

Untersuchungen zur Funktion des Inhibitor der Apoptose Proteins Survivin in der chromosomalen Stabilität und „DNA Damage Response“ von Tumorzellen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

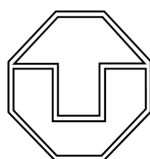
vorgelegt der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Technischen Universität Dresden
von

Ralf Wiedemuth

geboren am 23. März 1978 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Achim Temme
Prof. Dr. Herwig O. Gutzeit

Einreichung: 13.07.2012
Verteidigung: 08.10.2012



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DRESDEN

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Achim Temme, in dessen Labor diese Arbeit angefertigt wurde. Ich bedanke mich an dieser Stelle für die stets uneingeschränkte Unterstützung sowie für die vielen wertvollen Hinweise, Ratschläge und Diskussionen, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herwig O. Gutzeit für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Natürlich möchte ich mich bei der kompletten AG Temme der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie bedanken, meinen überaus netten Kollegen Sandy, Katja, Katrin, Nadja, Susanne, Freddy, Stefanie, Elke, Bianca und Frau Zachow für ihre praktische und ideelle Hilfe im Laboralltag.

Frau Dr. Barbara Klink danke ich für Ihre Unterstützung sowie die fruchtbaren Diskussionen und Hinweise.

Ein besonderer Dank geht an

meine Eltern Harald und Christine Wiedemuth, meine Oma Liselotte und an meinen Lieblingsbruder Klaus, die mich während meiner etwas zeitintensiven Ausbildung jederzeit unterstützten und mir in allen Lebenslagen halfen.

meine Freundin Manuela für ihre liebevolle Hilfe, Geduld, Nachsicht und Motivation.

Ralf Wiedemuth

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Mitose und Zell-Zyklus Kontrolle	8
1.1.1 Regulation des Zellzyklus	8
1.1.2 Checkpoints	9
1.1.2.1 Der G1-Checkpoint	9
1.1.2.2 S-Phase Checkpoint	12
1.1.2.3 G2/M Checkpoint	13
1.1.2.4 Der mitotische Spindel Kontrollpunkt	14
(Spindle Assembly Checkpoint - SAC)	
1.1.3 Zytokinese	17
1.1.4 DNA-Schäden und Apoptose	21
1.2 Die Inhibitor der Apoptose Proteine (IAP)	23
1.2.1 Die Inhibitor der Apoptose Protein Familie	23
1.2.2 Survivin - ein Inhibitor der Apoptose-Protein mit dualer	27
Funktion in Apoptose und Zellteilung	
1.2.2.1 Einteilung des Survivins in die IAP-Familie	27
und Isoformen	
1.2.2.2 Rolle des Survivins in apoptotischen Prozessen	29
1.2.2.3 Rolle des Survivins in der Mitose	32
1.3 Zielsetzung der Arbeit	37
2. Material und Methoden	38
2.1 Material	38
2.1.1 Antibiotika	39
2.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur	39
2.1.3 Bakterienmedien	41
2.1.4 DNA Größenstandards und Materialien für die	42
Gel-Elektrophorese	
2.1.5 Protein-Größenstandards	42
2.1.6 Antikörper	43
2.1.6.1 Primäre Antikörper	43
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	44

2.1.7 Substanzen und Inhibitoren	45
2.1.7.1 Inhibitoren.....	45
2.1.7.2 Substanzen.....	46
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	48
2.1.9 Bakterienstämme	50
2.1.10 Enzyme	51
2.1.11 Kommerzielle Kits	51
2.1.12 Oligonucleotide	52
2.1.13 Primer.....	53
2.1.13.1 PCR Primer	53
2.1.13.2 Sequenzierungsprimer.....	53
2.1.14 Verbrauchsmaterialien und Zubehör.....	53
2.1.15 Plasmide & Vektoren.....	54
2.1.16 Zelllinien.....	56
2.2 Methoden.....	57
2.2.1 Zellbiologische Methoden	57
2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	57
2.2.1.2 Zählen der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer.....	58
2.2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen und	58
Generierung Replikations-inkompetenter retroviraler Partikel	
2.2.1.3.1 Aussäen der Verpackungszellen HEK 293T	59
und Transfektion	
2.2.1.3.2 Aussäen der Zielzellen und Transduktion	60
2.2.1.3.3 Selektion der transduzierten Zellen	61
mit Puromycin	
2.2.1.3.4 Selektion der transduzierten Zellen	61
mit Hygromycin	
2.2.1.4 Zellyse zur Proteingewinnung	62
2.2.1.5 Durchflusszytometrie.....	62
2.2.1.5.1 Zellzyklusanalyse (SubG1)	63
2.2.1.5.2 Zellzyklusanalyse in Kombination mit	64
einer Antikörper Färbung	

2.2.1.5.3 Bromdesoxyuridin (BrdU) Inkorporations Analyse	64
2.2.1.5.4 Annexin-V Färbung	66
2.2.1.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen	66
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	68
2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford	68
2.2.2.2 Das Auftrennen von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
2.2.2.3 Der Westernblot	70
2.2.2.3.1 „Semidry-Blotting“ von Proteinen auf Membranen	70
2.2.2.3.2 Nassblot von Proteinen auf Membranen	71
2.2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	71
2.2.2.5 „Stripping“ von PDVF-Membranen und erneute AK-Inkubation	72
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	72
2.2.3.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	72
2.2.3.2 DNA-Gelelektrophorese	74
2.2.3.3 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	74
2.2.3.4 Die Ligation von linearen DNA-Fragmenten	75
2.2.3.5 Herstellung kompetenter E. coli	75
2.2.3.6 Transformation von E.coli	76
2.2.3.7 Plasmid-Minipräparation aus E.coli, modifiziert nach Holmes & Quigley	76
2.2.3.8 Plasmid-Maxipräparation	77
2.2.3.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	77
2.2.3.10 Restriktionsverdau von DNA	78
2.2.3.11 DNA-Sequenzierung	79
2.2.4 Spektrale Karyotypisierung (SKY)	79
2.2.4.1 Präparation von Metaphasenchromosomen	80
2.2.4.2 Hybridisierung und Detektion von SKY Sonden	81

3. Ergebnisse	83
3.1 Generierung von retroviralen pRVH-N-shSurv-puroR und pRVH-N-shluc-puroR-Vektoren	83
3.2 Generierung und Charakterisierung von MCF-7 und U87-MG Zellen mit stabilem „Knock down“ des Tumor-Suppressor-proteins p53	83
3.3 Survivin-RNAi führt zu Zellteilungsdefekten und einem p53-unabhängigen Anstieg an polyploiden Zellen	86
3.4 p53-positive Zellen mit „Knock down“ des Survivins zeigen biochemisch Zeichen eines G1-Zellzyklus-Arrests	88
3.5 Ein Anstieg in der Expression von p21 ^{waf/cip} und von Cyclin D1 in p53-positiven Zellen korreliert mit dem zunehmenden Polyploidiegrad nach Survivin-RNAi	89
3.6 Der Anstieg im Polyploidiegrad nach Survivin-Depletion durch RNAi bewirkt eine Hemmung der G1/S-Transition in HCT116-Wildtypzellen	94
3.6 Der „Knock down“ des Survivins resultiert in einem Caspase 3-unabhängigen Anstieg an toten Zellen	95
3.7 Der Survivin-„Knock down“ führt in Tumorzellen zur Endoreplikation des Genoms und multipolaren Spindeln	98
3.8 Der „Knock down“ des Survivins führt zu einer post-translationalen Modifikation von p53 in Form von Phosphorylierungen an S15	100
3.9 Der „Knock down“ des Survivins führt in HCT116, MCF-7 und U87-MG Wildtyp-Zellen als auch isogenetischen Zellen mit Verlust von p53 zu DNA Schäden und zu einer Aktivierung von DNA Reparatur-Mechanismen	103
3.10 Survivin-depletierte MCF-7 wt Zellen mit γ H2AX Foci zeigen eine höhere Expression an p21 ^{waf/cip}	109

3.11 ATM/ATR Inhibierung verhindert die durch Survivin	111
Depletion bedingte p53 und p21 ^{waf/cip} Akkumulation in	
HCT116 wt Zellen	
3.12 Die Inhibition der mitotischen Kinase Aurora B,	116
einem molekularen Partner des Survivins, führt zu Polyploidie,	
DNA-Schäden und G1-Arrest in Zellen mit funktionellem p53	
3.13 Der Survivin Verlust führt in HCT116 p53 ^{-/-} Zellen.	119
zu chromosomaler Instabilität und strukturellen	
chromosomalen Aberrationen	
4. Diskussion.....	124
5. Zusammenfassung	141
6. Literatur	143
7. Anhang	167
7.1 Abkürzungsverzeichnis	167
7.2 Erklärung.....	169
7.3 Publikationen.....	170

1. Einleitung

1.1 Mitose und Zell-Zyklus Kontrolle

1.1.1 Regulation des Zellzyklus

Im Verlauf der Zellteilung von eukaryotischen Zellen muss das Genom repliziert und mit dem Zytoplasma nebst Organellen gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt werden. Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene regulatorische Proteine, die sequentiell das Voranschreiten im Zellzyklus steuern und während der Mitose die gleichmäßige Verteilung der genetischen Information und des Zellkörpers auf die Tochterzellen gewährleisten.

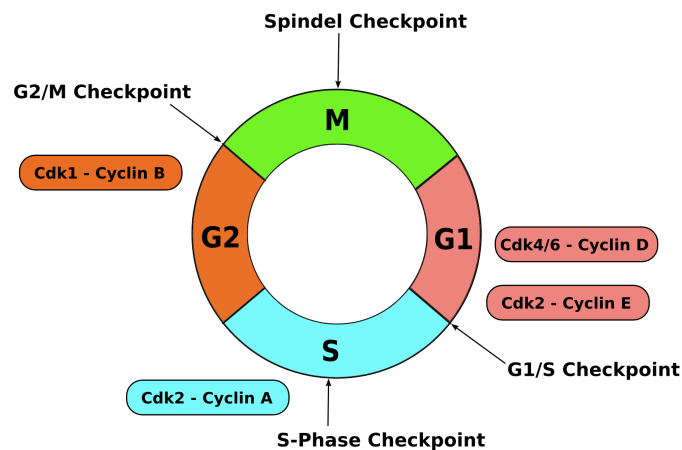


Abb. 1: Kontrolle und Regulation der Zellteilung durch Cycline und die dazugehörigen Cdk's. (M: Mitose; S: Synthese, G: „Gap“ Phase)

Über weitere regulatorische Proteine kann bei DNA-Schäden allerdings auch die Teilung der Zelle angehalten (Zellzyklusarrest) und gegebenenfalls der programmierte Selbstmord (Apoptose) induziert werden (Williams & Stoeber 2012).

Anhand der beiden Hauptaufgaben, der Replikation und der Segregation des Genoms, kann man den Zellzyklus von eukaryotischen Zellen in mehrere Phasen unterteilen (Abb. 1). Die Replikation der DNA findet in der S-Phase (Synthese-Phase) statt. Nach der DNA-Synthese erfolgt die Aufteilung der Chromosomen in der Mitose, welches innerhalb von Minuten ablaufen kann. Zwischen diesen beiden Ereignissen liegen die beiden Gap-Phasen G1 und G2, die abhängig von der jeweiligen Zelllinie bzw. Zelltyp zwischen einem

halben Tag oder mehreren Tagen andauern können. Am Ende der jeweiligen Gap-Phasen liegen Kontrollpunkte des Zellzyklus (siehe 1.1.2.1; 1.1.2.3), die den Zustand der Zelle hinsichtlich genomischer Integrität (z.B. DNA-Schädigungen), vollständiger Replikation der DNA, Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen analysieren und somit über das weitere Fortschreiten der Zellteilung oder Arrest entscheiden (Giono & Manfredi 2006). Ein dritter Kontrollpunkt liegt in der Mitose (siehe 1.1.2.4) und reguliert den Übergang der Metaphase zur Anaphase. Dieser so genannte „Spindle Assembly Checkpoint“ (SAC) kontrolliert die Interaktion der Chromosomen mit dem bipolaren Spindelapparat und garantiert eine korrekte Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (Musacchio & Salmon 2007).

Der S-Phase-Kontrollpunkt (siehe 1.1.2.2) spielt eine wichtige Rolle beim Auftreten von DNA Schäden und Störungen während der Replikation. Er überwacht die fehlerlose DNA Synthese und erlaubt die Reparatur von Mutationen und strukturellen DNA-Schäden (Segurado & Tercero 2009).

Das geordnete Voranschreiten des Zellzyklus wird durch eine sequentielle Expression von Cyclinen und Aktivierung der dazugehörigen „Cyclin dependent Kinases“ (Cdk) gesteuert (Malumbres & Barbacid 2005). Cyclin D-Cdk4, Cyclin D-Cdk6 und Cyclin E-Cdk2 regulieren dabei die Progression in der G1 Phase. Die S-Phase startet mit der Komplexbildung von Cyclin A-Cdk2, während Cyclin B-Cdk1 die Progression in G2 sowie den Übergang von der G2 Phase in die Mitose regelt (Malumbres & Barbacid 2009) (Abb. 1).

Im Nachfolgenden sollen die molekularen Mechanismen der Zellzyklus-Kontrollen und Vertreter der Zellzyklusregulation vorgestellt werden. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Signaltransduktion nach DNA Schäden, einer so genannten „DNA Damage Response“ (DDR), die in einem Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder auch in Apoptose resultieren kann.

1.1.2 Checkpoints

1.1.2.1 Der G1-Checkpoint

Während der G1 Phase leiten mitogene Signale die Synthese von Cyclin D (D1, D2, D3) sowie den Transport der Cdk4/6 in den Nukleus ein. Aktive Komplexe aus Cyclin D-Cdk4 und Cyclin D-Cdk6 phosphorylieren Mitglieder der

Retinoblastom Familie (Rb), wie Rb, p107 und p130, was zu einer partiellen Inaktivierung dieser Proteine führt (Harbour et al. 1999). Rb-Proteine sind eine wichtige Bremse im Zellzyklus, da sie E2F-Transkriptionsfaktoren, welche S-Phase Gene transkribieren, durch Bindung hemmen. Erst eine Inaktivierung der Rb-Proteine durch Cdk-abhängige Phosphorylierung setzt E2F-Proteine frei und führt zur Progression in die S-Phase (Hiebert et al. 1992; Chellappan et al. 1991; Cobrinik 2005). Eine vollständige Inaktivierung von Rb wird beim Übergang von der G1 zur S-Phase durch den Cyclin E-Cdk2 Komplex erreicht (Lundberg & Weinberg 1998). Sind nach der Mitose und Zytokinese DNA-Schäden vorhanden, wird der G1-Checkpoint aktiviert (Abb. 2). Wichtige Vertreter der G1-Kontrollpunkt-Signalkaskade sind dabei das Tumor-Suppressorprotein p53 und dessen Effektorprotein p21^{waf/cip}, ein Cdk-Inhibitor (el-Deiry et al. 1993), der zu einem starken G1-Zellzyklusarrest führen kann (Waldman et al. 1995; Lane 1992).

In Abhängigkeit der Qualität der DNA Schäden, d.h. Einzelstrangbrüche (SSB) oder Doppelstrangbrüche (DSB), kommt es zu einer Aktivierung der proximalen Sensorkinasen ATM, ATR und DNA-PK (Ciccia & Elledge 2010). Sie akkumulieren im Bereich der DNA-Schädigung und phosphorylieren unterschiedliche Zielproteine (Abraham 2001). Diverse assoziierte Proteine wie p53BP („p53-Binding Protein“) und BRCA1 („Breast Cancer Susceptibility Gene 1“) verstärken dabei die Lokalisation von ATM (Kastan et al.,2004). Die bedeutendsten Zielproteine von ATM/ATR sind dabei die Effektorkinasen CHK1 und CHK2. ATM phosphoryliert CHK2 an T68, was die Dimerisierung und Aktivierung fördert (Ahn et al. 2000; Ahn et al. 2002; Xu et al. 2002). ATR dagegen phosphoryliert und aktiviert CHK1 an S317 und S345 (Walworth & Bernards 1996; Q. Q. Liu et al. 2000a; Lopez-Girona et al. 2001).

Im weiteren Verlauf gibt es einen p53-abhängigen, lang-anhaltenden bzw. einen unmittelbaren, aber transienten p53-unabhängigen G1-Arrest nach DNA Schäden. Der schnellere G1-Arrest kommt ohne eine p53-gesteuerte Transkription von Cdk Inhibitoren aus und wird über die cdc25A Phosphatase reguliert (Waldman et al. 1995; Mailand et al. 2000; Lane 1992).

Nach der Aktivierung von CHK1 durch ATR sowie CHK2 durch ATM kommt es zu einer Phosphorylierung der CDC25a Phosphatase, die nachfolgend ubiquitinyliert und proteosomal abgebaut wird. CDC25a entfernt am N-Terminus der Cdk2 bzw. Cdk4/6 inhibitorische Phosphorylierungen, welche für eine volle

Aktivität der CDK-Cyclin-Komplexe erforderlich sind. Der Abbau von CDC25a behindert somit Cdk2/4/6-Komplexe, welche nicht mehr effektiv das Rb-Protein phosphorylieren können (Mailand et al. 2000; Sørensen et al. 2005; Falck et al. 2001).

