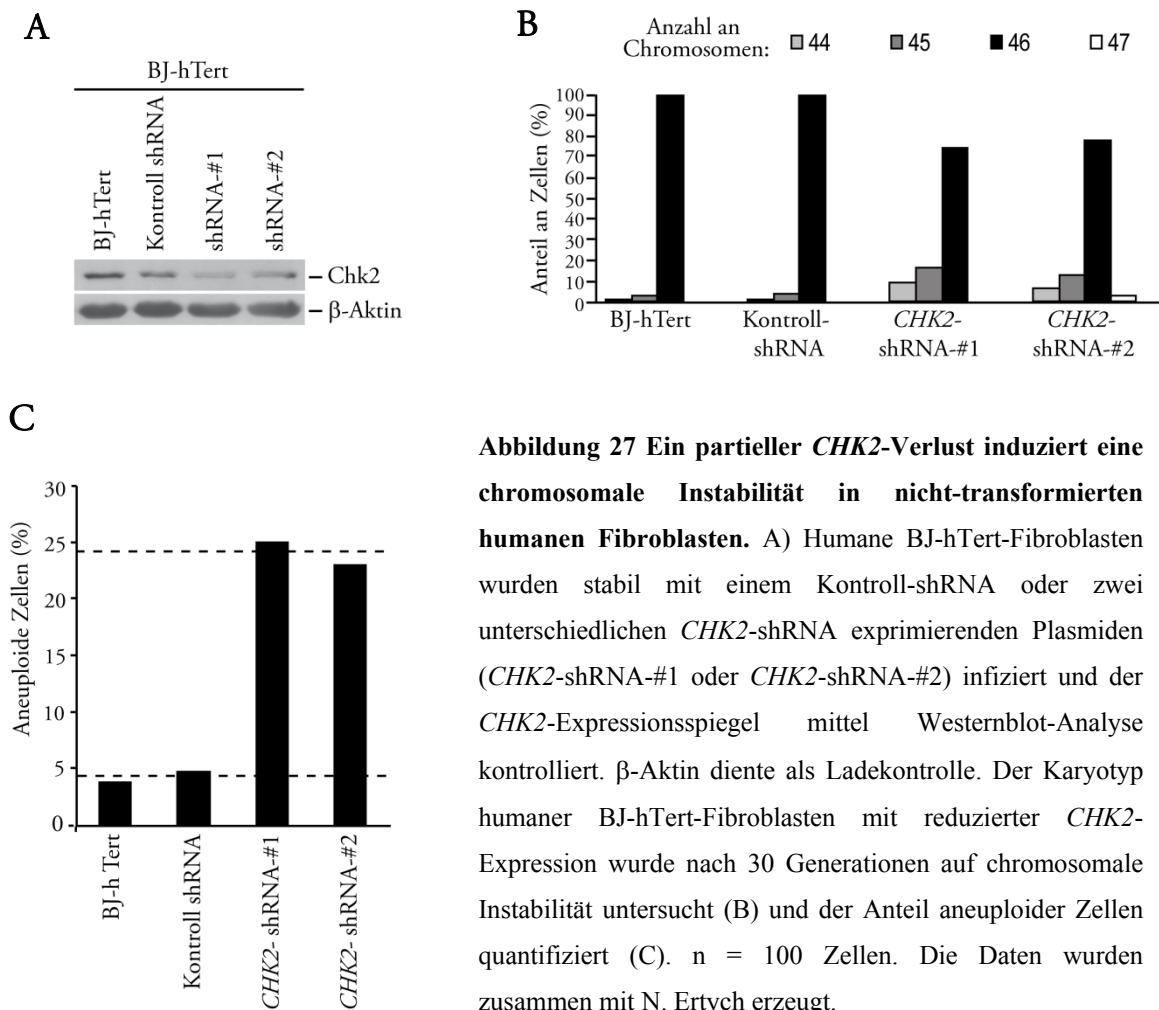
2. Die Rolle des Tumorsuppressors Chk2 für den Erhalt einer chromosomalen Stabilität

CHK2 wurde in früheren Studien als Tumorsuppressorgen identifiziert, das in verschiedenen Krebsarten wie Brust-, Kolon-, Lungen-, Eierstock- und Prostatakarzinomen mutiert ist, obgleich mit geringer Frequenz (Bartek und Lukas 2003; Antoni *et al.* 2007). Obwohl Chk2 eine Funktion im DNA-Schaden-Kontrollpunkt zugewiesen wurde (McGowan 2002; Bartek und Lukas 2003; Iliakis *et al.* 2003; Ahn *et al.* 2004; Li und Stern 2005), ist diese in verschiedenen Studien in Frage gestellt worden. Daher ist die Tumorsuppressor-Funktion von Chk2 unklar.

CHK2 wird für die Aufrechterhaltung einer chromosomalen Stabilität benötigt

Um die Tumorsuppressor-Funktion von Chk2 zu analysieren, wurden in unserem Labor Chk2 defiziente Kolon-Karzinomzellen (HCT116-Chk2^{-/-}; Jallepalli *et al.* 2003) untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von Chk2 zu einer chromosomalen Instabilität (CIN) und Aneuploidie führte. Zur weiteren Überprüfung dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob auch nicht-transformierte humane Zellen nach einem *CHK2*-Verlust CIN zeigen (Abb. 27). Als Zellsystem wurden humane BJ-hTert Vorhautfibroblasten gewählt, die einen murinen, ekotrophen Rezeptor exprimierten und somit retroviral infizierbar waren. BJ-hTert-Fibroblasten weisen einen stabilen, diploiden Karyotyp auf und eignen sich daher gut für die Analyse chromosomaler Abnormalitäten. Zur Herstellung von BJ-hTert-Fibroblasten mit geringer *CHK2*-Expression wurden diese mit Retroviren infiziert, die zwei unterschiedliche *CHK2*-shRNA exprimierende Plasmide (*CHK2*-shRNA-#1 oder -#2) trugen. Da BJ-hTert-Fibroblasten bei geringer Zelldichte nicht kultivierbar sind, wurden Zellpopulationen durch ein kontinuierliches Wachstum in Selektionsmedium generiert. Nach einer Kultur von 30 Generationen wurde der *CHK2*-„Knockdown“ auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse kontrolliert (Abb. 27A). Dabei zeigten Fibroblasten, die mit *CHK2*-shRNA exprimierenden Plasmiden infiziert wurden, im Gegensatz zu Kontroll-shRNA exprimierenden Fibroblasten, eine deutliche Minderexpression von *CHK2* (Abb. 27). Im Weiteren wurde überprüft, ob dieser partielle *CHK2*-Verlust in BJ-hTert-Fibroblasten eine chromosomale Instabilität innerhalb von 30 Generationen induziert (Abb. 27B). Dazu wurden Karyotyp-Analysen von BJ-hTert-Zellpopulationen durchgeführt, die stabil die *CHK2*-shRNA-Sequenz -#1 oder -#2

exprimierten. Die Karyotyp-Analysen zeigten eine, im Vergleich zu BJ-hTert-Wildtypzellen oder Kontroll-shRNA infizierten BJ-hTert-Zellen, breitere Verteilung von Chromosomen (Abb. 27B). Desweiteren zeigten BJ-hTert-Fibroblasten mit geringer *CHK2*-Expression einen um etwa 625% höheren Anteil aneuploider Zellen als nicht infizierte BJ-hTert-Fibroblasten oder Kontroll-shRNA infizierte BJ-hTert-Fibroblasten (Abb. 27C).



Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Verlust der Chk2-Expression sowohl in Tumorzellen als auch in nicht-transformierten Zellen eine chromosomale Instabilität erzeugt.

Die Chk2 Kinase ist in der Mitose aktiv

Das Erfordernis von Chk2 zur Aufrechterhaltung einer chromosomalen Stabilität legt eine wichtige, bisher nicht identifizierte mitotische Funktion der Chk2 Kinase nahe. In der Tat konnten in unserem Labor Aktivierungs-assoziierte Phosphorylierungen von

Chk2 an Threonin-68 und Threonin-387 (Ahn *et al.* 2002; Xu *et al.* 2002; Schwarz *et al.* 2003) in mitotischen Zellen nachgewiesen werden (Stolz *et al.* 2009; Daten von A. Kienitz, Dr. C. Vogel und PD Dr. H. Bastians).

Um eine Aktivierung von Chk2 in der Mitose direkt nachzuweisen, wurden *in vitro* Kinase-Reaktionen mit isoliertem endogenen Chk2 durchgeführt. Dazu wurden HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen mit DMSO oder mit 0,5 µg/ml Neocarzinostatin behandelt, um einen DNA-Schaden zu induzieren. Darüber hinaus wurden die Zellen mit Monastrol in der Mitose synchronisiert. Von den drei Zellpopulationen wurde Chk2 immunpräzipitiert und mit einem rekombinanten GST-Cdc25C-Fragment als Substrat, in Gegenwart von radioaktivem ^{32}P - γ -ATP, 30 Minuten bei 30°C inkubiert (Abb. 28).

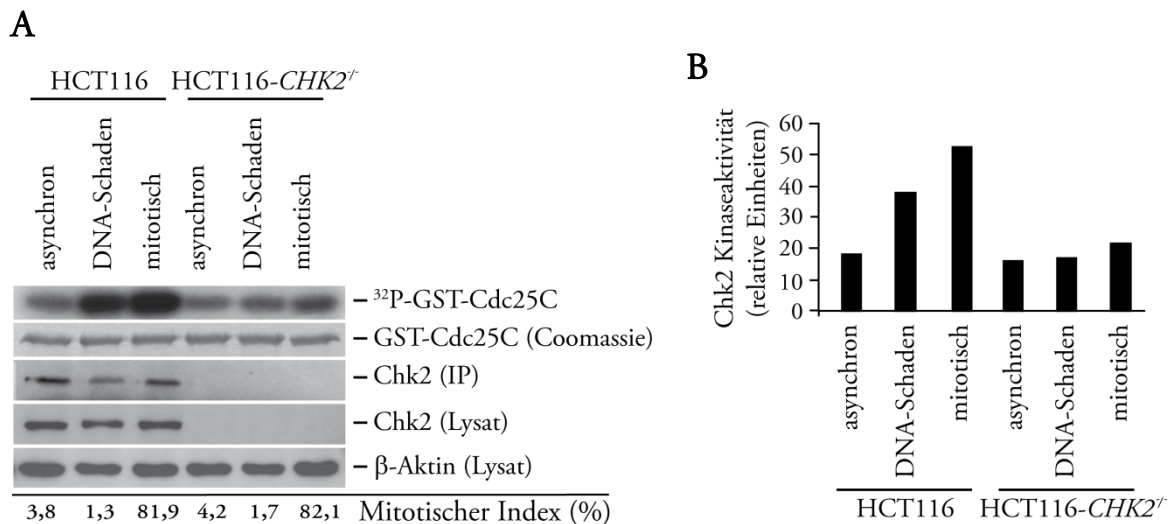


Abbildung 28: Die Chk2 Kinase ist nach Einführung von DNA-Schäden und in der Mitose aktiv. HCT116 und isogene *CHK2*-defiziente Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle), 0,5 µg/ml Neocarzinostatin für 30 Minuten (DNA-Schaden) behandelt oder mit 68 µM Monastrol für 14 Std. in der Mitose synchronisiert (mitotisch) und die Chk2 Kinase-Aktivität nach einer Chk2-IP in Gegenwart eines rekombinanten GST-Cdc25C-Fragments (200-256) als Substrat *in vitro* bestimmt. Der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das Substrat, wurde autoradiographisch quantifiziert. (A) Darstellung eines repräsentativen Experiments mit Angabe des jeweiligen mitotischen Index. (B) Quantifizierung der Chk2 Kinase-Aktivität.

Das Autoradiogramm zeigte eine verstärkte Modifikation des Substrates mit radioaktiv markiertem Phosphat nach einer Behandlung der Zellen mit Neocarzinostatin und ebenfalls mit Monastrol (Abb. 28A). Eine Quantifizierung der Chk2 Kinase-Aktivität nach Einführung von DNA-Schaden ergab eine, im Vergleich zur Basalaktivität asynchron wachsender, unbehandelter Kontrollzellen, Steigerung um den Faktor zwei.

Mitotisch synchronisierte Zellen hingegen zeigten eine, im Vergleich zu Kontrollzellen, Steigerung der Chk2 Kinase-Aktivität um den Faktor 2,5 (Abb. 28B).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Chk2 nicht ausschließlich nach Einführung von DNA-Schaden aktiviert wird, sondern ebenfalls in der Mitose aktiv ist.

CHK2 wird für die normale Progression durch die Mitose benötigt

CIN kann durch verschiedene Mechanismen induziert werden, die mit der Ausführung der Mitose interferieren und eine Fehlverteilung einzelner Chromatiden und damit Aneuploidie verursachen. In Untersuchungen in unserem Labor wurde gezeigt, dass durch den *CHK2*-Verlust weder eine Zentrosomen-Amplifikation, noch ein fehlerhafter G2-Kontrollpunkt oder ein geschwächter mitotischer SCP hervorgerufen wird (Stolz *et al.* 2009; Daten von A. Kienitz, Dr. C. Vogel und PD Dr. H. Bastians). Deshalb wurde im Weiteren die Progression der Mitose in Gegenwart und Abwesenheit von *CHK2* im Detail analysiert. Dabei wurden umfangreiche Analysen der Progression der Zellen durch die Mitose mittels FACS und Lebendzell-Untersuchungen sowie Immunfluoreszenz-Analysen der Spindel- und Chromosomen-Morphologie durchgeführt, die potentielle Mechanismen der *CHK2*-vermittelten chromosomalen Instabilität identifizieren sollten.

Der Verlust von CHK2 induziert eine mitotische Verzögerung

Zur Analyse der Progression der Mitose in Zellen mit verringerter *CHK2* Expression, wurden HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen (HCT116-*CHK2*^{-/-}) mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert und der Durchtritt durch die Mitose mittels FACS-Analysen und mittels Phospho-Histon H3-Westernblot analysiert (Abb. 29). Letzteres diente als häufig benutzter Marker für mitotische Zellen (Crosio *et al.* 2002; Tapia *et al.* 2006; Song *et al.* 2007). Dazu wurden nach der Auflösung des G1/S-Arrests regelmäßig Proben für die entsprechenden Analysen entnommen und analysiert. Das Histogramm der DNA-Verteilung an den verschiedenen Zeitpunkten zeigte in beiden Zelllinien bis zum Zeitpunkt des Mitose-Eintritts (t = 8 Std.) vergleichbare Ergebnisse (Abb. 29A). Bei späteren Zeitpunkten (t = 9 Std.) zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede beider Zelllinien. *CHK2* defiziente Zellen, welche die Mitose progressierten (t = 9 Std.), zeigten eine Verzögerung in der Generierung von Tochterzellen mit einem 2N DNA-Gehalt. So betrug der Anteil an

Zellen mit einem 2N DNA-Gehalt bei *CHK2* defizienten Zellen 35% und bei HCT116-Zellen bereits 45% (Abb. 29B). Bei späteren Zeitpunkten (t = 10-11 Std.) waren keine signifikanten Unterschiede mehr im 2N DNA-Gehalt zu beobachten (Abb. 29A und B).

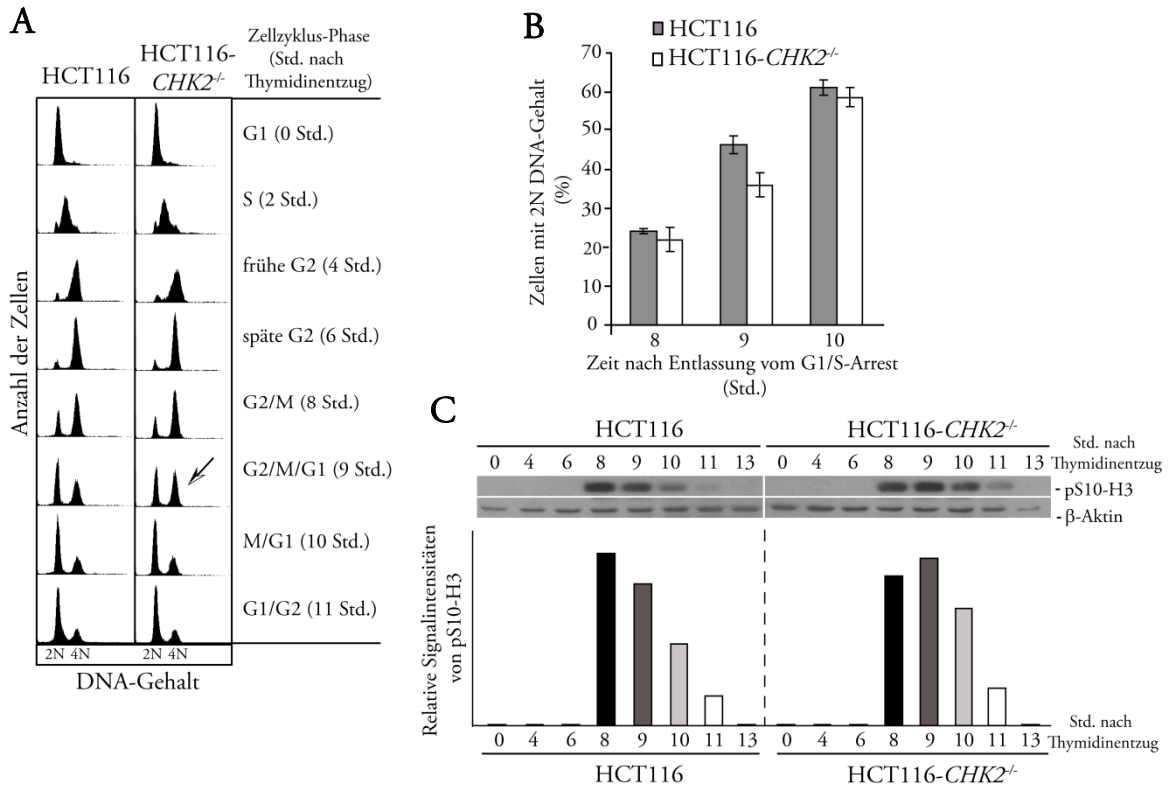


Abbildung 29: Der Verlust von *CHK2* induziert eine verzögerte Progression durch die Mitose. (A, B) HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert (t = 0 Std.) und die Progression durch die S, G2 und M-Phase (t = 2-11 Std.) mittels FACS-Analyse verfolgt (A). Ein exemplarisches Histogramm mit dem jeweiligen DNA-Gehalt (2N und 4N) ist dargestellt. *CHK2* defiziente Zellen, die durch die Mitose progressieren (t = 9 Std.), zeigen eine Verzögerung in der Generierung von Tochterzellen mit einem 2N DNA-Gehalt (Pfeil). (B) Quantifizierung von Zellen mit einem 2N DNA-Gehalt (= Tochterzellen in G1). Der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. (C) Der Verlust von *CHK2* induziert eine verlängerte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin-10. HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden wie in (A) synchronisiert und an Serin-10 phosphoryliertes Histon H3 (pS10-H3; als biochemischer Marker für die Mitose) mittels Westernblot-Analysen detektiert. Ein exemplarischer Westernblot und die Quantifizierung des Phospho-Histon H3-Signals mit Hilfe der Densitometrie sind dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen eine transiente mitotische Verzögerung von *CHK2*^{-/-}-Zellen, welche weiterhin durch die Analyse des Phospho-Histon H3-Levels bestätigt werden konnte (Abb. 29C). Der pS10-H3 Westernblot (Abb. 29C, oben) und die Quantifizierung der relativen pS10-H3-Signalintensität (Abb. 29C, unten) zeigten in beiden Zelllinien bis zum Zeitpunkt des Mitose-Eintritts (t = 8 Std.) kein pS10-H3-Signal. Im Gegensatz zu

HCT116-Zellen, bei denen das pS10-H3-Signal mit der Progression der Mitose graduell abnahm, zeigten *CHK2* defiziente Zellen eine verlängerte Phosphorylierung von Histon H3 an Serin-10 ($t = 8-9$ Std.; Abb. 29C).

Die über einen längeren Zeitraum hinaus anhaltende Phosphorylierung von Histon H3 lässt zusammen mit der verzögerten Generierung von Tochterzellen mit einem 2N DNA-Gehalt auf eine transiente mitotische Verzögerung *CHK2* defizienter Zellen schließen, deren Ursache im Weiteren untersucht werden soll.

*Nachweis einer mitotischen Verzögerung bei *CHK2*-Verlust durch Lebendzell-Analysen*

Um die Verzögerung der mitotischen Progression in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden Lebendzell-Analysen mit HCT116 und isogenen *CHK2*^{-/-}-Zellen durchgeführt, die zuvor mit pcDNA3-H2B-GFP transfiziert wurden. Dabei wurde die Progression durch eine Mitose beobachtet (Abb. 30C) und die benötigte Zeitspanne, die die Zellen vom Beginn des Kernmembran-Zusammenbruchs (NEB; nuclear envelope breakdown) bis zum Eintritt in die Anaphase benötigen, quantifiziert (Abb. 30 A, B). Der Zeitpunkt des NEB wurde dabei als das erste Bild mit kondensierten Chromosomen definiert und der Beginn der Anaphase als erste Bewegung der Chromosomen zu den Zellpolen.

Asynchron wachsende *CHK2*^{-/-}-Zellen zeigten, im Vergleich zu Parentalzellen, eine verlängerte Zeitspanne vom nukleären Kernmembran-Zusammenbruch bis zum Beginn der Anaphase (Abb. 30A). Während HCT116-Zellen durchschnittlich 23 Minuten vom NEB bis zum Beginn der Anaphase benötigten, waren es bei *CHK2* defizienten Zellen durchschnittlich 28 Minuten. Auffallend war die hohe zeitliche Variabilität, die *CHK2* defiziente Zellen bis zum Eintritt in die Anaphase benötigten (Abb. 30A). Während Parentalzellen 13 bis 42 Minuten vom NEB bis zum Beginn der Anaphase benötigten, waren es bei *CHK2* defizienten Zellen zwischen 16 und 75 Minuten (Abb. 30A).

Die beobachtete Verzögerung vom NEB bis zum Eintritt in die Anaphase *CHK2* defizienter Zellen war ebenfalls in synchronisierten Zellen zu beobachten (Abb. 30B). So benötigten Parentalzellen nach Synchronisation mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks im Durchschnitt 21 Minuten vom NEB bis zum Eintritt in die Anaphase, während *CHK2* defiziente Zellen durchschnittlich 29 Minuten benötigten. Ähnlich wie bei asynchron wachsenden Zellen (Abb. 30A), war auch nach einer Synchronisierung die

Zeitspanne vom NEB bis zum Beginn der Anaphase bei *CHK2* defizienten Zellen mit 16 bis 80 Minuten variabler als bei Wildtypzellen, bei denen sie 14 bis 50 Minuten betrug (Abb. 30B, obere und untere „Whisker“). Da per Definition die Zeit zwischen NEB zu Beginn der Prophase und einer vollständigen Aufreihung der Chromosomen in der Äquatorialebene in der Metaphase als Prometaphase bezeichnet wird, wird im Weiteren von einer Prometaphase-Verzögerung *CHK2* defizienter Zellen gesprochen. Diese Prometaphase-Verzögerung betrug im Durchschnitt 6,5 Minuten (Abb. 30, *CHK2*^{-/-}-Zellen: (A): 5 Minuten und (B): 8 Minuten).

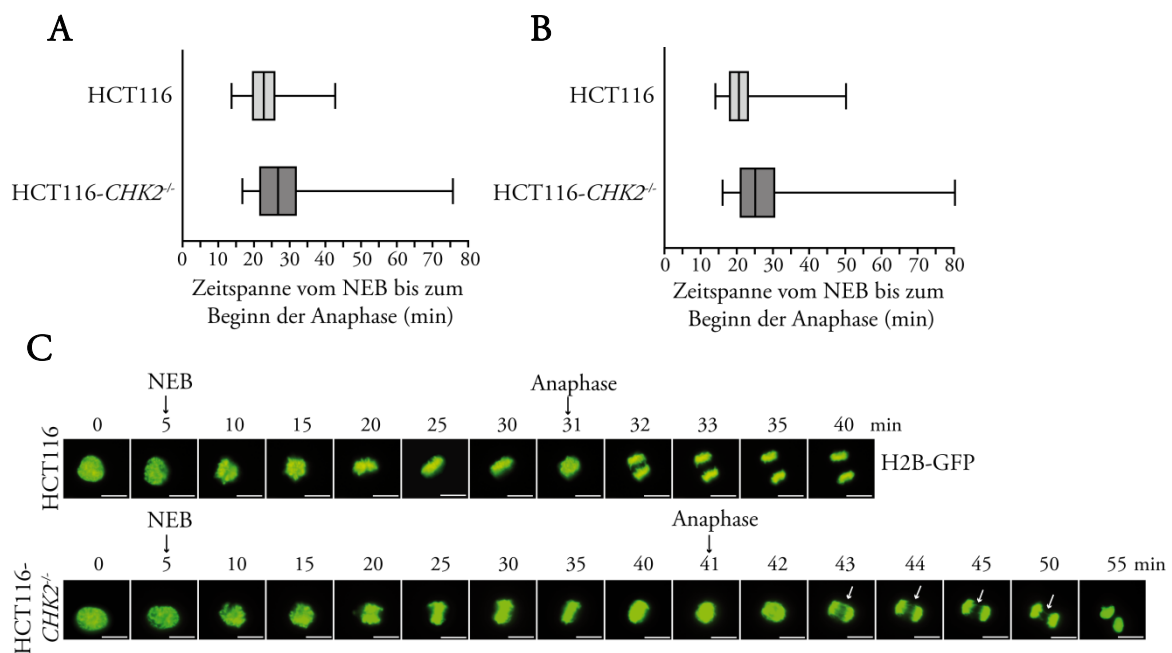


Abbildung 30: *CHK2* wird für die zeitgenaue Progression durch die Mitose benötigt. HCT116-Zellen und *CHK2* defiziente Zellen wurden mit pcDNA3-H2B-GFP transfiziert und die Progression asynchron wachsender (A) oder mittels eines doppelten Thymidinblocks synchronisierter Zellen (B) vom Beginn des Kernmembran-Zusammenbruchs (NEB) bis zum Eintritt der Zelle in die Anaphase der Mitose mittels Lebendzell-Analysen beobachtet. Es sind Kastengrafiken dieser Zeitspanne mit den entsprechenden „Whiskers“ von asynchron wachsenden (A) und von G1/S-synchronisierten (B) HCT116 und isogenen *CHK2*-defizienten Zellen dargestellt. (A) $p < 0,0001$; $n = 92/94$ Zellen; (B) $p < 0,0001$; $n = 94$ Zellen. (C) Zeitliche Darstellung von asynchron wachsenden, *H2B* exprimierenden HCT116 und *CHK2*^{-/-}-Zellen, die durch die Mitose progressieren. Es sind Einzelbilder im 5-Minuten-Abstand dargestellt. NEB: nuclear envelope breakdown, Kernmembran-Zusammenbruch. Größenmarker: 10 μ m.

Obwohl *CHK2* defiziente Zellen, im Vergleich zu Parentalzellen, eine Prometaphase-Verzögerung aufwiesen, zeigten Lebendzell-Analysen, dass grundsätzlich eine Progression durch die Mitose und die Segregation von Chromosomen gewährleistet war

(Abb. 30C). *CHK2* defiziente Zellen wiesen aber, im Gegensatz zu Parentalzellen, sogenannte Chromosomenbrücken auf, wobei einzelne Chromosomenstränge von einer Chromosomen-Population zur anderen reichten. Darüber hinaus wurden einzelne Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle beobachtet (Abb. 30C, Pfeile). Ob diese Defekte bei der Segregation der Chromosomen auf die Assemblierung aberranter Spindelstrukturen zurückzuführen ist, wird in den folgenden Kapiteln analysiert.

Die Spindelmorphologie in Lebendzell-Untersuchungen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Chk2 in der Mitose aktiv ist und für die chromosomale Stabilität und die zeitgenaue Progression durch die Mitose benötigt wird. Welche Aufgabe(n) Chk2 in der Mitose erfüllt und welche molekularen Mechanismen einer transienten Prometaphase-Verzögerung sowie der Formierung von Chromosomenbrücken und einzelnen Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle nach einem *CHK2*-Verlust zugrunde liegen, wurde im Folgenden analysiert. Dazu wurden HCT116 und *CHK2*^{-/-}-Zellen mit pEF-mCherry- α -Tubulin und pEGFP-H2B transfiziert und die Progression durch die Mitose in Lebendzell-Analysen beobachtet (Abb. 31).

HCT116-Zellen benötigten vom NEB bis zum Beginn der Anaphase 22 Minuten und zeigten bereits nach 30 Minuten eine Metaphase mit einer typischen Spindelmorphologie und Chromosomen-Aufreihung in der Äquatorialebene (Abb. 31, HCT116).

CHK2 defiziente Zellen hingegen benötigten vom NEB bis zum Beginn der Anaphase 34 Minuten. Auffällig waren die knäuelartigen Spindeln, die nach Zusammenbruch der Kernmembran nach 10 Minuten zu erkennen waren und bis 30 Minuten nach Kernmembran-Zusammenbruch bestehen blieben (Abb. 31, *CHK2*^{-/-}). Diese Art Knäule lösen sich bei weiterer Progression durch die Mitose aber auf und bildeten in der Metaphase eine bipolare Spindel aus. Eine wildtypische Metaphaseplatte mit in einer Ebene arrangierten Chromosomen ist aber nicht zu erkennen, sondern ein, breiterer Metaphase-Bereich mit nicht vollständig aufgereihten Chromosomen (Abb. 31, 42 Minuten, *CHK2*^{-/-}). Trotz dieser Schwierigkeiten bei der Bildung einer bipolaren Spindel und bei der Aufreihung der Chromosomen in der Äquatorialebene, progressierten *CHK2* defiziente Zellen weiter durch die Mitose und initiierten nach 44 Minuten die Anaphase. Die Chromosomen wurden anschließend, ähnlich wie bei HCT116-Zellen, zu den Zellpolen segregiert.

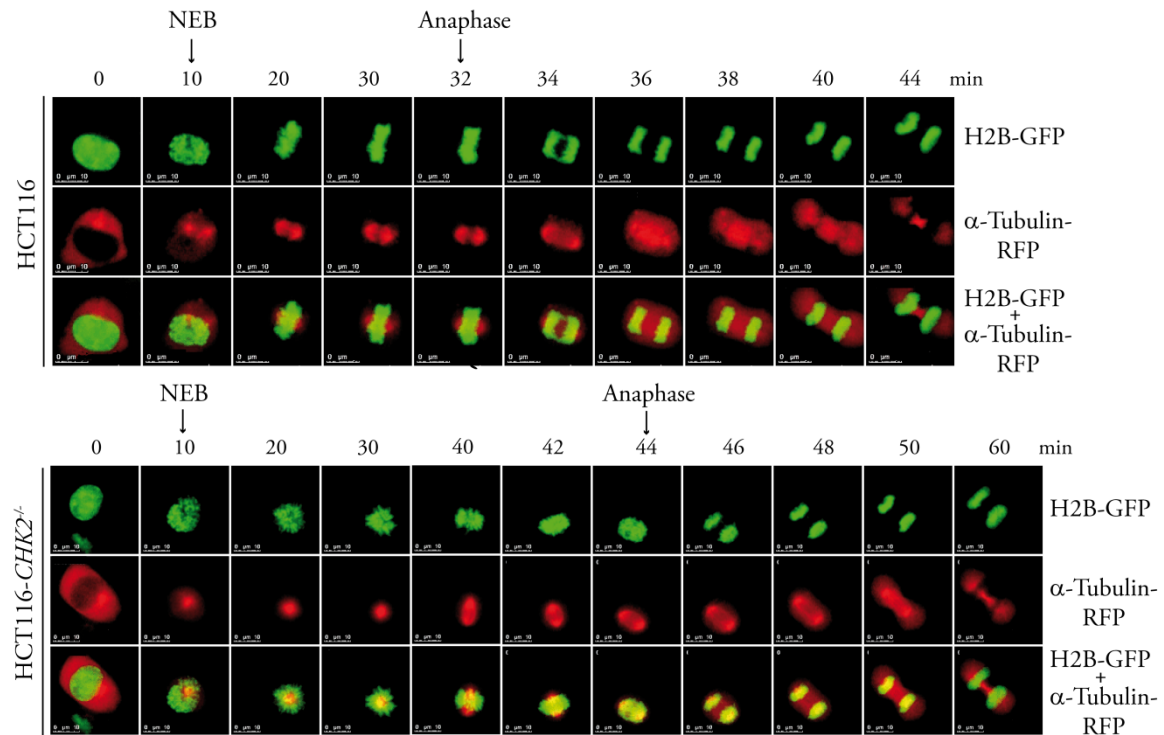


Abbildung 31: Der Verlust von *CHK2* induziert eine transiente Prometaphase Verzögerung mit aberranten Spindelstrukturen. HCT116 und HCT116-*CHK2*^{-/-}-Zellen wurden mit pEF-mCherry- α -Tubulin und pEGFP-H2B transfiziert und die Progression durch eine Mitose mit Hilfe von Lebendzell-Mikroskopie beobachtet. Ein repräsentatives Beispiel für jede Zelllinie ist dargestellt. Oben: H2B-GFP (pEGFP-H2B transfizierte Zellen); Mitte: α -Tubulin-RFP (pEF-mCherry- α -Tubulin transfizierte Zellen); unten: Überlagerung von H2B-GFP und α -Tubulin-RFP (pEGFP-H2B und pEF-mCherry- α -Tubulin transfizierte Zellen). NEB: nuclear envelope breakdown, Kernmembran-Zusammenbruch. Größenmarker: 10 μ m. Lebendaufnahmen wurden von N. Ertych zur Verfügung gestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein *CHK2*-Verlust zu einem transienten, mitotischen Arrest führt, der mit aberranten Spindelstrukturen in der Prometaphase und Fehlverteilungen der Chromosomen assoziiert ist. Damit bekräftigen diese Ergebnisse die zuvor mit Hilfe von FACS-, Westernblot- und Lebendzell-Analysen erhaltenen Daten (Abb. 29-30) und zeigen, dass *CHK2* für die korrekte Assemblierung mitotischer Spindeln erforderlich ist und somit für die akkurate und zeitlich korrekte Chromosomen-Segregation während der Mitose benötigt wird.