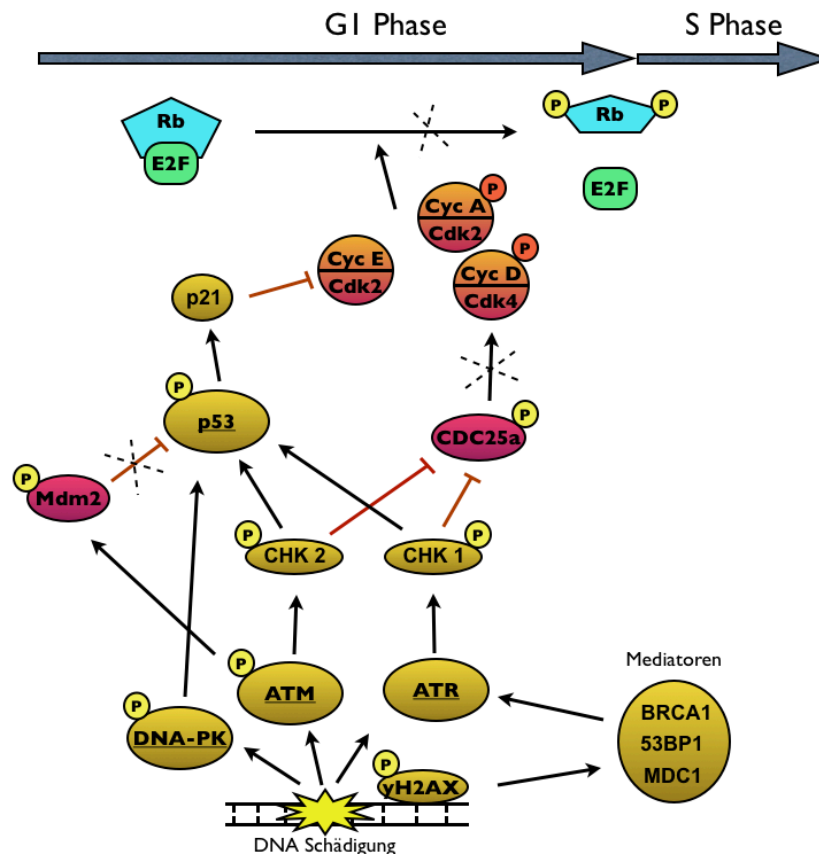


Abb. 2: Schematische Darstellung des G1 Checkpoints. Das Auftreten von DNA Schäden führt zu einer Aktivierung der Sensorkinasen ATM, ATR und DNA-PK sowie der Effektorinasen CHK1/CHK2. Eine schnelle Einleitung des Arrests erfolgt dabei über die CDC25a Phosphatase, die nach CHK1/CHK2 Phosphorylierung proteosomal abgebaut wird. Die permanente Arretierung wird über den p53 Weg eingeleitet. Die Phosphorylierung von p53 durch ATM, ATR, DNA-PK, CHK1 und CHK2 führt zu einer Stabilisierung, da die Repression durch Mdm2 aufgehoben wird. Durch stabilisiertes p53 kommt es zur Transkription des Cdk Inhibitors p21. Beide Wege enden in der Inaktivierung des Cyclin/Cdk Komplexes und der damit verbundenen Stabilisierung von Rb/E2F. (P: Phosphorylierung). Modifiziert nach Giono & Manfredi 2006.

Über die Aktivierung von p53 kann nachfolgend ein stabiler G1-Arrest initiiert werden. Die Aktivierung des Tumorsuppressproteins p53 nach DNA-Schäden erfolgt dabei durch Phosphorylierungen (S15, T18, S20 und S37) an den N-terminalen Transaktivierungsdomänen durch die Sensorkinasen ATM, ATR und DNA-PK als auch durch Effektorinasen CHK1/CHK2. Zudem wird Mdm2, eine Ubiquitin-Ligase, ebenfalls von ATM phosphoryliert. Beides, die Phosphorylierung von p53 und Mdm2, hat zur Folge, dass eine durch Mdm2

bedingte p53 Degradation aufgehoben wird und p53 in der Zelle akkumulieren kann (Maya et al. 2001; Z. Goldberg et al. 2002; Shieh et al. 1997; Sakaguchi et al. 2000).

Aktiviertes p53 wirkt als Transkriptionsfaktor und führt zur transkriptionalen Aktivierung des Cdk-Inhibitors p21^{waf/cip}. Durch p21^{waf/cip} erfolgt eine Inaktivierung der Cyclin D-Cdk4/6 und Cyclin E-Cdk2 Komplexe, was letztlich einen Übergang in die S-Phase verhindert (el-Deiry et al. 1993; Xiong et al. 1993; He et al. 2005).

1.1.2.2 S-Phase Checkpoint

Während der DNA Synthesephase wird Cyclin E durch Cyclin A ersetzt, das nun mit Cdk2 einen aktiven Komplex bildet und die Transition von der S-Phase in die G2 Phase fördert (Pines & Hunter 1990; Blomberg 1999). Treten in dieser Phase DNA Schäden auf, wird der S-Phase Checkpoint aktiviert. Es können während der Synthesephase durch physiologische Prozesse DSB oder SSB entstehen. Gleichzeitig kann die Modifikation der DNA Basen durch alkylierende Substanzen, ROS (reaktive O₂ Spezies) oder UV Licht die Replikation behindern, indem auftretende Replikationsgabeln an diesen Bereichen anhalten bzw. kollabieren. Das wiederum führt ebenfalls zu DSB und ssDNA Fragmenten und zur Aktivierung der Sensorinasen ATM und ATR (Sancar et al. 2004; Willis & Rhind 2009; Branzei & Foiani 2008).

Im Gegensatz zu dem G1 und G2/M Checkpoint resultiert die Aktivierung des S-Phasen Checkpoints nicht in einem direkten Arrest. Durch das Auftreten von Läsionen verlangsamt dieser Kontrollpunkt hauptsächlich die DNA Synthese und erlaubt gleichermaßen eine DNA-Reparatur (Sancar et al. 2004; Willis & Rhind 2009).

Dabei wird diese Verlangsamung der DNA-Synthese durch eine ATM/ATR abhängige Phosphorylierung von Cdc25a bewirkt, welches zu einer Degradation von Cdc25a führt und letztendlich den Cdk2-Komplex inaktiviert (Willis & Rhind 2009; Sancar et al. 2004). Die Inaktivierung des Cdk2 Komplexes unterbindet die Anlagerung des Cdc45 Replikation initiiierenden Proteins an die DNA und damit die Bildung von Replikationsgabeln (Costanzo et al. 2003).

1.1.2.3 G2/M Checkpoint

Beim Übergang von der S-Phase in die Mitose tritt der G2/M Kontrollpunkt in Kraft (Abb. 3). Ein aktiver G2/M-Kontrollpunkt verzögert den Eintritt in die Mitose, verschafft der Zelle also Zeit und führt zur Reparatur von DNA-Schäden, die während der Replikation entstanden sind (Kastan & Bartek 2004). Für die regulatorischen Proteine des G2-Kontrollpunkts ist der MPF (mitosis/maturation promoting factor), welcher aus dem Cyclin B und der Cdk1 besteht, das primäre Ziel. Der MPF akkumuliert am Ende der G2 Phase und leitet die Mitose ein (Nurse 1990). Dieser Komplex liegt in der G2 Phase, durch eine Wee1 abhängige Phosphorylierung an T14 und T15 von Cdk1, inaktiv im Zytoplasma vor (G J Den Haese 1995). Die Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus führt zur Aktivierung des Cdk1-Cyclin B Komplexes durch die Cdc25 abhängige Entfernung der inhibitorischen Phosphate (T14, T15) an Cdk1 (Mailand et al. 2002; Jesus & Ozon 1995).

Eine wichtige Rolle im G2/M Kontrollpunkt kommt wieder p53 zu, wobei es eher für die Aufrechterhaltung des Arrestes benötigt wird als für die Initiierung (Stewart et al. 1995; Bunz et al. 1998). Die Aktivierung von p53 erfolgt wieder über die Sensorkinasen ATM/ATR, DNA-PK sowie die Effektorinasen CHK1/CHK2.

Zielproteine, die nach DNA Schäden in G2 durch p53 transkribiert werden, sind p21^{waf/cip}, GADD45 und 14-3-3 σ (Bunz et al. 1998; Zhan et al. 1994; Hermeking et al. 1997). Alle diese regulatorischen Proteine führen zu einer Inhibierung des Cyclin B-Cdk1 Komplexes und verhindern dadurch den Eintritt in die Mitose (Kastan & Bartek 2004; Giono & Manfredi 2006).

Für die Initiierung des G2/M Arrestes ist eine CHK1/CHK2 abhängige Phosphorylierung von CDC25c an Aminosäureposition S216 verantwortlich.

Diese Phosphorylierungsstelle dient als Andockstation des 14-3-3 Proteins, einer Isoform von 14-3-3 σ und führt zu einer Translokation und Degradation von CDC25c im Zytoplasma (Peng et al. 1997; Antoni et al. 2007).

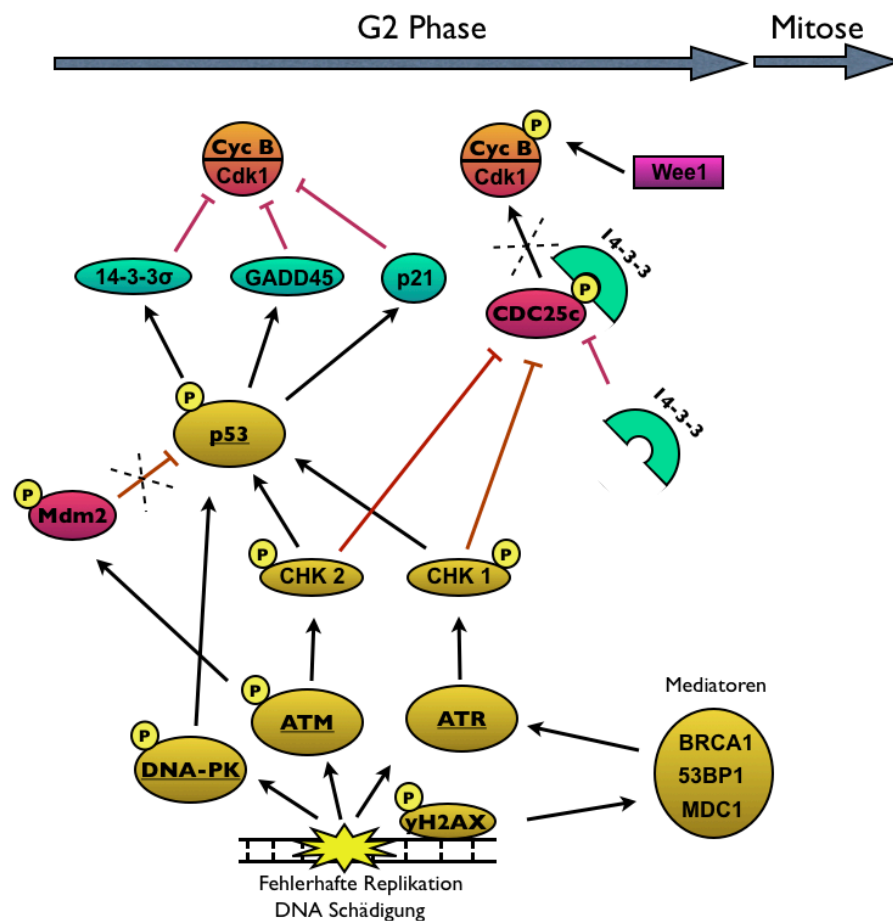


Abb. 3: Schematische Darstellung des G2/M Checkpoints. Der Übergang der G2 Phase zur Mitose wird von einem Cyclin B1/Cdk1 Komplex gesteuert. Aufgrund von DNA-Schädigungen oder Fehlern in der Replikation wird dieser Komplex durch Inaktivierung der cdc25C Phosphatase deaktiviert. Über p53 abhängige Zielgene (GADD45, p21, 14-3-3 σ) wird ein permanenter Arrest initiiert. Die Signaltransduktion erfolgt über die Sensorkinasen ATM/ATR, DNA-PK und die Effektorkinasen CHK1/CHK2. (P: Phosphorylierung). Modifiziert nach Giono & Manfredi 2006

1.1.2.4 Der mitotische Spindel Kontrollpunkt („Spindle Assembly Checkpoint“ - SAC)

Der Verlauf der Mitose sowie die Trennung der Chromosomen durch Verdau der letzten Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden, dem Cohesin, wird über den APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cytosome) gesteuert. Dieser Komplex enthält eine E3 Ubiquitin Ligase Funktion. Für die enzymatische Aktivität von APC/C wird ein CDC20 (Cell-Division-Cycle 20 homolog) Kofaktor benötigt.

Die entscheidenden Ziele des Komplexes sind das Cyclin B des MPF und Securin (Abb. 4 D). Letzteres bindet und inaktiviert das Enzym Separase. Beim

Übergang von der Metaphase zur Anaphase wird Securin vom APC/C ubiquitinyliert und vom Proteasom degradiert. Die frei werdende Separase baut das Cohesin ab und die Schwesterchromatiden können somit unmittelbar durch die bipolar angehefteten Spindeln getrennt werden. Die Degradation von Cyclin B inaktiviert Cdk1, was für die Beendigung der Mitose („Mitotic Exit“) notwendig ist (Peters 2002; Peters 2006).

Während der Metaphase stellt der SAC sicher, dass sämtliche Kinetochoren der Chromosomen amphitelisch mit den Mikrotubuli verbunden sind (Abb. 5). Ist dies nicht der Fall, wird der SAC aktiviert und der Übergang in die Anaphase, durch Inhibierung der Interaktion von APC und CDC20, unterbunden bzw. verzögert (Kops et al. 2005; Musacchio & Salmon 2007).

Ein einzelnes unbefestigtes Kinetochor kann dabei ein ausreichend starkes Signal erzeugen, um die Mitose anzuhalten (Rieder et al. 1994). In Vertebraten wird der Spindel-Checkpoint und damit ein Arrest in der Metaphase durch die Kinasen Bub1, Mps1 und BubR1 sowie Mad1, Mad2, Bub3 und das centromeric Protein E (CENP-E) gesteuert. Während der Mitose akkumulieren diese SAC-Proteine an den unbefestigten Kinetochoren. Der genaue Mechanismus, wie ein Arrest in der Metaphase bewerkstelligt wird, ist bis heute ungeklärt. Man vermutet aber, dass CENP-E und BubR1 an ein freies Kinetochor binden, was zu einer Aktivierung der Kinase BubR1 führt (Y. Mao et al. 2003). Eine Inaktivierung des APC/C Komplexes erfolgt durch den „Mitotic Checkpoint Complex“ (MCC), der aus Mad2, BubR1, Bub3 und CDC20 besteht und sich dynamisch im Bereich der unbefestigten Kinetochoren bildet (Sudakin et al. 2001; Poddar et al. 2005; Wassmann & Benezra 1998; Howell et al. 2000; Howell et al. 2004; Shah et al. 2004) (Abb.: 4 B).

Die Bildung des MCC Komplexes wird anhand des „MAD2-template models“ (Abb. 4 A) diskutiert (Musacchio & Salmon 2007). Ein Mad1-Mad2^{closed}-p31^{Comet} Komplex bindet an unbefestigte Kinetochoren unter Freisetzung von p31^{Comet} (Luo et al. 2001; Sironi et al. 2002). Dieser Mad1-Mad2^{closed} Komplex kann frei zirkulierende offene („open“) Mad2 Moleküle (Mad2^{open}) binden, die dann ebenfalls eine Konformationsänderung durchmachen und Mad2^{closed} bilden.

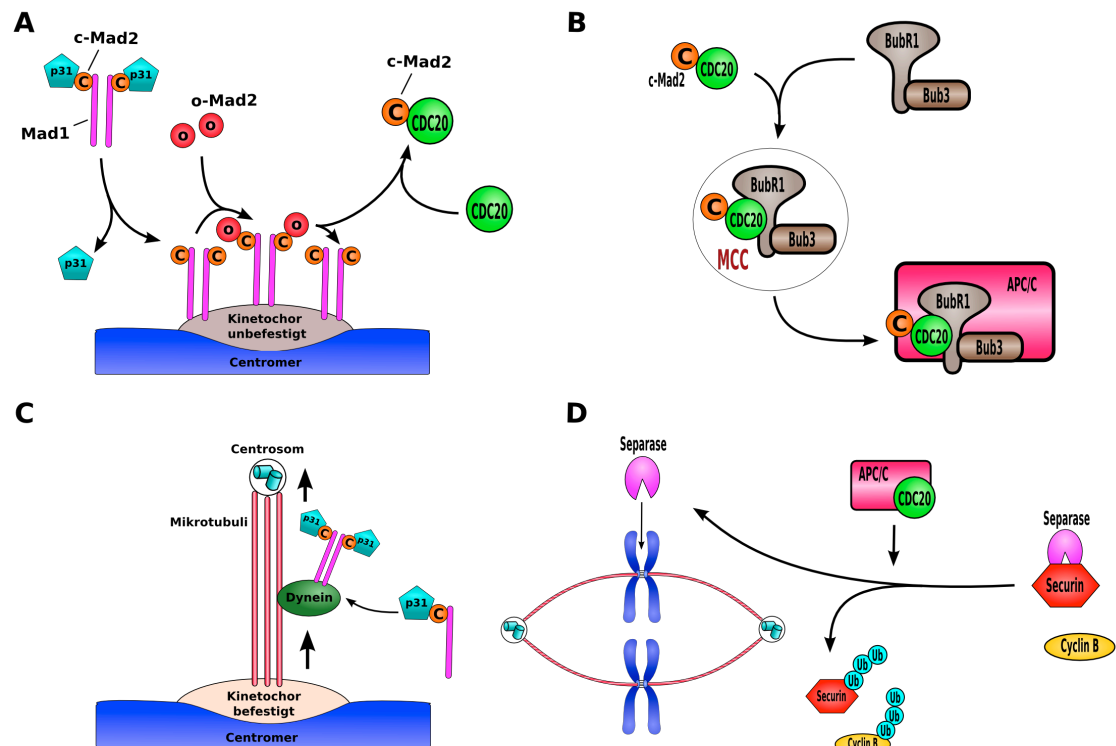


Abb. 4: Der mitotische Spindel Kontrollpunkt (SAC). (A) Das „Mad2-template modell“ beschreibt die Bildung von CDC20-Mad2^{closed}. Durch die Bindung des Mad1-Mad2^{closed}-p31^{Comet} Komplexes an unbefestigte Kinetochore kommt es zur Freisetzung von p31^{Comet}. An die Kinetochoren gebundenes Mad1-Mad2^{closed} rekrutiert Mad2^{open} und fördert die Konformationsänderung zu Mad2^{closed} in Anwesenheit von CDC20, was zur Bildung des CDC20-Mad2^{closed} Komplexes führt. (B) CDC20-Mad2^{closed} sowie BubR1-Bub3 bilden den MCC Komplex (Mitotic Checkpoint Complex), der an APC/C bindet und diese E3 Ubiquitinligase inhibiert. (C) Durch die Bindung von Mikrotubuli an das Kinetochor, erfolgt die Entfernung der MCC Proteine durch Dynein Motorproteine („Dynein stripping“), was zur Inaktivierung des SAC's führt. (D) Dadurch wird die Repression des APC/C Ubiquitinligase aufgehoben, die daraufhin Securin und Cyclin B polyubiquitinyliert (Ub: Ubiquitin), was in einem Proteosomalen Abbau resultiert. Die frei werdende Separase kann die Cohesin Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden aufheben und die Anaphase einleiten. (o-Mad2, Mad2^{open}; c-Mad2, Mad2^{closed}) Modifiziert nach Kops et al. 2005 und Musacchio & Salmon 2007

CDC20 kann die gleiche Konformationsänderung von Mad2 auslösen wie Mad1, da es eine ähnliche Mad2 Bindungsdomäne besitzt. Deshalb führt die Bindung von Mad2 an CDC20 ebenfalls zur Bildung von Mad2^{closed} (Luo et al. 2004; Sironi et al. 2002; Luo et al. 2001). Dabei wird Mad1-Mad2^{closed} als Matrize für die Bildung von CDC20-Mad2^{closed} gesehen. CDC20-Mad2^{closed} als auch Bub3 sind notwendig für die Bindung von BubR1 an CDC20, um den MCC Komplex zu bilden (Davenport et al. 2006; R.-H. Chen 2002) (Abb. 4 B). Wie der MCC Komplex APC/C inhibiert, ist noch nicht klar. Vermutlich erfolgt die

Bindung als eine Art Pseudosubstrat über das KEN-Box Motiv in BubRI (Musacchio & Salmon 2007).

Die Bindung der Mikrotubuli an das freie Kinetochor unterbricht die Repression des APC/C Komplexes durch die MCC Proteine. Vermutlich erfolgt dies durch die Entfernung der SAC Proteine entlang der Mikrotubuli zu den Centrosomen durch Dynein Motorproteine (Howell et al. 2001; Wojcik et al. 2001) (Abb. 4 C).

Eine Vielzahl anderer Proteine ist ebenfalls im SAC involviert. So auch die „Chromosomalen Passenger Proteine“ (CPP), zu denen Survivin, Borealin, INCENP und die Aurora B Kinase zählen (Lens et al. 2003; Vagnarelli & Earnshaw 2004)(siehe 1.2.2.3).

Die CPP bilden im Verlauf der Metaphase einen so genannten „Chromosomalen Passenger Complex“ (CPC) an den Kinetochoren, welcher vermutlich für die Detektion der Zugspannung durch bipolare Spindeln verantwortlich ist. Während des stochastischen Prozesses der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktionen und Bindung können syntelisch verknüpfte Chromosomen entstehen (Abb. 5), d.h. die Mikrotubuli eines Centrosoms binden an beide Kinetochoren und deaktivieren somit den SAC. Da aber das Chromosom mit demselben Centrosom verbunden ist, fehlt eine Zugspannung auf die Kinetochoren. Man nimmt heutzutage an, dass die Aurora B Kinase „falsche“ syntelische Kinetochor-Mikrotubuli Verbindung lösen kann (Hauf et al. 2003). Das dadurch freie Kinetochor aktiviert daraufhin den SAC und ermöglicht nun in einem weiteren Anlauf eine erfolgreiche amphitelische Bindung des Chromosoms mit den Mikrotubuli (Pinsky & Biggins 2005).

1.1.3 Zytokinese

Die Zytokinese ist der letzte Schritt in der Zellteilung bei der, nach der Duplikation und Aufteilung des genetischen Materials, eine Abschnürung des Zytoplasmas zwei Tochterzellen entstehen lässt.

In tierischen Zellen ist dabei ein kontraktiler Ring aus Aktin und Myosin II für die Abschnürung der Tochterzellen verantwortlich. Dabei wird die Kontraktilität der Aktin-Myosin-Elemente durch die GTPase RhoA gesteuert (Piekny et al. 2005; Jing Li et al. 2010).

Neben Zytoskelettproteinen und der damit interagierenden GTPase RhoA sind in der Zytokinese die Proteinkinasen Aurora B, Cdk1 und die Polo-like Kinase 1 (Plk1) von besonderer Bedeutung (Glotzer 2005; Barr & Gruneberg 2007),

Die eigentliche Zellteilung folgt einer Abfolge von Ereignissen (Abb. 6 A), die mit der Separation der Schwesterchromatiden während der Anaphase beginnt. Darauf folgt die Positionierung und Initiierung der Teilungsfurche, die zwischen den aufgeteilten Chromosomen in der Äquatorialebene liegt. Während der Telophase ist diese Einschnürung soweit fortgeschritten, dass die beiden Zellen nur noch durch eine interzelluläre Brücke, bestehend aus antiparallelen Mikrotubuli, die an ihren Enden überlappen und einen mikroskopisch sichtbaren „Midbody“ bilden, verbunden sind. Der finale Schritt stellt die Abszission dar, die eigentliche physische Trennung der interzellulären Brücke (Steigemann & Gerlich 2009; Jing Li et al. 2010).

All diese zellulären Ereignisse unterliegen einer räumlichen und zeitlichen Koordination, um eine erfolgreiche Zytokinese zu gewährleisten.

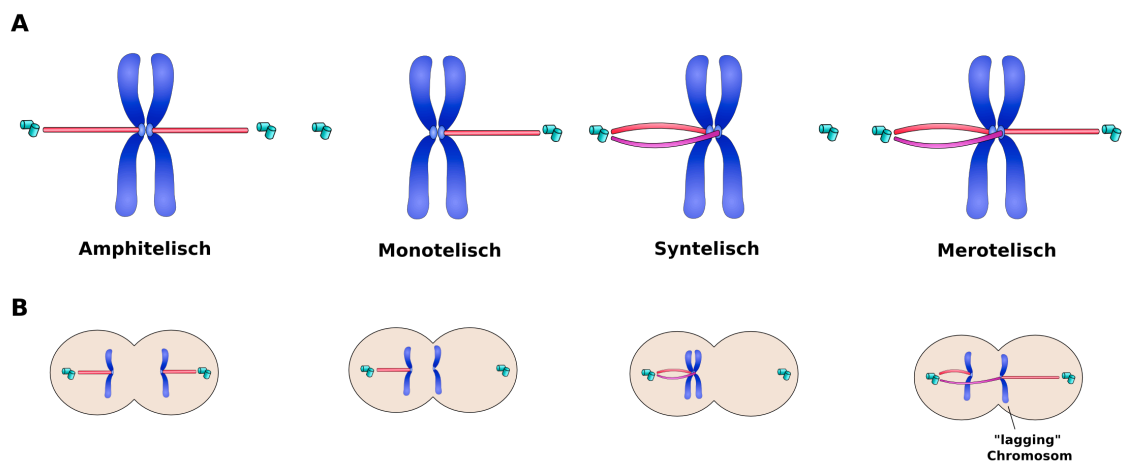


Abb. 5: Die korrekten und fehlerhaften Kinetochor-Mikrotubuli Befestigungen und deren Konsequenzen während der Mitose (A) Die unterschiedlichen Möglichkeiten der Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen in der Prometaphase und Metaphase. Eine korrekte amphitelische Verbindung bedeutet, die Kinetochore jedes Schwesterchromatids sind mit den Mikrotubuli von gegensätzlichen Centrosomen verbunden. Monotelische Verbindungen treten in der Prometaphase sehr häufig auf und das unbefestigte Kinetochor würde den SAC aktivieren bis die beiden Kinetochore amphitelisch verbunden sind. Bei einer syntelischen Verbindung greifen Mikrotubuli von einem Centrosom an die beiden Kinetochore der Schwesterchromatiden. Die fehlerhafte Zugspannung würde ebenfalls den SAC aktivieren und die falsche Kinetochor-Mikrotubuli Verbindung lösen. Bei einer merotelischen Verbindung ist ein einzelnes Kinetochor mit beiden Centrosomen verbunden. Die Auflösung dieser Verbindung kann durch die Aurora B Kinase erfolgen. (B) Konsequenzen der Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen in der Anaphase. Beeinträchtigungen des SAC können in der Anaphase, in Zellen mit fehlerhaften Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen, zu einer ungleichen Aufteilung der Chromosomen und somit zu Aneuploidie führen. Bei merotelischen Verbindungen treten sogenannte „lagging“ Chromosome auf, die zeitlich den anderen Chromosomen hinterher hängen und auf Höhe des Zelläquators verweilen. Blau, Chromosomen; Türkis, Centrosomen; Rot, Mikrotubuli; modifiziert nach Musacchio & Salmon 2007

Während der Metaphase setzt sich der mitotische Spindelapparat aus Mikrotubuli zusammen, die von den Centrosomen an die Kinetochoren (Kinetochormikrotubuli) und Zellcortex reichen (astrale Mikrotubuli) sowie aus gegenläufigen interpolaren Mikrotubuli. Mit Beginn der Anaphase kommt es zu einer dramatischen Reorganisation des Spindelapparates. Die Kinetochormikrotubuli verkürzen sich, astrale Mikrotubuli werden verlängert, um die Chromatiden zu trennen und zudem zentrale, antiparallele Spindelmikrotubuli gebildet (Tournebize et al. 2000; Rusan et al. 2001). Die zentralen Spindeln spielen dabei in der Zytokinese für die Ausbildung des kontraktilen Rings und die Abszission eine wichtige Rolle (Mabuchi & Okuno 1977; Knecht & Loomis 1987; Straight et al. 2003; Wheatley & Y. Wang 1996; Raich et al. 1998; Jantsch-Plunger et al. 2000). Aber auch die äquatorialen, astralen Mikrotubuli tragen im Bereich des Zellcortex, durch die gezielte Retention beteiligter Proteine, zur Ausbildung des kontraktilen Ringes bei (Dechant & Glotzer 2003; Bringmann & Hyman 2005; Werner et al. 2007; Murthy & Wadsworth 2008).

Für die Ausbildung der zentralen Spindel Mikrotubuli spielen verschiedene Faktoren eine Rolle (Glotzer 2009) (Abb. 6 B). Dazu gehören PRC1, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein mit Mikrotubuli bündelnden Eigenschaften, der Centralspindilin Komplex sowie der Chromosomale Passenger Komplex (CPC) (Mishima et al. 2002; Mollinari et al. 2002; Straight et al. 2003).

Der molekulare Auslöser für die Bildung der zentralen Spindeln ist die Inaktivierung des Cdk1/Cyclin B Komplexes während der Metaphase-Anaphase Transition durch den APC/C Komplex (Musacchio & Salmon 2007). Dadurch wird garantiert, dass erst nach der Trennung der Schwesterchromatiden die Zytokinese initiiert wird. Cdk1 phosphoryliert während der Metaphase PRC1, Mklp1, Ect2, INCENP und Aurora B und verhindert dadurch die Bindung und Lokalisation dieser Faktoren an die Mikrotubuli (Zhu et al. 2006; Mishima et al. 2004; Hümmer & Mayer 2009; Murata-Hori et al. 2002; Niiya et al. 2006).

PRC1 ist ein dimeres, Mikrotubuli-assoziiertes Protein mit einer Mikrotubuli bündelnden Funktion, das durch den Verlust der inhibitorischen Cdk1 Phosphorylierung während der Anaphase bei der Bildung der zentralen Spindeln beteiligt ist (W. Jiang et al. 1998; Mollinari et al. 2002). Zudem kann es verschiedene Kinesin Motorproteine wie Mklp1, Mklp2 und KIF4 binden (Zhu & W. Jiang 2005; Neef et al. 2007)

Centralspindilin ist ein tetramerer Komplex, der im Zentrum der zentralen Spindeln lokalisiert ist (Raich et al. 1998; Mishima et al. 2002; Sellitto & Kuriyama 1988; Adams et al. 1998). Er besteht aus einem Dimer des Kinesin Motorproteins Mklp1 und einem Dimer dem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) MgcRacGAP (CYK4, RacGAP1) (Mishima et al. 2002; Pavicic-Kaltenbrunner et al. 2007).

Mklp1 sorgt für den Transport von MgcRacGAP an den Äquator, wo es Ect2, einen Rho GEF (Guanin Nucleotid Exchange Factor) bindet (Somers & Saint 2002; Chalamalasetty et al. 2006).

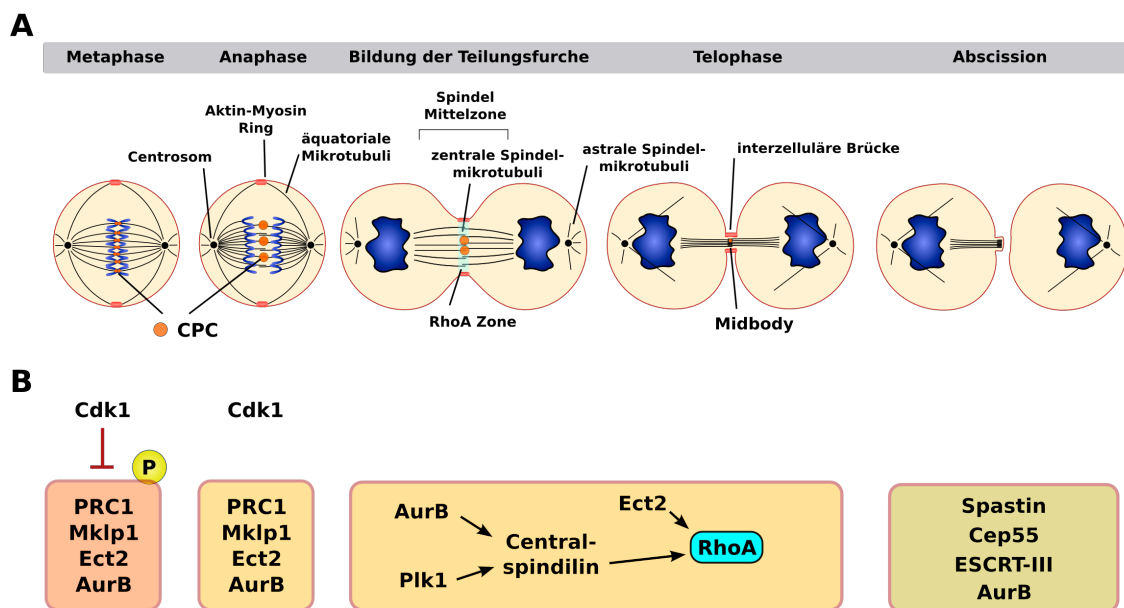


Abb. 6: Stadien der Zytokinese. (A) Schematische Darstellung des Verlaufs durch die unterschiedlichen Teilungsstadien sowie die morphologischen Besonderheiten. (B) Modell der molekularen Abläufe in den einzelnen Phasen. Während der Metaphase werden PRC1, Mklp1, der GTP Exchange Factor Ect2 und AurB (Aurora B Kinase) von Cdk1 phosphoryliert und inhibiert. Mit Beginn der Metaphase-Anaphase Transition wird Cdk1 inaktiviert und die Cdk1 Substrate dephosphoryliert. PRC1 fördert die Bildung der zentralen Spindelmikrotubuli und rekrutiert Kinesin Motorproteine wie Mklp1 und Mklp2 aber auch Proteinkinasen wie Plk1 und AurB im Bereich des Zelläquators. Aurora B und Plk1 phosphorylieren die Mitglieder des Centralspindilinkomplexes Mklp1 und MgcRacGAP, die dann zusammen mit Ect2 für die Aktivierung der GTPase RhoA im Bereich der zukünftigen Teilungsebene sorgen. Die Aktivierung von RhoA ist wichtig für die Ausbildung des kontraktiven Ringes und die Initiation der Teilungsfurche. Spastin, Cep55, ESCRT-III und Aurora B sind wichtige Faktoren in der Abscission, dem letzten Schritt der Zytokinese. (Cdk1, cyclin dependent kinase; Cep55, Centrosomal protein of 55 kDa; Ect2, Epithelial cell-transforming sequence 2; ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; Mklp, mitotic kinesin-like protein; Plk1, polo-like kinase 1; PRC1, Protein regulator of cytokinesis 1) Blau, DNA; modifiziert nach Steigemann & Gerlich 2009 und Barr & Gruneberg 2007

Eine weitere wichtige Kinase für die Ausbildung der zentralen Mikrotubuli ist das chromosomale Passenger Protein Aurora B, welches zusammen mit Survivin, Borealin und INCENP den chromosomalen Passenger Complex (CPC) bildet

(Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007a)(siehe 1.2.2.3). In einer Vielzahl von Experimenten konnte die Bedeutung des CPC für die Zytokinese demonstriert werden (Vader, Medema, et al. 2006b; Vagnarelli & Earnshaw 2004). Die Funktion des CPC in der Zytokinese zeigt sich in Aurora B-depletierten Zellen, wo sowohl die Ausbildung der zentralen Spindeln als auch die Initiierung der Teilungsfurche scheitert (Kaitna et al. 2000). Während der Metaphase-Anaphase Transition relokalisiert der CPC von den Centromeren der Chromosomen an die zentrale Spindel der Mittelzone. Dabei spielt das Kinesin 6 Motorprotein Mklp2 eine wichtige Rolle (Gruneberg et al. 2004). Der Mklp2 abhängige Transfer von Aurora B führt zur Phosphorylierung von Mklp1, einem Bestandteil von Centralspindilin (Neef et al. 2006).