Der Verlust von *CHK2* induziert aberrante Spindelstrukturen und Chromosomen-Fehlverteilungen

Um die Funktion von Chk2 in der Mitose und die molekularen Mechanismen, die dem transienten mitotischen Arrest und den Defekten im Spindelaufbau bzw. der Chromosomen-Segregation nach einem *CHK2*-Verlust zugrunde liegen zu analysieren, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit *CHK2* profizienten und defizienten Zellen durchgeführt. Dabei wurden HCT116 und isogene *CHK2*^{-/-}-Zellen mittels eines doppelten Thymidinblocks im Zellzyklus synchronisiert und die verschiedenen Mitose-Phasen (Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase/Zytokinese) mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen evaluiert.

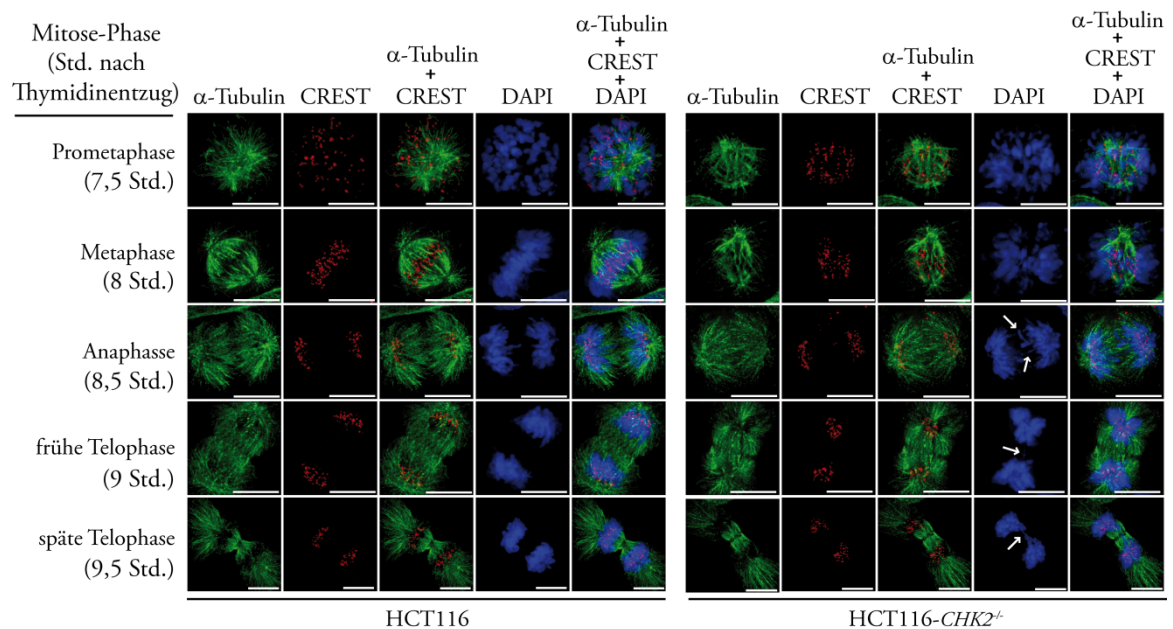


Abbildung 32: Der Verlust von *CHK2* induziert eine abnormale Spindelmorphologie und eine fehlerhafte Chromosomen-Segregation. HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden auf mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert. Sieben bis neun Stunden nach Auflösung des Arrests wurden die Zellen im halbstündigen Abstand fixiert und mittels Immunfluoreszenz-Färbung die Spindel (α -Tubulin, grün) und die Kinetochore (CREST, rot) visualisiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Es sind repräsentative Beispiele der verschiedenen mitotischen Phasen als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Die Pfeile verweisen auf missverteilte Chromosomen. Größenmarker: 10 μ m.

Die Immunfluoreszenz-Analysen von *CHK2* defizienten Zellen zeigten, im Gegensatz zu HCT116-Zellen, um die Spindel und an den Spindelpolen lokalisierte Chromosomen in der Metaphase. Darüber hinaus waren aberrante Spindelstrukturen zu beobachten (Abb. 32). Bei der weiteren Progression *CHK2* defizienter Zellen durch die Mitose kam es zur Ausbildung einer typischen Anaphase-Spindel aber die Chromosomen wurden häufig nicht korrekt auf die jeweiligen Zellpole segregiert. Es traten vermehrt Chromosomenbrücken auf. Solche Chromosomenstränge oder auch einzelne, isolierte Chromosomen waren auch während der späten Telophase *CHK2* defizienter Zellen im Bereich der Mittel-Zone zu erkennen (Abb. 32).

Obwohl *CHK2* defiziente Zellen aberrante Metaphase-Spindeln und nicht korrekt in der Äquatorialebene aufgereihete Chromosomen aufwiesen und in der Anaphase einzelne, isolierte Chromosomen zwischen beiden Chromosomen-Populationen zu beobachten waren, war kein erhöhter Anteil toter Zellen in FACS-, in Lebendzell- oder in Immunfluoreszenz-Analysen zu detektieren (Abb. 29-32). *CHK2* defiziente Zellen vollzogen demnach zum großen Teil eine korrekte Mitose wobei aberrante Spindelstrukturen als Intermediat bei der Formierung einer bipolaren Spindel in der Metaphase ausgebildet wurden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der FACS-, Western-, Lebendzell- und Immunfluoreszenz-Analysen eine transiente mitotische Verzögerung von *CHK2* defizienten Zellen, die mit Defekten im Spindelaufbau und Chromosomen-Fehlverteilungen während der Mitose verbunden waren. Somit erfüllt Chk2 eine wichtige Funktion bei der Ausbildung einer mitotischen Spindel und bei der Chromosomen-Aufreihung sowie -Segregation.

Um Zellen mit fehlerhaften Spindeln in *CHK2* defizienten Zellen zu quantifizieren, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit G1/S-synchronisierten HCT116 und *CHK2* defizienten Zellen durchgeführt und der Anteil aberranter Spindeln 7,5 Stunden nach Thymidinentzug quantifiziert (Abb. 33).

Ähnlich wie im vorhergehenden Experiment (Abb. 32) zeigten die Parentalzellen wiederum typische Metaphase-Spindeln mit einer symmetrischen, ballförmigen Form und Chromosomen, die korrekt in der Äquatorialebene angeordneten waren (Abb. 33, oben, HCT116). *CHK2* defiziente Zellen hingegen zeigten wiederum aberrante Spindeln mit

Prometaphase-ähnlich arrangierten Chromosomen, die um die mitotische Spindel verteilt sind (Abb. 33, *CHK2*^{-/-}, Pfeile).

Zur Quantifizierung aberranter Spindeln wurden ausschließlich Metaphasen herangezogen (Abb. 33A, Einzelbilder). Der Anteil an aberranten Spindeln war 7,5 Stunden nach Thymidinenzug bei *CHK2* defizienten Zellen mit 50% um etwa 25% höher, als bei Parentalzellen, bei denen der Anteil aberranter Spindeln 26% betrug.

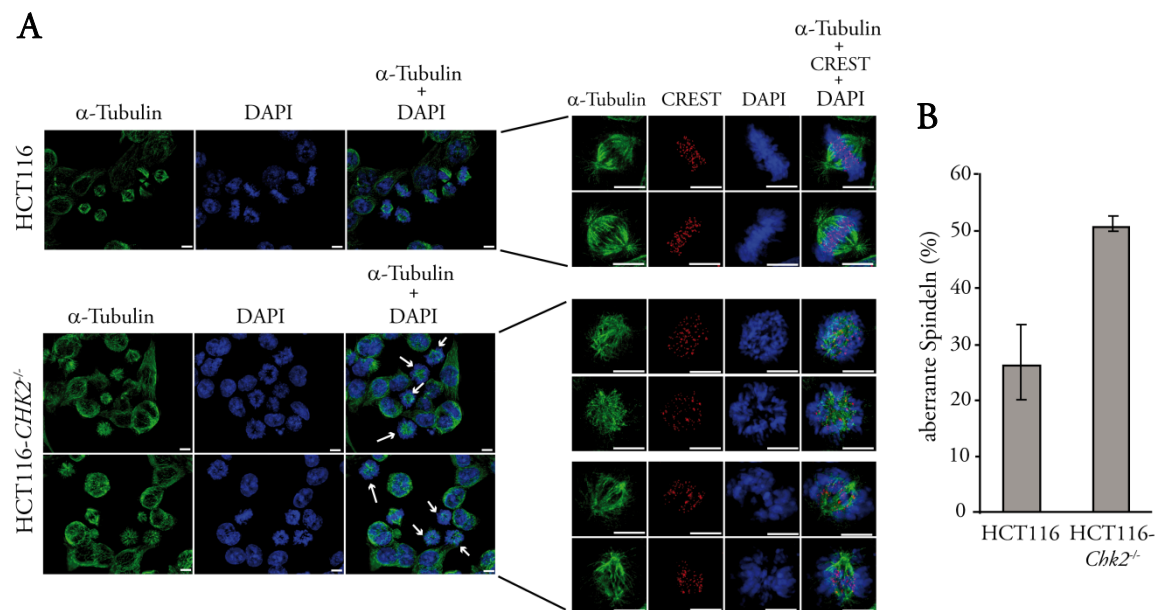


Abbildung 33: Der Anteil aberranter Metaphase-Spindeln ist nach *CHK2*-Verlust stark erhöht. HCT116 und isogene *CHK2*-defiziente Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert und (A) mitotische Spindeln (α -Tubulin, grün), Kinetochore (CREST, rot) und DNA (DAPI, blau) wurden 7,5 Std. nach Entlassung in den Zellzyklus mittels Immunfluoreszenz-Analysen detektiert. Aberrante Spindeln (Pfeile und Abb. 17A, Einzelbilder) wurden aus mindestens 1500 mitotischen Zellen quantifiziert (B). Repräsentative Beispiele mitotischer Spindeln sind als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μ m.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse (Abb. 14-33) eine unerwartete Rolle des Tumorsuppressors Chk2 bei der morphologisch korrekten und zeitgenauen Assemblierung mitotischer Spindeln und damit verbunden, der akkuraten Chromosomen-Aufreihung und-Segregation.

Der Verlust von CHK2 induziert einen abnormalen Spindelaufbau nach dem Auflösen eines Monastrol oder Nocodazol-vermittelten mitotischen Arrests

Die beobachteten Defekte im Spindelaufbau und die Defekte bei der Chromosomen-Aufreihung *CHK2* defizienter Zellen (Abb. 31-33) sollten zur Aufklärung der ursächlichen molekularen Mechanismen im Detail untersucht werden. Dazu wurden HCT116 und *CHK2*^{-/-}-Zellen mit Agenzien behandelt, die mit dem normalen Spindelaufbau interferierten und nach Auswaschen dieser Agenzien die Neubildung einer mitotischen Spindel in Immunfluoreszenz-Analysen überprüft (Abb. 34, 35). Damit sollte überprüft werden, ob *CHK2* für den korrekten Aufbau *bestehender* mitotischer Spindeln oder für die korrekte *Assemblierung* einer sich neu bildenden mitotischen Spindel erforderlich war.

Zunächst wurden HCT116 und *CHK2*^{-/-}-Zellen für vier Stunden mit 68 µM des Eg5/KSP-Inhibitors Monastrol (Mayer *et al.* 1999) behandelt (Abb. 34). Dadurch wurden die Formierung einer monopolen Spindel und ein monopoles Chromosomen-Alignment induziert. Unter diesen Bedingungen wurde ein SCP-vermittelter mitotischer Arrest vermittelt. Da Monastrol reversibel hemmt, konnte anschließend durch ein gründliches Auswaschen der Substanz mit PBS die Generierung einer bipolaren Spindel gewährleistet werden. Um die Progression post Metaphase zu verhindern, wurden die Zellen in Medium mit 30 µM MG132, einem effizienten Proteasomen-Inhibitor, entlassen. Wenn *CHK2* für die generelle Assemblierung einer mitotischen Spindel erforderlich ist, sollte die Neubildung einer mitotischen Spindel nach Auswaschen von Monastrol bei Abwesenheit von *CHK2* gestört sein.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten für HCT116-Zellen nach einer Monastrol-Behandlung die typisch symmetrischen, monopolen Spindeln (Abb. 34A, oben). Auch die rosettenartige Anordnung der Chromosomen um die Spindel herum entsprach den Erwartungen nach einer Monastrol-Behandlung der Zellen. *CHK2* defiziente Zellen hingegen, formierten monopole Spindeln, die im Vergleich zu HCT116-Zellen, asymmetrisch und „besenartig“ aussahen (Abb. 34A, unten). Die Chromosomen ordneten sich um diese deformierte Spindel herum an.

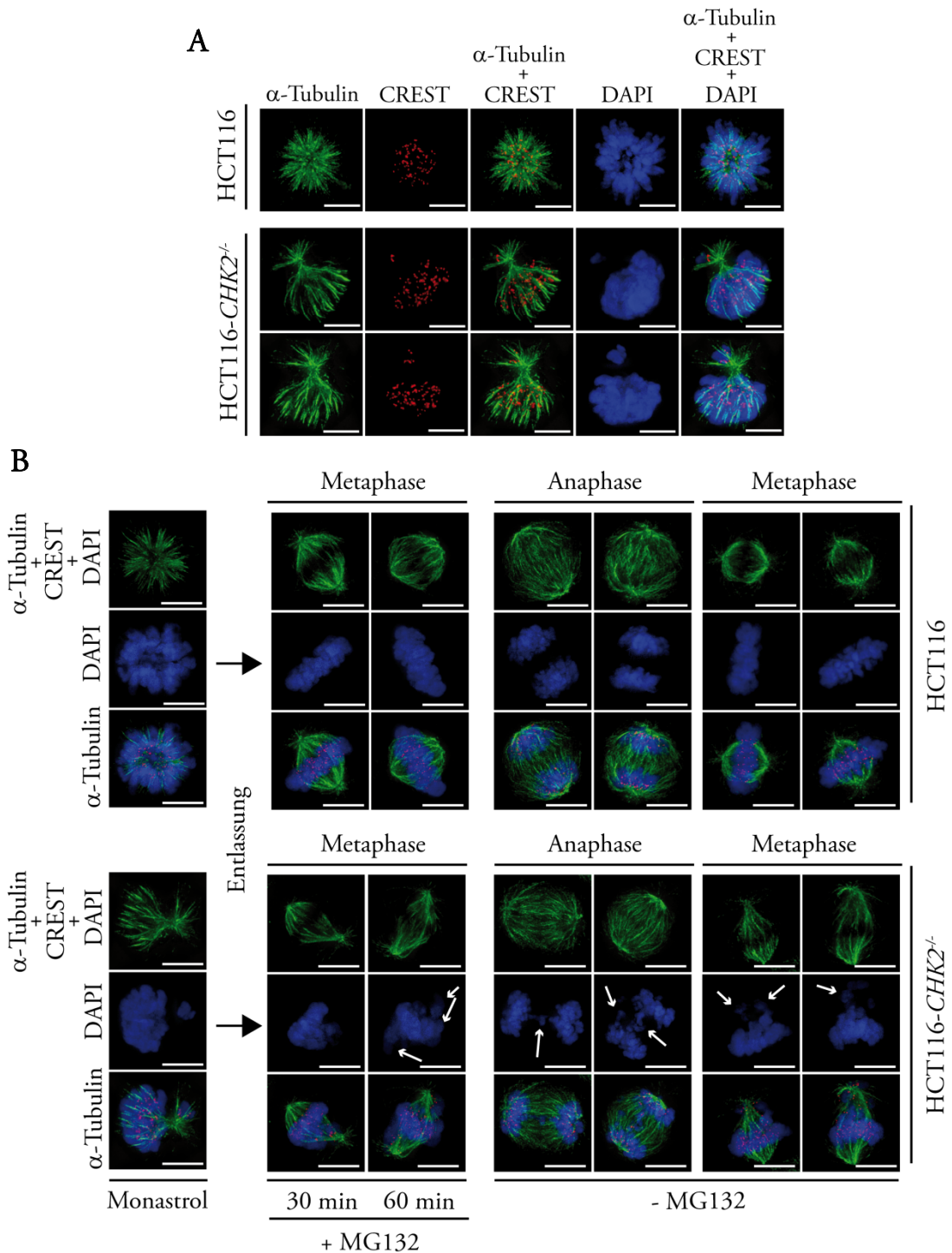


Abbildung 34: Der Verlust von *CHK2* induziert asymmetrische, Monastrol-initiierte monopolare Spindeln und aberrante, bipolare Spindeln nach Auflösung eines Monastrol-vermittelten mitotischen Arrests. HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden mit 68 μ M Monastrol für 4 Std. behandelt (A). (B) Nach Auswaschen des Inhibitors wurde die Neubildung einer bipolaren Spindel in der Metaphase und Anaphase mittels Immunfluoreszenz-Färbung der Spindel (α -Tubulin, grün) und der Kinetochore (CREST, rot) analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Repräsentative Beispiele von Meta- und Anaphasen nach Auflösung eines Monastrol-vermittelten mitotischen Arrests sind in Ab- bzw. Anwesenheit von MG132 als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μ m.

Nachdem das Monastrol aus den Zellen ausgewaschen wurde, um eine bipolare Spindel-Neubildung zu gewährleisten, wurde mittels Immunfluoreszenz-Analyse der Aufbau von Metaphase und Anaphase-Spindeln untersucht (Abb. 34B).

CHK2 profiziente HCT116-Zellen zeigten nach Auswaschen von Monastrol und Überführung in Medium ohne Inhibitor, Meta- und Anaphasen mit den zu erwartenden normalen, bipolaren Spindel-Morphologien und Chromosomen-Anordnungen (Abb. 34B, ohne MG132).

Auch die Metaphasen MG132 synchronisierter HCT116-Zellen zeigten typische, ballförmige Spindeln und in der Äquatorialebene vollständig aufgereichte Chromosomen (Abb. 34B, mit MG132). *CHK2* defiziente Zellen hingegen zeigten, ähnlich wie nach einer Thymidin-Synchronisierung (Abb. 32), aberrante Spindeln in der Metaphase, mit an den Zellpolen lokalisierten einzelnen Chromosomen (Abb. 34B, *CHK2*^{-/-}, ohne MG132, Metaphase). Diese aberranten Spindeln lösten sich bei der weiteren Progression durch die Mitose auf und es kam zur Ausbildung typischer Anaphase-Spindeln (Abb. 34B, *CHK2*^{-/-}, ohne MG132, Anaphase). Trotz typischer Anaphase-Spindeln traten Chromosomen-Fehlverteilungen auf, wie sie bereits in vorangehenden Experimenten beobachtet werden konnten (Abb. 32, Pfeile). Es waren Chromosomenbrücken und einzelne, isolierte Chromosomen in der Äquatorialebene der sich teilenden Zelle zu erkennen (Abb. 34B, Pfeile). Auch nach Entlassung der Monastrol-synchronisierten Zellen in Medium mit MG132 zeigten *CHK2* defiziente Zellen nicht, wie Parentalzellen, ballförmige Spindelstrukturen mit korrekt in der Äquatorialebene aufgereichten Chromosomen. Vielmehr waren aberrante Spindeln mit einzelnen Chromosomen, die an den Zellpolen lokalisiert waren, zu erkennen (Abb. 34B, *CHK2*^{-/-}, mit MG132).

Im Weiteren wurden durch das Spindelgift Nocodazol mitotische Spindeln depolymerisiert und durch anschließendes Auswaschen dieser Substanz, die Re-Polymerisierung einer neuen mitotischen Spindel mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen beobachtet (Abb. 35). Dazu wurden HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen durch eine vierstündige Behandlung mit 300 nM Nocodazol in der Prometaphase synchronisiert und nach 30-minütigem Waschen mit PBS in Medium ohne Nocodazol entlassen.

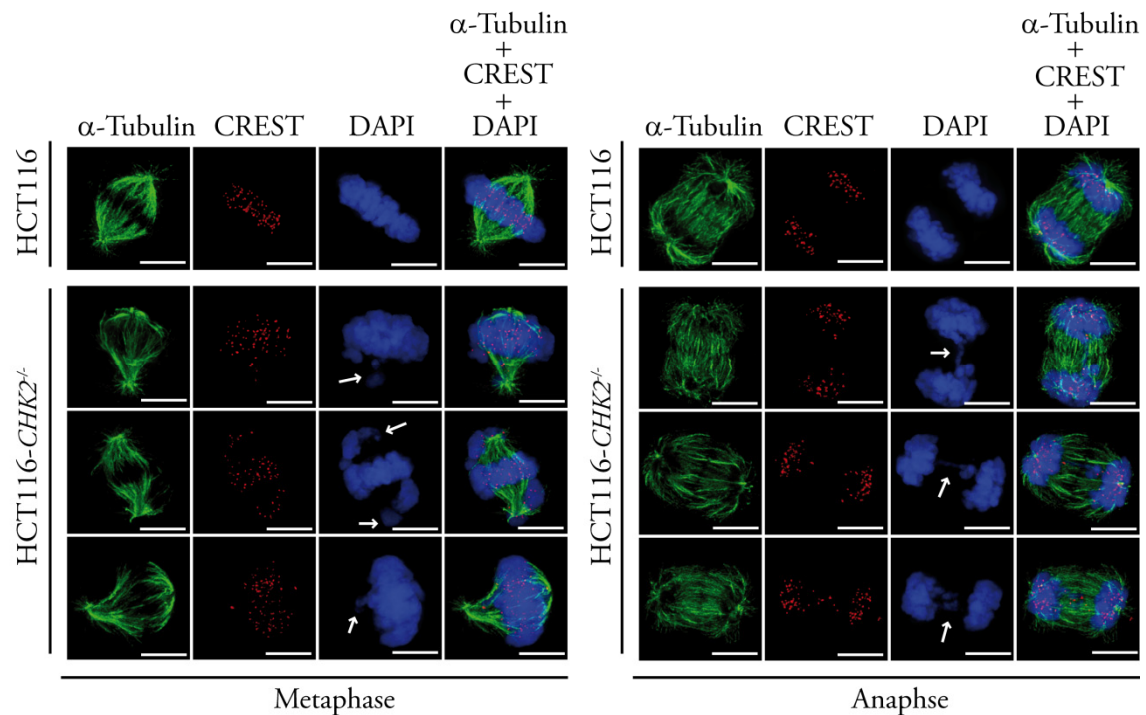


Abbildung 35: Der Verlust von *CHK2* induziert aberrante, bipolare Spindeln nach Auflösung eines Nocodazol-vermittelten mitotischen Arrests. HCT116 und isogene *CHK2*-defiziente Zellen wurden 4 Std. mit 300 nM Nocodazol behandelt, um mitotische Spindeln zu depolymerisieren und nach Auswaschen der Substanz, in Medium ohne Nocodazol entlassen. Die Re-Polymerisierung mitotischer Spindeln wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung der Spindel (α -Tubulin, grün) und der Kinetochore (CREST, rot) analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Repräsentative Beispiele von Meta- und Anaphasen nach Auflösung eines Nocodazol-vermittelten mitotischen Arrests sind als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Pfeile zeigen Beispiele fehlerhaft aufgereihter Chromosomen auf die Metaphaseplatte bzw. Missegregationen während der Anaphase. Größenmarker: 10 μ m.

Ähnlich wie bei den Experimenten nach Entlassen von Zellen aus einem Monastrol-Block (Abb. 34) formierten HCT116-Zellen nach Auswaschen von Nocodazol typische Metaphase- (Abb. 35, links) und Anaphase-Spindeln (Abb. 35, rechts) mit den charakteristischen Anordnungen der Chromosomen. *CHK2* defiziente Zellen hingegen, zeigten Metaphasen mit Spindelaberrationen und Aufreihungsdefekten der Chromosomen (Abb. 35, links, *CHK2*^{-/-}). Die Spindeln waren flach und kollabiert und außer in der Äquatorialebene der Zelle, befanden sich Gruppen von Chromosomen an den Zellpolen. Anaphase-Spindeln von *CHK2*^{-/-}-Zellen zeigten keine Defekte aber, ähnlich wie nach einer Synchronisierung mit Thymidin (Abb. 35) oder mit Monastrol (Abb. 35), waren die beiden Chromosomen-Populationen nicht vollständig voneinander getrennt. Es waren Chromosomenbrücken und mehrere einzelne Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle zu erkennen (Abb. 35, rechts, *CHK2*^{-/-}, Pfeile).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *CHK2* für die Assemblierung der mitotischen Spindel erforderlich ist und für eine korrekte Aufreihung der Chromosomen in die Äquatorialebene der Zelle und Segregation auf die Tochterzellen benötigt wird.

Der partielle CHK2-Verlust induziert asymmetrische monopolare Spindeln in Gegenwart des Eg5/KSP-Inhibitors Monastrol in HeLa-Zellen

In den vorangehenden Experimenten wurde in HCT116-Zellen mit einer *CHK2*-Defizienz die Bildung asymmetrischer monopolarer Spindeln nach dem Auflösen eines Monastrol-vermittelten mitotischen Arrests beobachtet. Um zu überprüfen, ob eine *CHK2*-Minderexpression in Zervix-Karzinomzellen ähnliche Ergebnisse erbringen, wurden HeLa-Zellen zunächst mit einem Kontroll-shRNA exprimierenden Plasmid und zwei verschiedenen *CHK2* shRNA exprimierenden Plasmiden (-#1 und -#2) transient transfiziert und der Expressionsspiegel der shRNAs im Westernblot überprüft (Abb. 36A, transient). Beide shRNAs induzierten, im Vergleich zu Kontroll-shRNA exprimierenden Zellen, eine *CHK2*-Minderexpression. Im Weiteren wurde der Anteil asymmetrischer monopolarer Spindeln in Immunfluoreszenz-Analysen nach Monastrol-Behandlung der Zellen bestimmt (Abb. 36B, transient). *CHK2*-shRNA transfizierte HeLa-Zellen wiesen einen erhöhten Anteil asymmetrischer monopolarer Spindeln von 23% (*CHK2*-shRNA-#2) bis 25% (*CHK2*-shRNA-#1) auf während Kontrollzellen zu 5% asymmetrische monopolare Spindeln aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen eine Induktion asymmetrischer Spindeln nach einer Monastrol-Behandlung in HeLa-Zellen mit geringer *CHK2*-Expression.

In weitergehenden Experimenten wurde gezeigt, dass ein partieller *CHK2*-Verlust in HCT116-Zellen, die ein *CHK2*-shRNA Plasmid stabil exprimierten, aberrante mitotische Spindeln induzierte und eine Wiedereinführung von *CHK2* diese Spindelphänotypen supprimierte (Daten nicht gezeigt). Dieser „Rescue“ wurde ebenfalls in HeLa-Zellen mit geringer *CHK2*-Expression überprüft, die mit einer *CHK2*-shRNA resistenten Mutante (*CHK2*^{resist}) transient transfiziert wurden. Nachdem die Wiederherstellung der *CHK2*-Expression in den stabilen Klonen im Westernblot überprüft wurde (Abb. 36A, stabil), wurde der Anteil an Zellen mit asymmetrischen, monopolaren Spindeln nach einer Monastrol-Behandlung quantifiziert (Abb. 36B, stabil).

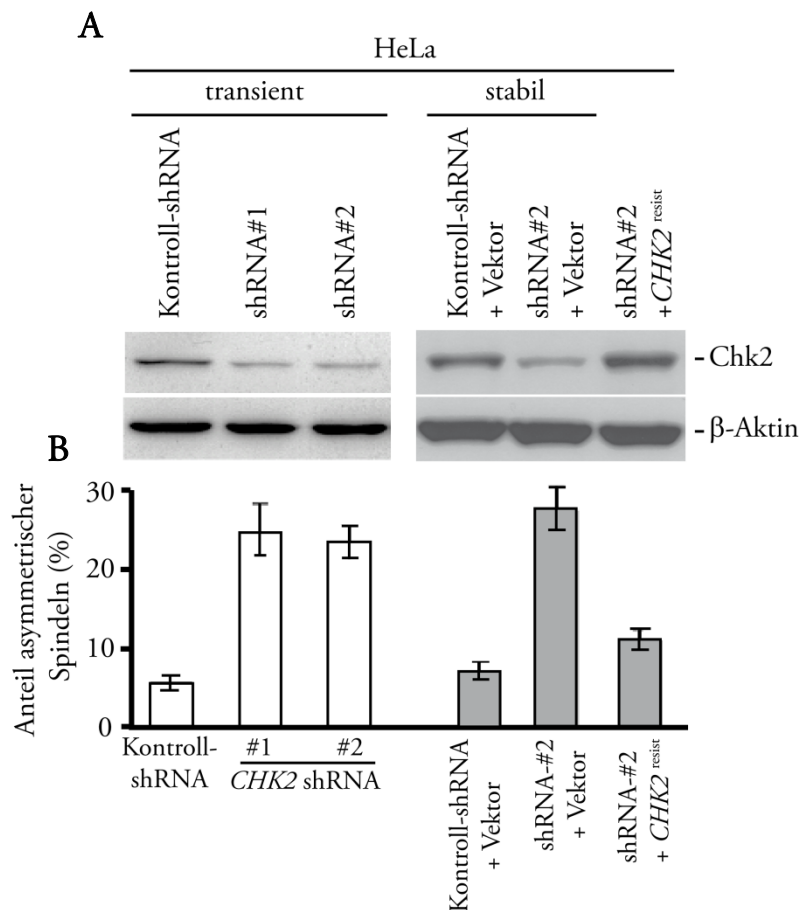


Abbildung 36: Der partielle Verlust von *CHK2* induziert und die Wiedereinführung von *CHK2* supprimiert die Bildung asymmetrischer monopolarer Spindeln in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden entweder transient oder stabil mit zwei verschiedenen shRNA exprimierenden Plasmiden gegen *CHK2* (shRNA-#1, shRNA-#2) transfiziert und stabile HeLa „Knockdown“-Zellen mit einer shRNA resistenten *CHK2*-Mutante (*CHK2*^{resist}) transfiziert, um die Re-Expression von *CHK2* zu ermöglichen. Es ist ein repräsentativer Westernblot, der die Proteinmenge von *CHK2* in HeLa-Zellen nach den Transfektionen zeigt, dargestellt (A). (B) Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 100 μ M Monastrol für 8 Std. behandelt und Zellen mit asymmetrischen, monopolarer Spindeln mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen quantifiziert. (Mittelwert \pm SD; n = 1000 monopolarer Spindeln).

*Eine *CHK2*-Defizienz induziert keine DNA-Schäden per se*

Der Anteil asymmetrischer monopolarer Spindeln von *CHK2*-„Knockdown“-Zellen war mit 25% viermal höher als in HeLa-Kontrollzellen. Nach Einführung des *CHK2*-shRNA resistenten Plasmids in HeLa-„Knockdown“-Zellen ging der Anteil an Zellen mit asymmetrischen monopolarer Spindeln auf 10% zurück (Abb. 36B, stabil). Somit konnte durch die Wiederherstellung der *CHK2*-Expression ein „Rescue“ asymmetrischer monopolarer Spindeln nach Monastrol-Behandlung erzielt werden.

Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind und hat somit eine wichtige Funktion im DNA-Schadensignalweg (Bunz *et al.* 1998; Kastan und Bartek 2004; Bartkova *et al.* 2005). Ebenso hat Chk2 eine wichtige und gut charakterisierte Funktion in diesem Signalweg (Hirao *et al.* 2000; Iliakis *et al.* 2003; Stevens *et al.* 2003; Ahn *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004; Bartkova *et al.* 2005). Dennoch haben vorangehende Daten aus unserem Labor gezeigt, dass eine *CHK2*-Defizienz, nicht aber eine *TP53*-Defizienz, die Bildung asymmetrischer Spindeln nach einer Monastrol-Behandlung der Zellen induziert (Daten nicht gezeigt; Daten von A. Kienitz und Dr. C. Vogel). Demnach ist die Bildung aberranter Spindeln nach einem *CHK2*-Verlust unabhängig vom DNA-Schadensignalweg. Da Chk2 aber eine Rolle im DNA-Schadensignalweg zukommt, sollte im Weiteren ausgeschlossen werden, dass weder ein *CHK2*-Verlust, noch die zur Synchronisierung der Zellen verwendeten Substanzen (Thymidin, Nocodazol, Monastrol) einen DNA-Schaden induzieren, welche in Folge die veränderten Spindel-Morphologien induzieren könnten.

Dazu wurde der DNA-Schaden-Marker γ -H2AX mit Hilfe von Westernblot und Immunfluoreszenz-Analysen detektiert. γ -H2AX ist eine Histon-Variante, die nach DNA-Doppelstrangbrüchen an Serin 139 in ATM/ATR-abhängiger Art und Weise phosphoryliert wird und somit als Marker für DNA-Schaden angesehen werden kann (Rogakou *et al.* 1999).

HCT116 und *CHK2*^{-/-}-Zellen wurden zunächst mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S Übergang des Zellzyklus synchronisiert und dann in Medium ohne Thymidin für bis zu 10 Stunden entlassen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die Westernblot-Analyse des γ -H2AX-Spiegels entnommen (Abb. 37A).