Die zentralen Spindelmikrotubuli übertragen demnach, durch die gezielte Lokalisation von RhoA Regulatoren im Bereich der Zellcortex, eine räumliche Information für die Teilungsfurche (Piekny et al. 2005). Diese RhoA Regulatoren sind der GDP-GTP Exchange Factor (GEF) ECT2 und das GTPase-activating Protein (GAP) MgcRacGAP, Bestandteil des Centralspindilin Komplexes (Piekny et al. 2005; Somers & Saint 2002). Zusammen bilden sie einen Komplex, der durch Mklp1 auf den Bereich der zentralen Spindeln beschränkt ist und für die Akkumulation von RhoA im Bereich der Teilungsfurche sorgt (Yüce et al. 2005). RhoA rekrutiert und aktiviert dann weitere Zielproteine wie Aktin, Rock und Myocin II, um die Furchenbildung und Abschnürung zu induzieren (Matsumura 2005) (Abb. 6 B).

1.1.4 DNA-Schäden und Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die zum einen durch internen Ereignisse, wie z.B. DNA Schäden oder extrinsisch durch eine Rezeptor-Ligand Bindung induziert werden kann (Fulda & Debatin 2006; R. S. Y. Wong 2011)(Abb.7).

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch die Bindung von Todes-Liganden an den entsprechenden Todes-Rezeptoren der Tumor Necrosis Factor Familie (TNFR), wie z.B. Fas/CD95, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Rezeptor (TRAILR) und TNFR initiiert (Ashkenazi 2008; Wajant 2002; Schütze et al. 2008; Mehlen & Bredesen 2011).

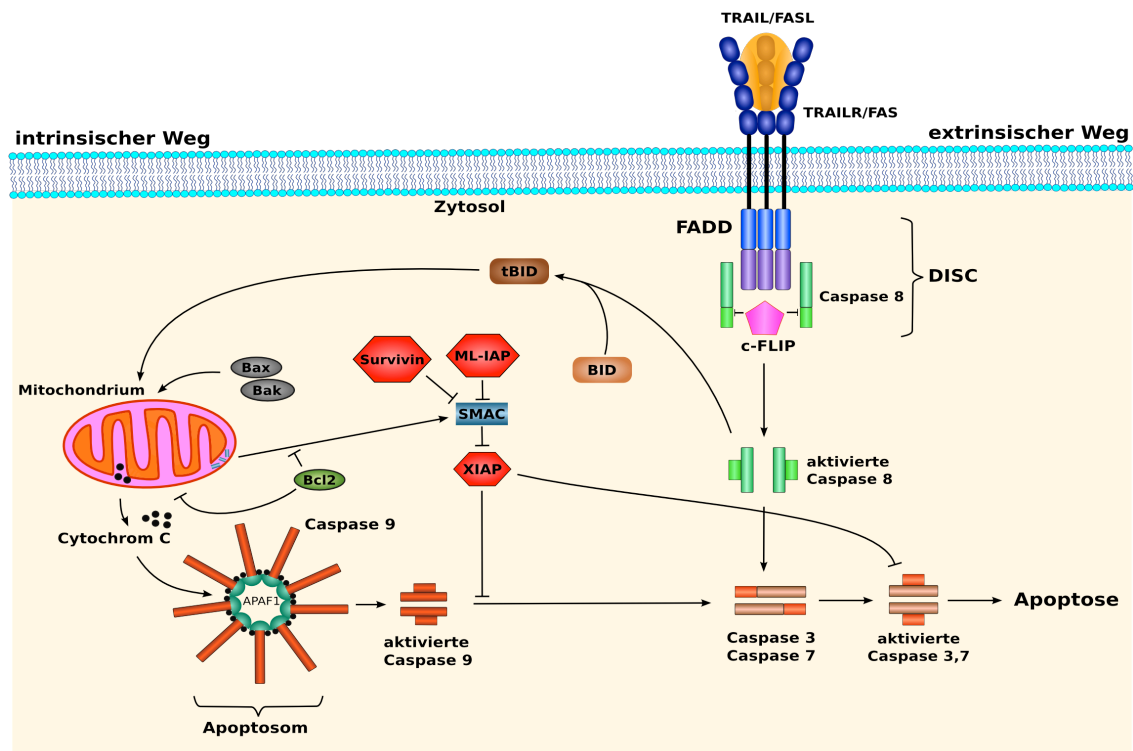


Abb. 7: Der intrinsische und extrinsische Apoptose Signalweg. Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung der Liganden FASL, TRAIL oder TNF an die Todesrezeptoren der TNFR Familie initiiert. Durch die Trimerisierung der Rezeptoren werden weitere Faktoren wie das Adaptermolekül FADD und Caspase 8 rekrutiert, die dann den DISC Komplex bilden was zu einer Spaltung und Aktivierung von Caspase 8 führt. Die Bildung des Komplexes kann durch c-Flip unterbunden werden. Aktivierte Caspase 8 kann dann die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren sowie über die Spaltung von Bid zu tBid (truncated Bid) den intrinsischen Apoptoseweg einleiten. Der intrinsische Apoptose Signalweg wird durch die Freisetzung von Cytochrom C und SMAC aus den Mitochondrien in das Zytosol initiiert. Dabei führen proapoptotischen Moleküle wie Bax und Bak zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Antiapoptotische Proteine wie Bcl2 können dagegen die Freisetzung von Cytochrom C unterbinden. Freigesetztes Cytochrom C bildet mit Caspase 9 und APAF1 das Apoptosom, was zur Spaltung und Aktivierung von Caspase 9 und daraufhin Caspase 3 führt. Das freigesetzte SMAC kann XIAP binden und so die XIAP-abhängige Inhibition der Caspasen 3, 7 und 9 aufheben. Die anderen Mitglieder der „Inhibitor of Apoptosis“ Familie wie Survivin und ML-IAP können ebenfalls an SMAC binden, was zu einer Blockierung der Apoptose durch freiwerdendes XIAP führt. (BID, BH3-interacting domain death agonist; c-FLIP, cellular Flice-like inhibitory protein; DISC, death inducing signalling complexes, FADD, FAS-associated death domain protein; ML-IAP, Melanoma IAP; SMAC, second mitochondria-derived activator of caspase; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; XIAP, X chromosome-linked IAP). Modifiziert nach Fulda & Vucic 2012

Der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg kann durch zellulären Stress, insbesondere DNA Schäden oder ROS (reaktive O₂ Spezies), über die Freisetzung von Cytochrom C, dem Apoptosis-Inducing Factor (AIF), der Endonuklease G sowie dem Second Mitochondria-derived Activator of Caspase (SMAC/Diablo) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol eingeleitet werden (Fulda et al. 2010; Kroemer et al. 2007). Proapoptotische Faktoren der Bcl2-Familie, die über p53 reguliert werden (Hemann & Lowe

2006), wie Bak und Bax, führen dabei zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-membran und zudem zu einem irreversiblen Absinken des mitochondrialen Membranpotentials (Tait & Green 2010; Brenner & Grimm 2006). Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl2 Familie können der Cytochromfreisetzung entgegen wirken. So bindet z.B. Bcl2 an den mitochondrialen „Voltage-dependent Anion Channel“ (VDAC), was zu einer Schließung der Kanäle führt und die Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien verhindert (Shimizu et al. 1999). Im Zytosol führt freigesetztes Cytochrom C zur Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom C, Caspase 9 und dem Apoptotic Protease-Activating Factor 1 (APAF1) (Fulda et al. 2010; P Li et al. 1997; Zou et al. 1997). Dieser Apoptosom Komplex spaltet Caspase 9, die daraufhin die Effektorcaspase 3 aktiviert.

SMAC wird ebenfalls von gestressten Mitochondrien freigesetzt und fördert eine Caspase Aktivierung, da es die Inhibitor of Apoptosis Proteine (IAP) XIAP, cIAP1 und cIAP2 hemmen kann (Chai et al. 2000; Z. Liu et al. 2000b; Wu et al. 2000)(siehe 1.2.1). Weitere mitochondriale Proteine, wie z.B. AIF und Endonuklease G, können ebenfalls in den Zellkern translozieren und führen dort zu einer Caspase unabhängigen groben Fragmentierung der genomischen DNA (Joza et al. 2001; Susin et al. 1999; L-Y Li et al. 2001; Büttner et al. 2007).

1.2 Die Inhibitor der Apoptose Proteine (IAP)

1.2.1 Die Inhibitor der Apoptose Protein Familie

Eine wichtige Gruppe antiapoptotischer Moleküle sind die Mitglieder der „Inhibitor of Apoptosis“ Protein (IAP) Familie. Diese Proteine interferieren mit der Aktivierung von Caspasen (Fulda & Vucic 2012). Eine Überexpression der IAP Proteine ist in vielen malignen Tumoren beschrieben und korreliert mit einer verringerten Überlebensrate, Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie als auch einer erhöhten Tumorprogression (Altieri 2003; LaCasse et al. 2008; Fulda & Vucic 2012; Srinivasula & al 2008).

Die ersten IAP Proteine wurden im Genom der Baculoviren *Orgyia pseudotsugata* und *Cydia pomonella* entdeckt, als man nach anti-apoptotischen Genen für die virale Replikation suchte (Crook et al. 1993; Birnbaum et al.

1994). Seitdem sind in weiteren Metazoen homologe Gene der IAP's identifiziert worden (Srinivasula & al 2008; Fulda & Vucic 2012).

Das erste humane, nicht virale IAP Gen NAIP (Neuronal inhibitor of apoptosis Protein - *BIRC1*) wurde 1995 entdeckt (Roy et al. 1995). Seitdem sind für den Menschen sieben weitere Proteine der IAP Familie beschrieben: cellular IAP1 (c-IAP1; *BIRC2*), cellular IAP2 (c-IAP2; *BIRC3*), X Chromosome-linked IAP (XIAP; *BIRC4*), Survivin (*BIRC5*) Ubiquitin-conjugating BIR Domain Enzyme Apollon (Bruce; *BIRC6*), Melanoma IAP (ML-IAP; *BIRC7*) und IAP-like Protein 2 (ILP2; *BIRC8*)(Roy et al. 1995; Rothe et al. 1995; Duckett et al. 1996; Liston et al. 1996; Uren et al. 1996; Lagacé et al. 2001; Richter et al. 2001; Hauser et al. 1998; Z. Z. Chen et al. 1999; Ambrosini et al. 1997; Vucic et al. 2000; Kasof & Gomes 2001)(Abb.8).

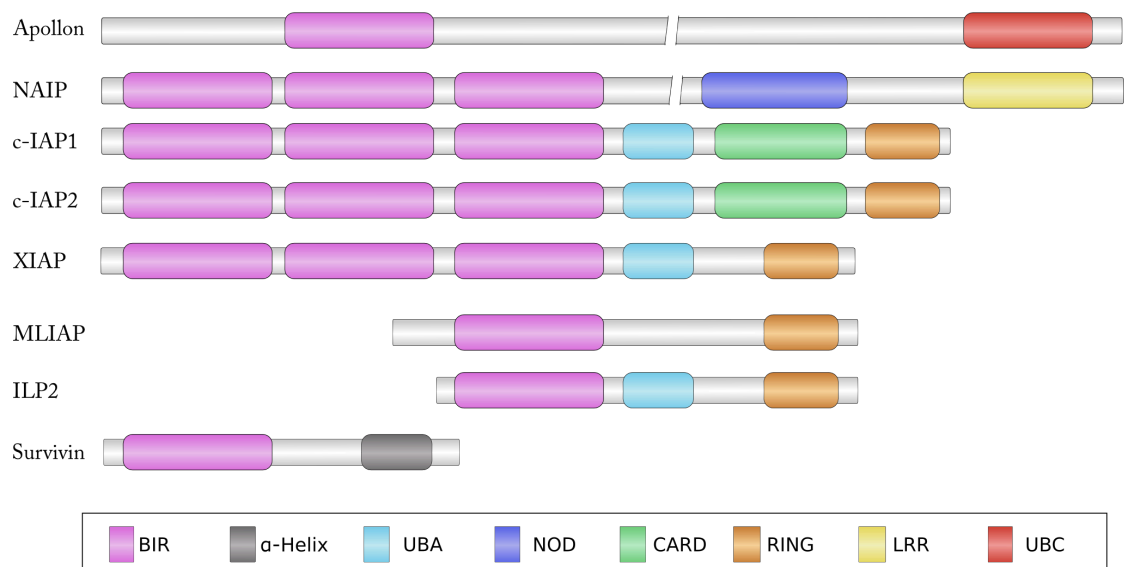


Abb. 8: Übersicht und struktureller Vergleich der Mitglieder der IAP Familie.

Charakteristisch für diese Familie ist das Vorkommen mindestens einer Baculovirus IAP repeat domain (BIR). Zudem weisen einige IAP eine E3 Ubiquitinligase Domäne (RING) an ihrem Carboxyterminus auf. XIAP, ILP2 und c-IAP1&2 tragen zentral eine Ubiquitin-associated (UBA) Domäne, c-IAP1&2 zudem noch eine Caspase-recruitment (CARD) Domäne. NAIP besitzt als einzigstes IAP zusätzlich zur BIR Domäne noch eine Nucleotide-binding and Oligomerization (NOD) Domäne und eine Leucine-rich Repeat (LRR) Domäne.

Am C-Terminus von Apollon befindet sich eine Ubiquitin-conjugating (UBC) Domäne und an Survivin eine „coiled-coil“ α-Helix, an welche die Chromosomalen Passenger Proteine INCENP und Borealin binden können. (RING, Really Interesting New Gen). Modifiziert nach Fulda & Vucic 2012

Charakteristisch für alle IAP's ist ihre Baculovirus IAP Repeat (BIR) Domäne, bestehend aus 70-80 Aminosäuren, die ein CX₂CX₁₆HX₆C (C, Cystein; H, Histidin; and X, beliebige Aminosäure) Sequenz Motiv aufweisen und die bis zu

fünf alpha-Helices und eine dreifache β -Faltblattstruktur bilden. Diese BIR Helices und β -Faltblattstrukturen formen einen hydrophoben Kern, der ein Zink Atom binden kann (Hinds et al. 1999; Sun et al. 1999; Sun et al. 2000; Verdecia et al. 2000).

Die Mitglieder der IAP Familie besitzen ein bis drei dieser BIR Domänen, die der Protein-Protein Interaktion dienen (Srinivasula & al 2008). Zusätzlich zu ihrer BIR Domäne besitzen die IAP noch diverse weitere Domänen. So weisen c-IAP1, c-IAP2, XIAP und ML-IAP am C-Terminus eine „Really Interesting New Gene“ (RING) Domäne auf, welche diese Proteine als Kofaktor und gleichzeitig als Ziel für Ubiquitinligasen fungieren lässt (Vaux & Silke 2005; Varfolomeev & Vucic 2008). Zudem besitzen c-IAP1, c-IAP2, XIAP und ILP2 zentral noch eine zusätzliche Ubiquitin associated Domäne (UBA), die für die Bindung an Mono- oder Polyubiquitinketten benötigt wird (Blankenship et al. 2009; Gyrd-Hansen et al. 2008). Einige IAP's weisen zusätzlich noch eine Caspase recruitment domain (CARD) wie c-IAP1&2, ein Ubiquitin-conjugating domain (UBC) wie Apollon, eine „coiled-coil“ α -Helix wie Survivin sowie eine „leucine-rich repeat“ (LLR) und eine Nucleotide-binding and Oligomerization (NOD) Domäne wie NAIP auf (Hauser et al. 1998; Z. Z. Chen et al. 1999; Jeyaprakash et al. 2007; Liston et al. 1996; Wilmanski et al. 2008).

Ursprünglich wurde postuliert, das IAP die Apoptose durch eine direkte Bindung an Caspasen inhibieren, allerdings konnte bisher nur für XIAP eine direkte und effektive Inhibierung der Caspasen 3, 7 und 9 demonstriert werden (Eckelman et al. 2006).

Die Bindung von XIAP an Caspase 9 erfolgt durch die BIR3 Domäne sowie dem N-terminalen Bereich der p12 Untereinheit der prozessierten Caspase 9, der homolog zu einer SMAC-Sequenz ist (Srinivasula et al. 2001; Shiozaki et al. 2003).

Für die Interaktion von XIAP mit Caspase 3 und 7 ist eine Sequenz zwischen der BIR1 und BIR2 Domäne von XIAP sowie die Substrat-bindende Domäne der aktivierten Caspasen notwendig (Huang et al. 2001; Chai et al. 2001; Riedl et al. 2001; Silke et al. 2001).

Eine Interaktion mit der Caspase 9 ist auch mit NAIP beschrieben, allerdings erfolgt dies nicht mit einer der drei BIR Domänen, sondern mit der Nucleotid

binding oligomerization domain (NOD) und LRR, und das nur in Anwesenheit von ATP (Davoodi et al. 2004; Davoodi et al. 2010; Karimpour et al. 2011).

Ein weiteres Beispiel für ein BIR interagierendes Molekül ist das mitochondriale Protein SMAC/DIABLO („Second derived mitochondrial activator of caspases“). Nach Beeinträchtigung des mitochondrialen Membranpotentials wird SMAC aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt und kann dort IAP inhibieren (Abb.7). Die Bindung an die BIR2 und BIR3 Domäne von XIAP erfolgt dabei durch eine N-terminale Sequenz von SMAC, was zu einer kompetitiven Bindung von SMAC und den Caspasen an XIAP führt (Shiozaki & Yigong Shi 2004; Srinivasula et al. 2000; Srinivasula et al. 2001; Huang et al. 2003).