HCT116 und *CHK2* defiziente Zellen wiesen nach Auflösen des G1/S-Arrests im Vergleich zu unbehandelten, asynchron wachsenden Kontrollzellen, keine Zunahme an Phosphorylierung von H2AX auf. Somit induziert weder Thymidin, noch eine *CHK2*-Defizienz einen DNA-Schaden *per se* (Abb. 37A).

Immunfluoreszenz-Analysen von DMSO-behandelten Kontrollzellen und von Zellen, die mit Nocodazol, Monastrol oder als Positivkontrolle mit dem Topoisomerase-Hemmer Adriamycin für vier Stunden behandelt wurden, zeigten lediglich nach einer Behandlung der Zellen mit Adriamycin DNA-Schaden. Mitotisch synchronisierte Zellen wiesen keinen DNA-Schaden auf (Abb. 37B).

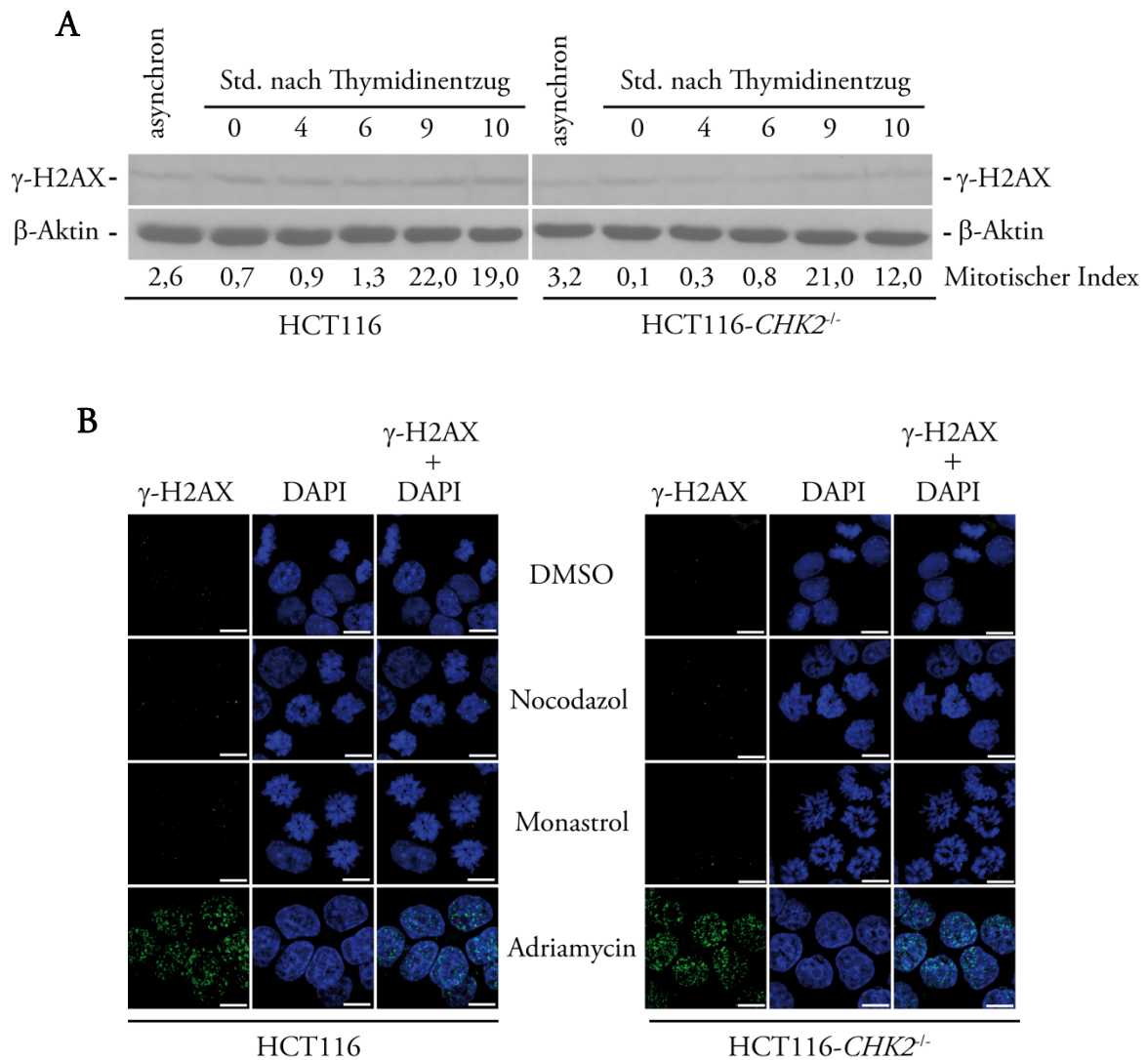


Abbildung 37: Weder der Verlust von *CHK2*, noch die mitotische Synchronisierung induziert einen DNA-Schaden *per se*. A) HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert und Proben von asynchron wachsenden Zellen sowie zum Zeitpunkt der Synchronisierung (0 Std.) und 4 Std., 6 Std., 9 Std. oder 10 Std. nach Thymidinentzug entnommen. Im Westernblot wurde die Menge phosphorylierten H2AX (γ -H2AX) ermittelt und mittels FACS-Analyse der jeweilige mitotische Index bestimmt. β -Aktin dient als Ladekontrolle. B) Asynchron wachsende HCT116 und isogene *CHK2* defiziente Zellen wurden für 4 Std. mit DMSO, 900 nM Adriamycin (Positivkontrolle), 300 nM Nocodazol oder 68 μ M Monastrol behandelt und γ -H2AX (grün) in Immunfluoreszenz-Analysen detektiert. Es sind repräsentative Beispiele jeder Bedingung als Maximalprojektion dekonvolierter Z-Stapel dargestellt. Größenmarker: 10 μ m. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit N. Ertych generiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass weder eine *CHK2*-Defizienz, noch die Synchronisierung der Zellen mit Thymidin oder mit Nocodazol oder Monastrol einen DNA-Schaden induzieren.

Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die mitotische Progression notwendig

Zur Überprüfung, ob die Chk2 Kinase-Aktivität für die korrekte Assemblierung mitotischer Spindeln und für eine korrekte Chromosomen-Aufreihung benötigt wird, wurden Experimente mit *CHK2*-„Knockout“-Zellen, die keine Kinase-Aktivität besitzen, durchgeführt (Abb. 38). Dazu wurden HCT116 und HCT116-*CHK2*^{-/-}-Zellen, die entweder mit einem Leervektor, mit Wildtyp-*CHK2* (Abb. 38: HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT) oder einer katalytisch inaktiven Mutante von *CHK2* (Abb. 38: HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD) rekonstituiert waren, mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert und für 2,5 Stunden in Medium mit 30 μ M MG132 entlassen. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen wurden anschließend Zellen mit korrekten Metaphase-Spindeln und vollständiger Chromosomen-Aufreihung in der Äquatorialebene der Zelle quantifiziert (Abb. 38).

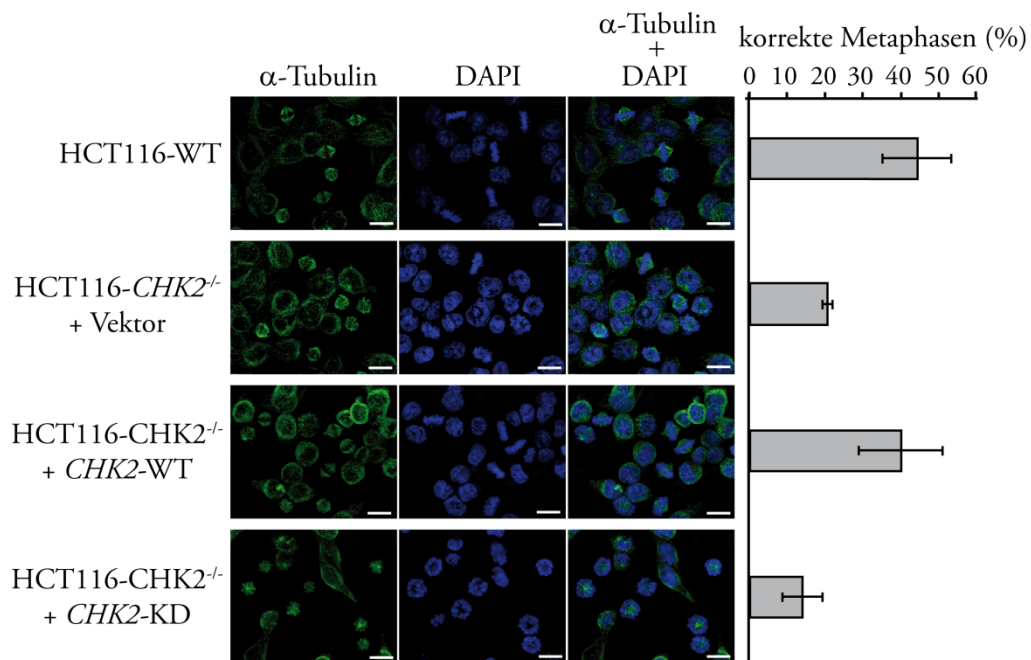


Abbildung 38: Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die Assemblierung mitotischer Spindeln erforderlich. HCT116-Zellen und HCT116-*CHK2*^{-/-}-Zellen, die mit einem Leervektor, *CHK2* (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT) oder einer Kinase-inaktiven Mutante von *CHK2* (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD) rekonstituiert waren, wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert und in Medium mit 30 μ M MG132 entlassen, um Zellen in der Metaphase zu arretieren. Zellen mit typischen Metaphase-Spindeln (α -Tubulin, grün) und vollständiger Chromosomen-Aufreihung (DAPI, blau) wurden aus mindestens 1500 mitotischen Zellen quantifiziert. Größenmarker: 10 μ m.

Der Anteil an Zellen mit korrekten, bipolaren Spindeln und vollständiger Chromosomen-Aufreihung in der Metaphase der Mitose war bei *CHK2*-Verlust signifikant reduziert. Während *CHK2*-profiziente HCT116-Zellen zu 44% normale Metaphasen ausbildeten, betrug der Anteil korrekter Metaphasen in *CHK2* defizienten Zellen 20% (Abb. 38). Nach Rekonstitution von *CHK2* defizienten Zellen mit *CHK2* wurde die korrekte Aufreihung der Chromosomen in die Äquatorialebene wiederhergestellt (40% normale Metaphasen), nach Rekonstitution mit der inaktiven *CHK2*-Mutante hingegen nicht (Abb. 38, Vgl. HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT mit HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD).

Diese Daten zeigen, dass die akkurate Bildung von Metaphase-Spindeln die Kinase-Aktivität von Chk2 erfordert.

Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die zeitgenaue Progression der Mitose notwendig

Die vorangehenden Daten haben gezeigt, dass Chk2 für die zeitgenaue Progression der Mitose benötigt wird (Abb. 29-31). Zur Überprüfung, ob auch für die zeitgenaue Progression durch die Mitose die Chk2 Kinase-Aktivität benötigt wird wurde auf Proteinebene die Menge an phosphoryliertem Histon H3 (Serin-10) in synchronisierten Zellen nachgewiesen (Abb. 39). Dazu wurden HCT116-*CHK2*^{-/-}-Zellen, die mit *CHK2* (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT) oder einer inaktiven *CHK2* Kinase-Mutante (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD) rekonstituiert waren, mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert. Nach Thymidinentzug wurde die Progression durch den Zellzyklus durch Detektion von pS10-H3 mittels Westernblot analysiert (Abb. 39). *CHK2* defiziente Zellen, die mit einer nicht aktiven Kinase-Mutante von *CHK2* rekonstituiert wurden, zeigten, gegenüber den *CHK2* rekonstituierten Zellen, ein länger anhaltendes Phospho-Histon H3 Signal. So zeigten *CHK2* rekonstituierte *CHK2*^{-/-}-Zellen (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT) acht Stunden nach Thymidinentzug eine maximale Signalintensität von pS10-H3, welche nach 11 Stunden wieder das Niveau G1/S arretierter Zellen erreichte. In *CHK2*^{-/-}-KD rekonstituierten *CHK2*^{-/-}-Zellen (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD) hingegen, war ein deutliches pS-H3-Signal vom Eintritt in die Mitose (t = 8 Std.) bis 11 Stunden nach Entlassung aus dem Thymidin-Block zu detektieren (Abb. 39).

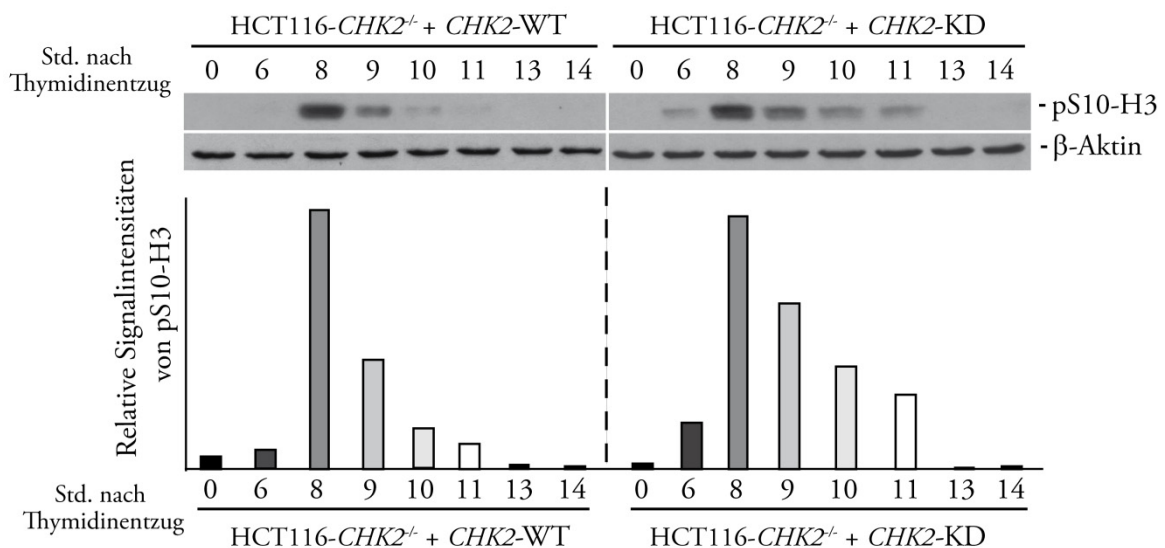


Abbildung 39: Die Chk2 Kinase-Aktivität ist für die zeitgenaue Progression durch die Mitose erforderlich. HCT116-*CHK2*^{-/-}-Zellen, die mit *CHK2* (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-WT) oder einer Kinase-inaktiven Mutante von *CHK2* (HCT116-*CHK2*^{-/-} + *CHK2*-KD) rekonstituiert waren, wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert und in Medium entlassen. Phosphoryliertes Histon H3 (pS10 H3) wurde mittels Westernblot-Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Thymidinentzug detektiert. Es sind ein repräsentativer Westernblot und die dazugehörige Quantifizierung mittels Densitometrie, dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zeitgenaue Progression durch die Mitose die Kinase-Aktivität von Chk2 erfordert.

Merotelische Kinetochor-Anheftung als Ursache für CIN

Ein wichtiger und weit verbreiteter Mechanismus chromosomaler Instabilität, ist die Persistenz inkorrekturer Mikrotubuli-Kinetochor Anheftungen, die zur Bildung von sogenannten „lagging chromosomes“ (einzelne, in der Äquatorialebene einer mitotischen Zelle lokalisierte Chromosomen) führen (Kapoor *et al.* 2000; Thompson und Compton 2008; Bakhoun *et al.* 2009; Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009). Merotelische Anheftungen, bei denen ein einzelnes Kinetochor Mikrotubuli von beiden Zellpolen bindet, stellen dabei ein besonderes Risiko für die sich teilende Zelle dar (Cimini 2008; Thompson und Compton 2008). Da Kinetochore durch Mikrotubuli gebunden werden, können merotelische Anheftungen nicht vom mitotischen SCP detektiert werden. Als Folge dieser Merotelie kommt es zu Chromosomen-Fehlverteilungen in der Anaphase der Mitose, mit einzelnen Chromosomen, die in der Äquatorialebene der Zelle zurück bleiben. Zur Auflösung merotelischer Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore

besteht in der Zelle ein Korrekturmechanismus, der aus dem CPC und Aurora B als Schlüsselkinase besteht (Cimini 2007; Vader *et al.* 2008). Werden diese unkorrekten Mikrotubuli-Anheftungen nicht vor Beginn der Anaphase aufgelöst, kann dies zu Chromosomen-Fehlverteilungen und Aneuploidie führen.

Der CHK2-Verlust induziert merotelische Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore

Merotelische Anheftungen von Mikrotubuli entstehen durch vorübergehend generierte aberrante Spindelstrukturen wie etwa nach Formierung multipolarer Spindeln (Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009). Da *CHK2*-defiziente Zellen aberrante mitotische Spindeln ausbilden (Abb. 31-35) wurde überprüft, ob ein *CHK2*-Verlust und Merotelie miteinander korrelieren (Abb. 40).

Anaphasen von HCT116-Zellen wiesen zwei voneinander getrennte Chromosomen-Populationen auf, wobei sich je eine Population an jedem Zellpol befand (Abb. 24A, HCT116). *CHK2* defiziente Zellen wiesen Anaphasen mit zum Teil nicht vollständig separierten Chromosomen-Populationen auf (Abb. 40A, HCT116-*CHK2*^{-/-}). Es waren sogenannte Chromosomenbrücken ersichtlich, wie sie bereits in vorangehenden Analysen bei *CHK2* defizienten Zellen beobachtet wurden (Abb. 30, 32,34-35). Darüber hinaus befanden sich auch einzelne, Kinetochor positive Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle (Abb. 40A, HCT116-*CHK2*^{-/-}, Pfeile), die als Folge nicht aufgelöster merotelischer Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore entstanden waren (Ganem *et al.* 2009).

Zur Quantifizierung der beobachteten isolierten Chromosomen bei *CHK2*-Verlust und zur Überprüfung ob das Auftreten isolierter Chromosomen durch eine Re-Expression von *CHK2* supprimierbar war, wurden zunächst HCT116-Zellen generiert, die stabil eine Kontroll-shRNA, eine *CHK2*-shRNA oder eine *CHK2*-shRNA zusammen mit einer *CHK2*-shRNA resistenten Mutante von *CHK2* exprimierten (Abb. 40B).

Dazu wurden HCT116-Zellen mit dem *CHK2*-shRNA-#2 exprimierenden Plasmid transfiziert und drei Einzelklone (12, 27, 35) mit geringer *CHK2*-Expression identifiziert. Ein stabiler Klon mit geringer *CHK2*-Expression wurde ausgewählt (Klon 27) und stabil mit einer *CHK2*-shRNA resistenten Mutante von *CHK2* transfiziert, um die *CHK2*-Expression wieder herzustellen (Abb. 40B, rechts). Der erhaltene *CHK2*-„Knockdown“

und *CHK2*-Rekonstitutionsklon (Abb. 40B, rechts) wurden im Weiteren zur Quantifizierung von isolierten Chromosomen in der Anaphase eingesetzt (Abb. 40C).

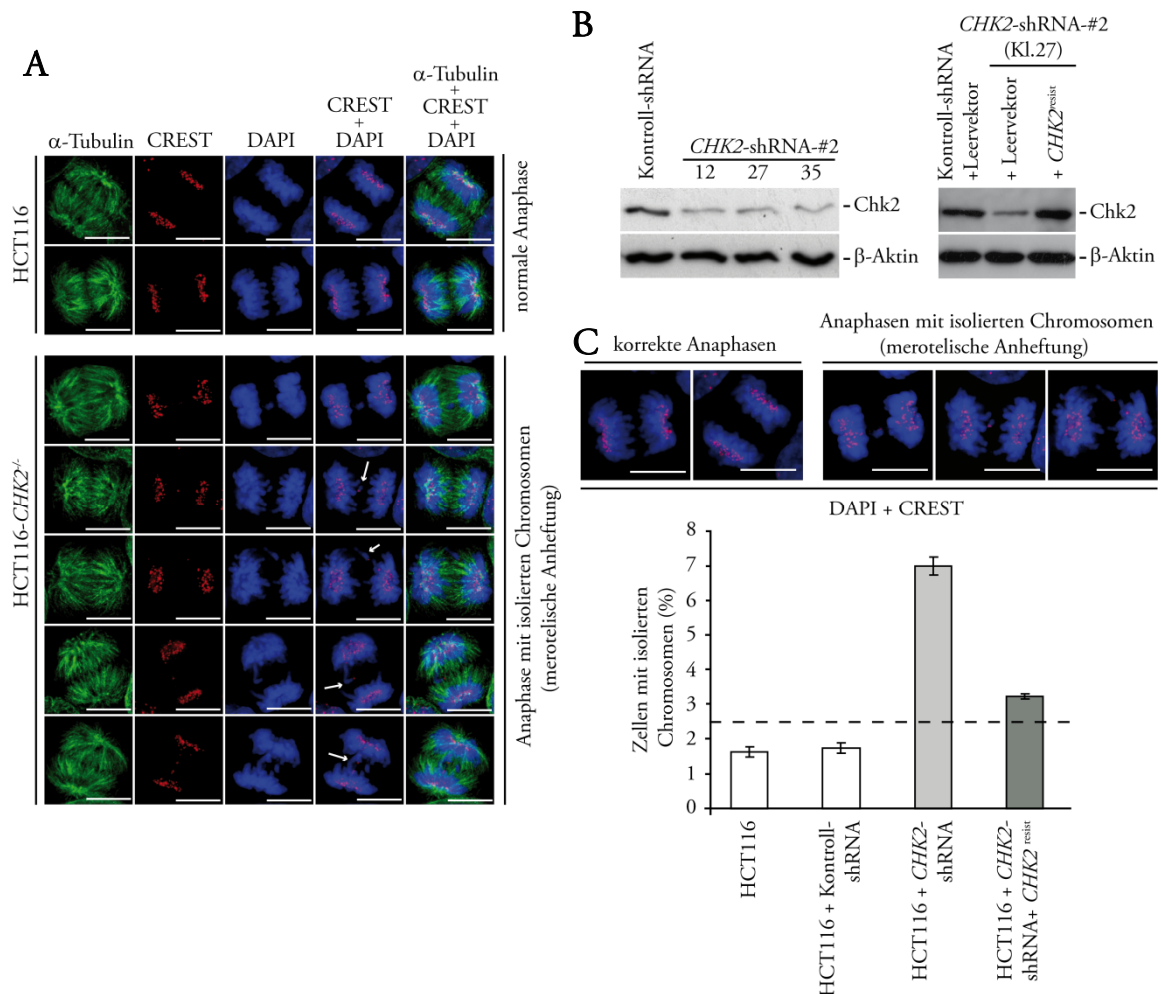


Abbildung 40: Der Verlust von *CHK2* induziert merotelische Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore. A) HCT116 und HCT116-*CHK2*^{-/-}- Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert und 8,5 Std. nach Thymidinentzug mittels Immunfluoreszenz-Analysen mitotische Spindeln (α -Tubulin, grün) und Kinetochore (CREST, rot) detektiert. Chromosomen wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Es sind repräsentative Beispiele von korrekten Anaphasen und Anaphasen mit isolierten Chromosomen in der Äquatorialebene nach einem *CHK2*-Verlust dargestellt. Größenmarker: 10 μ m. B, links) HCT116-Zellen wurden stabil mit einer Kontroll-shRNA oder einem *CHK2*-shRNA-#2 exprimierenden Plasmid transfiziert und drei Einzelklone (12, 27 und 35) mit *CHK2*-Mindereexpression analysiert. B, rechts) Der stabile *CHK2*-shRNA Klon 27 wurde weiterhin stabil mit einem Leervektor oder einer *CHK2*-shRNA resistenten Mutante von *CHK2* (*CHK2*^{resist}) transfiziert und der Expressionsspiegel von *CHK2* mittels Western-Analyse überprüft. β -Aktin dient als Ladekontrolle. C) HCT116-Zellen, die eine Kontroll-shRNA, eine *CHK2*-shRNA oder eine *CHK2*-shRNA zusammen mit einer shRNA resistenten Mutante von *CHK2* (*CHK2*^{resist}) exprimieren, wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert und nach 8,5 Std. der Anteil an Anaphasen mit isolierten Chromosomen in der Äquatorialebene bestimmt. (n = 800 Anaphasen.)

Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang des Zellzyklus synchronisiert und der Anteil an Zellen mit einzelnen Chromosomen, die in der Äquatorialebene einer Anaphase lokalisiert waren und eine positive Kinetochor-Färbung aufwiesen (Abb. 40C, oben) quantifiziert (Abb. 40C, unten). HCT116-Zellen und Kontroll-shRNA transfizierte Zellen wiesen einen Anteil an Zellen mit isolierten Chromosomen von unter 2% auf. *CHK2*-shRNA transfizierte Zellen hingegen zeigten einen signifikant höheren Anteil an Anaphasen mit isolierten Chromosomen in der Äquatorialebene (7%). Die Expression eines *CHK2*-shRNA resistenten Plasmids in HCT116-Zellen mit reduzierter *CHK2*-Expression reduzierte den Anteil isolierter Chromosomen wieder auf 3%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein *CHK2*-Verlust und das Auftreten von isolierten Chromosomen in der Anaphase miteinander korrelieren und eine Wiedereinführung von *CHK2* in Zellen mit geringer *CHK2*-Expression diesen Phänotyp supprimiert. Da isolierte Chromosomen in der Anaphase aus merotelischen Anheftungen der Mikrotubuli an die Kinetochore resultieren (Cimini 2007) und bei einem *CHK2*-Verlust das Auftreten isolierter Chromosomen beobachtet wurde, die durch Re-Expression von *CHK2* supprimiert wurden (Abb. 40), besteht eine Korrelation zwischen einem *CHK2*-Verlust und merotelischer Kinetochor-Anheftung.

Das Vorhandensein von isolierten Chromosomen bei *CHK2*-Verlust wurde zusätzlich in Lebendzell-Analysen überprüft (Abb. 41). Dazu wurden HCT116-Zellen und *CHK2*^{-/-}-Zellen transient mit einem GFP-markierten Histon *H2B* transfiziert und die Progression durch die Mitose beobachtet (Abb. 41). HCT116-Zellen benötigten 26 Minuten vom Zusammenbruch der Kernmembran (NEB; nuclear envelope breakdown) bis zum Beginn der Anaphase. Mit dem Eintritt der Zellen in die Anaphase wurde die Segregation der Chromosomen zu den Zellpolen beobachtet (Abb. 41, HCT116). *CHK2* defiziente Zellen benötigten vom NEB bis zum Beginn der Anaphase 35 Minuten. *CHK2*^{-/-}-Zellen wiesen demnach eine Verzögerung in der Prometaphase auf, wie bereits in vorangehenden Experimenten beobachtet werden konnte (Abb. 29-30). Ähnlich wie in Immunfluoreszenz-Analysen (Abb. 32, 34-35, 40), wurden auch in Lebendzell-Analysen isolierte Chromosomen in Anaphasen von *CHK2* defizienten Zellen beobachtet (Abb. 41, HCT116-*CHK2*^{-/-}, Pfeile). Demnach segregieren Kolonkarzinom-Zellen bei einem *CHK2*-Verlust ihre Chromosomen bei einer Progression durch die Mitose, aber mit einer

geringeren Genauigkeit als Parentalzellen, was wiederum die Grundlage chromosomaler Instabilität darstellen könnte.

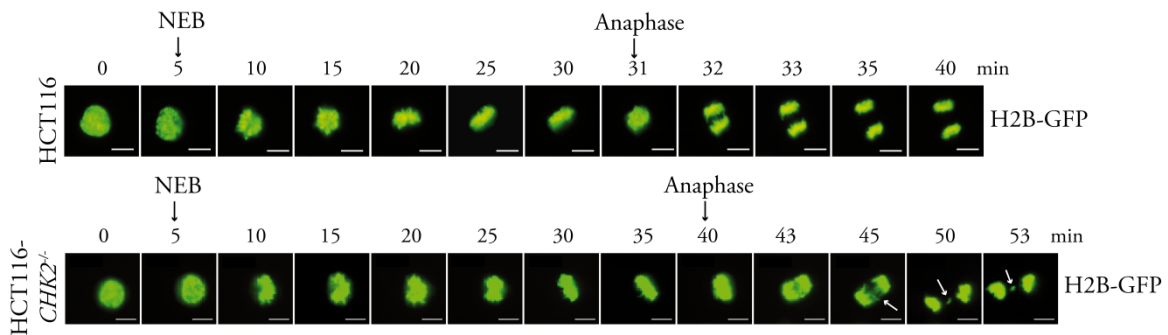


Abbildung 41: Der Verlust von *CHK2* induziert das Auftreten isolierter Chromosomen in der Anaphase. Die Progression durch eine Mitose GFP-markiertes *H2B* exprimierende HCT116 und *CHK2*-defizienter Zellen wurde mit Hilfe von Lebendzell-Mikroskopie beobachtet. Ein repräsentatives Beispiel für beide Zelllinien ist dargestellt. Nach 50 Minuten ist ein isoliertes Chromosom in der Mitte, zwischen den beiden getrennten Chromosomen-Populationen zu erkennen (Pfeile). NEB: nuclear envelope breakdown, Kernmembran-Zusammenbruch. Größenmarker: 10 μ m.

Die MCAK-Expression supprimiert merotelische Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore

Es wurde gezeigt, dass fehlerhafte Anheftungen von Chromosomen an die Mikrotubuli, die in der Generierung isolierter Chromosomen in der Anaphase resultieren, durch erhöhte Level des Kinetochor-assoziierten Mikrotubuli depolymerisierenden Kinesins MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) korrigiert werden können (Bakhoum *et al.* 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob eine Expression von *MCAK* in *CHK2* defizienten Zellen, das Auftreten isolierter Chromosomen während der Progression durch die Mitose reduziert (Abb. 42).

Dazu wurden zunächst als Kontrolle *CHK2*-profiziente HCT116-Zelllinien generiert, die stabil einen Leervektor oder eine GFP-markierte Form des Tubulin kodierenden Gens exprimierten (Abb. 42, HCT116 + GFP-Tubulin). Desweiteren wurden verschiedene *CHK2*-„Knockdown“-Zelllinien aus Einzelzellen generiert, die stabil einen Leervektor, eine GFP-markierte Form des Tubulins (Abb. 42, HCT116-*CHK2*^{-/-} + GFP-Tubulin) oder eine GFP-markierte Form von *MCAK* exprimierten (Abb. 42A). Der Expressionsspiegel der GFP-markierten Proteine wurde mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Der GFP-MCAK-Klon-#1 zeigte dabei die geringste *MCAK*-Expression aller drei Klone, der GFP-

MCAK-Klon-#3 eine mittlere und der Klon-#2 die höchste *MCAK*-Expression (Abb. 42A).

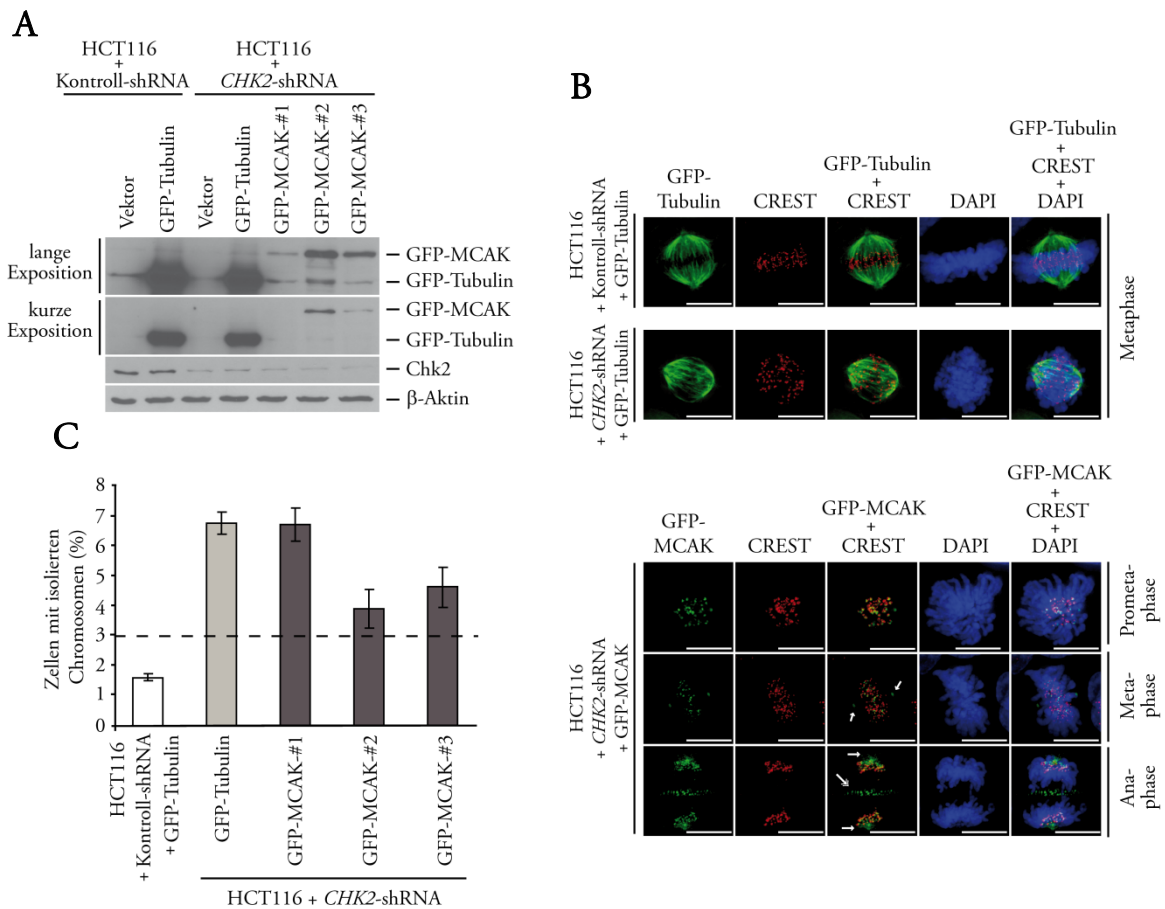


Abbildung 42: Expression und subzelluläre Lokalisation von GFP-Tubulin und GFP-MCAK in *CHK2*-„Knockdown“ Zellen. HCT116-Zellen, die entweder eine Kontroll-shRNA oder eine *CHK2*-shRNA stabil exprimieren, wurden stabil mit einer GFP-markierten Form des Tubulin kodierenden Gens als Kontrolle (GFP-*TUBULIN*) oder des MCAK-kodierenden Gens (GFP-*MCAK*) transfiziert und der Expressionspiegel mittels Westernblot bestimmt (A). Der Chk2-Westernblot dient als Kontrolle für den *CHK2*-Expressionspegel der Zelllinien und β -Aktin dient als Ladekontrolle. B) Die korrekte subzelluläre Lokalisierung der GFP-Konstrukte wurde mittels Immunfluoreszenz-Analysen (GFP: grün, Kinetochore, CREST: rot, DNA, DAPI: blau) detektiert. Pfeile deuten auf die subzelluläre Lokalisation von MCAK an den Zentrosomen (kleine Pfeile) oder dem Mittel-Zonen-Bereich (Doppelpfeil). Größenmarker: 10 μ m. C) Die Expression von *MCAK* supprimiert die Generierung von isolierten Chromosomen in der Anaphase. Die Zelllinien aus A) wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblocks synchronisiert und 8 Std. nach Thymidinentzug der Anteil an Anaphasen mit isolierten Chromosomen mittels Immunfluoreszenz-Analysen quantifiziert. (Mittelwert \pm SD; n = 800).

Anschließend wurde in Immunfluoreszenz-Analysen die korrekte subzelluläre Lokalisierung der Konstrukte überprüft (Abb. 42B). HCT116-Zellen, die stabil GFP-*TUBULIN* exprimierten, zeigten typische Metaphase-Spindeln und korrekt in der

Äquatorialebene aufgereichte Chromosomen. HCT116-Zellen mit einer geringen *CHK2* und einer zusätzlichen *TUBULIN*-Expression zeigten, im Vergleich zu Kontrollzellen, aberrante Spindeln und fehlerhafte Aufreihungen der Chromosomen in die Äquatorialebene der Zelle (Abb. 42B, HCT116 + *CHK2*-shRNA + GFP-Tubulin). Alle drei *MCAK* exprimierenden Klone zeigten eine korrekte Lokalisierung von *MCAK*, das in der Prometaphase an den Zentromeren lokalisiert war, in der Metaphase an den Zentromeren und an den beiden Zellpolen (Abb. 42B, kleine Pfeile) und in der Anaphase wiederum Zentromer-assoziiert und ferner auch in der Mittel-Zone der Spindel detektierbar war (Abb. 42 B, Doppelpfeil).

Um zu testen, ob die *MCAK*-Expression, das Auftreten von merotelischen Anheftungen von Mikrotubuli an die Kinetochore reduziert, wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen der Anteil isolierter Anaphase-Chromosomen mit positivem Kinetochorsignal quantifiziert (Abb. 42C). *CHK2* profiziente, GFP-*TUBULIN*-exprimierende Kontrollzellen (Abb. 42C, HCT116 + Kontroll-shRNA + GFP-Tubulin) wiesen unter 2% Anaphasen mit isolierten Chromosomen auf. Zellen mit reduzierter *CHK2* und gleichzeitiger GFP-*TUBULIN*-Expression wiesen mit etwa 7% einen hohen Anteil isolierter Anaphase-Chromosomen auf. Die drei *MCAK*-exprimierenden Zelllinien zeigten, entsprechend ihres GFP-*MCAK*-Expressionsspiegels, unterschiedliche Anteile an isolierten Chromosomen in der Anaphase. So zeigten die *MCAK*-exprimierenden *CHK2*-shRNA Klone-#2 und -#3 mit einem Anteil von 3,9% bzw. 4,7% isolierten Chromosomen, im Vergleich zum GFP-*TUBULIN*-exprimierenden *CHK2*-shRNA Klon (6,8%) den stärksten „Rescue“ isolierter Chromosomen von allen drei exprimierenden GFP-*MCAK*-Klonen. Der GFP-*MCAK*-Klon-#1 wies hingegen, korrelierend zum geringen *MCAK*-Expressionsspiegel, den geringsten „Rescue“ isolierter Chromosomen in der Anaphase auf (6,8%).

MCAK reduziert folglich das Auftreten von merotelischen Anheftungen von Mikrotubuli an Kinetochore in *Chk2* defizienten Zellen.

MCAK supprimiert CIN in Zellen mit geringer *CHK2*-Expression

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass ein *CHK2*-Verlust aberrante Spindeln und Fehlverteilungen der Chromosomen induziert (Abb. 31-35 und Abb.40-41), die mit einer transienten Verzögerung in der Prometaphase korrelieren (Abb. 29-31). Dabei induziert ein *CHK2*-Verlust isolierte („lagging“) Chromosomen in der Anaphase, welche den CIN-

Phänotyp von Zellen mit geringer *CHK2*-Expression erklären könnten (Abb. 27). Da fehlerhafte Anheftungen von Chromosomen an die Mikrotubuli, die in der Generierung isolierter Chromosomen in der Anaphase resultieren, durch erhöhte Level von MCAK korrigiert werden (Bakhoum *et al.* 2009 und Abb. 42 wurde untersucht, ob eine erhöhte *MCAK*-Expression die chromosomale Instabilität *CHK2* defizienter Zellen innerhalb weniger Generationen supprimieren kann. Zur Überprüfung dieser These wurden Karyotyp-Analysen der stabilen GFP-*TUBULIN* und GFP-*MCAK*-exprimierenden Zelllinien nach 30 Generationen in Kultur durchgeführt (Abb. 43).

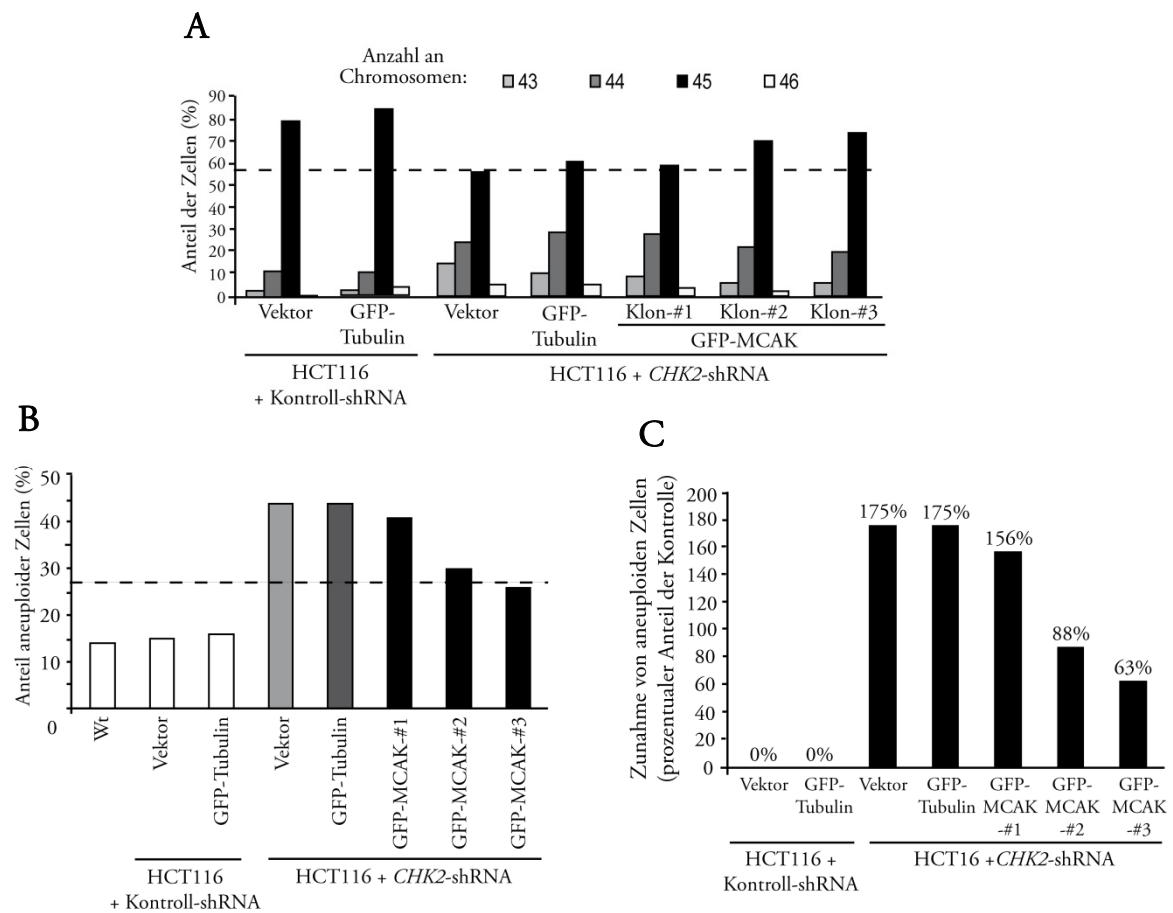


Abbildung 43: Die Expression von MCAK supprimiert die chromosomale Instabilität in Zellen mit geringer *CHK2*-Expression. A) Die chromosomale Verteilung in HCT116-Zellen, die entweder eine Kontroll-shRNA oder eine *CHK2*-shRNA stabil exprimieren, wurden stabil eine GFP-markierte Form des Tubulin kodierenden Gens als Kontrolle (GFP-Tubulin) oder des MCAK-kodierenden Gens (GFP-MCAK) exprimieren, wurde mittels Karyotyp-Analysen bestimmt. Es wurde die Anzahl der Chromosomen aus je 100 mitotischen Zellen, nach 30 Generationen in Kultur, bestimmt. B) Der Anteil aneuploider Zellen aus A wurde quantifiziert, auf die GFP-Tubulin-Kontrolle *CHK2* profizienter HCT116-Zellen normiert und anschließend als prozentuale Zunahme aneuploider Zellen (C) dargestellt.

Die Quantifizierung der Aneuploidie ergab für HCT116-Zellen und Kontroll-Plasmid oder GFP-*TUBULIN*-exprimierende HCT116-Zellen 15% aneuploide Zellen nach 30 Generationen (Abb. 43B). HCT116-Zellen mit geringem *CHK2*-Expressionspegel und gleichzeitiger Expression eines Kontroll-Plasmids oder eines GFP-*TUBULIN*-exprimierenden Plasmids wiesen eine deutlich erhöhte Aneuploidie von etwa 45% auf. GFP-*MCAK*-exprimierende Zelllinien mit geringem *CHK2*-Expressionspegel wiesen, je nach Expressionsmenge von *MCAK* (Abb. 42AA), eine Aneuploidie von 41% (Klon-#1), 30% (Klon-#2) oder 26% (Klon-#3) auf (Abb. 43B).

Wurde der Zuwachs an aneuploiden Zellen auf die Kontroll-Plasmid oder GFP-*TUBULIN* exprimierenden, *CHK2* profizienten Zellen normiert, ergab sich für die GFP-*TUBULIN* oder GFP-*MCAK* exprimierenden, *CHK2* defizienten Zelllinien eine folgende Verteilung (Abb. 43C). Zelllinien mit geringer *CHK2*-Expression (Abb. 43C, HCT116 + *CHK2*-shRNA + Vektor oder + GFP-Tubulin) wiesen, im Vergleich zu *CHK2* profizienten Zellen, einen Zuwachs aneuploider Zellen von 175% auf. Der schwach exprimierende GFP-*MCAK*-Klon-#1 zeigte einen Zuwachs von aneuploiden Zellen von 156%, was eine 20%-ige Reduktion gegenüber Kontroll-Plasmid exprimierenden *CHK2*-shRNA-Zellen darstellt. Der stärker exprimierende GFP-*MCAK*-Klon-#2 zeigte mit einer Zunahme aneuploider Zellen von 88% eine 90%ige Reduktion aneuploider Zellen im Vergleich zu *CHK2*-minderexprimierenden Kontrollzellen. Der stark exprimierende GFP-*MCAK*-Klon-#3 wies mit 63% eine um über 100% reduzierte Zunahme von aneuploiden Zellen auf (Abb. 43C).

Diese Experimente zeigen, dass durch eine erhöhte *MCAK*-Expression in Zellen mit geringer *CHK2*-Expression nicht nur die Erzeugung von isolierten Chromosomen in der Anaphase unterdrückt, sondern auch die chromosomale Instabilität supprimiert wird.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine unerwartete Funktion von *Chk2* für die Aufrechterhaltung chromosomaler Stabilität. Dabei ist *Chk2* für die korrekte und zeitgenaue Assemblierung einer mitotischen Spindel erforderlich. Ein *CHK2*-Verlust führt zu transient aberranten Spindeln, die die Bildung fehlerhaft angehefteter Mikrotubuli an die Kinetochore und damit isolierter Chromosomen in der Anaphase der Mitose, fördern. Dadurch werden Chromosomen-Fehlverteilungen unterstützt, die im Laufe mehrerer Mitosen, zur Aneuploidie führen.

Diskussion

1. Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt als Zielstruktur für die Krebstherapie

Anti-mitotische Wirkstoffe gehören zu den in der Klinik am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika. Sie inhibieren die Proliferation von Tumorzellen und induzieren Apoptose (Lee und Schmitt 2003). Insbesondere Mikrotubuli-bindende Wirkstoffe, wie Taxane (Paclitaxel[®], Docetaxel[®]), *Vinca*-Alkaloide (Vincristine, Vinblsatine) und Epothilone werden in der Klinik seit langem mit großem Erfolg eingesetzt (Johnson *et al.* 1960; Mollinedo und Gajate 2003; Jordan und Wilson 2004; Nettles *et al.* 2004; Geney *et al.* 2005; Zhou und Giannakakou 2005; Larkin und Kaye 2006). Diese Wirkstoffe binden direkt an die Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli, hemmen in Folge die Spindeldynamik und verursachen Aufreihungsdefekte der Chromosomen und aktivieren dadurch den mitotischen Spindel-Kontrollpunkt (SCP), was zu einem transienten Prometaphase-Arrest und anschließend zur mitochondrialen Apoptose führt (Jordan *et al.* 1996; Yvon *et al.* 1999; Jordan und Wilson 2004). Sowohl die Aktivierung des SCP als auch der anschließende vorzeitige mitotische Austritt tetraploider Zellen (mitotisches „slippage“) unterstützen die Induktion der Apoptose (Kasai *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2003; Sudo *et al.* 2004; Vogel *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Tao 2005; Vogel *et al.* 2005). Tumorzellen weisen allerdings häufig Fehlfunktionen des SCP-Signalweges auf und werden dadurch nicht durch diese Therapeutika angegriffen (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hernando *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Perez de Castro *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008). Weitere Resistenzmechanismen, wie z.B. die Expression mutierter oder bestimmter Tubulin-Isoformen (Giannakakou *et al.* 2000; Goncalves *et al.* 2001; Kavallaris *et al.* 2001; Hari *et al.* 2006) sowie die hohe Affinität, insbesondere von Taxanen und *Vinca*-Alkaloiden zu MDR (multidrug resistance) Efflux-Pumpen, welche die intrazelluläre Konzentration der Spindelgifte durch ihren Export verringern (Galletti *et al.* 2007), erschweren eine Therapie mit Mikrotubuli-bindenden Wirkstoffen. Nicht zuletzt binden diese Chemotherapeutika ebenfalls an Mikrotubuli von Interphase- und differenzierten Zellen, wodurch eine Reihe von Nebenwirkungen, wie z.B. Neutropenie und Neuropathien verursacht werden (Trudeau 1996; Zhou und

Giannakakou 2005) und sie besitzen lediglich eine geringe Mitose- und Tumorzellspezifität.

Deshalb besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer, anti-mitotischer Chemotherapeutika, die neue mitotische Zielstrukturen nutzen, um die Progression der Mitose zu modulieren, um schließlich Apoptose zu induzieren.

Mitotische Kinasen der CDK-, Aurora- und Plk-Familie sowie mitotische Kinesine wie z.B. Eg5/KSP oder Cenp-E stellen interessante neue Zielstrukturen dar, weil sie die normale Progression der Mitose stören, ohne die Mikrotubuli-Funktion zu modulieren (Schmidt und Bastians 2007). Deshalb ist ihre Inhibition erwartungsgemäß proliferationspezifisch und mit weniger Nebenwirkungen verbunden (Stein *et al.* 2006). Weiterhin werden Resistenzmechanismen von Tumorzellen, die in einer veränderten Tubulin-Expression begründet liegen, umgangen. Gegenwärtig werden eine Reihe verschiedener pharmakologischer Inhibitoren in den klinischen Phasen I und II mit Erfolg getestet. Diese umfassen z.B. Ispinesib, SB-743921, MK-0731, ARRY-520 mit einer Spezifität gegen Eg5/KSP (Mayer *et al.* 1999; Davis *et al.* 2006; Stein *et al.* 2006; Woessner *et al.* 2007), BI2536 und GSK461364A mit einer Spezifität gegen Plk1 (Steehmaier *et al.* 2007; Gilmartin 2009), MLN8054 mit einer Spezifität gegen Aurora A (Manfredi *et al.* 2007), Hesperadin, ZM447439 und AZD1152 mit einer Spezifität gegen Aurora B (Hauf *et al.* 2003; Ditchfield *et al.* 2003; Wilkinson 2007) und Flavopiridol, UCN-01, R-Roscovitine und BMS-387032 (Motwani *et al.* 2000; Newcomb 2004; Blagden und de Bono 2005) mit einer Spezifität gegen die CDK-Familie.

Da die meisten Kinase-Inhibitoren die ATP-Bindestelle blockieren, kann dies oft zu einer reduzierten Spezifität für strukturell ähnliche Kinasen, z.B. innerhalb der Aurora- oder CDK-Familie führen (Blagden und de Bono 2005; Bolanos-Garcia 2005; Shapiro 2006; Kollareddy *et al.* 2008). Desweiteren kann dies mit einer signifikanten Toxizität verbunden sein, wenn dadurch andere zellzyklusunabhängige Kinasen ebenfalls gehemmt werden (Motwani *et al.* 2000; Newcomb 2004; Blagden und de Bono 2005; Shapiro 2006). Ein zusätzliches Problem stellt der zu Mikrotubuli-bindenden Wirkstoffen ähnliche Wirkmechanismus dar. Dieser liegt nach Inhibition des Spindelkinesins Eg5/KSP oder der zentrosomalen Kinasen Aurora A und Plk1 in einer veränderten Spindelstruktur begründet, die zu Anheftungsfehler der Chromosomen führt, welche vom SCP erkannt werden und über einen transienten mitotischen Arrest zum vorzeitigen mitotischen „slippage“ und anschließend zur mitochondrialen Apoptose führt (Spankuch-

Schmitt *et al.* 2002; Sumara *et al.* 2004; Tao *et al.* 2005; Schmidt *et al.* 2006; Vijapurkar *et al.* 2007; Kaestner *et al.* 2009). Interessanterweise ist die Induktion von Apoptose nach einer Aurora A-Hemmung aber nicht abhängig von einem funktionellen SCP (Kaestner *et al.* 2009), so dass auch Tumorzellen, die oft Fehlfunktionen im SCP-Signalweg aufweisen (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hernando *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Perez de Castro *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008), angegriffen werden können. Eine Inhibition von Aurora B führt nicht zu einer Aktivierung des SCP, da die Bildung einer bipolaren mitotischen Spindel unbeeinflusst bleibt (Kaestner *et al.* 2009). Der Wirkmechanismus liegt wahrscheinlich in der Hemmung der Zytokinese begründet, die allerdings nicht unmittelbar, sondern erst nach einer anschließenden Endoreduplikation und Polyploidisierung zur späten Induktion von Apoptose führt, die allerdings ebenfalls unabhängig von einem funktionalen SCP ist (Ditchfield *et al.*, 2003; Hauf *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2007; Kaestner *et al.* 2009). Damit stellen insbesondere die Aurora Kinasen interessante Zielstrukturen für die Chemotherapie dar.

Es bedarf somit der Entwicklung neuartiger Therapie-Konzepte, die dem Anspruch einer Mitose- und Proliferationsspezifität bei einer gleichzeitig hohen Effizienz und schnellen Wirkung genügen und insbesondere die bislang Therapie-resistenten Tumorzellen angreifen.

Folgende interessante Beobachtungen führen zu einem Therapie-Konzept, das den SCP selber in den Mittelpunkt einer Chemotherapie rückt.

Der mitotische SCP ist nicht nur für die Induktion von Apoptose während einer Chemotherapie erforderlich (Kasai *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2003; Kienitz *et al.* 2005; Tao 2005), sondern ebenfalls für den Erhalt einer chromosomalen Stabilität und Euploidie (Abb. 44), da er den Beginn der Anaphase verhindert, bis alle Chromosomen korrekt an die mitotische Spindel angeheftet und ausgerichtet sind (Bharadwaj und Yu 2004). In der Tat zeigen verschiedene Mausmodelle eine erhöhte Rate an Aneuploidie und Karzinogen-induzierter oder spontaner Tumorgenese nach Induktion einer partiellen Fehlfunktion des SCP in Folge heterozygoter (z.B. *MAD2*) oder hypomorpher (z.B. *BUB1*) SCP-Gene (Michel *et al.* 2001; Jeganathan *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008).

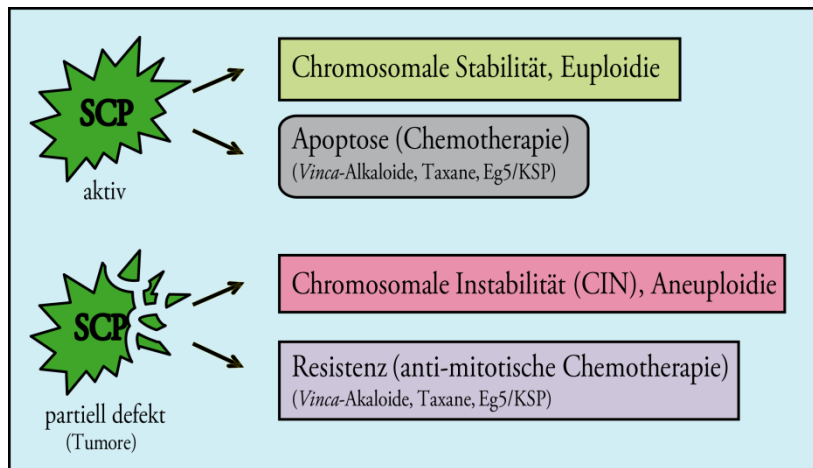


Abbildung 44: Die duale Funktion des mitotischen SCP. Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt (SCP) gewährleistet einerseits eine chromosomale Stabilität und Euploidie, andererseits ist er für die Induktion von Apoptose während einer Chemotherapie mit anti-mitotischen Wirkstoffen notwendig. Eine partielle Fehlfunktion des SCP resultiert in einer chromosomalen Instabilität, Aneuploidie und erhöhter Tumorzinzidenz auf der einen Seite und eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika andererseits.

Interessanterweise konnte in verschiedenen Maus- und Zellkulturmodellen darüber hinaus gezeigt werden, dass eine starke Repression bzw. der homozygote Verlust von SCP-Genen, wie z.B. *MAD2* oder *BUBR1* zu massiven Chromosomen-Fehlverteilungen während der Mitose führt, die mit einer Letalität der Zellen assoziiert sind. Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt ist somit, im Gegensatz zu anderen Zellzyklus-Kontrollpunkten, essentiell (Dobles *et al.* 2000; Michel *et al.* 2001; Dai *et al.* 2004; Kops *et al.* 2004; Michel *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005, Iwanaga *et al.* 2007).

Daraus lässt sich ein Konzept ableiten, in dem der Signalweg des Spindel-Kontrollpunktes direkt als neue Zielstruktur für die Tumorthherapie genutzt werden könnte. Dabei könnte die gezielte Inaktivierung des SCP-Signalweges mit Hilfe von pharmakologischen („small molecule“-)Inhibitoren genügen, um Apoptose in proliferierenden Tumorzellen zu induzieren (Abb. 45).

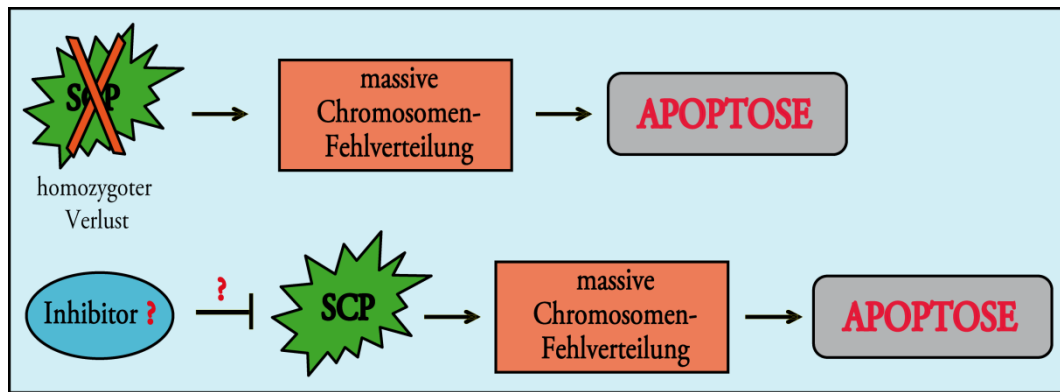


Abbildung 45: Ein neues Konzept zur Therapie humaner Tumore. Ein homozygoter Verlust von Spindel-Kontrollpunkt-(SCP)-Genen führt in humanen Tumorzelllinien und im transgenen Mausmodell zu schwerwiegenden Defekten, die zur Apoptose führen. Die essentielle Natur des SCP ist die Grundlage für ein neues Therapie-Konzept für humane Tumore, indem der SCP durch pharmakologische Inhibitoren inaktiviert wird. Diese SCP-Inhibierung führt zur massiven Chromosomen-Fehlverteilung und zur Apoptose.

Unsere Arbeitsgruppe hat das Konzept der SCP-Inaktivierung als Zielstruktur für die Krebstherapie untersucht. In einem „Screen“ nach pharmakologischen Inhibitoren, die einen SCP-abhängigen mitotischen Arrest aufheben, konnte dabei die Indolokarbazol-Verbindung Gö6976 als ein effizienter SCP-Inhibitor identifiziert werden, der zudem Apoptose in Tumorzellen induziert (Stolz *et al.* 2009).

Gö6976 wurde ursprünglich als ATP-kompetitiver Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor beschrieben (Martiny-Baron *et al.* 1993; Kohn *et al.* 2003) und hemmt darüber hinaus einen DNA-Schaden-induzierten G2-Arrest in *TP53* negativen Zellen durch Inhibierung der Chk1 Kinase, die hauptverantwortlich für einen G2-Arrest ist (Kohn *et al.* 2003; Kawabe 2004).

In meiner Arbeit habe ich Gö6976 als einen pharmakologischen Inhibitor des Spindel-Kontrollpunktes charakterisiert und überraschenderweise zeigen können, dass Gö6976 *in vitro* und *in vivo* die mitotischen Kinasen Aurora A und Aurora B hemmt (Abb. 19 und 20). Dabei induziert Gö6976 in Tumorzelllinien Defekte in der Struktur mitotischer Spindeln, welche mit Defekten im Chromosomen-Alignment und einem SCP-abhängigen, transienten mitotischen Arrest assoziiert sind (Abb. 16 und 17). Diese Phänotypen könnten dabei einer Aurora A-Inhibierung zugrunde liegen (Marumoto *et al.* 2005; Girdler *et al.* 2006; Manfredi *et al.* 2007; Kaestner *et al.* 2009). Der beobachtete mitotische Austritt in Gegenwart misalignter Chromosomen (Stolz *et al.* 2009) könnte durch eine zusätzliche Inhibierung der Aurora B-Kinase zu erklären sein, da Aurora B in

der SCP-Funktion involviert ist (Ditchfield *et al.* 2003; Hauf *et al.* 2003; Pinsky *et al.* 2003; Vader *et al.* 2008; Becker *et al.* 2010). Es gibt aber auch Hinweise für eine Aurora A-vermittelte Funktion im SCP, da sowohl eine Inhibition durch MLN8054 als auch eine Aurora A-Überexpression zur Inhibierung des SCP führen (Kaestner *et al.* 2009; Anand *et al.* 2003) und eine Aurora A-Überexpression in einer gestörten Bildung des APC/C-inhibierenden MCC (mitotic checkpoint complex) resultiert (Jiang *et al.*, 2003). Deshalb könnte der aberrante mitotische Austritt zusätzlich aufgrund einer Aurora A-Inhibierung bedingt sein.

Die beobachteten Unterschiede zu einer selektiven Aurora B-Hemmung, wie z.B. eine fehlende Zytokinese und eine fehlende Polyploidisierung (Abb. 21), sowie die Gö6976-vermittelte Inhibierung einer Taxol- und Nocodazol-vermittelten SCP-Aktivierung (Stolz *et al.* 2009) könnten durch eine gleichzeitige Aurora A-Hemmung erklärbar sein. In der Tat wurde gezeigt, dass Aurora B präferentiell eine Taxol-vermittelte SCP-Aktivierung hemmt und somit für den Spannungs-sensitiven Zweig des SCP wichtig ist (Ditchfield *et al.* 2003; Vader *et al.* 2008; Kaestner *et al.* 2009), wohingegen Aurora A präferentiell einen Nocodazol-aktivierten SCP hemmt und damit möglicherweise eher Funktionen bei dem Anheftungs-sensitiven Zweig des SCP erfüllen könnte (Musacchio *et al.* 2007; Kaestner *et al.* 2009). Desweiteren wäre eine unterschiedliche Inhibitor-Selektivität gegenüber verschiedene Aurora B-enthaltender Proteinkomplexe denkbar, die in der Zelle vorliegen könnten und unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen erfüllen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Gö6976-vermittelte Inhibition des SCP einem Mischphänotyp aus einer Aurora A und einer Aurora B-Inhibition entspricht, die von einem „zwei-Stufen“-Mechanismus abzuhängen scheint: Dabei wird zunächst ein mitotischer Schaden induziert, welcher zu einer SCP-abhängigen, transienten mitotischen Verzögerung führt. Die gleichzeitige Inhibierung des SCP erlaubt nachfolgend den Austritt aus einer aberranten Mitose, was die Induktion von Apoptose fördern könnte (Abb. 46).

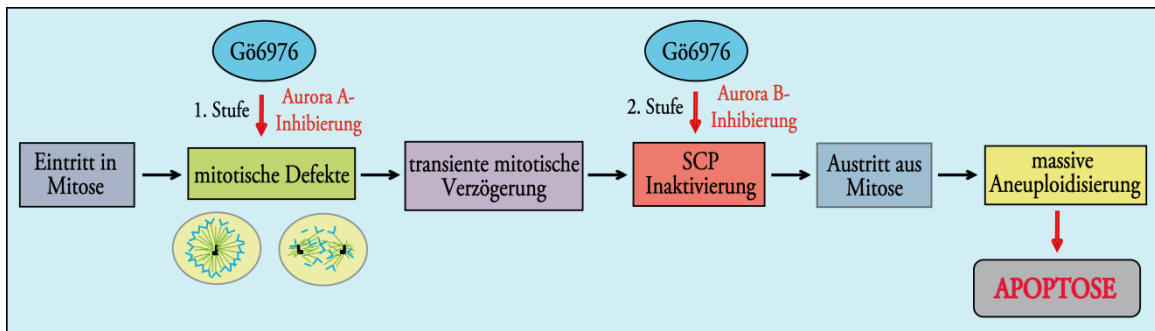


Abbildung 46: Der „Zwei-Stufen“-Mechanismus der Aurora A/B-Inhibierung. Eine Gö6976-Behandlung induziert zunächst mitotische Defekte durch Inhibierung von Aurora A (1. Stufe), wobei monopolare und aberrante Spindelstrukturen induziert werden. Diese Defekte führen zu einer transienten mitotischen Verzögerung. Die Gö6976-vermittelte Inhibierung von Aurora B (2. Stufe) inaktiviert den SCP und fördert den mitotischen Austritt in Gegenwart mitotischer Defekte, wodurch Apoptose induziert wird.

Um die Spezifität von Gö6976 für Aurora A und Aurora B zu verifizieren, könnten weiterführend Gö6976-resistente Mutanten beider Aurora Kinasen generiert werden, mit deren Hilfe der Gö6976-vermittelte Phänotyp detaillierter charakterisiert werden kann. Dabei sollte eine Gö6976-resistente Aurora A-Mutante nach einer Inhibierung mit Gö6976 den ZM447439-vermittelten Phänotyp zeigen, wohingegen eine Gö6976-resistente Aurora B-Mutante den Phänotyp einer Aurora A-vermittelten Inhibierung repräsentieren sollte. Wenn dies der Fall wäre, könnte davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Phänotyp nach einer Gö6976-Behandlung tatsächlich auf einen Mischeffekt aus der dualen Inhibierung beider Aurora-Kinasen resultiert. Ist dies nicht der Fall, wäre der Gö6976-vermittelte Phänotyp auf einen anderen Wirkmechanismus zurückzuführen, der weiterführend untersucht werden müsste. Nichtsdestotrotz bleibt festzustellen, dass Gö6976 ein Aurora A und Aurora B *in vitro* und *in vivo* Inhibitor ist, den mitotischen SCP hemmt und Apoptose induziert.