SMAC scheint zudem als ein allgemeiner Inhibitor von IAP's zu wirken, da er ebenfalls an c-IAP1 und -2, Survivin, ML-IAP und Apollon, nicht aber an NAIP bindet (Verhagen et al. 2000; Vucic et al. 2000; Du et al. 2000; Davoodi et al. 2004; Hao et al. 2004; Qiu & A. L. A. Goldberg 2005).

Die anderen IAP Proteine wie c-IAP1 und -2, Apollon, Survivin und ML-IAP sind trotz experimentell belegter Interaktion mit Caspasen offensichtlich keine potenten Inhibitoren der Caspasen (Vucic et al. 2005; Hegde et al. 2002). Man nimmt heute an, dass durch ihre Bindung an SMAC die XIAP-SMAC Interaktion verhindert wird, was dann in einer Inhibition von Caspasen durch freigesetztes XIAP resultieren kann (Vucic et al. 2005; Hao et al. 2004; Fulda & Vucic 2012; LaCasse et al. 2008) (Abb.7).

Es wird vermutet, dass die Unterdrückung der Apoptose Signaltransduktion durch IAP-Moleküle, aber auch durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie, die Tumorgenese neoplastischer Zellen fördern kann (Hanahan & Weinberg 2011). Viele Tumore exprimieren tatsächlich hohe Level an anti-apoptotischen Proteinen wie die der IAP Familie (Srinivasula & al 2008; Fulda & Vucic 2012; LaCasse et al. 2008).

Zudem konnte in einem Lymphom des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes eine Tranlokation festgestellt werden, die die BIR Domäne von c-IAP2 mit dem Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1 (MALT1) verknüpft, was zu einer konstitutiv aktivierten NF- κ B Signalweg führt (Dierlamm et al. 1999; Akagi et al. 1999; H. Zhou et al. 2005; Varfolomeev et al. 2006).

1.2.2 Survivin - ein Inhibitor der Apoptose-Protein mit dualer Funktion in Apoptose und Zellteilung

1.2.2.1 Einteilung des Survivins in die IAP-Familie und Isoformen

Das Survivin zählt zur Familie der „Inhibitor of Apoptosis Proteine“ (IAP) und scheint eine duale Funktion als IAP und als CPP zu besitzen. Wie die anderen Mitglieder der IAP's besitzt Survivin N-terminal eine BIR Domäne (Ambrosini et al. 1997; F Li et al. 1998), die der Dimerisierung, Interaktionen mit weiteren Proteinen sowie der Lokalisation an den Centromeren der Chromosomen dient (Verdecia et al. 2000; Chantalat et al. 2000; Lens, Rodriguez, et al. 2006a; Vader, Kauw, et al. 2006a)(Abb. 9 A). Der C-Terminus stellt eine α -Helix dar, die für die Bindung an Mikrotubuli sowie INCENP und Borealin notwendig ist (Wheatley & McNeish 2005) (siehe 1.2.2.3).

Das Survivin besteht aus 142 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 16,5 kDa und wird durch das *BIRC5* Gen codiert. Unter physiologischen Umständen liegt Survivin als Homodimer vor (Ambrosini et al. 1997; Chantalat et al. 2000; Verdecia et al. 2000).

Durch alternatives Spleißen des Survivin Gens können bis zu fünf Isoformen entstehen (Mahotka et al. 1999; Badran et al. 2004; Caldas et al. 2004)(Abb. 9 B). Das vorherrschende 16,5 kDa Survivin entsteht durch die Verknüpfung der Exons 1 bis 4. Survivin 2 β besteht ebenfalls aus Exon 1 bis 4 mit einer zusätzlich 69 bp Sequenz aus Intron 2. Survivin- Δ Ex3 setzt sich aus Exon 1, 2 und 4 zusammen und Survivin 3 β aus Exon 1 bis 4, mit einer weiteren 169 bp großen Sequenz aus Intron 3. Survivin-2 α besteht aus Exon 1 und 2 und einer zusätzlichen Sequenz (192 bp) aus Intron 2. Survivin-2 β und Survivin-2 α wirken dabei proapoptotisch, wohingegen Survivin, Survivin- Δ Ex3 und Survivin-3 β antiapoptotisch wirken (Mahotka et al. 1999; Badran et al. 2004; Caldas et al. 2005).

Für die grundlegenden Funktionen von Survivin, d.h. Apoptose Inhibierung und Regulation der Zellproliferation, werden unterschiedliche Survivin-Fraktionen verantwortlich gemacht (Abb. 10). Bisher wurden nukleäre, zytoplasmatische, mitochondriale und extrazelluläre Survivin-Fraktionen detektiert (Fortugno et al. 2002; Dohi et al. 2004; Dallaglio et al. 2012).

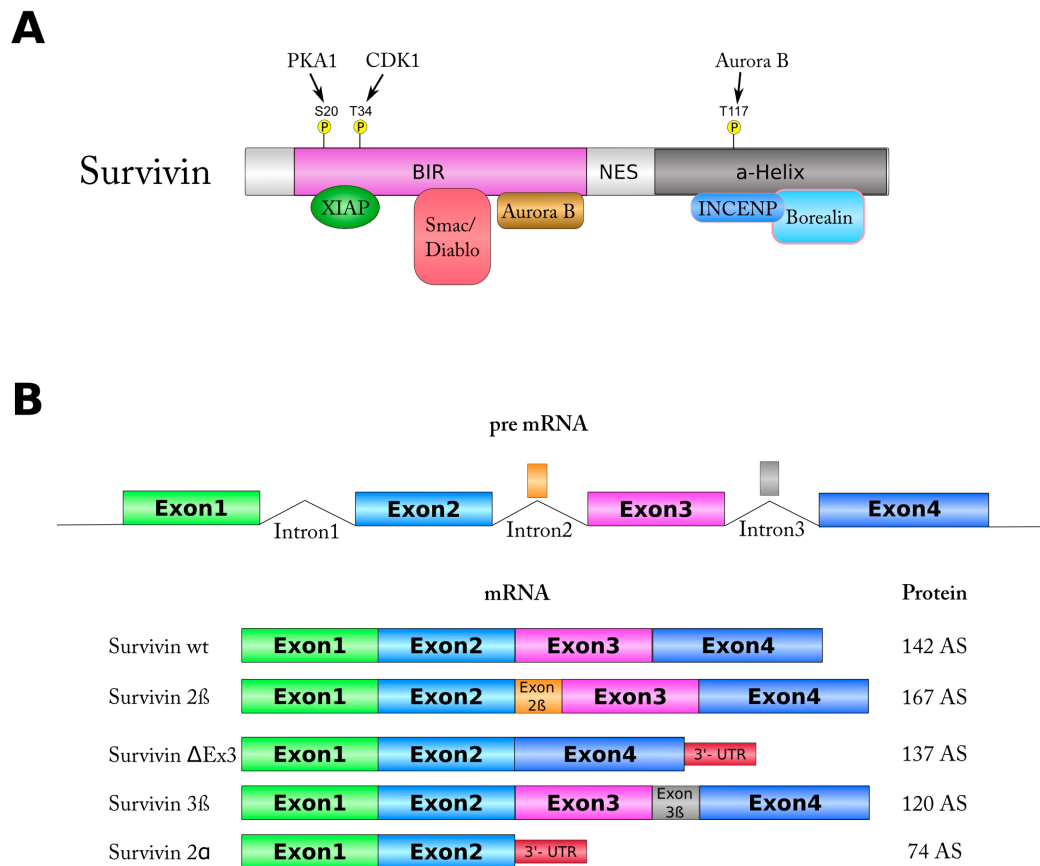


Abb. 9: Das Survivin und seine Isoformen. (A) Schematische Darstellung der Survivin Proteinstruktur mit Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen der Interaktionspartner. (B) Schematische Darstellung der Survivin pre-mRNA mit seinen fünf Spleißvarianten. Bei Survivin 3 β liegt in dem zusätzlichen Exon 3 β ein Stop Codon, was zu einem verkürzten 120 AS großen Protein führt.

(BIR: Baculovirus IAP repeat; INCENP: Inner centromere protein; NES: Nuclear export signal; PKA: Protein kinase A; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein) modifiziert nach Pennati et al. 2008

Für die Rolle des Survivins während der Zellteilung wird eine nukleäre Lokalisation postuliert (siehe 1.2.2.3), wohin gegen mitochondriales Survivin vor Apoptose schützen soll (Fortugno et al. 2002; Colnaghi et al. 2006) (siehe 1.2.2.2). Für zytoplasmatisches Survivin ist keine protektive Funktion bekannt, da es sich wahrscheinlich um translationally modifiziertes, freigesetztes mitochondriales Survivin nach einem Apoptose Stimuli handelt (Dohi & Altieri 2004). Erst kürzlich wurde eine, durch exosomalen Transport nach einem Stressstimulus bedingte (Khan et al. 2011), extrazelluläre Survivin Lokalisation festgestellt, die anti-apoptotische sowie proliferative Eigenschaften aufweist (Mera et al. 2007; Khan et al. 2009).

Wie diese unterschiedlichen Pools an Survivin zusammenarbeiten, ist noch nicht klar, man vermutet aber, dass posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle dabei spielen (Abb. 9). So moduliert die Monoubiquitylierung von Survivin an Lysin 48 und Lysin 63 die Lokalisation an den Centromeren und den zentralen Spindelmikrotubuli (Vong et al. 2005), wohin gegen Phosphorylierungen an Survivin durch Cdk1, Aurora B und die Polo-like Kinase 1 (Plk1) Einfluss auf die Proteinstabilität, subzelluläre Lokalisation, Proteininteraktion und Zytoprotektion während des Zellzyklus haben (O'Connor et al. 2000; Tsukahara et al. 2010; Barrett et al. 2009; Wheatley et al. 2007; Wheatley et al. 2004; Colnaghi & Wheatley 2010).

1.2.2.2 Rolle des Survivins in apoptotischen Prozessen

Ursprünglich wurde das Survivin als Inhibitor der Apoptose beschrieben und wie andere IAP resultiert diese Inhibition durch Bindung der BIR Domäne an Effektorinasen, speziell Caspase 3 (Tamm et al. 1998; Kobayashi et al. 1999; O'Connor et al. 2000; F Li et al. 1999; Shin et al. 2001). Tatsächlich ist auch Survivin in der Lage, verschiedenen intrinsischen und extrinsischen Mediatoren der Apoptose wie FAS, TRAIL, Caspase 3, 7, 8 und p53 entgegen zu wirken und die Apoptose zu hemmen (Mahotka et al. 1999; Tamm et al. 1998; Suzuki et al. 2000; Mirza et al. 2002; Zaffaroni et al. 2002; Azuhata et al. 2006). Allerdings bleibt die Wirkung, d.h. die Inhibition der Effektorcaspasen durch Survivin umstritten (Banks et al. 2000; Changqing Li et al. 2008).

Heute geht man eher davon aus, dass Survivin die Apoptose nicht über eine direkte Interaktion mit den Effektorcaspasen blockiert (Eckelman et al. 2006; Altieri 2008). Vielmehr vermutet man einen protektiven Survivin-Effekt in der Apoptose Signalkaskade oberhalb der Aktivierung der Effektorcaspasen.

So assoziiert z.B. Survivin mit dem Hepatitis B X-interacting Protein (HBXIP) und dieser Komplex bindet an Caspase 9, was zu einer Inhibition der mitochondrialen Apoptose führt (Marusawa et al. 2003). Ein weiterer Mechanismus der Survivin vermittelten Inhibierung der Apoptose resultiert aus der Interaktion von Survivin mit SMAC/DIABLO. Dadurch werden an SMAC/DIABLO gebundene IAPs freigesetzt, die dann spezifisch an Caspasen binden können (Verhagen et al. 2000; Du et al. 2000; Sun et al. 2005) (Abb.7).

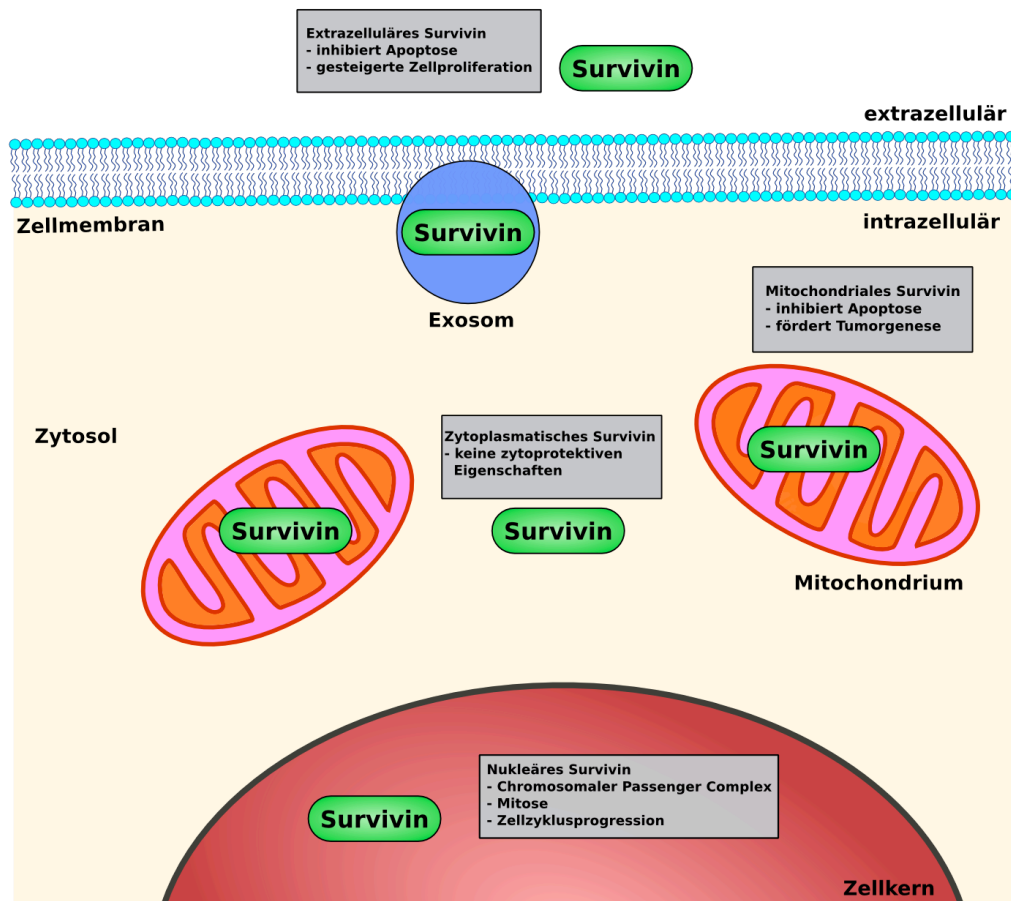


Abb. 10: Die Survivin Lokalisationen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen. Das Survivin kann sowohl extrazellulär als auch intrazellulär vorkommen. Der extrazelluläre Pool inhibiert Apoptose und führt zu einer erhöhten Proliferation von Tumorzellen. Der exosomale Transport erfolgt dabei nach einer Stressinduktion. Intrazellulär sind bisher drei Survivin Lokalisationen beschrieben wurden: zytoplasmatisch, nukleär und mitochondrial. Nukleäres und zytoplasmatisches Survivin besitzt keine zytoprotektiven Eigenschaften, obwohl die Translokation in den Zellkern die Zellzyklus Progression fördert. Mitochondriales Survivin schützt die Zellen, indem es die Apoptose inhibiert. Modifiziert nach Dallaglio et al. 2012

Zudem kann Survivin an XIAP binden, was den proteosomale Abbau verhindert und zur Stabilisierung von XIAP führt (Dohi et al. 2004; Dohi et al. 2007).

Eine erhöhte Zytoprotektion durch eine Heterodimerisierung von Survivin mit seinen Spleißvarianten ist ebenfalls beschrieben (Caldas et al. 2005).

Eine weitere Funktion der IAP, speziell Survivin, die in den letzten Jahren in den Fokus geraten ist, liegt in der Reaktion auf zellulären Stress. So konnten in proteomischen Untersuchungen drei molekulare Chaperone, das Heat-shock protein 90 (Hsp90), Hsp60 und das „Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein“ (AIP) identifiziert werden, die *in vivo* mit Survivin interagieren (Fortugno et al. 2003; Ghosh et al. 2008; Kang & Altieri 2006). Diese Interaktionen

könnten Survivin vor einer proteosomalen Degradation schützen und damit die intrinsische Apoptose inhibieren.

Erst kürzlich wurde in humanen Glioblastomzellen festgestellt, dass nukleäres Survivin einen Einfluss auf die DNA Reparatur hat. Nach Bestrahlung lokalisiert Survivin im Nukleus der Zellen und bindet Mitglieder der DNA Damage Reparatur wie DNA-PK, MDC1, γ H2AX und Ku70. Eine RNAi vermittelte Survivin-Depletion führte zu einer Beeinträchtigung der DNA Reparatur und DNA-PK Aktivität (Capalbo et al. 2010; Reichert et al. 2011).

In teilungsaktiven Zellen findet man eine Expression von Survivin vorwiegend in G2/M Phase des Zellzyklus (F Li & Altieri 1999a). Ausdifferenzierte Zellen und damit G0-arretierte Zellen zeigen keine Survivin Expression (Leung et al. 2007). In einer Vielzahl von Tumorentitäten findet man Survivin stark überexprimiert vor (Velculescu et al. 1999; Altieri 2001).

Da die hohe Expression in Neoplasien mit einer erhöhten Resistenz der Tumoren gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie einher geht, stellt Survivin einen wichtigen prognostischen Marker für den Erfolg einer Chemo- oder Strahlentherapie dar, der mit einer geringeren Überlebensprognose korreliert (Zaffaroni et al. 2002; Sah et al. 2006; Zaffaroni et al. 2005; Su et al. 2010; Taubert et al. 2010; Xiaoyuan et al. 2010).