Das neuartige Konzept einer SCP-Inhibierung bietet im Vergleich zu einer Chemotherapie mit Mikrotubuli-bindenden Wirkstoffen den Vorteil einer Mitose- und Proliferationsspezifität, weshalb erwartungsgemäß Interphase- und differenzierte Zellen nicht beeinträchtigt werden sollten. Außerdem ist zu erwarten, dass z.B. Neuropathien und auf Tubulin-Modifizierungen basierende Resistenzmechanismen umgangen werden und eine Therapie Taxol-resistenter Tumore, wie z.B. Kolonkarzinome, potentiell ermöglicht (Schmidt und Bastians 2007). Da Kolonkarzinome eine hohe Rate an chromosomaler Instabilität zeigen, die mit SCP-Fehlfunktionen assoziiert sein könnten

(Michel *et al.* 2001; Weaver und Cleveland 2006; Jeganathan *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008), stellt eine abgeschwächte SCP-Funktion einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die geringe Wirksamkeit von Paclitaxel und verwandten Wirkstoffen dar. In der Tat ist die Induktion von Apoptose nach einer Behandlung mit anti-mitotischen Wirkstoffen wie Nocodazol, Taxol und Eg5/KSP-Inhibitoren abhängig von einem funktionalen SCP (Sudo *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Tao *et al.* 2005) und erschwert damit die Chemotherapie von Tumoren, die SCP-Fehlfunktionen aufweisen (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Hernando *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Perez de Castro *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008). Deshalb bietet das Konzept der SCP-Inhibierung den entscheidenden Vorteil, diese Therapie-resistenten Tumorzellen ebenfalls angreifen zu können (Stolz *et al.* 2009). Dabei führt eine Inaktivierung des SCP in aneuploiden Tumoren zu einer weiteren Erhöhung der Chromosomen-Fehlverteilung in der Mitose, die den letalen Effekt auslösen könnte. Chromosomal instabile Tumorzellen könnten dadurch möglicherweise eine Selektivität gegenüber euploiden Zellen aufweisen. Dieser Wirkmechanismus birgt allerdings gleichzeitig die Gefahr, Chromosomen-Fehlverteilungen und Aneuploidie in überlebenden Zellen zu induzieren, die zu einer *de novo* Tumorgenese beitragen können. Dies stellt ein allgemeines Problem der Chemotherapie mit anti-mitotischen Wirkstoffen dar, weshalb eine Tumor-selektive und höchst effiziente Induktion der Apoptose dringend erforderlich ist.

Die SCP-Inhibierung im Falle einer Gö6976-Behandlung wird über die duale Inhibierung der Aurora A/B-Kinasen vermittelt, die beide Funktionen im SCP erfüllen (Anand *et al.* 2003; Ditchfield *et al.* 2003; Hauf *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Vader *et al.* 2008). In der Tat führt eine Aurora A-Inhibierung zu Spindel- sowie zu Chromosomen-Alignment- und Segregations-Defekten (Hoar *et al.* 2007; Kaestner *et al.* 2009) und es wurde vermutet, dass Aneuploidie die Hauptursache für die Induktion von Apoptose nach einer MLN8054-Behandlung darstellt (Hoar *et al.* 2007). Übereinstimmend damit ist eine MLN8054-, ZM447439- und Gö6976-vermittelte Induktion von Apoptose unabhängig von einem vollständig funktionalen SCP (Kaestner *et al.* 2009; Stolz *et al.* 2009), weshalb eine Inhibierung von Aurora A, Aurora B oder eine duale Inhibierung beider Aurora Kinasen eine alternative Therapie für aneuploide Tumore darstellen könnte, die Fehlfunktionen des SCP aufweisen. Die duale Inhibierung beider Aurora Kinasen bietet dabei einige Vorteile gegenüber einer separaten Aurora A- oder Aurora B-Inhibierung,

wie z.B. eine reduzierte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Tumorzell-Mutationen, die zu Kinase-Inhibitor-Resistenzen und dadurch zum Wirkverlust der Chemotherapie führen können (Girdler *et al.* 2008). Darüber hinaus umgeht die duale Aurora A/B-Inhibierung, im Gegensatz zu einer alleinigen Aurora B-Inhibierung, den Weg der Polyploidisierung (Abb. 21), die zu einer verzögerten Induktion von Apoptose führt (Kaestner *et al.* 2009). Eine alleinige Aurora A-Inhibierung erhöht aufgrund von Spindelschäden, die mit Chromosomen-Fehlverteilungen assoziiert sind, das Risiko von Aneuploidien. Deshalb könnte die kombinatorische Inhibierung beider Kinasen wesentlich effizienter bei der Induktion von Apoptose wirken.

In der Tat gibt es Hinweise auf eine erhöhte Sensitivität verschiedener Krebszellen gegenüber Gö6976 (Stolz *et al.* 2009). Die Daten meiner Arbeit zeigen darüber hinaus eine *selektive* Wachstumshemmung von Krebszellen gegenüber nicht-transformierten humanen Fibroblasten (Abb. 23 und 24). Die molekulare Ursache für diese Selektivität gegenüber Krebszellen ist nicht klar, aber von besonderer Bedeutung für die Chemotherapie, da die bislang eingesetzten Chemotherapeutika diese Selektivität kaum besitzen. *Vinca*-Alkaloide und Taxane weisen lediglich eine gewisse Selektivität für proliferierende Zellen auf, aber nicht für transformierte Zellen (Abb. 23 und 24; Schmidt und Bastians 2007).

Interessanterweise wurde vor kurzem ein synergistischer Effekt zwischen einer SCP-Inhibierung und Taxol beschrieben, wobei ein verringerter Level der SCP-Kinasen Mps1 und BubR1 zu schwerwiegenden Chromosomen-Fehlverteilungen führt und Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit Taxol sensitiviert (Janssen *et al.* 2009). Allerdings konnte andererseits gezeigt werden, dass eine Taxol-Behandlung in Gegenwart eines bereits inaktiven SCP eine Endoreduplikation und eine reduzierte Sensitivität gegenüber Taxol bewirkt (Vogel *et al.* 2004; Vogel *et al.* 2005; Swanton *et al.* 2007), wohingegen eine Behandlung in umgekehrter Reihenfolge eine deutlich erhöhte Induktion von Apoptose zeigte (Lee *et al.* 2004; Kim *et al.* 2008; Stolz *et al.* 2009). Somit scheint die Reihenfolge der Behandlung über den Erfolg einer kombinierten Taxol/SCP-Inhibitor-Therapie zu entscheiden. Dabei muss zuerst ein mitotischer Schaden induziert und der SCP aktiviert werden, um durch eine anschließende SCP-Inaktivierung den Austritt aus einer aberranten Mitose und in der Folge die Induktion von Apoptose zu ermöglichen.

Mehrere Studien zeigen, dass für die Induktion von Apoptose durch anti-mitotische Wirkstoffe, wie Nocodazol, Taxol oder Eg5/KSP-Inhibitoren, sowohl die Aktivierung des mitotischen SCP als auch der anschließende mitotische Austritt (mitotisches „slippage“) benötigt wird (Kasai *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2003; Sudo *et al.* 2004; Vogel *et al.* 2004; Kienitz *et al.* 2005; Tao 2005; Vogel *et al.* 2005). Der transiente mitotische Arrest kann dabei direkt zu einer Mitose-assoziierten Apoptose führen, da einerseits anti-apoptische Proteine (z.B. IAP oder Mcl-1) während des Arrests abgebaut und aufgrund der abwesenden mitotischen Genexpression (Taylor 1960; Prescott und Bender 1962; Prescott 1964; Martinez-Balbas *et al.* 1995; Segil *et al.* 1996; Gottesfeld und Forbes 1997; Long 1998) nicht nachsynthetisiert werden können (Blagosklonny 2007).

Andererseits können während der transienten mitotischen Verzögerung pro-apoptische Signale langsam akkumulieren, die für die Induktion von Apoptose notwendig sind (Gascoigne und Taylor 2008). So wird vermutet, dass während eines verlängerten mitotischen Arrests Caspase-vermittelte Mechanismen aktiviert werden, wie die Initiator Caspase-9, was zur Induktion von Apoptose führt (Allan und Clarke 2007; Gascoigne und Taylor 2008; Kim *et al.* 2008). Damit besteht eine Art „timer“-Mechanismus, der die Dauer des mitotischen Arrests kontrolliert (Ahn *et al.* 2008) und über die Akkumulation von Todessignalen darüber entscheidet, ob sich eine Zelle teilt bevor die Apoptose induziert wird. Dieser Mechanismus ist allerdings langsam und stellt dadurch einen Nachteil für die Therapie dar. Außerdem können Tumorzellen dem Mitose-assoziierten Zelltod auch entkommen, wenn sie, z.B. in Folge eines geschwächten SCP, die Mitose vorzeitig verlassen, bevor sie Apoptose initiieren konnten.

Der induzierte verlängerte mitotische Arrest führt zusammen mit der fehlenden Neusynthese, ebenfalls zum kontinuierlichen Abbau von Cyclin B, was den vorzeitigen mitotischen Austritt multinukleärer, tetraploider Zellen bewirkt (Brito und Rieder 2006; Blagosklonny 2007). Das mitotische „slippage“ schützt die Zelle vor einer Mitose-assoziierten Apoptose, ermöglicht aber gleichzeitig den Eintritt in die postmitotische G1-Phase, in der die transkriptionelle Aktivierung pro-apoptischer Gene wie z.B. *BAX* durch p53 erfolgen kann (Chen *et al.* 2003), was zur effizienten Induktion der mitochondrialen Apoptose führt (Blagosklonny *et al.* 2007). Tumorzellen, die SCP-Fehlfunktionen aufweisen oder besonders schnell aus der Mitose austreten, entkommen ebenfalls einer Mitose-assoziierten Apoptose.

Eine Gö6976-Behandlung bietet den Vorteil, unabhängig von einem vollständig funktionalen SCP Apoptose initiieren zu können. Hierbei werden die Zellen in

Anwesenheit mitotischer Defekte direkt in die transkriptionell aktive G1-Phase überführt, in der eine effiziente Induktion von Apoptose gewährleistet ist. Damit steht eine SCP-Inhibierung im Gegensatz zu einer Spindel- oder Kinesin-orientierten Chemotherapie und bietet den Vorteil, schnell und effizient Apoptose in Tumorzellen induzieren zu können. Ob die Effizienz der SCP-Inhibition von einer p53 und p21-vermittelten Aktivierung des postmitotischen G1-Kontroll-Punktes abhängig ist und zu einer Aktivierung proapoptotischer Signale wie z.B. *BAX* führt, ist nicht näher untersucht worden, wäre aber im Falle von Gö6976 aufgrund der Aurora A-Inhibierung naheliegend (Kaestner *et al.* 2009). Es konnte aber gezeigt werden, dass die Gö6976-vermittelte Apoptose abhängig von der Aktivität von Caspasen ist, da eine gleichzeitige Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor zur Hemmung der Gö6976-induzierten Apoptose führt (Abb. 22). Ob Gö6976 tatsächlich als Therapeutikum in Frage kommt, könnte weiterführend im humanen Xenograft-Modell evaluiert werden. Dabei könnten Mäuse mit z.B. HCT116-abgeleiteten Xenografts mit Gö6976 behandelt werden, wobei die Rückbildung des Tumors für eine potentielle Therapie essentiell wäre.

Genomweite „Screens“ für Gene, die für die Zellzyklus-Regulation und Progression essentiell sind, haben zur Identifizierung verschiedener potentiell chemotherapeutischer Zielstrukturen geführt (Bettencourt-Dias *et al.* 2004; Mukherji *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang stellen die Kinase Haspin und die p58-Isoform von Cdk11 interessante neue Zielstrukturen dar, da sie essentiell für die Schwesterchromatid-Kohäsion bzw. für die Zentrosomenreifung und einen bipolaren Spindelaufbau sind (Dai und Higgins 2005; Petretti *et al.* 2006).

Zusätzlich zur direkten Inhibierung des mitotischen SCP, sind ebenfalls oberhalb des SCP gelegene regulatorische Signalwege für die Entwicklung von Chemotherapeutika von Bedeutung. Interessanterweise werden das am SCP-Signalweg beteiligte Kinesin Cenp-E und das Kinetochor-Protein Cenp-F in der Mitose über eine Farnesylierung reguliert (Ashar *et al.* 2000; Hussein und Taylor 2002). In der Tat induzieren Farnesyltransferase-Inhibitoren mitotische Defekte (Ashar *et al.* 2000) und zeigen synergistische Effekte mit Taxanen und Etoposiden (Moasser *et al.* 1998). Mehrere Farnesyltransferase-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien erprobt (Pan und Yeung 2005).

Auch regulatorische Signalwege unterhalb des SCP-Signalweges könnten wichtige Zielstrukturen für die Chemotherapie darstellen, wie z.B. die Inhibierung des APC/C-

Aktivators Cdc20, wodurch der mitotische Arrest verlängert und dadurch mehr Zeit für die Initiierung einer Mitose-assoziierten Apoptose erhalten wird (Huang *et al.* 2009).

Die optimale Krebstherapie hängt von der Identifizierung von Faktoren ab, die spezifisch für die Vitalität einer Krebszelle sind. Dabei sollten Chemotherapeutika die biologischen Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen ausnutzen. Ein signifikanter Unterschied besteht beispielsweise darin, dass viele humane Tumore zusätzliche Zentrosomen aufweisen (Lingle 1998; Pihan *et al.* 1998; Nigg 2002; Duensing 2005; Giehl *et al.* 2005; Kramer *et al.* 2005) und auf eine Zentrosomen-Gruppierung („centrosome clustering“) angewiesen sind, um eine bipolare Zellteilung ausführen zu können, die für das Zellüberleben notwendig ist (Kwon *et al.* 2008). Das Zentrosomen-„Clustern“ in Tumorzellen erfordert Mikrotubuli-basierende Motorproteine und Mikrotubuli assoziierte Proteine, die an der Organisation der Spindelpole beteiligt sind. Diese Proteine umfassen v.a. den NuMA/Dynein-Komplex (Merdes *et al.* 1996; Quintyne *et al.* 2005) und das ebenfalls Mikrotubuli Minus-Ende gerichtete Kinesin HSET, das zusammen mit Eg5/KSP an der Chromatin-induzierten Spindelassemblierung und -Bipolarität sowie für das Mikrotubuli-„Cross-linking“ eine wichtige Funktion ausübt (Mountain *et al.* 1999; Cai *et al.* 2009). HSET könnte dabei von besonderem Interesse für die selektive Tumorzell-Therapie sein, da es offensichtlich keine essentielle Funktion in normalen, nicht-transformierten Zellen erfüllt (Mountain *et al.* 1999), hingegen essentiell für das Überleben von Krebszellen mit zusätzlichen Zentrosomen ist (Kwon *et al.* 2008). Deshalb stellt HSET eine vielversprechende neue Therapie-Zielstruktur dar. Interessanterweise ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) ebenfalls am Zentrosomen-„Clustern“ beteiligt und es wird vermutet, dass die Inhibition von HSET und PI-3-Kinase synergistisch Krebszellen angreifen könnte (Ward *et al.* 2003; Godinho *et al.* 2009).

2. Die Rolle des Tumorsuppressors Chk2 für den Erhalt einer chromosomalen Stabilität

In dieser Arbeit habe ich das putative Tumorsuppressorgen *CHK2* als einen zentralen Regulator der Mitose charakterisiert. Der Verlust von Chk2 induziert Defekte bei der Assemblierung der mitotischen Spindel (Abb. 31-35), was mit einer transienten Verzögerung in einem Prometaphase-ähnlichen Zustand verbunden ist (Abb. 29 und 30). Obwohl diese aberranten Spindelstrukturen im weiteren Verlauf der Mitose aufgelöst werden (Abb. 31), führt dies dennoch zu Chromosomen-Fehlverteilungen in der Mitose, die aufgrund von isolierten sogenannten "lagging" Chromosomen erklärt werden können (Abb. 40 und 41). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Chk2 Kinase vermutlich den Spindelaufbau direkt reguliert, möglicherweise über eine Regulation der Zentrosomen-Aktivität oder der Mikrotubuli-Dynamik. Wie dies erfolgt ist gegenwärtig noch unklar.

Die Chk2 Kinase wurde ursprünglich als ein zentraler Regulator des DNA-Beschädigungs-Signalweges identifiziert (McGowan 2002; Bartek und Lukas 2003; Iliakis *et al.* 2003; Ahn *et al.* 2004; Li und Stern 2005), der Signale zu Effektoren transduziert, welche die Zellteilung, DNA-Reparatur und Apoptose kontrollieren (Zhou und Elledge 2000; Seo *et al.* 2003; Shiloh 2003) (Abb.47). Zu diesen Effektoren gehören z.B. die CDK-Phosphatase Cdc25C, die nach einer Chk2-vermittelten Phosphorylierung ins Zytoplasma sequestriert wird, was zu einem G2/M-Arrest nach DNA-Schaden führt (Matsuoka *et al.* 1998; Blasina *et al.* 1999). Weitere Substrate von Chk2 umfassen Cdc25A, den Tumorsuppressor p53 und Brca1. Es wurde gezeigt, dass Chk2 durch Phosphorylierung Cdc25A destabilisiert (Falck *et al.* 2001) und p53 stabilisiert (Chehab *et al.* 2000; Hirao *et al.* 2000), wodurch nach DNA-Beschädigung ein Zellzyklus-Arrest in G1/S induziert wird. Andere Studien widerlegen hingegen die Beteiligung von Chk2 an einer Phosphorylierungs-vermittelten Destabilisierung von Cdc25A (Jin *et al.* 2008) und stellen ebenfalls, zumindest in humanen somatischen Zellen, die Chk2-vermittelte Stabilisierungsfunktion für p53 in Frage (Ahn *et al.* 2003; Jallepalli *et al.* 2003). Unumstritten ist hingegen die Chk2-vermittelte Phosphorylierung des Tumorsuppressors Brca1 an Serin-988 nach γ -Bestrahlung (Lee *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004). Diese Phosphorylierung ist mit der DNA-Reparatur nach DNA-Schaden in Zusammenhang gebracht worden (Kim *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006; Zhuang *et al.* 2006).

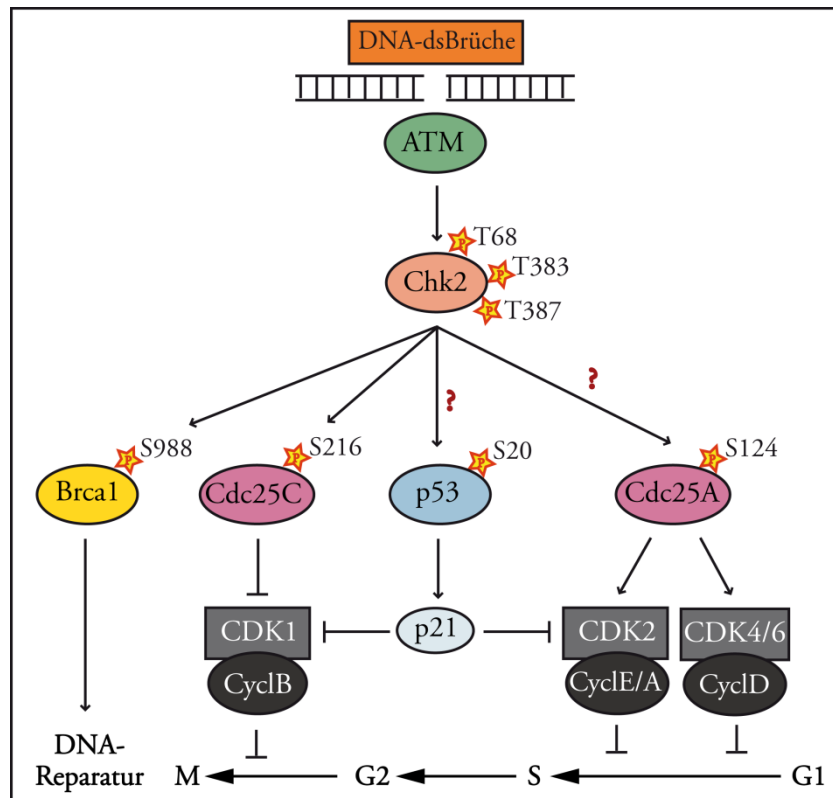


Abbildung 47: Wichtige Substrate von Chk2 im DNA-Beschädigungs-Signalweg. Durch DNA-Beschädigung wie DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-dsBrüche) wird die Kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated) aktiviert, die daraufhin die Chk2-Kinase an zentralen Aktivierungsresten phosphoryliert. Chk2 phosphoryliert daraufhin wichtige Regulatoren, die u.a. an der DNA-Reparatur (Brca1) und der Regulation des Zellzyklus-Arrests (Cdc25C, Cdc25A und p53) beteiligt sind. Die Funktionen der Chk2-vermittelten Phosphorylierungen von p53 und Cdc25A sind umstritten. Eine Beteiligung an der Regulation der Stabilisierung von p53 und Cdc25A wird vermutet.

CHK2 wurde in früheren Studien als putatives Multi-Organ Tumorsuppressorgen beschrieben, das in vielen verschiedenen Krebsarten wie Brust-, Kolon-, Lungen-, Eierstock- und Prostatakarzinomen mutiert ist, obgleich mit geringer Frequenz (Bartek und Lukas 2003; Antoni *et al.* 2007). Die eigentliche Tumorsuppressor-Funktion ist aber nicht geklärt.

Die neue mitotische Funktion von Chk2 zum Erhalt einer chromosomalen Stabilität, die ich in meiner Arbeit beschreibe und die unabhängig vom DNA-Beschädigungs-Signalweg erfolgt (Abb. 37; Stolz *et al.* 2010, im Druck), könnte aber direkt zur Tumorsuppressor-Funktion von Chk2 beitragen.

In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Aneuploidie, beispielsweise durch Minderexpression von *MAD2* und anderen SCP-Genen, zur Induktion von spontanen oder karzinogen-induzierten Tumoren führt (Michel *et al.* 2001; Jeganathan *et al.* 2007; Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008). Insbesondere führt dies zu Lungentumoren und

speziell zu Lungenadenokarzinomen (Masuda und Takahashi 2002; Ricke *et al.* 2008; Holland und Cleveland 2009).

Diese Beobachtungen veranlassten uns, die *CHK2*-Expression in Lungentumoren zu evaluieren und in der Tat war *CHK2* in 68% der von uns untersuchten humanen Lungenadenokarzinomen minderexprimiert (Stolz *et al.* 2010, im Druck). Darüber hinaus korreliert der *CHK2*-Status mit dem Ploidie-Status und der erhöhten Variabilität der Kerngröße, einem morphologischen Marker für chromosomale Instabilität (Petersen *et al.* 2009), in einem Teil der Lungenadenokarzinome (unsere unpublizierten Daten). Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Korrelation zwischen einer geringen *CHK2*-Expression und Aneuploidie in humanen Lungentumoren vermutet werden.

Die molekulare Funktion von Chk2 beim Spindelaufbau und für den Erhalt der Euploidie ist bislang noch unklar. Prinzipiell könnten verschiedene Defekte dafür verantwortlich sein. Aufgrund einer möglichen Beteiligung von Chk2 am G2-Kontrollpunkt, könnte ein verfrühter Eintritt in die Mitose mit Störungen beim Spindelaufbau assoziiert sein. Dies wurde jedoch nicht beobachtet (Stolz *et al.* 2010, im Druck). Weiterhin konnten wir zeigen, dass Chk2 in HCT116-Zellen sowohl nach DNA-Beschädigung als auch nach DNA-Replikationshemmung keine signifikante Funktion zur Vermittlung eines Zellzyklusarrestes in der G2-Phase spielt (Stolz *et al.* 2010, im Druck).

Eine weitere Möglichkeit, eine Aneuploidie zu induzieren, besteht in einer Fehlfunktion des SCP-Signalweges. Dies ist in Tumorzellen ebenfalls häufig der Fall und resultiert in Chromosomen-Fehlverteilungen (Wang *et al.* 2002; Anand *et al.* 2003; Kienitz *et al.* 2005; Perez de Castro *et al.* 2007; Guardavaccaro *et al.* 2008). Diese Möglichkeit, Aneuploidie zu induzieren, konnte bei einer *CHK2*-Defizienz aber ebenfalls ausgeschlossen werden (Stolz *et al.* 2010, im Druck).

Eine wichtige Rolle in Tumorzellen spielen Amplifikationen von Zentrosomen, die multipolare Spindeln als Intermediat induzieren können, die, wie auch nach einer *CHK2*-Depletion, die Ausbildung von nicht-segregierbaren, „lagging“ Chromosomen in der Anaphase fördern (Abb. 40 und 41); (Ganem *et al.* 2009; Silkworth *et al.* 2009). Diese „lagging“ Chromosomen stellen ein wichtiges Kennzeichen von Tumorzellen dar (Cimini *et al.* 2001; Salmon *et al.* 2005; Cimini 2008; Thompson und Compton 2008; Bakhoun *et al.* 2009; Ganem *et al.* 2009). Interessanterweise werden „lagging“ Chromosomen nicht vom SCP erkannt (Cimini *et al.* 2001; Thompson und Compton 2008). Daher ist eine Aneuploidisierung nach einem *CHK2*-Verlust auch in Anwesenheit eines intakten SCP möglich (Abb. 27; Stolz *et al.* 2010, im Druck). Die aberranten Spindelstrukturen, die während einer verlängerten Prometaphase nach einem *CHK2*-Verlust auftreten, stellen damit möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Förderung von fehlerhaften Chromosomen-Anheftungen an die mitotische Spindel dar, die zur Bildung von „lagging“ Chromosomen führen und dadurch eine chromosomale Instabilität induzieren (Abb. 48).

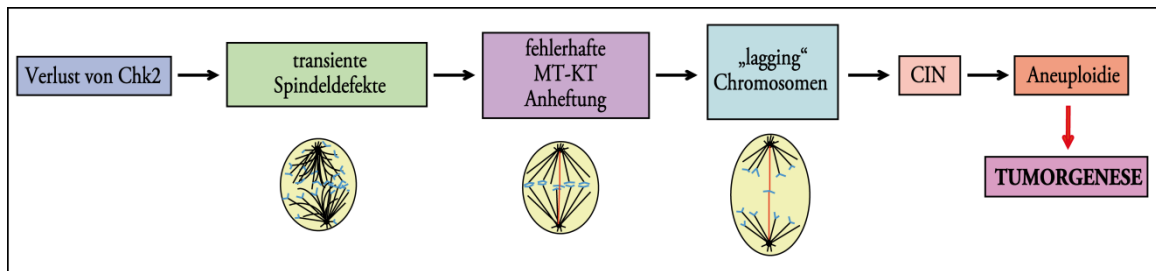


Abbildung 48: Ein Verlust von *CHK2* kann die Tumorgenese fördern. Eine Depletion von *CHK2* oder ein Verlust der Chk2 Kinase-Aktivität induziert die Bildung aberranter Spindelstrukturen, die mit fehlerhafter Mikrotubuli (MT)-Kinetochor (KT)-Anheftungen assoziiert sind. In der Folge kommt es zur Bildung isolierter, sogenannter „lagging“ Chromosomen in der Anaphase, chromosomaler Instabilität (CIN) und Aneuploidie, die wiederum die Tumorgenese fördern kann.

Die zentrale Frage, die sich daraus ergibt, ist, welche Funktion Chk2 bei dem Aufbau einer mitotischen Spindel erfüllt.

Interessanterweise co-lokalisiert die Chk2-Kinase und die mitotische Kinase Plk1 an Zentrosomen und am Mittelkörper mitotischer Zellen. Darüber hinaus interagiert Plk1 direkt mit Chk2 und kann dieses phosphorylieren (Tsvetkov *et al.* 2003; Tsvetkov *et al.* 2005). Plk1 erfüllt wichtige mitotische Funktionen bei der Kontrolle des mitotischen Eintritts, der Regulation der Zentrosomen-Reifung, dem Aufbau des mitotischen Spindelapparates, der Chromosomen-Segregation, der Aktivierung des APC/C, der Zytokinese und der Aktivierung des SCP (Golsteyn *et al.* 1995; Budde *et al.* 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2001; Sumara *et al.* 2004; van Vugt und Medema 2005; Petronczki *et al.* 2008; Seki *et al.* 2008). Plk1 ist dabei besonders wichtig für die Zentrosomen-Funktion, da es verschiedene zentrosomale Proteine phosphoryliert, die für die Zentrosomen-Reifung und -Stabilität wichtig sind, wie z.B. Nlp und Kizuna (Casenghi *et al.* 2003; Casenghi *et al.* 2005; Oshimori *et al.* 2006) und den mitotischen Eintritt regulieren, wie z.B. Cdc25C und Cyclin B1 (Toyoshima-Morimoto *et al.* 2001; Jackman *et al.* 2003) sowie den APC/C und seinen Inhibitor Emi1 (Golan *et al.* 2002; Kraft *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2004; Moshe *et al.* 2004). Eine Regulation der zentrosomalen Spindelbildung über einen *PLK1/CHK2*-vermittelten Signalweg wäre daher möglich.

Interessanterweise konnten Aktivierungs-assoziierte Phosphorylierungen von Chk2 an Threonin-68 und Threonin-387 (Ahn *et al.* 2002; Xu *et al.* 2002; Schwarz *et al.* 2003) in mitotischen Zellen (Stolz *et al.* 2010, im Druck) und mehr noch, die Aktivierung von Chk2 in der Mitose direkt nachgewiesen werden (Abb. 28). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von Chk2 für die Assemblierung einer ordnungsgemäßen mitotischen Spindel und für die zeitgenaue Progression der Mitose (Abb. 38 und 39) benötigt wird und darüber hinaus, für den Erhalt einer Euploidie essentiell ist (Stolz *et al.* 2010, im Druck). An anderer Stelle konnte

gezeigt werden, dass die ektopische Expression einer katalytisch inaktiven Mutante von Chk2 (*CHK2-KD*) zur Entstehung aneuploider Tumoren führt (Kwak *et al.* 2006). Da Aneuploidie aber ein generelles Kennzeichen humaner Tumore ist, konnte eine direkte Korrelation zwischen einem Verlust der Chk2-Kinaseaktivität und Aneuploidie, im Gegensatz zu unseren Studien, aber nicht gezeigt werden (Stolz *et al.* 2010, im Druck). Unsere überraschenden Beobachtungen legen in der Tat eine neue mitotische Funktion von Chk2 nahe. Die zukünftige Identifizierung von mitotischen Substraten ist daher wichtig, um die molekularen Mechanismen der Chk2-vermittelten mitotischen Funktion aufklären zu können.

Auf der Suche nach putativen mitotischen Substraten von Chk2 haben wir Brca1 identifiziert und zeigen können, dass Chk2 Brca1 nach DNA-Beschädigung und in der Mitose, in Abwesenheit von DNA-Schäden, an Serin-988 phosphoryliert (Stolz *et al.* 2010, im Druck). Bemerkenswerterweise sind die mitotischen Defekte nach einem *BRC1*-Verlust denen bei einer *CHK2*-Defizienz, wie Spindeldefekte, eine Verzögerung in der mitotischen Progression und das Auftreten von „lagging“ Chromosomen, ähnlich (Stolz *et al.* 2010, im Druck). Darüber hinaus induziert ein Brca1-Verlust eine chromosomale Instabilität und Aneuploidie (Joukov *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1999; Stolz *et al.* 2010, im Druck). Überraschenderweise wurde eine Lokalisation von Brca1 an den Zentrosomen und Spindel-Mikrotubuli postuliert (Hsu und White 1998) und es wurde kürzlich eine neue Funktion von Brca1 in der Zentrosomen-Funktion und der Assemblierung einer mitotischen Spindel beschrieben (Joukov *et al.* 2006).

Diese Ergebnisse legen einen *CHK2/BRC1*-vermittelten Signalweg nahe, der eine Feinregulation der Zentrosomenaktivität beinhalten könnte, die eine Euploidie aufrecht erhält (Joukov *et al.* 2006; Pujana *et al.* 2007; Stolz *et al.* 2010, im Druck).

Brca1 reguliert möglicherweise zusammen mit seinem Bindungspartner BARD1 (Brca assoziiert ring domain 1; Wu *et al.* 1996; Starita und Parvin 2003) die Zentrosomen-Integrität und Duplikation über eine inhibierende Ubiquitinierung von γ -Tubulin (Hsu *et al.* 2001; Starita *et al.* 2004; Parvin 2009), wodurch eine aberrante Re-Duplikation von Zentrosomen verhindert wird (Starita und Parvin 2006). Allerdings können wir eine Zentrosomen-Amplifikation weder in Zellen mit verminderter *BRC1*-Expression, noch in *CHK2* defizienten Zellen beobachten (Stolz *et al.* 2010 akzeptiert), weshalb eine Deregulation der Zentrosomen-Duplikation als Ursache für die Entstehung einer chromosomalen Instabilität nach einem *CHK2*-Verlust unwahrscheinlich ist. Brca1 könnte aber möglicherweise die Funktion von Chk2 über die beschriebene Brca1/BARD1-vermittelte Funktion bei der Assemblierung einer mitotischen Spindel vermitteln (Joukov *et al.* 2006). Dabei könnte der Verlust einer Chk2-vermittelten Phosphorylierung von Brca1 (Abb. 49, Schritt C) zu einer Deregulation der Zentrosomen-Funktion führen, die mit Defekten im Spindelaufbau assoziiert sind (Abb. 31-35) und CIN in humanen Zellen fördern können (Abb. 27). Dabei wird diese Funktion von Brca1/BARD1 möglicherweise über eine Interaktion mit

γ -Tubulin, RHAMM (receptor for hyaluronic-acid-mediated motility), Aurora A und TPX2 vermittelt und ist abhängig von der Brca1/BARD1-vermittelten Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Groen *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2003; Maxwell *et al.* 2008; Joukov *et al.* 2006); (Abb. 49).

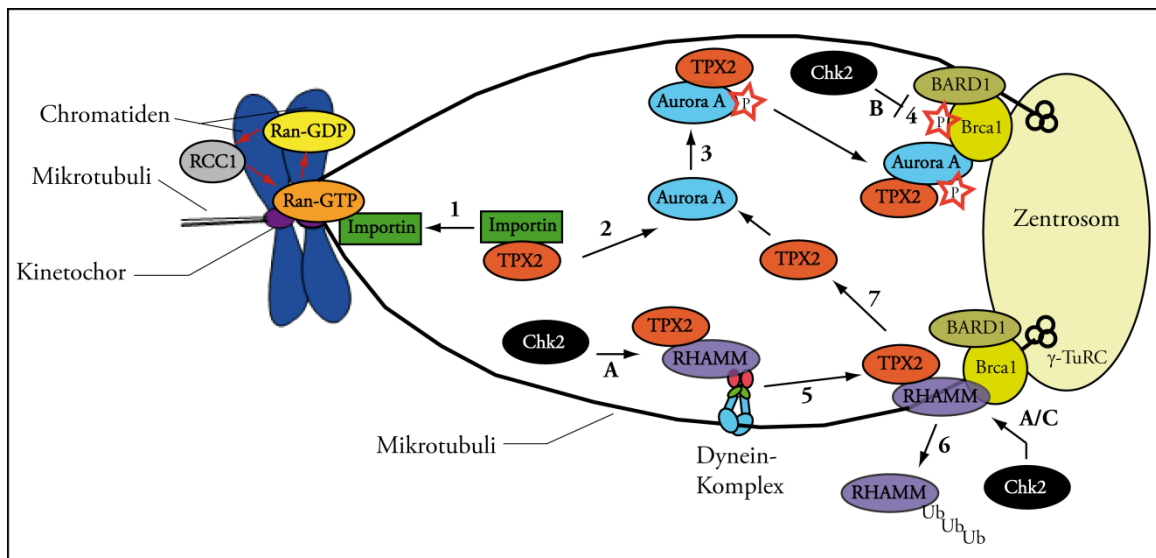


Abbildung 49: Die zentrosomale und Chromatin-vermittelte Bildung einer mitotischen Spindel. Ein Ran-GTP-Gradient, der durch den Chromosomen-gebundenen Guanin-Austauschfaktor RCC1 etabliert wird, reguliert die anastrale Bildung einer mitotischen Spindel. Dabei bindet Ran-GTP Importine (1), die daraufhin den Aurora A-Aktivator TPX2 entlassen (2). TPX2 aktiviert Aurora A durch Stabilisierung der Autophosphorylierung von Aurora A an Threonin-288 (3). Daraufhin kann die aktivierte Aurora A Kinase Brca1 phosphorylieren (4) und dadurch die G2/M-Transition und Spindelassemblierung regulieren. Durch Interaktion von RHAMM mit dem Dynein-Komplex, lokalisiert RHAMM an den Spindelpolen, wo es mit γ -Tubulin interagieren kann (5). RHAMM interagiert ebenfalls mit TPX2 und Dynein und kann dadurch TPX2 zu den Polen rekrutieren (5). Der BRCA1/BARD1-Komplex modifiziert die TPX2-Lokalisation und die Spindelassemblierung durch Ubiquitinierung (Ub) von RHAMM (6). Ubiquitinierung und der anschließende Abbau von RHAMM könnten TPX2 von den Spindelpolen entlassen (7) und dadurch die Aurora A-Aktivierung beeinflussen. Die potentielle Interaktion von Chk2 mit RHAMM, Brca1/BARD1 oder Aurora A/TPX2 sind gekennzeichnet (A-C) und im Text näher beschrieben. (Modifiziert nach Maxwell *et al.* 2008).

RHAMM wurde ursprünglich eine Funktion bei der Hyaluronsäure-induzierten Zellbewegung zugeschrieben, inzwischen ist aber eine zusätzliche zentrosomale Lokalisation sowie eine Funktion bei der zentrosomalen (astral) und Ran-abhängigen, Chromatin (anastral)-vermittelten Bildung einer mitotischen Spindel und der G2/M-Transition beschrieben worden (Hardwick *et al.* 1992; Maxwell *et al.* 2003; Groen *et al.* 2004). Durch eine Interaktion mit dem Dynein-Komplex lokalisiert RHAMM an den Spindelpolen, wo es mit γ -Tubulin interagieren kann (Abb. 49, Schritt 5). RHAMM interagiert ebenfalls mit TPX2 und Dynein und kann TPX2 zu den Spindelpolen

rekrutieren. An den Spindelpolen kann TPX2, zusammen mit RHAMM und γ -Tubulin die Bildung von Astral-Spindeln fördern und zur Pol-Fokussierung beitragen (Maxwell *et al.* 2003; Schatz *et al.* 2003; Groen *et al.* 2004); (Abb. 49, Schritt 5). Interessanterweise habe ich während eines *CHK2*-Verlustes, TPX2 verstärkt auf der mitotischen Spindel beobachten können (unpublizierte Daten), was möglicherweise für eine Chk2-vermittelte Regulation der TPX2-Rekrutierung zu den Spindelpolen sprechen könnte (Abb. 49, Schritt A). Dabei wäre eine deregulierte TPX2-Rekrutierung und damit gestörte zentrosomale Spindelbildung nach einem *CHK2*-Verlust denkbar, die zu den typischen Spindeldefekten in *CHK2* defizienten Zellen führen könnte (Abb. 31 und 32). Eine direkte Interaktion von Chk2 mit TPX2, RHAMM oder Dynein wurde nicht näher untersucht, könnte aber zur weiteren Aufklärung des molekularen Mechanismus einer *CHK2*-vermittelten chromosomalen Stabilität beitragen.

Der Proteinlevel von zentrosomalem RHAMM-Protein wird durch die Brca1/BARD1-vermittelte Ubiquitinierung reguliert (Joukov *et al.* 2006; Pujana *et al.* 2007); (Abb. 49, Schritt 6), wodurch möglicherweise die TPX2-Lokalisierung und in der Folge die Aurora A-Aktivität und damit die Spindelassemblierung modifiziert werden. So kann durch den Brca1/BARD1-vermittelten Abbau von RHAMM TPX2 entlassen werden (Abb. 49, Schritt 7) und die Autophosphorylierung und Aktivierung von Aurora A stabilisieren (Bayliss *et al.* 2003; Eyers *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2007); (Abb. 49, Schritt 3). Aurora A könnte daraufhin Brca1 phosphorylieren und so möglicherweise die zentrosomale Assemblierung einer mitotischen Spindel regulieren (Abb. 49, Schritt 4). In der Tat phosphoryliert die Aurora A Kinase Brca1 an Serin-308 *in vitro* und *in vivo* (Ouchi *et al.* 2004) und inhibiert dadurch die γ -Tubulin-inhibierende Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Brca1 (Sankaran *et al.* 2007). Darüber hinaus ist Aurora A an der Rekrutierung von γ -Tubulin zu den Zentrosomen beteiligt (Terada *et al.* 2003) und phosphoryliert wichtige zentrosomale Proteine wie Eg5/KSP oder TACC3 (Giet *et al.* 1999; Wilde *et al.* 2001; Giet *et al.* 2002; Kinoshita *et al.* 2005). Deshalb ist die Aurora A Kinase essentiell für die exakte Zentrosomen-Reifung sowie für die Assemblierung und Stabilität einer bipolaren mitotischen Spindel (Meraldi *et al.* 2004; Marumoto *et al.* 2005; Fu *et al.* 2007). Eine Deregulation von Aurora A könnte somit zu einem deregulierten Spindelaufbau führen. Dabei wäre eine Regulation von Aurora A durch Chk2, eventuell über den Aurora A-Aktivator TPX2, denkbar.

Auch könnte ein Verlust von Chk2 die Aurora A-vermittelte Regulation der Ubiquitin-Ligase-Funktion von Brca1 deregulieren und die Aurora A-vermittelte Rekrutierung von γ -Tubulin zu den Zentrosomen beeinträchtigt sein. Dies könnte zu einer Deregulation der Spindelassemblierung und CIN-induzierter Tumorgenese, beitragen (Abb. 49, Schritt B). Allerdings konnten wir in *CHK2* defizienten Zellen keine signifikante Verringerung von γ -Tubulin an den Polen beobachten (unpublizierte Daten).

Wie in Abbildung 49 dargestellt, erfüllt das Zentrosom eine zentrale Funktion für die Spindelbildung, da es als eine Art Plattform für die Rekrutierung verschiedener struktureller und regulatorischer Proteine dient. Die Effizienz des Mikrotubuli-Wachstums ausgehend vom Zentrosom wird dabei durch die relative Menge und Aktivität dieser Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt (Howard und Hyman 2007). Dabei nehmen Mikrotubuli-stabilisierende Proteine wie z.B. ch-TOG und die TACC-Proteine sowie Mikrotubuli-destabilisierende Proteine wie z.B. MCAK (Peset und Vernos 2008) eine wichtige Rolle ein. In einem möglichen Model phosphoryliert Aurora A TACC3, wodurch Aurora A und ch-TOG (durch Bindung an die TACC-Domäne) zu den Zentrosomen rekrutiert werden (Abb. 50). Zentrosomales ch-TOG bindet und stabilisiert die Mikrotubuli und wirkt der destabilisierenden Aktivität von MCAK entgegen wodurch das zentrosomale Mikrotubuli-Wachstum gefördert wird (Kinoshita *et al.* 2005; Mori *et al.* 2007; Peset und Vernos 2008); (Abb. 50).

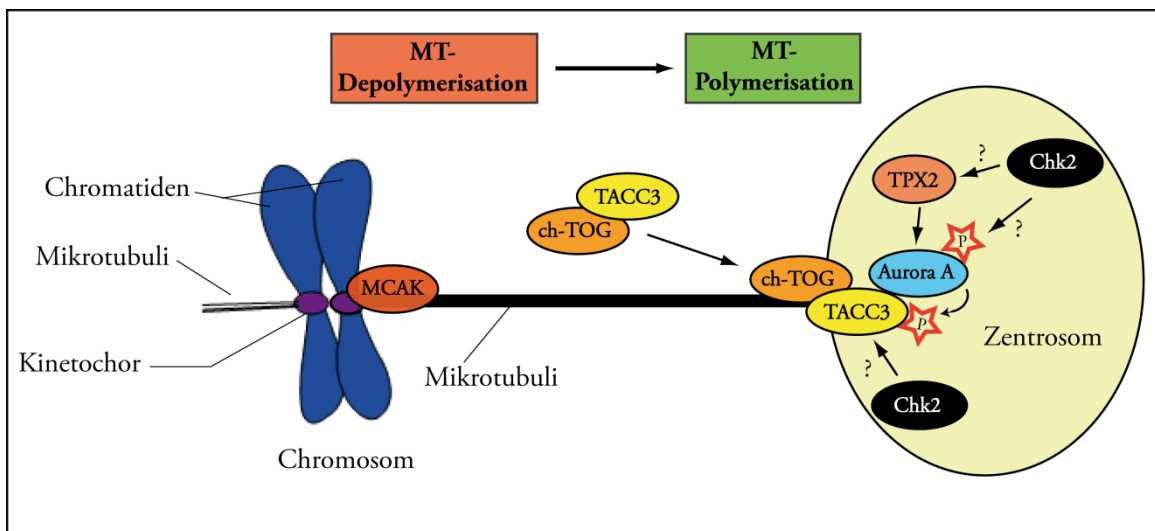


Abbildung 50: Ein Model für die potentielle Funktion von TACC3/ch-TOG an den Zentrosomen. Die zentrosomale, aktivierte Aurora A Kinase phosphoryliert TACC3 und rekrutiert das Protein dadurch zu den Spindelpolen. Phosphoryliertes TACC3 rekrutiert ch-TOG zu den Zentrosomen, wo es an die Mikrotubuli binden und diese stabilisieren kann. Damit wirkt ch-TOG der depolymerisierenden Aktivität von MCAK am Kinetochor entgegen, so dass das zentrosomale Mikrotubuli-Wachstum gefördert wird. Die zentrosomale Aktivierung von Aurora A durch TPX2 sowie mögliche Interaktionen von Chk2 mit Aurora A/TPX2 oder TACC3/ch-TOG sind gekennzeichnet. (Modifiziert nach Peset und Vernos 2008).

Möglicherweise könnte auch Chk2 durch Interaktion mit TACC3 die Rekrutierung von ch-TOG zum Zentrosom fördern und damit die zentrosomale Mikrotubuli-Polymerisation unterstützen (Abb. 50). Für die Rekrutierung von TACC3 zum Zentrosom wird die Kinase-Aktivität von Aurora A benötigt (LeRoy *et al.* 2007). Chk2 könnte dabei möglicherweise die Rekrutierung von TPX2 zu den Zentrosomen über RHAMM fördern und so zur Aktivierung von Aurora A

beitragen (Abb. 49). Ein *CHK2*-Verlust könnte demnach über eine mögliche Deregulation von TACC3 und Aurora A/TPX2, zur verstärkten MCAK-vermittelten Depolymerisation der Mikrotubuli führen und die ordnungsgemäße Spindelbildung verhindern.

Direkte Interaktionen von Chk2 mit TACC3, Aurora A oder TPX2 sind nicht näher untersucht worden, könnten aber zur Aufklärung des Mechanismus einer Chk2-vermittelten Regulation der Spindeldynamik beitragen. Interessanterweise konnten wir nach einer Behandlung *CHK2* defizienter Zellen mit geringen Konzentrationen der Mikrotubuli-stabilisierenden Substanz Taxol den defekten Spindel-Phänotyp supprimieren (unpublizierte Daten von A. Kienitz), was in der Tat eine Funktion von Chk2 bei der Spindelstabilisierung unterstützen könnte.

Neben ch-TOG spielt auch das ebenfalls Mikrotubuli-stabilisierende Protein HURP (hepatoma up-regulated protein) eine wichtige Rolle, da es nach einer Aurora A-vermittelten Phosphorylierung mit den Mikrotubuli assoziiert und Ran-GTP-abhängig den Spindelaufbau und die Spindelstabilität reguliert (Wong und Fang 2006; Wong *et al.* 2008). In *Xenopus* wurde dabei ein Komplex aus HURP, Eg5/KSP, TPX2 und Aurora A identifiziert, der für die Ran-abhängige Bildung einer bipolaren mitotischen Spindel aus Mikrotubuli-Astern, erforderlich ist (Koffa *et al.* 2006). Im humanen System wurde ein solcher quartärer Komplex bislang nicht identifiziert (Wong *et al.* 2008). Möglicherweise induziert HURP die Bildung einer Art Hülse aus Tubulin um Kinetochor-Mikrotubuli und verhindert dadurch die Depolymerisation (Davis und Wordeman 2007). Da eine Deregulation von HURP Defekte in der Spindelmorphologie und Spindelstabilität induziert (Wong *et al.* 2008) wäre es möglich, dass Chk2 die Aktivität von HURP reguliert und dadurch die Spindelstabilität moduliert. Da HURP ein Substrat von Aurora A darstellt (Wong *et al.* 2008), wäre darüber hinaus wiederum eine Chk2-vermittelte Regulation von HURP über Aurora A denkbar.

So könnte Chk2 das Wachstum von Mikrotubuli am Zentrosom über eine positive Regulation von Aurora A/TACC3/ch-TOG fördern (Abb. 50) und gleichzeitig die Depolymerisation von Kinetochor-Mikrotubuli durch eine potentielle Interaktion mit HURP regulieren.

Mögliche hypothetische Mechanismen zeigen, dass verschiedene zentrosomale Proteine, die wichtige Aufgaben bei der Assemblierung und Stabilisierung einer bipolaren mitotischen Spindel erfüllen, durch die Chk2 Kinase reguliert werden könnten. Dabei stellen die Ubiquitin-Ligase Brca1 und die zentrosomalen Kinasen Aurora A und Plk1 sowie die regulatorischen Proteine wie TPX2, BARD1, RHAMM und TACC3/ch-TOG mitunter interessante potentielle Interaktionspartner von Chk2 in der Mitose dar (Abb. 49 und 50).

Durch eine Chk2-vermittelte Feinregulierung dieser Proteine könnte die Spindeldynamik möglicherweise moduliert werden, was eine essentielle Notwendigkeit für eine akkurate Progression der Mitose, chromosomaler Stabilität und Euploidie darstellt. Der Verlust von *CHK2*

könnte zum Zusammenbruch dieser Feinregulation führen und damit CIN und Aneuploidie induzieren und in der Folge die Tumorgenese fördern.

Die meisten soliden Tumore sind aneuploid und viele sind chromosomal instabil (Lengauer *et al.* 1997; Lengauer *et al.* 1998; Thompson und Compton 2008). Chromosomale Instabilität kann direkt zur Tumorgenese beitragen (Boveri 1914; Rajagopalan und Lengauer 2004; Holland und Cleveland 2009). In der Tat führt die experimentelle Erzeugung von Aneuploidie in transgenen Mausmodellen zu Karzinogen-induzierter oder spontaner Tumorgenese (Sotillo *et al.* 2007; Ricke *et al.* 2008), vor allem zu Lungentumoren (Michel *et al.* 2001; Jeganathan *et al.* 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass CIN direkt mit der Genese von Lungentumoren assoziiert ist.

Interessanterweise zeigen unsere und frühere Daten, dass sowohl *CHK2* als auch *BRCA1* häufig in Lungentumoren mindorexprimiert ist (Lee *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2004; Stolz *et al.* 2010, im Druck). Eine Deregulation eines *CHK2/BRCA1*-vermittelten Signalweges könnte daher in Lungentumoren von besonderer Bedeutung sein.

Brc1 ist ebenfalls ein etablierter Tumorsuppressor in Brust- und Ovarienkarzinomen (Miki *et al.* 1994). Interessanterweise ist *AURORA A* in 62% der Brustkarzinome überexprimiert (Miyoshi *et al.* 2001) und eine verringerte oder fehlende *Chk2* Kinase-Aktivität (in Folge einer in humanen Tumoren häufig vorkommenden 1100DelC-Mutation) ist mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Meijers-Heijboer *et al.* 2003; Varley und Haber 2003). Daher könnte eine Deregulation eines *Chk2/AuroraA/Brc1*-vermittelten Signalweges auch in Brusttumoren eine zentrale Rolle spielen. Dabei könnte durch einen Verlust von *Chk2* die Aurora A-vermittelte Regulation der Ubiquitin-Ligase-Funktion von *Brc1* aus dem Gleichgewicht geraten und die Aurora A-vermittelte Rekrutierung von γ -Tubulin zu den Zentrosomen beeinträchtigt sein (Abb. 49, Schritt B). Dies könnte zu einer Deregulation der Spindelassemblierung und CIN-induzierter Brust-Tumorgenese beitragen.

Von einem besonderen Interesse ist die Fragestellung, ob und wie sich das hochfrequente Fehlen von *CHK2* und *BRCA1* in diesen Tumoren therapeutisch ausnutzen lassen könnte. Dabei könnten zum einen synergistische Effekte zwischen einer *CHK2*- oder *BRCA1*-Defizienz in verschiedenen Tumoren und anti-mitotischen Chemotherapeutika (z.B. Taxane, *Vinca* Alkaloide und Kinesin-Inhibitoren) untersucht werden, zum anderen aber auch neue synthetisch-letale Interaktionen identifiziert werden.

Es konnte bereits eine signifikante klinische Wirksamkeit von Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP)-Inhibitoren in *BRCA1* defizienten Brusttumoren beschrieben werden (Fong *et al.* 2009). Dabei zeigen *BRCA1* defiziente Zellen einen DNA-Reparaturdefekt, der eine signifikante Hypersensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren bedingt (Bryant *et al.* 2005; Farmer *et al.* 2005).

Da die Therapiemöglichkeiten insbesondere von Lungentumoren eingeschränkt sind, könnten solche synthetisch-letalen „screens“ nach Genen, deren Repression mit der *CHK2*-Defizienz synthetisch-letal wirken von besonderem Interesse sein, um spezifisch *CHK2* defiziente Tumorzellen in die Apoptose zu überführen. Hierbei könnten weitere Spindel-regulierende Proteine neue vielversprechende chemotherapeutische Zielstrukturen, insbesondere für die Therapie von Lungenadenokarzinomen darstellen.

Literaturverzeichnis

Abraham, RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, **15**, 2177-2196.

Abrieu, A; Kahana, JA; Wood, KW und Cleveland, DW (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell*, **102**, 817-826.

Abrieu, A; Magnaghi-Jaulin, L; Kahana, JA; Peter, M; Castro, A; Vigneron, S; Lorca, T; Cleveland, DW und Labbe, JC (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*, **106**, 83-93.

Acquaviva, C und Pines, J (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci*, **119**, 2401-2404.

Adams, RR; Maiato, H; Earnshaw, WC und Carmena, M (2001). Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol*, **153**, 865-880.

Adams, RR; Wheatley, SP; Gouldsworthy, AM; Kandels-Lewis, SE; Carmena, M; Smythe, C; Gerloff, DL und Earnshaw, WC (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, **10**, 1075-1078.

Ahn, J und Prives, C (2002). Checkpoint kinase 2 (Chk2) monomers or dimers phosphorylate Cdc25C after DNA damage regardless of threonine 68 phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 48418-48426.

Ahn, J; Urist, M und Prives, C (2003). Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem*, **278**, 20480-20489.

Ahn, J; Urist, M und Prives, C (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1039-1047.

Ahn, JY; Li, X; Davis, HL und Canman, CE (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem*, **277**, 19389-19395.

Ahn, JY; Schwarz, JK; Piwnica-Worms, H und Canman, CE (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 5934-5936.

Anand, S; Penrhyn-Lowe, S und Venkitaraman, AR (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, **3**, 51-62.

Anderson, K; Yang, J; Koretke, K; Nurse, K; Calamari, A; Kirkpatrick, RB; Patrick, D; Silva, D; Tummino, PJ; Copeland, RA und Lai, Z (2007). Binding of TPX2 to Aurora A alters substrate and inhibitor interactions. *Biochemistry*, **46**, 10287-10295.

Andrews, PD; Ovechkina, Y; Morrice, N; Wagenbach, M; Duncan, K; Wordeman, L und Swedlow, JR (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell*, **6**, 253-268.

- Ang, XL und Wade Harper, J (2005). SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. *Oncogene*, **24**, 2860-2870.
- Antoni, L; Sodha, N; Collins, I und Garrett, MD (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer*, **7**, 925-936.
- Aristarkhov, A; Eytan, E; Moghe, A; Admon, A; Hershko, A und Ruderman, JV (1996). E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **93**, 4294-4299.
- Arnaud, L; Pines, J und Nigg, EA (1998). GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma*, **107**, 424-429.
- Ashar, HR; James, L; Gray, K; Carr, D; Black, S; Armstrong, L; Bishop, WR und Kirschmeier, P (2000). Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules. *J Biol Chem*, **275**, 30451-30457.
- Baker, DJ; Jin, F; Jeganathan, KB und van Deursen, JM (2009). Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell*, **16**, 475-486.
- Bakhom, SF; Thompson, SL; Manning, AL und Compton, DA (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol*, **11**, 27-35.
- Bakkenist, CJ und Kastan, MB (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499-506.
- Banin, S; Moyal, L; Shieh, S; Taya, Y; Anderson, CW; Chessa, L; Smorodinsky, NI; Prives, C; Reiss, Y; Shiloh, Y und Ziv, Y (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-1677.
- Bao, S; Lu, T; Wang, X; Zheng, H; Wang, LE; Wei, Q; Hittelman, WN und Li, L (2004). Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. *Oncogene*, **23**, 5586-5593.
- Barber, TD; McManus, K; Yuen, KW; Reis, M; Parmigiani, G; Shen, D; Barrett, I; Nouhi, Y; Spencer, F; Markowitz, S; Velculescu, VE; Kinzler, KW; Vogelstein, B; Lengauer, C und Hieter, P (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3443-3448.
- Barr, FA; Sillje, HH und Nigg, EA (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 429-440.
- Bartek, J; Falck, J und Lukas, J (2001). CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 877-886.
- Bartek, J; Lukas, C und Lukas, J (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 792-804.
- Bartek, J und Lukas, J (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, **3**, 421-429.
- Bartkova, J; Horejsi, Z; Koed, K; Kramer, A; Tort, F; Zieger, K; Guldborg, P; Sehested, M; Nesland, JM; Lukas, C; Orntoft, T; Lukas, J und Bartek, J (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**, 864-870.

- Bastians, H; Topper, LM; Gorbsky, GL und Ruderman, JV (1999). Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Mol Biol Cell*, **10**, 3927-3941.
- Bayliss, R; Sardon, T; Vernos, I und Conti, E (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell*, **12**, 851-862.
- Becker, M; Stolz, A; Ertych, N und Bastians, H (2010). Centromere localization of INCENP-Aurora B is sufficient to support spindle checkpoint function. *Cell Cycle*, im Druck.
- Bell, DW; Varley, JM; Szydlo, TE; Kang, DH; Wahrer, DC; Shannon, KE; Lubratovich, M; Verselis, SJ; Isselbacher, KJ; Fraumeni, JF; Birch, JM; Li, FP; Garber, JE und Haber, DA (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*, **286**, 2528-2531.
- Belmont, L; Mitchison, T und Deacon, HW (1996). Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends Biochem Sci*, **21**, 197-198.
- Belmont, LD; Hyman, AA; Sawin, KE und Mitchison, TJ (1990). Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*, **62**, 579-589.
- Bernard, P; Maure, JF; Partridge, JF; Genier, S; Javerzat, JP und Allshire, RC (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
- Bettencourt-Dias, M; Giet, R; Sinka, R; Mazumdar, A; Lock, WG; Balloux, F; Zafiropoulos, PJ; Yamaguchi, S; Winter, S; Carthew, RW; Cooper, M; Jones, D; Frenz, L und Glover, DM (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature*, **432**, 980-987.
- Bharadwaj, R und Yu, H (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*, **23**, 2016-2027.
- Blagden, S und de Bono, J (2005). Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, **6**, 325-335.
- Blagosklonny, MV (2007). Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*, **6**, 70-74.
- Blangy, A; Lane, HA; d'Herin, P; Harper, M; Kress, M und Nigg, EA (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.
- Blasina, A; Price, BD; Turenne, GA und McGowan, CH (1999). Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol*, **9**, 1135-1138.
- Bolanos-Garcia, VM (2005). Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 1572-1577.
- Bolton, MA; Lan, W; Powers, SE; McClelland, ML; Kuang, J und Stukenberg, PT (2002). Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **13**, 3064-3077.
- Bornstein, G; Bloom, J; Sitry-Shevah, D; Nakayama, K; Pagano, M und Hershko, A (2003). Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*, **278**, 25752-25757.
- Boveri, T (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Gustav Fischer Verlag, Jena.

- Briassouli, P; Chan, F und Linardopoulos, S (2006). The N-terminal domain of the Aurora-A Phe-31 variant encodes an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination of IkappaBalpha. *Hum Mol Genet*, **15**, 3343-3350.
- Brito, DA und Rieder, CL (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol*, **16**, 1194-1200.
- Brummelkamp, TR; Bernards, R und Agami, R (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brummelkamp, TR; Bernards, R und Agami, R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bryant, HE; Schultz, N; Thomas, HD; Parker, KM; Flower, D; Lopez, E; Kyle, S; Meuth, M; Curtin, NJ und Helleday, T (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, **434**, 913-917.
- Budde, PP; Kumagai, A; Dunphy, WG und Heald, R (2001). Regulation of Op18 during spindle assembly in Xenopus egg extracts. *J Cell Biol*, **153**, 149-158.
- Bunz, F; Dutriaux, A; Lengauer, C; Waldman, T; Zhou, S; Brown, JP; Sedivy, JM; Kinzler, KW und Vogelstein, B (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**, 1497-1501.
- Buscemi, G; Carlessi, L; Zannini, L; Lisanti, S; Fontanella, E; Canevari, S und Delia, D (2006). DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. *Mol Cell Biol*, **26**, 7832-7845.
- Cahill, DP; Lengauer, C; Yu, J; Riggins, GJ; Willson, JK; Markowitz, SD; Kinzler, KW und Vogelstein, B (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, **392**, 300-303.
- Cai, S; Weaver, LN; Ems-McClung, SC und Walczak, CE (2009). Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol Biol Cell*, **20**, 1348-1359.
- Campbell, M und Gorbsky, G (1995). Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J. Cell Biol.*, **129**, 1195-1204.
- Canepa, ET; Scassa, ME; Ceruti, JM; Marazita, MC; Carcagno, AL; Sirkin, PF und Ogara, MF (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*, **59**, 419-426.
- Canman, CE; Lim, DS; Cimprich, KA; Taya, Y; Tamai, K; Sakaguchi, K; Appella, E; Kastan, MB und Siliciano, JD (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, **281**, 1677-1679.
- Carrano, AC; Eytan, E; Hershko, A und Pagano, M (1999). Skp2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biol.*, **4**, 193-199.
- Carter, SL; Eklund, AC; Kohane, IS; Harris, LN und Szallasi, Z (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet*, **38**, 1043-1048.

- Carvalho, A; Carmena, M; Sambade, C; Earnshaw, WC und Wheatley, SP (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci*, **116**, 2987-2998.
- Casenghi, M; Barr, FA und Nigg, EA (2005). Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. *J Cell Sci*, **118**, 5101-5108.
- Casenghi, M; Meraldi, P; Weinhart, U; Duncan, PI; Korner, R und Nigg, EA (2003). Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*, **5**, 113-125.
- Castro, A; Bernis, C; Vigneron, S; Labbe, JC und Lorca, T (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene*, **24**, 314-325.
- Castro, A; Vigneron, S; Bernis, C; Labbe, JC; Prigent, C und Lorca, T (2002). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep*, **3**, 1209-1214.
- Cazales, M; Schmitt, E; Montembault, E; Dozier, C; Prigent, C und Ducommun, B (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle*, **4**, 1233-1238.
- Chan, EH; Santamaria, A; Sillje, HH und Nigg, EA (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma*, **117**, 457-469.
- Chan, GK; Jablonski, SA; Sudakin, V; Hittle, JC und Yen, TJ (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol*, **146**, 941-954.
- Cheeseman, IM; Chappie, JS; Wilson-Kubalek, EM und Desai, A (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, **127**, 983-997.
- Cheeseman, IM und Desai, A (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 33-46.
- Chehab, NH; Malikzay, A; Appel, M und Halazonetis, TD (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, **14**, 278-288.
- Chen, J; Jin, S; Tahir, SK; Zhang, H; Liu, X; Sarthy, AV; McGonigal, TP; Liu, Z; Rosenberg, SH und Ng, SC (2003). Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 486-490.
- Chen, RH (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol*, **158**, 487-496.
- Chen, RH; Brady, DM; Smith, D; Murray, AW und Hardwick, KG (1999). The spindle checkpoint of budding yeast depends on a tight complex between the Mad1 and Mad2 proteins. *Mol Biol Cell*, **10**, 2607-2618.
- Chen, RH; Shevchenko, A; Mann, M und Murray, AW (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol*, **143**, 283-295.
- Chen, RH; Waters, JC; Salmon, ED und Murray, AW (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Sci.*, **274**, 242-246.

- Cheng, M; Olivier, P; Diehl, JA; Fero, M; Roussel, MF; Roberts, JM und Sherr, CJ (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*, **18**, 1571-1583.
- Chieffi, P; Cozzolino, L; Kisslinger, A; Libertini, S; Staibano, S; Mansueto, G; De Rosa, G; Villacci, A; Vitale, M; Linardopoulos, S; Portella, G und Tramontano, D (2006). Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate*, **66**, 326-333.
- Chung, E und Chen, RH (2002). Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell*, **13**, 1501-1511.
- Ciferri, C; De Luca, J; Monzani, S; Ferrari, KJ; Ristic, D; Wyman, C; Stark, H; Kilmartin, J; Salmon, ED und Musacchio, A (2005). Architecture of the human ndc80-hec1 complex, a critical constituent of the outer kinetochore. *J Biol Chem*, **280**, 29088-29095.
- Ciferri, C; Musacchio, A und Petrovic, A (2007). The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. *FEBS Lett*, **581**, 2862-2869.
- Cimini, D (2007). Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle*, **6**, 1558-1564.
- Cimini, D (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1786**, 32-40.
- Cimini, D; Howell, B; Maddox, P; Khodjakov, A; Degraffi, F und Salmon, ED (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*, **153**, 517-527.
- Cimini, D; Moree, B; Canman, JC und Salmon, ED (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci*, **116**, 4213-4225.
- Cimini, D; Tanzarella, C und Degraffi, F (1999). Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells. *Mutagenesis*, **14**, 563-568.
- Cimprich, KA; Shin, TB; Keith, CT und Schreiber, SL (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2850-2855.
- Cooke, CA; Heck, MM und Earnshaw, WC (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol*, **105**, 2053-2067.
- Cooper, JR; Wagenbach, M; Asbury, CL und Wordeman, L (2010). Catalysis of the microtubule on-rate is the major parameter regulating the depolymerase activity of MCAK. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 77-82.
- Cortez, D; Wang, Y; Qin, J und Elledge, SJ (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, **286**, 1162-1166.
- Crane, R; Gadea, B; Littlepage, L; Wu, H und Ruderman, JV (2004). Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell*, **96**, 215-229.