In vielen Studien konnte auf transkriptioneller Ebene eine veränderte Survivin Promoteraktivität zwischen Normalgewebe und Tumorzellen festgestellt werden (F F Li & Altieri 1999b; Ulasov et al. 2007; J.-S. Chen et al. 2004). Es wurden zudem Signalwege identifiziert, wo aktivierte Onkogene wie Stat3, NF κ B und myc zu einer gesteigerten Promoteraktivität von Survivin führten (Siddiquee et al. 2007; Kawakami et al. 2005; Cosgrave et al. 2006). Aber nicht nur Onkogene haben einen Einfluss auf die Survivin Expression, auch der Verlust von Tumorsuppressorgenen verändert die Survivin Genexpression. So konnte gezeigt werden, dass p53 im Bereich des Survivin Promoters an p53 responsible Elemente binden kann und dadurch dessen Expression reprimiert (Hoffman et al. 2002; Mirza et al. 2002). Mit dem Retinoblastom ist ein weiterer Tumorsuppressor bekannt, der die Expression von Survivin reguliert und die Survivin mRNA-Level während der Interphase niedrig hält (Y. Jiang et al. 2004). Bisher wurden verschiedene Strategien genutzt, um die Expression bzw. Funktion des Survivins zu hemmen, wie z.B. die Verwendung von Substanzen

(YM155), die an den Survivin Promoter binden und diesen blockieren, die Inhibition der Proteintranslation durch RNAi oder die Verwendung von dominant-negativen Proteinen (Ryan et al. 2009).

Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Polyethylenimin (PEI)/siRNA-Komplexen gegen Survivin zu einem erhöhten Überleben von Mäusen führte, denen humane U87-MG Glioblastomzellen orthotopisch transplantiert wurden (Hendruschk et al. 2011).

Tumorzellen, in denen Survivin mittels dominant negativen Mutanten oder antisense-RNA ausgeschaltet wurde, zeigen Defekte in der Mitose, multipolare Spindeln, fehlerhafte Zytokinese, Polyploidie und eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums (Carvalho et al. 2003; Lens et al. 2003; Wheatley & McNeish 2005; Temme et al. 2005; Hendruschk et al. 2011). Zudem führt der „knock down“ von Survivin in Tumorzellen zu einer Caspase-abhängigen und Caspase-unabhängigen Apoptose (Shankar et al. 2001; Croci et al. 2008; Hendruschk et al. 2011).

1.2.2.3 Rolle des Survivins in der Mitose

Neben seiner Funktion in der Apoptose spielt Survivin zudem eine zentrale Rolle in der Mitose und Zytokinese. Während der Mitose assoziiert die Aurora B Kinase mit dem Mikrotubuli-bindenden Protein Inner Centromere Protein (INCENP), Borealin und Survivin, um den Chromosomalen Passenger Complex (CPC) zu bilden (Earnshaw & Bernat 1991; Temme et al. 2003; Vagnarelli & Earnshaw 2004). Welche Rollen den einzelnen Mitgliedern dieses Komplexes zukommen, ist sehr schwierig zu klären, da die vier Mitglieder des CPC alle voneinander abhängen (Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007a; Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007b). So führt die RNAi vermittelte Depletion eines CPC Proteins in humanen Zellen zu einer Beeinträchtigung der Lokalisation, Funktion und Struktur des gesamten CPC (Adams et al. 2001; Carvalho et al. 2003; Honda et al. 2003; Lens et al. 2003; Gassmann et al. 2004). Kristallstrukturanalysen zeigten, dass Survivin-Borealin-INCENP den Kern des CPC's bilden, mit Aurora B als enzymatischen Anteil. Dabei erfolgt die Bindung von INCENP und Borealin an die C-terminale alpha-Helix Domäne von Survivin unter Ausbildung einer Bündelstruktur von drei alpha-Helices, d.h. eine alpha-Helix von jedem Protein (Jeyaprakash et al. 2007) (Abb. 9).

Die Lokalisierung der Aurora B Kinase durch die anderen Mitglieder des CPC im Bereich des inneren Centromers führt dazu, dass die Aurora B Kinase ihre Substrate während der Zellteilung zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort phosphorylieren kann (Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007a)

Der CPC ist am Anfang der Mitose mit dem Chromatin und während der Prometaphase mit dem Centromer der mitotischen Chromosomen assoziiert. Zu Beginn der Metaphase-Anaphase Transition transferiert der CPC an die zentralen Mikrotubuli und ist dann, während der Telophase, im Midbody lokalisiert (Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007a)(Abb. 6).

Die Funktion des CPC zu Beginn der Mitose beinhaltet die Regulierung der Chromosomenstruktur, die Ausbildung der Kinetochoren, die Verknüpfung der Kinetochoren mit den Mikrotubuli, die Chromosomenanordnung als auch die Kontrolle des SAC (Ruchaud, Carmena & Earnshaw 2007a).

Die Bindung des CPC in der Prometaphase und Metaphase an die Centromeren erfolgt durch die BIR Domäne von Survivin sowie über den N-Terminus von INCENP (Lens, Rodriguez, et al. 2006a; Vader, Kauw, et al. 2006a; Mackay et al. 1998).

Der CPC trägt ebenfalls zur Bildung der mitotischen Spindeln bei (Gassmann et al. 2004; Adams et al. 2001). Aurora B phosphoryliert und inhibiert mit Stathmin und MCAK zwei Mitglieder des „Spindle Assembly Pathway“ (Ohi et al. 2004; Gadea & Ruderman 2006). Jedoch weisen auch Zellen, in denen CPC Mitglieder depletiert wurden, bipolare Mikrotubuli Spindeln auf, was auf einen zusätzlichen, CPC unabhängigen Mechanismus hindeutet (Yue et al. 2008; Adams et al. 2001; Gassmann et al. 2004; Carmena et al. 2009).

Eine weitere wichtige Funktion hat der CPC bei der Verknüpfung der Mikrotubuli mit den Kinetochoren sowie in der Chromosomensegregation während der Metaphase (Abb. 11 A). Studien in Hefen zeigten, dass Aurora B für die Loslösung der Mikrotubuli von den Kinetochoren notwendig ist (Tanaka et al. 2002). In Vertebraten phosphoryliert Aurora B das Highly expressed in cancer-1 Protein (Hec1; Ndc80) am N-Terminus (Cheeseman et al. 2006). Hec1 ist notwendig für die Kinetochor-Mikrotubuli Interaktion und Segregation der Chromosomen (DeLuca et al. 2003). Zudem ist Hec1 Bestandteil des KMN Komplexes, bestehend aus dem Mis12 Komplex, KNL-1 und Hec1/Ndc80, welcher essentiell für die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochoren ist (Cheeseman et al. 2006).

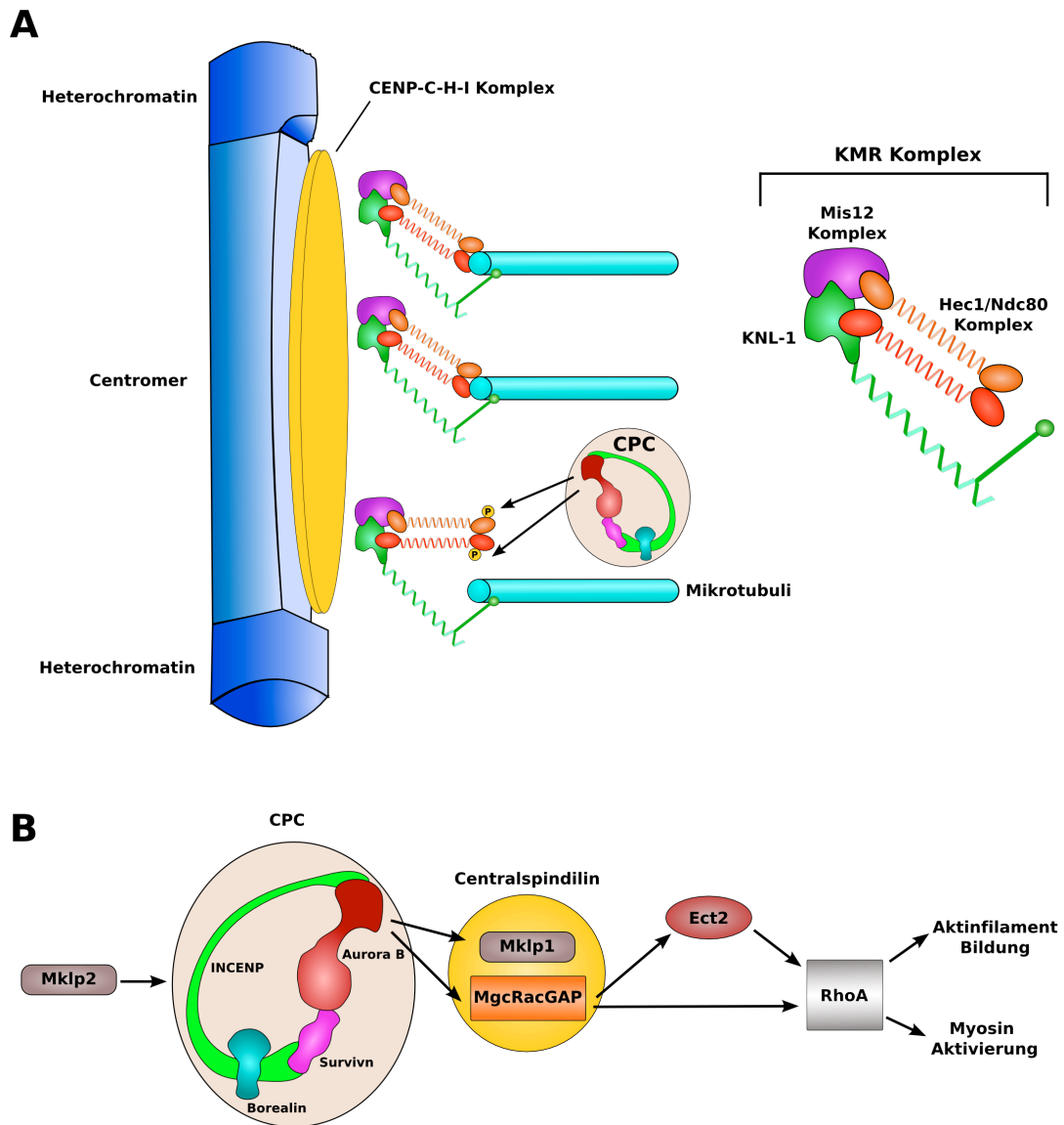


Abb. 11: Die Funktion des Chromosomalen Passenger Complex (CPC) in der Mitose. (A) Die Regulation der Kinetochor-Mikrotubuli Verbindung während der Metaphase durch den CPC. Schematische Darstellung der Centromerregion und Kinetochorregion eines Chromosoms, bestehend aus der inneren Platte des Kinetochors, welche sich aus CENP-C, CENP-H und CENP-I (CENP-C-H-I Komplex) zusammen setzt und dem KMN Netzwerk, das die Mikrotubuli mit dem Kinetochor verbindet. Der KMN Komplex besteht aus KNL-1, dem Mis12 Komplex und dem Hec1/Ndc80 Komplex und hat zwei Möglichkeiten Mikrotubuli zu binden. Zum einen über KNL-1 und zum anderen über Hec1/Ndc80. Die Interaktion zwischen Hec1/Ndc80 und den Mikrotubuli wird durch die N-terminale Phosphorylierung von Hec1/Ndc80 durch die Aurora B Kinase des CPC negativ reguliert. (B) Interaktionen des CPC während der Zytokinese, die zu der Bildung des kontraktiven Ringes und zur Initiierung der Teilungsfurche führen. Der CPC, bestehend aus INCENP, Borealin, Survivin und der Aurora B Kinase, lokalisiert Mklp2 abhängig an den zentralen Spindeln in der Spindel Mittelzone. Das führt zur Phosphorylierung von Mklp1 und MgcRacGAP, den Mitgliedern des Centralspindilin Komplexes. Mklp1 transportiert MgcRacGAP an den Zelläquator, wo es den Rho Guanin Nucleotid Exchange Factor (GEF) Ect2 bindet. Ect2 und MgcRacGAP regulieren die Aktivität der GTPase RhoA in dem Bereich des Zelläquators. RhoA reguliert die Polymerisation von Aktin und die Aktivierung von Myosin II, was zur Ausbildung des kontraktiven Ringes führt. Modifiziert nach Ruchaud, Carmena, Earnshaw 2007a und Carmena 2008.

Eine Unterbindung der Hec1 Phosphorylierung durch Aurora B führt zu einer hoch-stabilisierten Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung und zu der Ausbildung von merotelischen Befestigungen (DeLuca et al. 2006). Die Aurora B-abhängige Phosphorylierung von Hec1 stellt somit eine Möglichkeit dar, fehlerhafte Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen zu lösen.

Eine weitere Möglichkeit des CPC, fehlerhafte Verbindungen zu korrigieren, ist die Regulation der MCAK Aktivität durch eine Aurora B-abhängige Phosphorylierung (Andrews et al. 2004; Lan et al. 2004).

Aufgrund dieser Funktion, fehlerhafte Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen zu trennen, speziell von merotelischen Befestigungen, die zwar das Kinetochor okkupieren aber keine Zugspannung aufweisen, hat der CPC auch eine wichtige Funktion im SAC (Pinsky & Biggins 2005; Nezi & Musacchio 2009). Durch die Verwendung von RNAi konnte gezeigt werden, dass Survivin, INCENP und Aurora B essentiell für einen funktionellen SAC als auch für die Rekrutierung von BubR1 sind, wenn zusätzlich die Mikrotubuli-Kinetochor Zugspannung, durch die Verwendung von Mikrotubuli stabilisierenden Substanzen wie Taxol, aufgehoben wurde, (Carvalho et al. 2003; Lens et al. 2003; Vader, Kauw, et al. 2006a; Gadea & Ruderman 2005; Ditchfield et al. 2003; Hauf et al. 2003; Kallio et al. 2002).

In Experimenten mit Survivin Mutanten, die eine mutierte BIR Domäne aufwiesen wurde gezeigt, dass für die Lokalisation des Survivins an die zentralen Mikrotubuli eine vorhergehende Bindung des CPC an die Centromere nicht notwendig ist. Survivin-BIR-Mutanten konnten nicht an den Centromeren binden und auch nicht die anderen Mitglieder des CPC in diesem Bereich rekrutieren, was zu einer Beeinträchtigung des SAC und einer fehlerhaften Chromosomenanordnung führte. Allerdings war die Bindung des Survivin/CPC, anhand des verbliebenen C-Terminus, an die zentralen Spindelmikrotubuli sowie die komplette Zytokinese nicht beeinflusst (Lens, Rodriguez, et al. 2006a). Zudem konnte in Zellen, in denen hFAM, ein deubiquitylierendes Enzym, dass die dynamisch Assoziation von Survivin an den Centromeren reguliert, mittels RNAi ausgeschalten wurde, eine Beeinträchtigung der Lokalisation des CPC an den Centromeren, nicht aber an den zentralen Spindeln festgestellt werden, was in einer fehlerhaften Ausrichtung der Chromosomen und „lagging“ Chromosomen resultierte (Vong et al. 2005).

Wie unter (1.1.3) beschrieben, ist der CPC wichtig für die Lokalisation und Regulation des Centralspindilin Komplexes (Abb. 11 B). Humane Zellen, die mit einem Aurora B Inhibitor behandelt wurden, zeigen einen delokalisierten Centralspindilin Komplex und die Ausbildung der zentralen Spindelmikrotubuli ist stark beeinträchtigt (Hauf et al. 2003). Die Mklp2 abhängige Lokalisation des CPC an den zentralen Spindeln führt zur Phosphorylierung von Mklp1 an S911. Mklp1 Mutanten mit einer mutierten S911 Phosphorylierungsstelle zeigen eine korrekte Lokalisation an den zentralen Spindelmikrotubuli, aber die Zytokinese ist beeinträchtigt (Neef et al. 2006). Aurora B phosphoryliert und reguliert zudem MgcRacGAP an S387, was zu einer gesteigerten GAP Aktivität gegenüber RhoA führt. Die Überexprimierung von phosphorylierungsdefizienten MgcRacGAP Mutanten verhindert die Zytokinese und induziert Polyploidie (Minoshima et al. 2003).

Neben seiner Funktion in der Ausbildung der zentralen Spindeln spielt der CPC ebenfalls eine Rolle in der Abszission, dem letzten Schritt der Zytokinese, der zur Trennung der Tochterzellen führt. So phosphoryliert Aurora B verschiedene Intermediärfilamente wie Desmin, GFAP und Vimentin (Yasui et al. 1998; Kawajiri et al. 2003). Zellen, die phosphorylierungsdefiziente Mutanten von Desmin oder Vimentin überexprimieren, weisen Abtrennungsdefekte der Filamente und Intermediärfilamentbrücken zwischen den Tochterzellen auf, welches zu Polyploidie führen kann (Goto et al. 2003; Kawajiri et al. 2003).