- Crosio, C; Fimia, GM; Loury, R; Kimura, M; Okano, Y; Zhou, H; Sen, S; Allis, CD und Sassone-Corsi, P (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*, **22**, 874-885.
- Dai, J und Higgins, JM (2005). Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle*, **4**, 665-668.
- Davis, TN und Wordeman, L (2007). Rings, bracelets, sleeves, and chevrons: new structures of kinetochore proteins. *Trends Cell Biol*, **17**, 377-382.
- De Antoni, A; Pearson, CG; Cimini, D; Canman, JC; Sala, V; Nezi, L; Mapelli, M; Sironi, L; Faretta, M; Salmon, ED und Musacchio, A (2005). The mad1/mad2 complex as a template for mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*, **15**, 214-225.
- De Brabander, M; Van de Veire, R; Aerts, F; Geuens, S und Hoebeke, J (1976). A new culture model facilitating rapid quantitative testing of mitotic spindle inhibition in mammalian cells. *J Natl Cancer Inst*, **56**, 357-363.
- De Clerck, F und De Brabander, M (1977). Nocodazole, a new synthetic antimitotic agent, enhances the production of plasminogen activator by cells in culture. *Thromb Res*, **11**, 913-914.
- Denicourt, C und Dowdy, SF (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev*, **18**, 851-855.
- Deshaies, RJ (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Ditchfield, C; Johnson, VL; Tighe, A; Ellston, R; Haworth, C; Johnson, T; Mortlock, A; Keen, N und Taylor, SS (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, **161**, 267-280.
- Dobles, M; Liberal, V; Scott, ML; Benezra, R und Sorger, PK (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*, **101**, 635-645.
- Ducat, D und Zheng, Y (2004). Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*, **301**, 60-67.
- Dutertre, S; Cazales, M; Quaranta, M; Froment, C; Trabut, V; Dozier, C; Mirey, G; Bouche, JP; Theis-Febvre, N; Schmitt, E; Monsarrat, B; Prigent, C und Ducommun, B (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, **117**, 2523-2531.
- Dynlacht, BD; Ngwu, C; Winston, J; Swindell, EC; Elledge, SJ; Harlow, E und Harper, JW (1997). Purification and analysis of CIP/KIP proteins. *Methods Enzymol*, **283**, 230-244.
- Elowe, S; Hummer, S; Uldschmid, A; Li, X und Nigg, EA (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev*, **21**, 2205-2219.
- Eyers, PA; Erikson, E; Chen, LG und Maller, JL (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*, **13**, 691-697.

- Falck, J; Lukas, C; Protopopova, M; Lukas, J; Selivanova, G und Bartek, J (2001). Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene*, **20**, 5503-5510.
- Falck, J; Mailand, N; Syljuasen, RG; Bartek, J und Lukas, J (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, **410**, 842-847.
- Fang, G (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*, **13**, 755-766.
- Fang, G; Yu, H und Kirschner, MW (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Dev.*, **12**, 1871-1883.
- Farmer, H; McCabe, N; Lord, CJ; Tutt, AN; Johnson, DA; Richardson, TB; Santarosa, M; Dillon, KJ; Hickson, I; Knights, C; Martin, NM; Jackson, SP; Smith, GC und Ashworth, A (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, **434**, 917-921.
- Fischle, W; Tseng, BS; Dormann, HL; Ueberheide, BM; Garcia, BA; Shabanowitz, J; Hunt, DF; Funabiki, H und Allis, CD (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, **438**, 1116-1122.
- Fong, PC; Boss, DS; Yap, TA; Tutt, A; Wu, P; Mergui-Roelvink, M; Mortimer, P; Swaisland, H; Lau, A; O'Connor, MJ; Ashworth, A; Carmichael, J; Kaye, SB; Schellens, JH und de Bono, JS (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, **361**, 123-134.
- Fu, J; Bian, M; Jiang, Q und Zhang, C (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, **5**, 1-10.
- Fuller, BG; Lampson, MA; Foley, EA; Rosasco-Nitcher, S; Le, KV; Tobelmann, P; Brautigan, DL; Stukenberg, PT und Kapoor, TM (2008). Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature*, **453**, 1132-1136.
- Fung, TK; Ma, HT und Poon, RY (2007). Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol Biol Cell*, **18**, 1861-1873.
- Gadde, S und Heald, R (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol*, **14**, R797-805.
- Gadea, BB und Ruderman, JV (2005). Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in Xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell*, **16**, 1305-1318.
- Gadea, BB und Ruderman, JV (2006). Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4493-4498.
- Galletti, E; Magnani, M; Renzulli, ML und Botta, M (2007). Paclitaxel And Docetaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Development of New Generation Taxanes. *ChemMedChem*, **2**, 920-942.
- Ganem, NJ und Compton, DA (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J Cell Biol*, **166**, 473-478.

- Ganem, NJ; Godinho, SA und Pellman, D (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*, **460**, 278-282.
- Gascoigne, KE und Taylor, SS (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell*, **14**, 111-122.
- Gassmann, R; Carvalho, A; Henzing, AJ; Ruchaud, S; Hudson, DF; Honda, R; Nigg, EA; Gerloff, DL und Earnshaw, WC (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol*, **166**, 179-191.
- Geney, R; Chen, J und Ojima, I (2005). Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. *Med Chem*, **1**, 125-139.
- Gerth, K; Bedorf, N; Hofle, G; Irschik, H und Reichenbach, H (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, **49**, 560-563.
- Giet, R und Glover, DM (2001). Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*, **152**, 669-682.
- Giet, R; McLean, D; Descamps, S; Lee, MJ; Raff, JW; Prigent, C und Glover, DM (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol*, **156**, 437-451.
- Giet, R und Prigent, C (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*, **112 (Pt 21)**, 3591-3601.
- Giet, R und Prigent, C (2000). The *Xenopus laevis* aurora/Ipl1p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Exp Cell Res*, **258**, 145-151.
- Giet, R; Uzbekov, R; Cubizolles, F; LeGeullec, K und Prigent, C (1999). The *Xenopus laevis* Aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XI Eg5. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15005-15003.
- Gimenez-Abian, JF; Sumara, I; Hirota, T; Hauf, S; Gerlich, D; de la Torre, C; Ellenberg, J und Peters, JM (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol*, **14**, 1187-1193.
- Girdler, F; Sessa, F; Patercoli, S; Villa, F; Musacchio, A und Taylor, SS (2008). Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem Biol*, **15**, 552-562.
- Glotzer, M; Murray, AW und Kirschner, MW (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Glover, D; Leibowitz, M; McLean, D und Parry, H (1995). Mutations in *Aurora* prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, **81**, 95-105.
- 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, RM; Mundt, KE; Fry, AM und Nigg, EA (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.*, **129**, 1617-1628.

- Golsteyn, RM; Schultz, SJ; Bartek, J; Ziemiecki, A; Ried, T und Nigg, EA (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.
- Gong, D; Pomerening, JR; Myers, JW; Gustavsson, C; Jones, JT; Hahn, AT; Meyer, T und Ferrell, JE, Jr. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol*, **17**, 85-91.
- Gorbsky, GJ (2004). Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B. *Curr Biol*, **14**, R346-348.
- Gorbsky, GJ; Chen, RW und Murray, AW (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells induces premature anaphase. *J. Cell Biol.*, **141**, 1193-1205.
- Goto, H; Yasui, Y; Kawajiri, A; Nigg, EA; Terada, Y; Tatsuka, M; Nagata, K und Inagaki, M (2003). Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem*, **278**, 8526-8530.
- Goto, H; Yasui, Y; Nigg, EA und Inagaki, M (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells*, **7**, 11-17.
- Grego, S; Cantillana, V und Salmon, ED (2001). Microtubule treadmilling in vitro investigated by fluorescence speckle and confocal microscopy. *Biophys J*, **81**, 66-78.
- Groen, AC; Cameron, LA; Coughlin, M; Miyamoto, DT; Mitchison, TJ und Ohi, R (2004). XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. *Curr Biol*, **14**, 1801-1811.
- Gruss, OJ; Wittmann, M; Yokoyama, H; Pepperkok, R; Kufer, T; Sillje, H; Karsenti, E; Mattaj, IW und Vernos, I (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol*, **4**, 871-879.
- Guardavaccaro, D; Frescas, D; Dorrello, NV; Peschiaroli, A; Multani, AS; Cardozo, T; Lasorella, A; Iavarone, A; Chang, S; Hernando, E und Pagano, M (2008). Control of chromosome stability by the beta-TrCP-REST-Mad2 axis. *Nature*, **452**, 365-369.
- Guse, A; Mishima, M und Glotzer, M (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol*, **15**, 778-786.
- Hagting, A; Den Elzen, N; Vodermaier, HC; Waizenegger, IC; Peters, JM und Pines, J (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol*, **157**, 1125-1137.
- Hannak, E; Kirkham, M; Hyman, AA und Oegema, K (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **155**, 1109-1116.
- Hansemann, D (1890). Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virschows Arch. Pathol. Anat.*, **119**, 299-326.
- Hansen, DV; Loktev, AV; Ban, KH und Jackson, PK (2004). Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell*, **15**, 5623-5634.

- Haoudi, A; Daniels, RC; Wong, E; Kupfer, G und Semmes, OJ (2003). Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J Biol Chem*, **278**, 37736-37744.
- Hardwick, C; Hoare, K; Owens, R; Hohn, HP; Hook, M; Moore, D; Cripps, V; Austen, L; Nance, DM und Turley, EA (1992). Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol*, **117**, 1343-1350.
- Hardwick, KG; Johnston, RC; Smith, DL und Murray, AW (2000). MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol*, **148**, 871-882.
- Hauf, S; Cole, RW; LaTerra, S; Zimmer, C; Schnapp, G; Walter, R; Heckel, A; van Meel, J; Rieder, CL und Peters, JM (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, **161**, 281-294.
- Hayden, JH; Bowser, SS und Rieder, CL (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol*, **111**, 1039-1045.
- He, X; Rines, DR; Espelin, CW und Sorger, PK (2001). Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell*, **106**, 195-206.
- Hernando, E; Nahle, Z; Juan, G; Diaz-Rodriguez, E; Alaminos, M; Hemann, M; Michel, L; Mittal, V; Gerald, W; Benezra, R; Lowe, SW und Cordon-Cardo, C (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*, **430**, 797-802.
- Hernando, E; Orlow, I; Liberal, V; Nohales, G; Benezra, R und Cordon-Cardo, C (2001). Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer*, **95**, 223-227.
- Hinchcliffe, EH; Li, C; Thompson, EA; Maller, JL und Sluder, G (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science*, **283**, 851-854.
- Hirao, A; Cheung, A; Duncan, G; Girard, PM; Elia, AJ; Wakeham, A; Okada, H; Sarkissian, T; Wong, JA; Sakai, T; De Stanchina, E; Bristow, RG; Suda, T; Lowe, SW; Jeggo, PA; Elledge, SJ und Mak, TW (2002). Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol*, **22**, 6521-6532.
- Hirao, A; Kong, YY; Matsuoka, S; Wakeham, A; Ruland, J; Yoshida, H; Liu, D; Elledge, SJ und Mak, TW (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-1827.
- Hirokawa, N (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519-526.
- Hirota, T; Kunitoku, N; Sasayama, T; Marumoto, T; Zhang, D; Nitta, M; Hatakeyama, K und Saya, H (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, **114**, 585-598.

- Hirota, T; Lipp, JJ; Toh, BH und Peters, JM (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, **438**, 1176-1180.
- Holland, AJ und Cleveland, DW (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 478-487.
- Honda, R; Korner, R und Nigg, EA (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell*, **14**, 3325-3341.
- Howard, J und Hyman, AA (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 31-35.
- Howell, BJ; McEwen, BF; Canman, JC; Hoffman, DB; Farrar, EM; Rieder, CL und Salmon, ED (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol*, **155**, 1159-1172.
- Hoyt, MA; Totis, L und Roberts, BT (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, **66**, 507-517.
- Hsu, JY; Sun, ZW; Li, X; Reuben, M; Tatchell, K; Bishop, DK; Grushcow, JM; Brame, CJ; Caldwell, JA; Hunt, DF; Lin, R; Smith, MM und Allis, CD (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.
- Hsu, LC; Doan, TP und White, RL (2001). Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1. *Cancer Res*, **61**, 7713-7718.
- Hsu, LC und White, RL (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12983-12988.
- Huang, HC; Shi, J; Orth, JD und Mitchison, TJ (2009). Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell*, **16**, 347-358.
- Hunt, T; Luca, FC und Ruderman, JV (1992). The requirements for protein synthesis, and the control of cyclin destruction in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J. Cell Biol.*, **116**, 707-724.
- Iliakis, G; Wang, Y; Guan, J und Wang, H (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, **22**, 5834-5847.
- Indjeian, VB und Murray, AW (2007). Budding yeast mitotic chromosomes have an intrinsic bias to biorient on the spindle. *Curr Biol*, **17**, 1837-1846.
- Inoue, H; Nojima, H und Okayama, H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Iwaizumi, M; Shinmura, K; Mori, H; Yamada, H; Suzuki, M; Kitayama, Y; Igarashi, H; Nakamura, T; Suzuki, H; Watanabe, Y; Hishida, A; Ikuma, M und Sugimura, H (2009). Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut*, **58**, 249-260.
- Iwanaga, Y; Chi, YH; Miyazato, A; Sheleg, S; Haller, K; Peloponese, JM, Jr.; Li, Y; Ward, JM; Benzra, R und Jeang, KT (2007). Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. *Cancer Res*, **67**, 160-166.

- Jablonski, SA; Chan, GK; Cooke, CA; Earnshaw, WC und Yen, TJ (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma*, **107**, 386-396.
- Jackman, M; Lindon, C; Nigg, EA und Pines, J (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*, **5**, 143-148.
- Jallepalli, PV; Lengauer, C; Vogelstein, B und Bunz, F (2003). The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem*, **278**, 20475-20479.
- Jallepalli, PV; Waizenegger, IC; Bunz, F; Langer, S; Speicher, MR; Peters, JM; Kinzler, KW; Vogelstein, B und Lengauer, C (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*, **105**, 445-457.
- Jeganathan, K; Malureanu, L; Baker, DJ; Abraham, SC und van Deursen, JM (2007). Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol*, **179**, 255-267.
- Jelluma, N; Brenkman, AB; van den Broek, NJ; Cruijsen, CW; van Osch, MH; Lens, SM; Medema, RH und Kops, GJ (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*, **132**, 233-246.
- Jiang, Y; Zhang, Y; Lees, E und Seghezzi, W (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene*, **22**, 8293-8301.
- Jin, J; Ang, XL; Ye, X; Livingstone, M und Harper, JW (2008). Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem*, **283**, 19322-19328.
- Johnson, DG und Walker, CL (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 295-312.
- Johnson, IS; Wright, HF; Svoboda, GH und Vlantis, J (1960). Antitumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. I. Vincalukoblastine and leurosine. *Cancer Res*, **20**, 1016-1022.
- Jordan, MA; Wendell, K; Gardiner, S; Derry, WB; Copp, H und Wilson, L (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*, **56**, 816-825.
- Jordan, MA und Wilson, L (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, **4**, 253-265.
- Joukov, V; Groen, AC; Prokhorova, T; Gerson, R; White, E; Rodriguez, A; Walter, JC und Livingston, DM (2006). The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell*, **127**, 539-552.
- Kaestner, P; Stolz, A und Bastians, H (2009). Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, **8**, 2046-2056.
- Kaitna, S; Mendoza, M; Jantsch-Plunger, V und Glotzer, M (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol*, **10**, 1172-1181.

- Kaitna, S; Pasierbek, P; Jantsch, M; Loidl, J und Glotzer, M (2002). The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis. *Curr Biol*, **12**, 798-812.
- Kalitsis, P; Earle, E; Fowler, KJ und Choo, KH (2000). Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev*, **14**, 2277-2282.
- Kallio, MJ; McClelland, ML; Stukenberg, PT und Gorbsky, GJ (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr Biol*, **12**, 900-905.
- Kanda, T; Sullivan, KF und Wahl, GM (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*, **8**, 377-385.
- Kapoor, TM; Mayer, TU; Coughlin, ML und Mitchison, TJ (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol*, **150**, 975-988.
- Kasai, T; Iwanaga, Y; Iha, H und Jeang, KT (2002). Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J Biol Chem*, **277**, 5187-5193.
- Kastan, MB und Bartek, J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**, 316-323.
- Kawabe, T (2004). G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*, **3**, 513-519.
- Kawajiri, A; Yasui, Y; Goto, H; Tatsuka, M; Takahashi, M; Nagata, K und Inagaki, M (2003). Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. *Mol Biol Cell*, **14**, 1489-1500.
- Keen, N und Taylor, SS (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*, **4**, 927-936.
- Kelly, AE; Sampath, SC; Maniar, TA; Woo, EM; Chait, BT und Funabiki, H (2007). Chromosomal enrichment and activation of the aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev Cell*, **12**, 31-43.
- Kienitz, A; Vogel, C; Morales, I; Muller, R und Bastians, H (2005). Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene*, **24**, 4301-4310.
- Kim, J-h; Kang, J-s und Chan, CSM (1999). Sli15 associates with the Ip11 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **145**, 1381-1394.
- Kim, SS; Cao, L; Li, C; Xu, X; Huber, LJ; Chodosh, LA und Deng, CX (2004). Uterus hyperplasia and increased carcinogen-induced tumorigenesis in mice carrying a targeted mutation of the Chk2 phosphorylation site in Brca1. *Mol Cell Biol*, **24**, 9498-9507.
- Kimmins, S; Crosio, C; Kotaja, N; Hirayama, J; Monaco, L; Hoog, C; van Duin, M; Gossen, JA und Sassone-Corsi, P (2007). Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol*, **21**, 726-739.

- King, EM; Rachidi, N; Morrice, N; Hardwick, KG und Stark, MJ (2007). Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes Dev*, **21**, 1163-1168.
- King, JB; Gross, J; Lovly, CM; Rohrs, H; Piwnica-Worms, H und Townsend, RR (2006). Accurate mass-driven analysis for the characterization of protein phosphorylation. Study of the human Chk2 protein kinase. *Anal Chem*, **78**, 2171-2181.
- Kinoshita, K; Noetzel, TL; Pelletier, L; Mechtler, K; Drechsel, DN; Schwager, A; Lee, M; Raff, JW und Hyman, AA (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol*, **170**, 1047-1055.
- Kitajima, TS; Hauf, S; Ohsugi, M; Yamamoto, T und Watanabe, Y (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol*, **15**, 353-359.
- Kleibl, Z; Havranek, O; Hlavata, I; Novotny, J; Sevcik, J; Pohlreich, P und Soucek, P (2009). The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population. *Eur J Cancer*, **45**, 618-624.
- Klein, UR; Nigg, EA und Gruneberg, U (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell*, **17**, 2547-2558.
- Kline-Smith, SL; Khodjakov, A; Hergert, P und Walczak, CE (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell*, **15**, 1146-1159.
- Knowlton, AL; Lan, W und Stukenberg, PT (2006). Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr Biol*, **16**, 1705-1710.
- Koepp, DM; Harper, JW und Elledge, SJ (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, **97**, 431-434.
- Koepp, DM; Schaefer, LK; Ye, X; Keyomarsi, K; Chu, C; Harper, JW und Elledge, SJ (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science*, **294**, 173-177.
- Koffa, MD; Casanova, CM; Santarella, R; Kocher, T; Wilm, M und Mattaj, IW (2006). HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation. *Curr Biol*, **16**, 743-754.
- Kohn, EA; Yoo, CJ und Eastman, A (2003). The protein kinase C inhibitor Go6976 is a potent inhibitor of DNA damage-induced S and G2 cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, **63**, 31-35.
- Kops, GJ; Foltz, DR und Cleveland, DW (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8699-8704.
- Kraft, C; Herzog, F; Gieffers, C; Mechtler, K; Hagting, A; Pines, J und Peters, JM (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J*, **22**, 6598-6609.
- Kufer, TA; Sillje, HH; Korner, R; Gruss, OJ; Meraldi, P und Nigg, EA (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*, **158**, 617-623.

- Kwak, EL; Kim, S; Zhang, J; Cardiff, RD; Schmidt, EV und Haber, DA (2006). Mammary tumorigenesis following transgenic expression of a dominant negative CHK2 mutant. *Cancer Res*, **66**, 1923-1928.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lampson, MA und Kapoor, TM (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol*, **7**, 93-98.
- Lane, H und Nigg, E (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.
- Larkin, JM und Kaye, SB (2006). Etoposides in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, **15**, 691-702.
- Lee, CH und Chung, JH (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *J Biol Chem*, **276**, 30537-30541.
- Lee, JH und Paull, TT (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, **26**, 7741-7748.
- Lee, JS; Collins, KM; Brown, AL; Lee, CH und Chung, JH (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, **404**, 201-204.
- Lee, S und Schmitt, CA (2003). Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 90-96.
- Lengauer, C; Kinzler, KW und Vogelstein, B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, **386**, 623-627.
- Lengauer, C; Kinzler, KW und Vogelstein, B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649.
- Lens, SM; Rodriguez, JA; Vader, G; Span, SW; Giaccone, G und Medema, RH (2006). Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol Biol Cell*, **17**, 1897-1909.
- Lens, SM; Wolthuis, RM; Klompmaker, R; Kauw, J; Agami, R; Brummelkamp, T; Kops, G und Medema, RH (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *Embo J*, **22**, 2934-2947.
- LeRoy, PJ; Hunter, JJ; Hoar, KM; Burke, KE; Shinde, V; Ruan, J; Bowman, D; Galvin, K und Ecsedy, JA (2007). Localization of human TACC3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on Ser558 by Aurora A: a novel pharmacodynamic method for measuring Aurora A activity. *Cancer Res*, **67**, 5362-5370.
- Levesque, AA und Compton, DA (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J Cell Biol*, **154**, 1135-1146.
- Li, F; Ambrosini, G; Chu, EY; Plescia, J; Tognin, S; Marchisio, PC und Altieri, DC (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-584.

- Li, J und Stern, DF (2005). DNA damage regulates Chk2 association with chromatin. *J Biol Chem*, **280**, 37948-37956.
- Li, JJ und Li, SA (2006). Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther*, **111**, 974-984.
- Li, R und Murray, AW (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, **66**, 519-531.
- Li, Y und Benezra, R (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*, **274**, 246-248.
- Li, Y; Gorbea, C; Mahaffey, D; Rechsteiner, M und Benezra, R (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12431-12436.
- Lindqvist, A; Kallstrom, H; Lundgren, A; Barsoum, E und Rosenthal, CK (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol*, **171**, 35-45.
- Lipp, JJ; Hirota, T; Poser, I und Peters, JM (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci*, **120**, 1245-1255.
- Littlepage, LE und Ruderman, JV (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*, **16**, 2274-2285.
- Liu, D; Vader, G; Vromans, MJ; Lampson, MA und Lens, SM (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*, **323**, 1350-1353.
- Liu, Q; Guntuku, S; Cui, XS; Matsuoka, S; Cortez, D; Tamai, K; Luo, G; Carattini-Rivera, S; DeMayo, F; Bradley, A; Donehower, LA und Elledge, SJ (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, **14**, 1448-1459.
- Liu, Q und Ruderman, JV (2006). Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5811-5816.
- Lolli, G und Johnson, LN (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle*, **4**, 572-577.
- Loncarek, J; Kisurina-Evgenieva, O; Vinogradova, T; Hergert, P; La Terra, S; Kapoor, TM und Khodjakov, A (2007). The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces. *Nature*, **450**, 745-749.
- Lukasiewicz, KB und Lingle, WL (2009). Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environ Mol Mutagen*, **50**, 602-619.
- Luo, X; Tang, Z; Rizo, J und Yu, H (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell*, **9**, 59-71.
- Macurek, L; Lindqvist, A; Lim, D; Lampson, MA; Klompmaker, R; Freire, R; Clouin, C; Taylor, SS; Yaffe, MB und Medema, RH (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, **455**, 119-123.

Maddox, PS; Portier, N; Desai, A und Oegema, K (2006). Molecular analysis of mitotic chromosome condensation using a quantitative time-resolved fluorescence microscopy assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15097-15102.

Maiato, H und Sunkel, CE (2004). Kinetochore-microtubule interactions during cell division. *Chromosome Res*, **12**, 585-597.

Maliga, Z; Kapoor, TM und Mitchison, TJ (2002). Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol*, **9**, 989-996.

Malumbres, M und Barbacid, M (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*, **30**, 630-641.

Manfredi, MG; Ecsedy, JA; Meetze, KA; Balani, SK; Burenkova, O; Chen, W; Galvin, KM; Hoar, KM; Huck, JJ; LeRoy, PJ; Ray, ET; Sells, TB; Stringer, B; Stroud, SG; Vos, TJ; Weatherhead, GS; Wysong, DR; Zhang, M; Bolen, JB und Claiborne, CF (2007). Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4106-4111.

Manning, AL; Ganem, NJ; Bakhoun, SF; Wagenbach, M; Wordeman, L und Compton, DA (2007). The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell*, **18**, 2970-2979.

Mao, Y; Abrieu, A und Cleveland, DW (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell*, **114**, 87-98.

Margolis, RL und Wilson, L (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays*, **20**, 830-836.

Marti, A; Wirbelauer, C; Scheffner, M und Krek, W (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nature Cell Biol.*, **1**, 14-19.

Martiny-Baron, G; Kazanietz, MG; Mischak, H; Blumberg, PM; Kochs, G; Hug, H; Marme, D und Schachtele, C (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem*, **268**, 9194-9197.

Marumoto, T; Zhang, D und Saya, H (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer*, **5**, 42-50.

Masuda, A; Maeno, K; Nakagawa, T; Saito, H und Takahashi, T (2003). Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancers. *Am J Pathol*, **163**, 1109-1116.

Masuda, A und Takahashi, T (2002). Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene*, **21**, 6884-6897.

Matsuoka, S; Huang, M und Elledge, SJ (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, **282**, 1893-1897.

Matsuoka, S; Nakagawa, T; Masuda, A; Haruki, N; Elledge, SJ und Takahashi, T (2001). Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer. *Cancer Res*, **61**, 5362-5365.

Maxwell, CA; Keats, JJ; Crainie, M; Sun, X; Yen, T; Shibuya, E; Hendzel, M; Chan, G und Pilarski, LM (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell*, **14**, 2262-2276.

Mayer, TU; Kapoor, TM; Haggarty, SJ; King, RW; Schreiber, SL und Mitchison, TJ (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, **286**, 971-974.

McGowan, CH (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays*, **24**, 502-511.

McGuinness, BE; Hirota, T; Kudo, NR; Peters, JM und Nasmyth, K (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol*, **3**, e86.

Mehlhop, P und Gardner, AL (1982). A rapid field technique for preparing ant chromosomes for karyotypic analysis. *Stain Technol*, **57**, 99-101.

Meijers-Heijboer, H; Wijnen, J; Vasen, H; Wasielewski, M; Wagner, A; Hollestelle, A; Elstrodt, F; van den Bos, R; de Snoo, A; Fat, GT; Brekelmans, C; Jagmohan, S; Franken, P; Verkuijlen, P; van den Ouweland, A; Chapman, P; Tops, C; Moslein, G; Burn, J; Lynch, H; Klijn, J; Fodde, R und Schutte, M (2003). The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet*, **72**, 1308-1314.

Melchionna, R; Chen, XB; Blasina, A und McGowan, CH (2000). Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, **2**, 762-765.

Meraldi, P; Draviam, VM und Sorger, PK (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell*, **7**, 45-60.

Meraldi, P; Honda, R und Nigg, EA (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 29-36.

Meraldi, P und Sorger, PK (2005). A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *Embo J*, **24**, 1621-1633.

Michaelis, C; Ciosk, R und Nasmyth, K (1997). Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, **91**, 35-45.

Michel, L; Diaz-Rodriguez, E; Narayan, G; Hernando, E; Murty, VV und Benezra, R (2004). Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4459-4464.

Michel, LS; Liberal, V; Chatterjee, A; Kirchwegger, R; Pasche, B; Gerald, W; Dobles, M; Sorger, PK; Murty, VV und Benezra, R (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*, **409**, 355-359.

Miki, Y; Swensen, J; Shattuck-Eidens, D; Futreal, PA; Harshman, K; Tavtigian, S; Liu, Q; Cochran, C; Bennett, LM; Ding, W und et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**, 66-71.

Miller, CW; Ikezoe, T; Krug, U; Hofmann, WK; Tavor, S; Vegesna, V; Tsukasaki, K; Takeuchi, S und Koeffler, HP (2002). Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 17-21.

- Mills, GB; Schmandt, R; McGill, M; Amendola, A; Hill, M; Jacobs, K; May, C; Rodricks, AM; Campbell, S und Hogg, D (1992). Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem*, **267**, 16000-16006.
- Minoshima, Y; Kawashima, T; Hirose, K; Tonozuka, Y; Kawajiri, A; Bao, YC; Deng, X; Tatsuka, M; Narumiya, S; May, WS, Jr.; Nosaka, T; Semba, K; Inoue, T; Satoh, T; Inagaki, M und Kitamura, T (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*, **4**, 549-560.
- Mitchison, T und Kirschner, M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237-242.
- Miyoshi, Y; Iwao, K; Egawa, C und Noguchi, S (2001). Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer*, **92**, 370-373.
- Moasser, MM; Sepp-Lorenzino, L; Kohl, NE; Oliff, A; Balog, A; Su, DS; Danishefsky, SJ und Rosen, N (1998). Farnesyl transferase inhibitors cause enhanced mitotic sensitivity to taxol and epothilones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1369-1374.
- Mollinedo, F und Gajate, C (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, **8**, 413-450.
- Moore, A und Wordeman, L (2004). C-terminus of mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) inhibits its lattice-stimulated ATPase activity. *Biochem J*, **383**, 227-235.
- Moore, A und Wordeman, L (2004). The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol*, **14**, 537-546.
- Mori, D; Yano, Y; Toyo-oka, K; Yoshida, N; Yamada, M; Muramatsu, M; Zhang, D; Saya, H; Toyoshima, YY; Kinoshita, K; Wynshaw-Boris, A und Hirotsune, S (2007). NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol*, **27**, 352-367.
- Moritz, M; Braunfeld, MB; Guenebaut, V; Heuser, J und Agard, DA (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*, **2**, 365-370.
- Moshe, Y; Boulaire, J; Pagano, M und Hershko, A (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7937-7942.
- Motwani, M; Li, X und Schwartz, GK (2000). Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, prevents spindle inhibitor-induced endoreduplication in human cancer cells. *Clin Cancer Res*, **6**, 924-932.
- Mountain, V; Simerly, C; Howard, L; Ando, A; Schatten, G und Compton, DA (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol*, **147**, 351-366.
- Mukherji, M; Bell, R; Supekova, L; Wang, Y; Orth, AP; Batalov, S; Miraglia, L; Huesken, D; Lange, J; Martin, C; Sahasrabudhe, S; Reinhardt, M; Natt, F; Hall, J; Mickanin, C; Labow, M; Chanda, SK; Cho, CY und Schultz, PG (2006). Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14819-14824.

- Mundt, KE; Golsteyn, RM; Lane, HA und Nigg, EA (1997). On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 377-385.
- Murata-Hori, M; Fumoto, K; Fukuta, Y; Iwasaki, T; Kikuchi, A; Tatsuka, M und Hosoya, H (2000). Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J Biochem*, **128**, 903-907.
- Murata-Hori, M und Wang, YL (2002). The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Curr Biol*, **12**, 894-899.
- Murnion, ME; Adams, RR; Callister, DM; Allis, CD; Earnshaw, WC und Swedlow, JR (2001). Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem*, **276**, 26656-26665.
- Murray, AW (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, **116**, 221-234.
- Musacchio, A und Salmon, ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 379-393.
- Nakayama, K (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays*, **20**, 1020-1029.
- Nakayama, KI und Nakayama, K (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 323-333.
- Nasmyth, K; Peters, JM und Uhlmann, F (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, **288**, 1379-1385.
- Nettles, JH; Li, H; Cornett, B; Krahn, JM; Snyder, JP und Downing, KH (2004). The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science*, **305**, 866-869.
- Newcomb, EW (2004). Flavopiridol: pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity. *Anticancer Drugs*, **15**, 411-419.
- Nigg, EA (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Nishimura, Y und Yonemura, S (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci*, **119**, 104-114.
- Nomoto, S; Haruki, N; Takahashi, T; Masuda, A; Koshikawa, T; Fujii, Y und Osada, H (1999). Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene*, **18**, 7180-7183.
- Nonaka, N; Kitajima, T; Yokobayashi, S; Xiao, G; Yamamoto, M; Grewal, SI und Watanabe, Y (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, **4**, 89-93.
- Noton, E und Diffley, JF (2000). CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell*, **5**, 85-95.
- O'Neill, T; Giarratani, L; Chen, P; Iyer, L; Lee, CH; Bobiak, M; Kanai, F; Zhou, BB; Chung, JH und Rathbun, GA (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem*, **277**, 16102-16115.

- Ohashi, S; Sakashita, G; Ban, R; Nagasawa, M; Matsuzaki, H; Murata, Y; Taniguchi, H; Shima, H; Furukawa, K und Urano, T (2006). Phospho-regulation of human protein kinase Aurora-A: analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies. *Oncogene*, **25**, 7691-7702.
- Ohi, R; Sapra, T; Howard, J und Mitchison, TJ (2004). Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **15**, 2895-2906.
- Okada, H und Mak, TW (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, **4**, 592-603.
- Oshimori, N; Ohsugi, M und Yamamoto, T (2006). The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat Cell Biol*, **8**, 1095-1101.
- Ouchi, M; Fujiuchi, N; Sasai, K; Katayama, H; Minamishima, YA; Ongusaha, PP; Deng, C; Sen, S; Lee, SW und Ouchi, T (2004). BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem*, **279**, 19643-19648.
- Pan, J und Yeung, SC (2005). Recent advances in understanding the antineoplastic mechanisms of farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res*, **65**, 9109-9112.
- Parrilla-Castellar, ER; Arlander, SJ und Karnitz, L (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1009-1014.
- Parvin, JD (2009). The BRCA1-dependent ubiquitin ligase, gamma-tubulin, and centrosomes. *Environ Mol Mutagen*, **50**, 649-653.
- Peng, CY; Graves, PR; Thoma, RS; Wu, Z; Shaw, AS und Piwnica-Worms, H (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
- Percy, MJ; Myrie, KA; Neeley, CK; Azim, JN; Ethier, SP und Petty, EM (2000). Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 356-362.
- Perez de Castro, I; de Carcer, G und Malumbres, M (2007). A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis*, **28**, 899-912.
- Peset, I und Vernos, I (2008). The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. *Trends Cell Biol*, **18**, 379-388.
- Petermann, E und Caldecott, KW (2006). Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell Cycle*, **5**, 2203-2209.
- Peters, J-M (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 759-768.
- Peters, JM (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Peters, JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 644-656.

- Peters, JM; Tedeschi, A und Schmitz, J (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev*, **22**, 3089-3114.
- Petersen, I; Kotb, WF; Friedrich, KH; Schluns, K; Bocking, A und Dietel, M (2009). Core classification of lung cancer: Correlating nuclear size and mitoses with ploidy and clinicopathological parameters. *Lung Cancer*.
- Petretti, C; Savoian, M; Montembault, E; Glover, DM; Prigent, C und Giet, R (2006). The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep*, **7**, 418-424.
- Petronczki, M; Lenart, P und Peters, JM (2008). Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell*, **14**, 646-659.
- Pfleger, CM und Kirschner, MW (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev*, **14**, 655-665.
- Pickart, CM und Eddins, MJ (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 55-72.
- Piehl, M; Tulu, US; Wadsworth, P und Cassimeris, L (2004). Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1584-1588.
- Piekny, A; Werner, M und Glotzer, M (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol*, **15**, 651-658.
- Pines, J (2006). Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol*, **16**, 55-63.
- Pinsky, BA und Biggins, S (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol*, **15**, 486-493.
- Pinsky, BA; Kung, C; Shokat, KM und Biggins, S (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol*, **8**, 78-83.
- Pray, TR; Parlati, F; Huang, J; Wong, BR; Payan, DG; Bennett, MK; Issakani, SD; Molineaux, S und Demo, SD (2002). Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat*, **5**, 249-258.
- Przewloka, MR und Glover, DM (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet*, **43**, 439-465.
- Pujana, MA; Han, JD; Starita, LM; Stevens, KN; Tewari, M; Ahn, JS; Rennert, G; Moreno, V; Kirchhoff, T; Gold, B; Assmann, V; Elshamy, WM; Rual, JF; Levine, D; Rozek, LS; Gelman, RS; Gonsky, KC; Greenberg, RA; Sobhian, B; Bertin, N; Venkatesan, K; Ayivi-Guedehoussou, N; Sole, X; Hernandez, P; Lazaro, C; Nathanson, KL; Weber, BL; Cusick, ME; Hill, DE; Offit, K; Livingston, DM; Gruber, SB; Parvin, JD und Vidal, M (2007). Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet*, **39**, 1338-1349.
- Rajagopalan, H; Jallepalli, PV; Rago, C; Velculescu, VE; Kinzler, KW; Vogelstein, B und Lengauer, C (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, **428**, 77-81.
- Rajagopalan, H und Lengauer, C (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature*, **432**, 338-341.

- Reed, SI (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 855-864.
- Ricke, RM; van Ree, JH und van Deursen, JM (2008). Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet*, **24**, 457-466.
- Rieder, C; Cole, R; Khodjakov, A und Sluder, G (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.*, **130**, 941-948.
- Rieder, CL; Schultz, A; Cole, R und Sluder, G (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Bio.*, **127**, 1301-1320.
- Rogakou, EP; Boon, C; Redon, C und Bonner, WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rubin, CI und Atweh, GF (2004). The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem*, **93**, 242-250.
- Ruchaud, S; Carmena, M und Earnshaw, WC (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 798-812.
- Saeki, A; Tamura, S; Ito, N; Kiso, S; Matsuda, Y; Yabuuchi, I; Kawata, S und Matsuzawa, Y (2002). Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **94**, 2047-2054.
- Sakuno, T; Tada, K und Watanabe, Y (2009). Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature*, **458**, 852-858.
- Salmon, ED; Cimini, D; Cameron, LA und DeLuca, JG (2005). Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **360**, 553-568.
- Sampath, SC; Ohi, R; Leismann, O; Salic, A; Pozniakovski, A und Funabiki, H (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, **118**, 187-202.
- Sanchez, Y; Wong, C; Thoma, RS; Richman, R; Wu, Z; Piwnica-Worms, H und Elledge, SJ (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497-1501.
- Sankaran, S; Crone, DE; Palazzo, RE und Parvin, JD (2007). Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res*, **67**, 11186-11194.
- Sankaran, S und Parvin, JD (2006). Centrosome function in normal and tumor cells. *J Cell Biochem*, **99**, 1240-1250.
- Sasai, K; Katayama, H; Stenoiien, DL; Fujii, S; Honda, R; Kimura, M; Okano, Y; Tatsuka, M; Suzuki, F; Nigg, EA; Earnshaw, WC; Brinkley, WR und Sen, S (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **59**, 249-263.

- Satinover, DL; Brautigan, DL und Stukenberg, PT (2006). Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in *Xenopus* early embryonic cell cycles. *Cell Cycle*, **5**, 2268-2274.
- Saxton, WM; Stemple, DL; Leslie, RJ; Salmon, ED; Zavortink, M und McIntosh, JR (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J Cell Biol*, **99**, 2175-2186.
- Schatz, CA; Santarella, R; Hoenger, A; Karsenti, E; Mattaj, IW; Gruss, OJ und Carazo-Salas, RE (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J*, **22**, 2060-2070.
- Schmidt, M und Bastians, H (2007). Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat*, **10**, 162-181.
- Schuyler, SC und Pellman, D (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell*, **105**, 421-424.
- Schwartzman, JM; Sotillo, R und Benezra, R (2010). Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer*, **10**, 102-115.
- Schwarz, JK; Lovly, CM und Piwnicka-Worms, H (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res*, **1**, 598-609.
- Seki, A; Coppinger, JA; Du, H; Jang, CY; Yates, JR, 3rd und Fang, G (2008). Plk1- and beta-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. *J Cell Biol*, **181**, 65-78.
- Seki, A; Coppinger, JA; Jang, CY; Yates, JR und Fang, G (2008). Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*, **320**, 1655-1658.
- Seo, GJ; Kim, SE; Lee, YM; Lee, JW; Lee, JR; Hahn, MJ und Kim, ST (2003). Determination of substrate specificity and putative substrates of Chk2 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 339-343.
- Severson, AF; Hamill, DR; Carter, JC; Schumacher, J und Bowerman, B (2000). The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol*, **10**, 1162-1171.
- Shannon, KB und Salmon, ED (2002). Chromosome dynamics: new light on Aurora B kinase function. *Curr Biol*, **12**, R458-460.
- Shapiro, GI (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*, **24**, 1770-1783.
- Sherr, CJ und Roberts, JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shichiri, M; Yoshinaga, K; Hisatomi, H; Sugihara, K und Hirata, Y (2002). Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res*, **62**, 13-17.
- Shieh, SY; Ahn, J; Tamai, K; Taya, Y und Prives, C (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
- Shiloh, Y (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 71-77.

Shiloh, Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.

Shiloh, Y (2003). ATM: ready, set, go. *Cell Cycle*, **2**, 116-117.

Shirane, M; Harumiya, Y; Ishida, N; Hirai, A; Miyamoto, C; Hatakeyama, S; Nakayama, K und Kitagawa, M (1999). Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem*, **274**, 13886-13893.

Silkworth, WT; Nardi, IK; Scholl, LM und Cimini, D (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS One*, **4**, e6564.

Sironi, L; Mapelli, M; Knapp, S; De Antoni, A; Jeang, KT und Musacchio, A (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *Embo J*, **21**, 2496-2506.

Skoufias, DA; Andreassen, PR; Lacroix, FB; Wilson, L und Margolis, RL (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4492-4497.

Song, L; Li, D; Liu, R; Zhou, H; Chen, J und Huang, X (2007). Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger. *Cell Biol Int*, **31**, 1184-1190.

Sotillo, R; Hernando, E; Diaz-Rodriguez, E; Teruya-Feldstein, J; Cordon-Cardo, C; Lowe, SW und Benezra, R (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*, **11**, 9-23.

Squire, CJ; Dickson, JM; Ivanovic, I und Baker, EN (2005). Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation. *Structure*, **13**, 541-550.

Starita, LM; Machida, Y; Sankaran, S; Elias, JE; Griffin, K; Schlegel, BP; Gygi, SP und Parvin, JD (2004). BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol Cell Biol*, **24**, 8457-8466.

Steigemann, P; Wurzenberger, C; Schmitz, MH; Held, M; Guizetti, J; Maar, S und Gerlich, DW (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, **136**, 473-484.

Stevens, C; Smith, L und La Thangue, NB (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, **5**, 401-409.

Stewart, S und Fang, G (2005). Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res*, **65**, 8730-8735.

Stolz, A; Vogel, C; Schneider, V; Ertych, N; Kienitz, A; Yu, H und Bastians, H (2009). Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Res*, **69**, 3874-3883.

Stolz, A; Ertych, N; Kienitz, A; Vogel, C; Schneider, V; Fritz, B; Jacob, R; Dittmar, G; Weichert, W; Petersen, I und Bastians, H (2010). The *CHK2-BRCA1* tumor suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cell. *Nat Cell Biol*, im Druck.

- Strohmaier, H; Spruck, CH; Kaiser, P; Won, KA; Sangfelt, O und Reed, SI (2001). Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*, **413**, 316-322.
- Stucke, VM; Sillje, HH; Arnaud, L und Nigg, EA (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *Embo J*, **21**, 1723-1732.
- Sudakin, V; Chan, GK und Yen, TJ (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, **154**, 925-936.
- Sudo, T; Nitta, M; Saya, H und Ueno, NT (2004). Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*, **64**, 2502-2508.
- Sullivan, A; Yuille, M; Repellin, C; Reddy, A; Reelfs, O; Bell, A; Dunne, B; Gusterson, BA; Osin, P; Farrell, PJ; Yulug, I; Evans, A; Ozelik, T; Gasco, M und Crook, T (2002). Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene*, **21**, 1316-1324.
- Sumara, I; Gimenez-Abian, JF; Gerlich, D; Hirota, T; Kraft, C; de la Torre, C; Ellenberg, J und Peters, JM (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol*, **14**, 1712-1722.
- Sumara, I; Vorlaufer, E; Stukenberg, PT; Kelm, O; Redemann, N; Nigg, EA und Peters, JM (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell*, **9**, 515-525.
- Takahashi, T; Haruki, N; Nomoto, S; Masuda, A; Saji, S; Osada, H und Takahashi, T (1999). Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene*, **18**, 4295-4300.
- Takai, H; Naka, K; Okada, Y; Watanabe, M; Harada, N; Saito, S; Anderson, CW; Appella, E; Nakanishi, M; Suzuki, H; Nagashima, K; Sawa, H; Ikeda, K und Motoyama, N (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *Embo J*, **21**, 5195-5205.
- Takai, H; Tominaga, K; Motoyama, N; Minamishima, YA; Nagahama, H; Tsukiyama, T; Ikeda, K; Nakayama, K und Nakanishi, M (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev*, **14**, 1439-1447.
- Takemoto, A; Murayama, A; Katano, M; Urano, T; Furukawa, K; Yokoyama, S; Yanagisawa, J; Hanaoka, F und Kimura, K (2007). Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2403-2412.
- Tanaka, TU; Rachidi, N; Janke, C; Pereira, G; Galova, M; Schiebel, E; Stark, MJ und Nasmyth, K (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, **108**, 317-329.
- Tang, CJ; Lin, CY und Tang, TK (2006). Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol*, **290**, 398-410.
- Tang, Z; Bharadwaj, R; Li, B und Yu, H (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*, **1**, 227-237.

- Tang, Z; Shu, H; Oncel, D; Chen, S und Yu, H (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell*, **16**, 387-397.
- Tao, W (2005). The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle*, **4**, 1495-1499.
- Tao, W; South, VJ; Zhang, Y; Davide, JP; Farrell, L; Kohl, NE; Sepp-Lorenzino, L und Lobell, RB (2005). Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell*, **8**, 49-59.
- Tapia, C; Kutzner, H; Mentzel, T; Savic, S; Baumhoer, D und Glatz, K (2006). Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol*, **30**, 83-89.
- Tatsumoto, T; Xie, X; Blumenthal, R; Okamoto, I und Miki, T (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol*, **147**, 921-928.
- Taylor, SS; Ha, E und McKeon, F (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, **142**, 1-11.
- Taylor, SS und McKeon, F (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, **89**, 727-735.
- Taylor, SS; Scott, MI und Holland, AJ (2004). The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res*, **12**, 599-616.
- Taylor, WR und Stark, GR (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, **20**, 1803-1815.
- Terada, Y; Tatsuka, M; Suzuki, F; Yasuda, Y; Fujita, S und Otsu, M (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J*, **17**, 667-676.
- Terada, Y; Uetake, Y und Kuriyama, R (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *J Cell Biol*, **162**, 757-763.
- Thompson, SL und Compton, DA (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol*, **180**, 665-672.
- Tibbetts, RS; Brumbaugh, KM; Williams, JM; Sarkaria, JN; Cliby, WA; Shieh, SY; Taya, Y; Prives, C und Abraham, RT (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**, 152-157.
- Tighe, A; Johnson, VL; Albertella, M und Taylor, SS (2001). Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep*, **2**, 609-614.
- Toyoshima-Morimoto, F; Taniguchi, E und Nishida, E (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*, **3**, 341-348.
- 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.
- Trudeau, ME (1996). Docetaxel: a review of its pharmacology and clinical activity. *Can J Oncol*, **6**, 443-457.

- Tsai, MY; Wiese, C; Cao, K; Martin, O; Donovan, P; Ruderman, J; Prigent, C und Zheng, Y (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **5**, 242-248.
- Tsvetkov, L; Xu, X; Li, J und Stern, DF (2003). Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem*, **278**, 8468-8475.
- Tsvetkov, LM; Tsekova, RT; Xu, X und Stern, DF (2005). The Plk1 Polo box domain mediates a cell cycle and DNA damage regulated interaction with Chk2. *Cell Cycle*, **4**, 609-617.
- Tulu, US; Fagerstrom, C; Ferenz, NP und Wadsworth, P (2006). Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. *Curr Biol*, **16**, 536-541.
- Tyers, M und Jorgensen, P (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 54-64.
- Vader, G; Cruijsen, CW; van Harn, T; Vromans, MJ; Medema, RH und Lens, SM (2007). The chromosomal passenger complex controls spindle checkpoint function independent from its role in correcting microtubule kinetochore interactions. *Mol Biol Cell*, **18**, 4553-4564.
- Vader, G; Kauw, JJ; Medema, RH und Lens, SM (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep*, **7**, 85-92.
- Vader, G und Lens, SM (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta*.
- Vader, G; Maia, AF und Lens, SM (2008). The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div*, **3**, 10.
- Vader, G; Medema, RH und Lens, SM (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*, **173**, 833-837.
- van der Vaart, B; Akhmanova, A und Straube, A (2009). Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochem Soc Trans*, **37**, 1007-1013.
- van Vugt, MA; Bras, A und Medema, RH (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell*, **15**, 799-811.
- van Vugt, MA; Bras, A und Medema, RH (2005). Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt. *Cancer Res*, **65**, 7037-7040.
- van Vugt, MA und Medema, RH (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, **24**, 2844-2859.
- Varley, J und Haber, DA (2003). Familial breast cancer and the hCHK2 1100delC mutation: assessing cancer risk. *Breast Cancer Res*, **5**, 123-125.
- Vigneron, S; Prieto, S; Bernis, C; Labbe, JC; Castro, A und Lorca, T (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell*, **15**, 4584-4596.
- Vischioni, B; Oudejans, JJ; Vos, W; Rodriguez, JA und Giaccone, G (2006). Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol Cancer Ther*, **5**, 2905-2913.

- Visintin, R; Prinz, S und Amon, A (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Sci.*, **278**, 460-463.
- Vogel, C; Kienitz, A; Hofmann, I; Muller, R und Bastians, H (2004). Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene*, **23**, 6845-6853.
- Vogel, C; Kienitz, A; Muller, R und Bastians, H (2005). The Mitotic Spindle Checkpoint Is a Critical Determinant for Topoisomerase-based Chemotherapy. *J Biol Chem*, **280**, 4025-4028.
- Voorhoeve, PM und Agami, R (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*, **4**, 311-319.
- Wade, RH (2009). On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol*, **43**, 177-191.
- Wang, HC; Chou, WC; Shieh, SY und Shen, CY (2006). Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res*, **66**, 1391-1400.
- Wang, Q; Liu, T; Fang, Y; Xie, S; Huang, X; Mahmood, R; Ramaswamy, G; Sakamoto, KM; Darzynkiewicz, Z; Xu, M und Dai, W (2004). BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood*, **103**, 1278-1285.
- Wang, X; Jin, DY; Ng, RW; Feng, H; Wong, YC; Cheung, AL und Tsao, SW (2002). Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. *Cancer Res*, **62**, 1662-1668.
- Wani, MC; Taylor, HL; Wall, ME; Coggon, P und McPhail, AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, **93**, 2325-2327.
- Wassmann, K; Liberal, V und Benezra, R (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *Embo J*, **22**, 797-806.
- Weaver, BA; Bonday, ZQ; Putkey, FR; Kops, GJ; Silk, AD und Cleveland, DW (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol*, **162**, 551-563.
- Weaver, BA und Cleveland, DW (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 658-667.
- Weaver, BA; Silk, AD; Montagna, C; Verdier-Pinard, P und Cleveland, DW (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*, **11**, 25-36.
- Wei, JH; Chou, YF; Ou, YH; Yeh, YH; Tyan, SW; Sun, TP; Shen, CY und Shieh, SY (2005). TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. *J Biol Chem*, **280**, 7748-7757.
- Wheatley, SP; Carvalho, A; Vagnarelli, P und Earnshaw, WC (2001). INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol*, **11**, 886-890.
- Wheatley, SP; Henzing, AJ; Dodson, H; Khaled, W und Earnshaw, WC (2004). Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 5655-5660.

Wiese, C und Zheng, Y (1999). Gamma-tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 250-259.

Wilde, A; Lizarraga, SB; Zhang, L; Wiese, C; Gliksman, NR; Walczak, CE und Zheng, Y (2001). Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat Cell Biol*, **3**, 221-227.

Winey, M und Huneycutt, BJ (2002). Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene*, **21**, 6161-6169.

Wirth, KG; Wutz, G; Kudo, NR; Desdouets, C; Zetterberg, A; Taghybeeglu, S; Seznec, J; Ducos, GM; Ricci, R; Firmberg, N; Peters, JM und Nasmyth, K (2006). Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol*, **172**, 847-860.

Wittmann, T; Wilm, M; Karsenti, E und Vernos, I (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol*, **149**, 1405-1418.

Wong, J und Fang, G (2006). HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture. *J Cell Biol*, **173**, 879-891.

Wong, J; Lerrigo, R; Jang, CY und Fang, G (2008). Aurora A regulates the activity of HURP by controlling the accessibility of its microtubule-binding domain. *Mol Biol Cell*, **19**, 2083-2091.

Wood, KW; Sakowicz, R; Goldstein, LS und Cleveland, DW (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, **91**, 357-366.

Wordeman, L; Wagenbach, M und von Dassow, G (2007). MCAK facilitates chromosome movement by promoting kinetochore microtubule turnover. *J Cell Biol*, **179**, 869-879.

Wu, X und Chen, J (2003). Autophosphorylation of checkpoint kinase 2 at serine 516 is required for radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 36163-36168.

Wysong, DR; Chakravarty, A; Hoar, K und Ecsedy, JA (2009). The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents. *Cell Cycle*, **8**, 876-888.

Xia, G; Luo, X; Habu, T; Rizo, J; Matsumoto, T und Yu, H (2004). Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *Embo J*, **23**, 3133-3143.

Xu, X; Tsvetkov, LM und Stern, DF (2002). Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Mol Cell Biol*, **22**, 4419-4432.

Yamano, H; Gannon, J; Mahbubani, H und Hunt, T (2004). Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in Xenopus egg extracts. *Mol Cell*, **13**, 137-147.

Yanai, A; Arama, E; Kilfin, G und Motro, B (1996). Ayk1, a novel mammalian gene related to *Drosophila* aurora centrosome separation kinase, is specifically expressed during meiosis. *Oncogene*, **14**, 2943-2950.

Yang, M; Li, B; Tomchick, DR; Machius, M; Rizo, J; Yu, H und Luo, X (2007). p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell*, **131**, 744-755.

Yang, S; Kuo, C; Bisi, JE und Kim, MK (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol*, **4**, 865-870.

- Yao, X; Abrieu, A; Zheng, Y; Sullivan, KF und Cleveland, DW (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol*, **2**, 484-491.
- Yasui, Y; Urano, T; Kawajiri, A; Nagata, K; Tatsuka, M; Saya, H; Furukawa, K; Takahashi, T; Izawa, I und Inagaki, M (2004). Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem*, **279**, 12997-13003.
- Yeh, YH; Huang, YF; Lin, TY und Shieh, SY (2009). The cell cycle checkpoint kinase CHK2 mediates DNA damage-induced stabilization of TTK/hMps1. *Oncogene*, **28**, 1366-1378.
- Yen, TJ; Compton, DA; Wise, D; Zinkowski, RP; Brinkley, BR; Earnshaw, WC und Cleveland, DW (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J*, **10**, 1245-1254.
- Yoon, DS; Wersto, RP; Zhou, W; Chrest, FJ; Garrett, ES; Kwon, TK und Gabrielson, E (2002). Variable levels of chromosomal instability and mitotic spindle checkpoint defects in breast cancer. *Am J Pathol*, **161**, 391-397.
- Yu, H (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 706-714.
- Yu, H; King, RW; Peters, J-M und Kirschner, MW (1996). Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr. Biol.*, **6**, 455-466.
- Yu, R; Lu, W; Chen, J; McCabe, CJ und Melmed, S (2003). Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology*, **144**, 4991-4998.
- Yuce, O; Piekny, A und Glotzer, M (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol*, **170**, 571-582.
- Yvon, AM; Wadsworth, P und Jordan, MA (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell*, **10**, 947-959.
- Zachariae, W und Nasmyth, K (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zachariae, W; Shevchenko, A; Andrews, PD; Ciosk, R; Galova, M; Stark, MJ; Mann, M und Nasmyth, K (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science*, **279**, 1216-1219.
- Zhang, J; Willers, H; Feng, Z; Ghosh, JC; Kim, S; Weaver, DT; Chung, JH; Powell, SN und Xia, F (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **24**, 708-718.
- Zhang, N; Ge, G; Meyer, R; Sethi, S; Basu, D; Pradhan, S; Zhao, YJ; Li, XN; Cai, WW; El-Naggar, AK; Baladandayuthapani, V; Kittrell, FS; Rao, PH; Medina, D und Pati, D (2008). Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13033-13038.
- Zhang, X; Lan, W; Ems-McClung, SC; Stukenberg, PT und Walczak, CE (2007). Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell*, **18**, 3264-3276.

Zhao, H und Piwnica-Worms, H (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*, **21**, 4129-4139.

Zhao, H; Watkins, JL und Piwnica-Worms, H (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14795-14800.

Zhao, WM und Fang, G (2005). MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13158-13163.

Zhou, BB und Elledge, SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-439.

Zhou, J und Giannakakou, P (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **5**, 65-71.

Zhuang, J; Zhang, J; Willers, H; Wang, H; Chung, JH; van Gent, DC; Hallahan, DE; Powell, SN und Xia, F (2006). Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res*, **66**, 1401-1408.

Anhang

Abkürzungen

A	Ampere
ADR	Adriamycin
au	arbitrary units
BARD1	<i>BRCA1 associated RING domain1</i>
Brcal	breast cancer 1, early onset
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion V
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
Chk	<i>checkpoint kinase</i>
ch-TOG	<i>colonic and hepatic tumor-overexpressed gene</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Zyclin-abhängige Kinase)
cDNA	komplementäre DNA
Caspase	Cystein Aaspartat Protease
Cenp	<i>centromere protein</i>
CIN	chromosomale Instabilität
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	forward scatter
g	Gramm
Gö	Gö6976
HURP	<i>hepatoma up-regulated protein</i>

IF	Immunofluoreszenz
IMT	Institute für Molekular Biologie und Tumor Forschung, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Deutschland
IP	Immunopräzipitation
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
μ	Micro (1x10 ⁻⁶)
m	Milli (1x10 ⁻³)
M	Molarität
MCAK	<i>mitotic centromere-associated kinesin</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Multi-Klonierungsstelle)
min	Minute(n)
MIN	Mikrosatelliten Instabilität
MLN	MLN8054
Mon	Monastrol
MPM2	<i>mitotic protein monoclonal 2</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
n	nano (1x10 ⁻⁹)
Noc	Nocodazol
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
p	pico (1x10 ⁻¹²)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PBS	<i>Phosphat buffer solution</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration PCR
PI	Propidiumiodid
Plk	<i>Polo-like kinase</i>
Puro	Puromycin
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan-mediated motility</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SSC	<i>sideward scatter</i>
SSC	<i>sodium chloride-sodium citrate</i> (Natriumchlorid-Natriumzitat)
Std.	Stunde(n)
TACC	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein</i>
TAE	Tris/Essigsäure (Acetat)/EDTA-Puffer
Tax	Taxol
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCN	UCN-01
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Westernblot
z.B.	zum Beispiel
ZM	ZM447439

Lebenslauf

Name Aline Katharina Stolz
Adresse Ockershäuser Allee 39, 35037 Marburg,
Deutschland
Telefon 06421-6979030
E-Mail ailine.stolz@googlemail.com

Geburtsdatum 10. November 1980
Geburtsort Euskirchen
Familienstand ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

August 1987 bis Juli 1991 Katholische Grundschule Gemünd
August 1991 bis Juni 2000 Bischöfliches Clara-Fey-Gymnasium Schleiden
(Eifel)
08. Juni 2000 Abitur

Hochschulbildung

Oktober 2000 bis November 2005 Biologie-Studium (Diplom) an der RWTH Aachen

September 2002 Vordiplom

Februar 2005 bis November 2005 Diplomarbeit an der RWTH Aachen,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Virologie, PD Dr. Michael Kleines
Titel der Diplomarbeit: Bedeutung der viralen
DNase (BGLF-5) für den Lebenszyklus des Epstein-
Barr-Virus

07. 11. 2005 Abschluss als Diplom-Biologin (Gesamtnote: sehr
gut)

Promotion

November 2005 bis März 2010 Anfertigung der Dissertation für Humanbiologie (Dr. rer. physiol.) am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Holger Bastians

Thema der Dissertation: Molekulare Mechanismen der Spindel-Kontrollpunkt-Inhibierung und der chromosomalen Instabilität

Publikationsliste

Stolz, A.*, Vogel, C.*, Schneider, V., Ertych, N., Kienitz, A., Yu, H. und Bastians, H. (2009). Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Research*, **69**: 3874 - 3883. (*gleichberechtigte Erstautoren)

Kaestner, P., **Stolz, A.** und Bastians, H. (2009). Determinants for the efficiency of anti-cancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases. *Mol. Cancer Ther.* **8**: 2046 - 2056.

Stolz, A. und Bastians, H. (2009). A role for Chk2 after DNA damage in mitosis? *Cell Cycle*, **9**: 25 - 26.

Becker, M.* , **Stolz, A.***, Ertych, N.* und Bastians, H. (2010). Centromere localization of INCENP-Aurora B is sufficient to support spindle checkpoint function. *Cell Cycle*, im Druck. (*gleichberechtigte Erstautoren)

Stolz, A*, Ertych, N.*, Kienitz, A., Vogel, C., Schneider, V., Fritz, B., Jacob, R., Dittmar, G., Weichert, W., Petersen, I. und Bastians, H. (2010). The *CHK2-BRCA1* tumor suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. *Nature Cell Biology*, im Druck. (*gleichberechtigte Erstautoren)

Kongressbeiträge in Poster-Form:

Stolz, A., Vogel, C., Kienitz, A., Schneider, V. und Bastians, H. (2007) Small molecule targeting of the mitotic spindle checkpoint: A novel concept for anti-cancer therapy
14th International „Arbeitsgemeinschaften experimentelle Krebsforschung“ (AEK)
Cancer Congress, Februar/März 2007, Frankfurt a.M., Deutschland

Stolz, A., Vogel, C., Schneider, V., Ertych, N., Kienitz, A., Yu, H. und Bastians, H. (2007) Gö6976 is a pharmacological spindle checkpoint inhibitor that efficiently kills cancer cells

Abcam Mitosis and Cancer Symposium, Februar 2009, Amsterdam, Niederlande

Stolz, A., Ertych, N., Kienitz, A., Vogel, C., Fritz, B., Weichert, W., und Bastians, H. (2009) Identification of human tumor suppressor genes required for chromosomal stability

1st Joint Congress of the Swiss and the German Societies of Cell Biology (ZMG and DGZ) Konstanz, März 2009, Konstanz, Deutschland

Stolz, A., Vogel, C., Kienitz, A., Schneider, V. und Bastians, H. (2007) Gö6976 is a pharmacological spindle checkpoint inhibitor that efficiently kills cancer cells

Signal Transduction and Disease (GBM), September 2009, Aachen, Deutschland

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Aachen (RWTH-Aachen, Aachen, Deutschland):

Bräunig, Commandeur, Conrath, Fischer, Frentzen, Jahnke, Klinner, Kreuzaler, Mey, Peterhänsel, Priefer, Schäfer, Schäffer, Schaffrath, Simons, Slusarenko, Schwaneberg, Stahl, Thomas, Vossen, Wagner, Wolf, Zimmermann

In Marburg (Philipps-Universität Marburg, Marburg, Deutschland):

Bastians, Krebber, Jacob, Müller

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Holger Bastians für die Bereitstellung des außerordentlich spannenden Themas, aber auch für die hervorragende Betreuung in allen Phasen dieser Dissertation. Ich konnte immer auf seine Unterstützung und stetige Gesprächsbereitschaft sowie seine vielen wertvollen Anregungen zählen. Vielen Dank!

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rolf Müller für die guten Arbeitsmöglichkeiten, die mir in der Arbeitsgruppe durch ihn zur Verfügung gestellt wurden. Meinen „Thesis Komitee“-Mitgliedern Prof. Dr. Rolf Müller und Professor Dr. Ralf Jacob danke ich für die wertvollen Ratschläge.

Mein weiterer Dank gilt allen Vor- und Mitarbeitern meiner Publikationen, Dr. Celia Vogel, Anne Kienitz, Verena Schneider, Markus Becker, Phillip Kästner und Norman Ertych sowie den kooperierenden Arbeitsgruppen.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der Arbeitsgruppen Bastians und Krebber, für die nette Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Ich danke euch, dass ihr mir die vielen Stunden im Labor so angenehm gemacht habt und mir eure Unterstützung und Ratschläge zu jeder Zeit angeboten habt.

Weiterhin danke ich unserer Sekretärin Ulrike Schülke für die schöne Zusammenarbeit sowie die Unterstützung in organisatorischen Fragen sowie unseren technischen Assistenten Klaus Weber und Bernhard Wilke für die vielen Reparaturen im Laboralltag und die helfende Hand. Zusätzlich möchte ich Dr. Jürgen Adamkiewicz für die vielen lustigen Momente früh morgens in der Zellkultur danken.

Thomas und Nicki, euch beiden danke ich besonders für die Korrekturen meiner Arbeit, die vielen Ratschläge und schönen Momente, nicht nur im Labor. Auch Dir, Phillip danke ich für die netten Gespräche im „Kaffeeraum“ und die geselligen Videoabende.

Claudia, Anne und Katha, euch danke ich für das stetig offene Ohr, eure Ratschläge und aufmunternden Worte - und natürlich für die Stammtisch-Abende, die eine nette Abwechslung zum Laboralltag waren!

Norman, Dir danke ich, dass Du immer für mich da warst und mir die Zeit im Labor so angenehm gemacht hast! Ohne Deine Liebe, Unterstützung und aufbauenden Worte, wenn es einmal nicht so gut lief, hätte ich das nie geschafft. Vor allem danke ich Dir natürlich auch für die Korrektur meiner Arbeit und die vielen Tipps, die Du mir gegeben hast!

Der größte Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die immer für mich da waren und mich motiviert haben. Insbesondere danke ich Dir, Papa, dass Du es mir ermöglicht hast, diesen Werdegang überhaupt einzuschlagen und dass Du mich, trotz der traurigen, familiären Umstände, stets unterstützt und motiviert hast. Ich danke euch von ganzem Herzen!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Molekulare Mechanismen der Spindel-Kontrollpunkt-Inhibierung und der chromosomalen Instabilität

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn PD Dr. Holger Bastians ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen „Cancer Research“ „Nature Cell Biology“ veröffentlicht (siehe: Publikationen).

Marburg, den 17.03.2010

Aline Stolz