Eine weitere Rolle spielt die Aurora B Kinase im Abszission Checkpoint „Nocut“. Dabei sorgt Aurora B für eine Stabilisierung der interzellulären Brücke durch die Phosphorylierung von Mklp1 (Steigemann et al. 2009), wenn sogenannte „lagging“ Chromosomen auftreten (Abb.5), d.h. die Auftrennung der Chromosomen noch nicht vollständig abgeschlossen ist (Steigemann et al. 2009; Norden et al. 2006; Mendoza et al. 2009). Die Inhibierung der Aurora B Kinase in Zellen mit „lagging“ Chromosomen führt zu einer Rückbildung der Teilungsfurche und zu Polyploidie (Steigemann et al. 2009). Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass eine Untereinheit von ESCRT-III an Borealin bindet und dadurch im „Nocut“ Checkpoint Aurora B reguliert (Carlton et al. 2012).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren konnte die essentielle Funktion des Inhibitors der Apoptose-Proteins (IAP) Survivin während der Mitose aufgeklärt werden. Einige Studien ergaben jedoch Hinweise darauf, dass eine IAP-Funktion des Survivins protektiv in der Mitose wirkt und eine Inaktivierung des Survivins durch Antisense-RNA oder RNA-Interference (RNAi) zu einem p53/p21^{waf/cip}-vermittelten Zellzyklusarrest und nachfolgender Apoptose führte (Beltrami et al. 2004; F Li et al. 1999). Derzeit ist eine pleiotrope Funktion des Survivins, welche die genomische Integrität der Zelle mit einem p21^{waf/cip}-vermittelten Zellzyklusarrest verbinden kann völlig ungeklärt. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, eine kausale Verbindung zwischen der mitotischen Funktion des Survivins und der Induktion eines Zellzyklusarrests herzustellen. Ausgehend von der Hypothese, dass die originäre Funktion des Survivins in der Zelle im „Spindle Assembly Checkpoint“ und Zytokinese liegt, sollten die molekularen Auswirkungen einer Survivin-Inaktivierung mittels RNAi auf Polyploidie, Aneuploidie und letztendlich auf eine potentielle Induktion eines „DNA Damage Response“ untersucht werden. Von besonderer Bedeutung war es hierbei, wie eine p53-Aktivierung erfolgen kann und inwieweit ein stabiler Zellzyklusarrest feststellbar war.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Chemikalien bzw. Materialien von folgenden Firmen verwendet:

- Abcam; Cambridge, UK
- Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- BioRad, München, Deutschland
- Clontech; Heidelberg, Deutschland
- Cell Signaling; Danvers, USA
- Dacko Cytomation; Hamburg, Deutschland
- Dianova; Hamburg, Deutschland
- Epicentre Biotechnologies, Oldendorf, Deutschland
- Epitomics; Burlingame, USA
- Greiner-one; Frickenhausen, Deutschland
- Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
- Invitek; Berlin, Deutschland
- MBI-Fermentas; St.Leon-Rot, Deutschland
- Merck; Darmstadt, Deutschland
- Millipore; Schwalbach/TS., Deutschland
- Nalge Nunc; Wiesbaden, Deutschland
- PAA; Cölbe, Deutschland
- Pall, Portsmouth, England
- Qiagen; Hilden, Deutschland
- R&D; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
- Roche; Mannheim, Deutschland
- Santa Cruz; Heidelberg, Deutschland
- Serva; Heidelberg, Deutschland
- Sigma; Hamburg, Deutschland

2.1.1 Antibiotika

Name	Hersteller	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Verwendung
Ampicillin	Sigma	100 mg/ml	0,1 mg/ml	Bakterienkultivierung
Penicillin	PAA	10000 U/ml	100 U/ml	Zellkultur
Streptomycin	PAA	10 mg/ml	0,1 mg/ml	Zellkultur
Puromycin	Clontech	50 mg/ml	0,1-50 μ g/ml	Selektion von Zellen
Hygromycin	Invitrogen	50 mg/ml	300-500 μ g/ml	Selektion von Zellen

2.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM (ohne): Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco, 1959), high Glucose (4,5 g/l) und L-Glutamin; PAA, Kat.-Nr.: E15-843

DMEM (komplett): DMEM (ohne) mit zusätzlich:

- 10% fötales Rinderserum (PAA; Kat.-Nr.: A15-101)
- Penicillin/Streptomycin-Mix (PAA, Kat.-Nr.: S11-010);
 $c_{\text{end}} = 100 \text{ U/ml Penicillin}; c_{\text{end}} = 0,1 \text{ mg/ml Streptomycin}$
- 1 M HEPES, $c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$; (PAA, Kat.-Nr.: S11-001)

DMEM (15 %): DMEM (ohne) mit zusätzlich:

- 15% fötales Rinderserum (PAA; Kat.-Nr.: A15-101)
- Penicillin/Streptomycin-Mix (PAA, Kat.-Nr.: S11-010);
 $c_{\text{end}} = 100 \text{ U/ml Penicillin}; c_{\text{end}} = 0,1 \text{ mg/ml Streptomycin}$
- 1 M HEPES, $c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$; (PAA, Kat.-Nr.: S11-001)

- DMEM (Doxorubicin): DMEM (komplett) mit zusätzlich:
 - 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin Hydrochlorid (Sigma, Kat.-Nr.: D1515)
- DMEM (Puromycin): DMEM (komplett) mit zusätzlich:
 - 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (Clontech, Kat.-Nr.: 631306)
- DMEM (Hygromycin): DMEM (komplett) mit zusätzlich:
 300-500 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin (Clontech, Kat.-Nr.: 631306)
- RPMI 1640 (komplett): Roswell Park Memorial Institute Medium; ohne L-Glutamin, mit Phenolrot; PAA, Kat.-Nr.: E15-039 enthält zusätzlich:
 - 10% fötales Rinderserum (PAA; Kat.-Nr.: A15-101)
 - Penicillin/Streptomycin-Mix (PAA, Kat.-Nr.: S11-010);
 $c_{\text{end}} = 100 \text{ U/ml}$ Penicillin; $c_{\text{end}} = 0,1 \text{ mg/ml}$ Streptomycin
 - 1 M HEPES, $c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$; (PAA, Kat.-Nr.: S11-001)
 - 200 mM L-Glutamin von GIBCO (Invitrogen, Kat.-Nr.: 25030-024); $c_{\text{end}} = 2 \text{ mM}$
- RPMI (Doxorubicin): RPMI 1640 (komplett); enthält zusätzlich
 - 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin Hydrochlorid (Sigma, Kat.-Nr.: D1515)
- BME (komplett): Basal Medium Eagle; ohne Glutamin; GIBCO, Kat.-Nr.: 21010-046 enthält zusätzlich:
 - 1x MEM NEAA (Nicht Essentielle Aminosäuren); PAA (Kat. Nr.:M11-003)
 - 10% fötales Rinderserum (PAA; Kat.-Nr.: A15-101)
 - Penicillin/Streptomycin-Mix (PAA, Kat.-Nr.: S11-010);
 $c_{\text{end}} = 100 \text{ U/ml}$ Penicillin; $c_{\text{end}} = 0,1 \text{ mg/ml}$ Streptomycin
 - 1 M HEPES, $c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$; (PAA, Kat.-Nr.: S11-001)
 - 200 mM L-Glutamin von GIBCO (Invitrogen,

Kat.-Nr.: 25030-024); $c_{\text{end}} = 2 \text{ mM}$

BME (Hygromycin):	BME (komplett) mit zusätzlich 300-500 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin
PBS:	Dulbecco's 1x PBS; ohne Mg und Ca, pH 7,4; PAA Kat.-Nr.: H15-002
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution; PAA Kat. Nr.: H15-008
Trypsin/EDTA:	GIBCO .25 % Trypsin EDTA 1x; Invitrogen, Kat.-Nr.: 25200
Natriumbutyrat:	Sigma; Kat.-Nr.: B5887; - in 1x PBS gelöst - 500 mM Stammlösung - $c_{\text{end}} = 10 \text{ mM}$
PEI-Lösung:	Polyethylenimin, für die Transfektion eukaryotischer Zellen; Sigma - 100 mg/ml Stocklösung - Arbeitslösung 1 mg/ml in Aqua bidest verdünnt - durch einen 0,45 μm Filter filtrieren

2.1.3 Bakterienmedien

LB-Medium:	-10g/l Bacto-Trypton - 5g/l Hefe-Extrakt - 10g/l NaCl - auffüllen mit Aqua bidest. auf 1L - dieser Ansatz wurde für 20min bei 121°C autoklaviert
2xYT-Medium	- 8 g Bacto-Trypton - 5 g Hefe-Extrakt - 5 g NaCl

Ad 500 ml Aqua bidest

Mit 10N NaOH auf pH 7,5 einstellen

Dieser Ansatz wurde für 20 min bei 120°C autoklaviert.

Kurz vor Gebrauch wurde das YT-Medium mit 20mM MgSO₄ und 10mM KCl (aus sterilfiltrierten Stammlösungen) vervollständigt.

LB-Platten (Amp): Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung wurde Ampicillin (1 mg/ml) 1:1000 zugesetzt und die Bakterienplatten gegossen.

2.1.4 DNA Größenstandards und Materialien für die Gel-Elektrophorese

- GeneRuler 1 kb DNA Plus; Fermentas Kat.-Nr.: SM1333
- GeneRuler 100 bp DNA Plus; Fermentas Kat.-Nr.: SM0243
- 6x Ladepuffer; Fermentas

Agarose SERVA: zur DNA Gelelektrophorese (SERVA, Kat.-Nr.: 11404.07)

Ethidiumbromid 10 mg/ml; (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

2.1.5 Protein-Größenstandards

- PageRuler Prestained Protein Ladder Plus; Fermentas Kat.-Nr.: SM1812
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Fermentas Kat.-Nr.: SM1842
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder; Fermentas Kat.-Nr.: SM1851

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Alle primären Antikörper für Western Blot (WB) Analysen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in 5 % Blocklösung (Milchpulver) bzw. 5% BSA⁽¹⁾ gelöst. Die Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz (IF) und die Fluoreszenzzytometrie (FACS) wurden in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton-X-100 gelöst.

Name	Verdünnung			Referenz (Kat.-Nr.:
	WB	IF	FACS	
Maus anti-alpha-Tubulin (monoklonal)	1:5000-1:10000	-	-	Sigma (T 6199)
Maus anti-p21 ^{waf/cip} (polyklonal)	1:1500	-	-	R&D (MAB1047)
Kaninchen anti-p21 ^{waf/cip} (monoklonal)	1:5000	1:50	1:100	Cell Signaling (#2947)
Ziege anti-p53 (polyklonal)	1:5000	-	-	R&D Kat.-Nr.: AF1355
Kaninchen anti-p53 (monoklonal)	1:1000	1:50	-	Cell Signaling (#2527)
Kaninchen anti-p53 (S15) ⁽¹⁾ (monoklonal)	1:500	-	-	Abcam (ab1431)
Maus anti-alpha-Tubulin (monoklonal)	1:5000-1:10000	-	-	Sigma (T 6199)
Kaninchen anti-pATM (S1981) (monoklonal)	1:2000	1:100	-	Epitomics (#2152-1)
Kaninchen anti-ATM (polyklonal)	1:100	-	-	Merck (PC116-100UG)
Maus anti-BrdU-FITC (monoklonal)	-	-	1:12,5	Becton Dickinson (347583)
Kaninchen anti-Caspase3 (monoklonal)	1:1000	-	-	Cell Signaling (#9665)
Kaninchen anti-pCHK2 (T68) (monoklonal)	1:1000	-	1:100	Cell Signaling (#2661)

Name	Verdünnung			Referenz (Kat.-Nr.)
	WB	IF	FACS	
Kaninchen anti-Cyclin B1 (polyklonal)	1:1000	-	1:100	Santa Cruz (sc-752)
Kaninchen anti-Cyclin D1 (polyklonal)	1:1000	-	1:100	Santa Cruz (sc-753)
Kaninchen anti-Cyclin E (polyklonal)	1:1000	-	-	Santa Cruz (sc-247)
Maus anti-pDNA-PK (T2609) (monoklonal)	-	1:50	-	Abcam (ab18356)
Maus anti-yH2AX (monoklonal)	1:2000	1:100	1:100	Millipore (05-636)
Maus-IgG1 (monoklonal)				Millipore (MABC002)
Kaninchen-IgG (monoklonal)				Cell Signaling (#3900)
Kaninchen-IgG (polyklonal)				Santa Cruz (sc-2027)
Kaninchen anti-Survivin (polyklonal)	1:2000	1:50	-	R&D Kat.-Nr.: AF886

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper für die WB-Analysen wurden in 5 % Blocklösung (Milchpulver), die Antikörper für FACS-Messungen und indirekte Immunfluoreszenzanalysen in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton-X-100 gelöst.

Der Nachweis von gebundenem Antikörper auf dem WB erfolgte mit einem „Enhanced Chemiluminescence Kit,, (ECL) der Firma Amersham (Plus Detektions Kit) oder Millipore (Luminata Forte).

Name	Verdünnung			Firma
	WB	IF	FACS	
Ziege anti-Kaninchen-POD	1:2000			Dako Kat.-Nr.: P0448
Kaninchen anti-Maus-POD (polyklonal)	1:2000			Dako Kat.-Nr.: P0447
Kaninchen anti-Ziege-POD (polyklonal)	1:2000			Dako Kat.-Nr.: P0449
Schaf anti-Maus-FITC (polyklonal)		1:100	1:100	Dianova Kat.-Nr.: 515095062
Ziege anti-Kaninchen-FITC (polyklonal)		1:100	1:100	Dianova Kat.-Nr.: 111095047
Schaf anti-Maus-Cy3 (polyklonal)		1:100		Dianova Kat.-Nr.: 515165062
Ziege anti-Kaninchen-Cy3 (polyklonal)		1:100		Dianova Kat.-Nr.: 111165047
Ziege anti-Maus-AF633		1:100		Invitrogen Kat.-Nr.: 21052
Ziege anti-Kaninchen-AF633		1:100		Invitrogen Kat.-Nr.: 21071

POD: Meerrettich-Peroxidase; AF: Alexa Fluor; FITC: Fluoresceinisothiocyanat

2.1.7 Substanzen und Inhibitoren

2.1.7.1 Inhibitoren

AZD1152-HQPA

Aurora B Inhibitor; Selleckchem, Houston, USA
(Kat. Nr.: S1147)

gelöst in DMSO (10 mM)

$C_{end}=50$ nM

CGK733	ATM/ATR Inhibitor; Sigma (Kat. Nr.:C9867) gelöst in DMSO (20 mM); $C_{\text{end}}=10 \mu\text{M}$
Ku55933	ATM Inhibitor; Merk (Kat. Nr.: gelöst in DMSO (10 mM); $C_{\text{end}}=10 \mu\text{M}$
Nu7026	DNA-PK Inhibitor; Sigma (Kat. Nr.:N1537) gelöst in DMSO (10 mM); $C_{\text{end}}=10 \mu\text{M}$

2.1.7.2 Substanzen

2x Laemmli Sample Buffer	Sigma Kat.-Nr.: S3401
Aprotinin	Proteaseinhibitor, Roche 5 $\mu\text{g/ml}$ in Protein-Lysepuffer Lagerung bei -20°C
APS	10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) (Lagerung bei -20°C)
Bradford Reagenz	Sigma (Kat.-Nr.: B6916)
BrdU	Bromdesoxyuridin; Sigma (Kat. Nr.:B5002) gelöst in A.dest (38,38 mM) $C_{\text{end}}=10 \mu\text{M}$
Doxorubicin Hydrochlorid	Sigma (Kat. Nr.:D1515); gelöst in A.dest (10 mg/ml) $C_{\text{end}}=0,25 \mu\text{g/ml}$
Eindeckmedium	Vectashield Mounting Medium; Vector (Kat. Nr.: H-1000)

FACS Flow	Becton Dickinson Kat.-Nr.:342003
FACS Clean	Becton Dickinson Kat.-Nr.:340345
FACS Rinse	Becton Dickinson Kat.-Nr.:340346
Hoechst 33342	1 mg/ml gelöst in PBS, Invitrogen 1:1000 eingesetzt
Leupeptin	Proteaseinhibitor, Roche 10 μ g/ml in Protein-Lysepuffer Lagerung bei -20°C
Luminata Forte	Millipore, Western Blot Detektionsreagenz (Kat. Nr.:WBLUF0500)
Milchpulver	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Germany (Kat. Nr.:T145.2)
Nocodazol	Sigma, (Kat. Nr.:M1404) gelöst in DMSO (10 mg/ml) $C_{\text{end}}=10 \mu\text{g/ml}$
Phosphatase-Inhibitor Cocktail	Sigma (Kat. Nr.:P2850) 1:100 in Protein-Lysepuffer
Polybren	8 mg/ml gelöst in PBS, sterilfiltriert über Filter mit 0,2 μm Poren
Propidiumiodid	Sigma, Kat.-Nr.: P4864 1 mg/ml
Zeocin	Invitrogen (Kat. Nr.:R250-01) 50 mg/ml $C_{\text{end}}=500 \mu\text{g/ml}$

2.1.8 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
5 % Blockierungslösung	5 % Milchpulver (w/v) 1x TBS Lagerung bei 4°C
1 % BSA in PBS	1 % BSA (w/v) 1x PBS
Denaturierungspuffer	2 N HCL 0,5 % Triton-X-100 (v/v)
DNA-Extraktionspuffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,1 M Zitronensäure auf pH 7,8 einstellen
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v)
Neutralisierungspuffer	0,1 M Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O (pH 8,5) mit HCL auf pH 8,5 einstellen
Protein-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl; pH 8,0 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ (v/v) 1 % Triton X-100 Lagerung bei 4°C

	0,5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin Proteaseinhibitoren kurz vor Gebrauch zugeben
	1x Laemmlipuffer kurz vor SDS-Gel-elektrophorese zugeben
Lysozymlösung	10 mg/ml Hühnereiweißlysozym gelöst in 10 mM Tris-HCl pH 8
Natriumacetat	2,5 M Natriumacetat gelöst in Aqua bidest pH 5,2
Paraformaldehydlösung	4 % Paraformaldehyd (w/v) durch Erhitzen in PBS lösen, danach sofort auf Eis stellen
Permeabilisierungslösung	1% BSA (w/v) 0,3% Triton-X-100 (v/v) 1x PBS
Propidiumiodid-Färbelösung	1 μl Propidiumiodid (1mg/ml) 1 μl RNase (10 $\mu\text{g/ml}$) gelöst in 50 μl PBS
RNase-Lösung	2 mg/ml RNase A, 8000 U/ml RNase T1 gelöst in 15 mM Natriumchlorid und 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 15 min bei 100 °C inkubieren
Sammelgel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	14 % Glycin 1 % SDS 6 % Tris-Base

20xSSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7
STET-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA 0,1 M Natriumchlorid 5 % Triton X-100 (v/v)
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 7,0) 2 % SDS 100 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
10x TBS	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M Natriumchlorid
TBS-TT	1x TBS 0,05 % Tween 20 (v/v) 0,2 % Triton X-100 (v/v)
10x WBTP	Western Blot Transfer Puffer 25 mM Tris Base 192 mM Glycin

2.1.9 Bakterienstämme

Name	Charakteristika	Referenz
E.coli Top10 F'	F' $\{\text{lacI}^q \text{ Tn10 (Tet}^R)\}$ <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ $\Phi 80/\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ ΔlacX74 <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> $\Delta(\text{ara-leu})7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen

2.1.10 Enzyme

Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas
RNase A	Roche
RNase T1	Roche
Fast-Link-DNA-Ligase	Epicentre Biotechnologies
Taq Polymerase	Invitrogen

2.1.11 Kommerzielle Kits

Name	Firma	Verwendung
Invisorb Plasmid Kit (12)	Invitex	Plasmidextraktion aus Bakterien-Maxi-Kulturen
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham	Detektion Western Blot
Fast-Link DNA Ligation Kit	Epicentre Biotechnologies	DNA Ligation
QIAquick DNA Extraction Kit	Qiagen	Extraktion von DNA aus Agarosegelen
pCR2.1 Cloning Kit	Invitrogen	Klonierung von PCR Fragmenten
Annexin-V-FITC; Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson	Nachweis von Apoptose
Human Phospho-Kinase Antibody Array	R&D	Proteom Profiler

2.1.12 Oligonucleotide

Hairpin für Survivin (Honda et al. 2003)

BamHI loop

5' - **GATCC**CCGAATTAACCCTTGGTGAAT**TTCAAGAGA**ATTCACCAA
 3' - **GGGCT**TAAATTGGGAACCACTTAA**AAGTTCTCT**TAAGTGGTT

XhoI

GGGTTAATTCTTTTTGGC -3'
 CCCAATTAAGAAAAACCGAGCT -5'

Hairpin für p53 (Brummelkamp et al. 2002)

BamHI loop

5' - **gatcccc**gactccagtggtaatctact**ttcaagag**agtagattac
 3' **gggct**gaggtcaccattagat**gaagttctct**catctaag

XhoI

cactggagtctTTTTGGC -3'
 gtgacctcagaaaaacc**gagct**-5'

Hairpin für Luciferase (Elbashir et al. 2002)

BamHI loop

5' - **gatcccc**cgtagcggaataacttcgatt**ttcaagag**atcgaagtatt
 3' - **ggggc**atgcgccattatgaagct**aagttctct**agcttcataa

XhoI

ccgctgtagTTTTGGC -3'
 ggcgcatgcaaaaaacc**gagct**-5'

2.1.13 Primer

2.1.13.1 PCR Primer

HygR_xbal_fw

XbaI

5'-tttttt**ctaga**TTGCCACAACCCGTACCAAAGATG-3'

HygR_NotI_rv

NotI

5'-aaaaa**gcggcgc**AGGCGTTCTCGAAATCAGCTCTTG-3'

2.1.13.2 Sequenzierungsprimer

RVH-for: 5'-CCTACAACGTGACCTGG-3'

T7 prom 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

M13 rv 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

2.1.14 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

Combitips (2,5 ml; 5 ml, 12,5 ml)	Eppendorf AG
Einfriergefäße	Nalge Company, Rochester, NY, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml; 0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filterpapier Whatman 3 MM	Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland
Fluorotrans Transfer Membrane (PVDFMembran)	Whatman, Sanford

Greiner Filter Top Flaschen (Wachstumsfläche 25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-one
Küvetten	BioRad
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wi, USA
Pipetten	Greiner Bio-one GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one
PVC Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen AG
Zellkulturplatten (6 Vertiefungen)	Greiner Bio-one
Zellkulturschalen (94 mm)	Greiner Bio-one
Lab-Tek II Chamber Slides	Nalge Company

2.1.15 Plasmide & Vektoren

Die Vektoren wurden, sofern nicht anders beschrieben, von Prof. Dr. Achim Temme, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, TU Dresden zur Verfügung gestellt.

Name	Resistenz	Beschreibung
pHIT60	Ampicillin	Expressionsvektor für gag-pol Protein über einen CMV Promoter (Soneoka et al. 1995)
pcz-VSV-Gwt	Ampicillin	Expressionsvektor mit dem Glycoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus (D. Lindemann) ⁽¹⁾
pRVH-N-EGFP-shSurv	Ampicillin	retroviraler Vektor (Sandy Hendruschk) ⁽²⁾ ; EGFP Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shSurvivin
pRVH-N-RFP-shSurv	Ampicillin	retroviraler Vektor; RFP Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shSurv - shRNA gegen humanes Survivin
pRVH-N-RFP-shLuc	Ampicillin	retroviraler Vektor; RFP Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shLuc - shRNA gegen die Luciferase (Sandy Hendruschk) ⁽²⁾
pRVH-N-RFP	Ampicillin	retroviraler Vektor mit RFP unter einem CMV Promoter
pRVH-N-PuroR	Ampicillin	retroviraler Vektor mit dem Puromycin Resistenz Gen unter einem CMV Promoter
pRVH-N-PuroR-shSurv	Ampicillin	shSurv mit XhoI/EcoRI aus pRVH-N-shSurv-RFP in pRVH-N-Puro umklontiert; im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pRVH-N-PuroR-shluc	Ampicillin	shluc mit XhoI/EcoRI aus pRVH-N-shluc-RFP in pRVH-N-Puro umklontiert; im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pRVH-N-HygR	Ampicillin	pRVH-N-PuroR; Austausch des Puromycin Resistenzgen gegen Hygromycin Resistenz aus pCR2.1-HygR mit XbaI/NotI; im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pCR2.1-HygR	Ampicillin, Kanamycin	Ligation von pCR2.1 mit Hygromycin-PCR Fragment; im Rahmen dieser Arbeit erstellt
pCR2.1	Ampicillin, Kanamycin	aus TA Cloning Kit (Invitrogen)
pRev-CMV-HygR	Ampicillin	Retroviraler Vektor pRevTRE (Clontech-Takara) mit Substitution, des „Tetracyclin-Responsive Elements (TRE) durch ein BgIII-CMVie-Promoter-HindIII-Fragment
pRVH-N-HygR-shp53	Ampicillin	retroviraler Vektor; HygR Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shp53 - shRNA gegen humanes p53

Name	Resistenz	Beschreibung
pRVH-N-EGFP-shp53	Ampicillin	retroviraler Vektor (Sandy Hendruschk) ⁽²⁾ ; EGFP Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shp53 - shRNA gegen humanes p53
pRVH-N-Puro-shp53	Ampicillin	retroviraler Vektor; Puro Expression unter CMV Promotor; „Hairpin“ entgegengesetzt von H1 Promoter für RNA-Polymerase III; shp53 - shRNA gegen humanes p53

⁽¹⁾ Institut für Virologie, TU Dresden

⁽²⁾ Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, TU Dresden

2.1.16 Zelllinien

Die Zelllinien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von Prof. Dr. Achim Temme, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, TU Dresden, zur Verfügung gestellt.

Name	Medium	Beschreibung	Referenz
HCT116 wt	RPMI (komplett)	humane Kolon Karzinomzellen; besitzt eine Mutation im ras-Protoonkogen; zur Verfügung gestellt von Holger Bastians ⁽¹⁾ p53+; Rb+; Hdm2+; INK4a/ARF heterozygously mutated and methylated (Crescenzi et al. 2008)	ATCC Nr. CCL-247
HCT116 p53 ^{-/-}	RPMI (komplett)	humane Kolon Karzinomzellen; besitzt eine Mutation im ras-Protoonkogen; p53 Gen über homologe Rekombination zerstört; zur Verfügung gestellt von Bert Vogelstein ⁽²⁾	(Bunz et al. 1998)
MCF-7 wt	DMEM (komplett)	humane Mammakarzinomzellen; Caspase 3 defizient (Jänicke et al. 1998); p53+; Rb+; Hdm2+; INK4a/ARF deleted (Crescenzi et al. 2008)	ATCC Nr. HTB-22

Name	Medium	Beschreibung	Referenz
MCF-7 shp53	DMEM (komplett)	wie MCF-7 wt, p53 durch shRNA ausgeschaltet und Zellen mit Hygromycin selektioniert	im Rahmen dieser Arbeit generiert
HEK 293T	DMEM (komplett)	immortalisierte humane embryonale Nierenepithelzellen, beinhalten das große T-Antigen des SV40-Virus	(DuBridge et al. 1987)
U87-MG wt	BME (komplett)	humane Glioblastomzelllinie (WHO IV)	ATCC Nr. HTB-14
U87-MG shp53	BME (komplett)	Wie U87.MG wt; p53 konstitutiv über shRNA ausgeschaltet und Zellen mit Hygromycin selektioniert	im Rahmen dieser Arbeit generiert

⁽¹⁾ Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg

⁽²⁾ Johns Hopkins University, Baltimore

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Air-Flow HERAsafe (Heraeus) durchgeführt. Die benötigten Materialien wurden dementsprechend vor Benutzung mit Mikrocid desinfiziert bzw. abgeflammt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchte von ca. 80 %.

Je nach Bedarf variierten die Splittraten der Zellen zwischen 1:5 - 1:100. Das Verdünnen (splitten) der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 - 90%, also je nach Splittrate aller 2 - 7 Tage. Spätestens nach drei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Beim Splitten der Zellen wurde das verbrauchte Medium abgenommen und dann der Zellrasen vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 1 x Trypsin/EDTA Lösung für maximal 3 min bei 37°C. Die Reaktion

wurde mit mindestens der doppelten Menge an Medium gestoppt und ordentlich resuspendiert.

Von dieser Zellsuspension wurde eine definierte Menge in neue Zellkulturflaschen zurückgegeben und diese mit Medium aufgefüllt.

2.2.1.2 Zählen der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer

Für Transfektions- und Transduktionsversuche, aber auch für Antikörperfärbungen am FACS, wurde eine genaue Anzahl von Zielzellen eingesetzt. Trypsinierte Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet dann in neuem Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde mit einer 0.4%igen Trypanblaulösung eine 1:2 - 1:10 Verdünnung durchgeführt und 10 μ l davon auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. Alle acht Quadrate der Zählkammer wurden ausgezählt und der Mittelwert dann mit der jeweiligen Verdünnung und 1×10^4 multipliziert. Zellen, die den Trypanblaufarbstoff aufgenommen hatten, wurden als tote Zellen gewertet. Die gewünschte Zahl an vitalen Zellen wurde entsprechend mit dem passenden Medium eingestellt.

2.2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen und Generierung Replikationsinkompetenter retroviraler Partikel

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremdgenen in eukaryotische Zellen. Hierfür kann man das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) verwenden, welches mit negativ geladenen Nukleinsäuren stabile Komplexe bildet, die dann vermutlich über Endozytose von den Zielzellen aufgenommen werden. Bei einer transienten Transfektion liegen die aufgenommenen Vektoren als extrachromosomaler Bestandteil neben der genomischen DNA vor.

In dieser Arbeit wurden HEK293T als Verpackungszellen zur Gewinnung replikationsinkompetenter viraler Partikel transfiziert.

Dafür wurde das 3-Vektor-System nach Soneoka (Soneoka et al. 1995) verwendet, mit dem vom „Molony murine leukemia virus“ (MoMuLV)-abgeleiteten, retrovirale Vektoren verpackt werden. Als retroviraler Vektor wurde

der sh-targeting-Vektor, pRVH1-N-PuroR und der pRVH1-N-HygR (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Achim Temme, Institut für Neurochirurgie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden) genutzt. Zusätzlich wurden die Verpackungsplasmide pHIT60 (enthält die Gene gag und pol) (Soneoka et al. 1995) und pcz-VSV-Gwt (Kalajzic et al. 2001) eingesetzt (siehe Abb.12 A). In beiden Verpackungsplasmiden stehen die Gene für die Strukturproteine unter Kontrolle eines Zytomegalie-Virus (CMV)-Promotors.

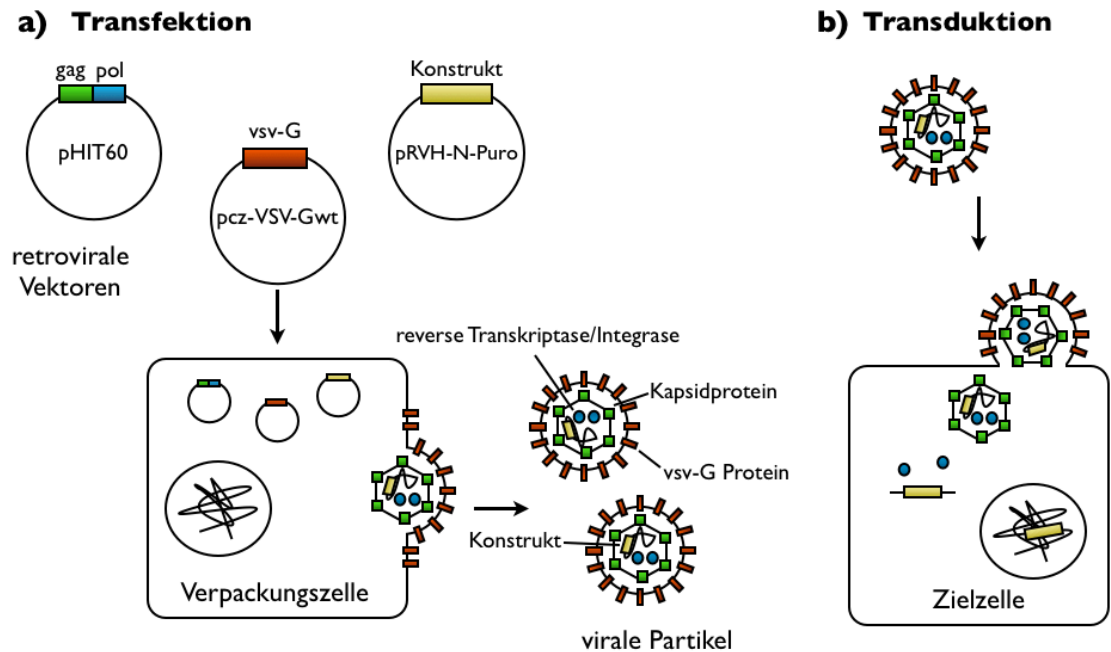


Abb.12 schematische Darstellung eines viralen Gentransfers mit replikationsinkompetenten Viren. a) Transfektion einer Verpackungszelle mittels des 3-Vektorsystems (Soneoka et al. 1995) und Freisetzung der infektiösen viralen Partikel. b) Transduktion einer Zielzelle durch die viralen Partikel und Integration des Konstruktes in das Wirtsgenom.

2.2.1.3.1 Aussäen der Verpackungszellen HEK 293T und Transfektion

Für die Transfektion wurden 4×10^6 Zellen pro 10 cm Schale (Greiner Bio-one) mit DMEM-(komplett) ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 .

Am nächsten Tag wurde kurz vor der Transfektion das alte Medium entfernt und 4 ml neues DMEM (15% FCS) zugesetzt. Parallel dazu wurde die u.a. Transfektionslösung hergestellt.

Transfektionslösung	pro 10 cm Schale
PEI- Mix	45 μ l PEI (1mg/ml) 955 μ l DMEM (ohne Zusätze)
DNA-Mix	5 μ g DNA pro Vektor (z.B 1 μ g/ μ l) 985 μ l DMEM (ohne Zusätze)

Beide Lösungen wurden gemischt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank statt.

Am folgenden Tag erfolgte eine Natriumbutyrat-Behandlung der transfizierten Zellen. Natriumbutyrat verstärkt über einen noch unbekanntem Mechanismus die Aktivität des CMV Promoters. Zuerst wurde das alte Medium entfernt und mit 6 ml DMEM (komplett) ersetzt. Zu dem Medium wurden noch 120 μ l Natriumbutyrat (500 mM) hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach 6 - 8 Stunden erfolgte wiederum ein Mediumwechsel mit DMEM (komplett).

Am nächsten Morgen konnte der 1. Virusüberstand abgenommen und durch neues DMEM (komplett) ersetzt werden. Die weitere Inkubation erfolgte wieder im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für Minimum 8 Stunden oder über Nacht. Nach den 8 Stunden bzw. am nächsten Tag wurde ein zweiter bzw. dritter Virusüberstand abgenommen.

Der Zellkulturüberstand mit den darin enthaltenen Viren wurde mit einer Spritze aufgezogen und anschließend durch einen 0,45 μ m Filter filtriert. Die gesammelten Virusüberstände wurden bei -80°C eingefroren oder gleich für die Transduktion von Zielzellen eingesetzt.

2.2.1.3.2 Aussäen der Zielzellen und Transduktion

Die Transduktion der Zielzellen erfolgte in 6-Wellplatten oder in 10 cm-Zellkulturschalen.

In einer 6-Wellplatte wurden pro Well 3 - 5 x 10⁴ Zellen und in 10 cm Schalen 2,5 - 5 x 10⁵ Zellen ausgesät und für 24h bei 37°C kultiviert.

Am zweiten Tag erfolgte die Transduktion der Zellen (Abb.11 B). Dazu wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und gegen 2 ml Virusüberstand pro Well (6-Wellplatten) oder 10 ml pro 10 cm Zellkulturschale ersetzt. Um die Adsorption der Viren zu verbessern, wurde 0,2 μ l Polybren (8 mg/ml) zu der Virussuspension gegeben. Ca. 9 Stunden später erfolgte die 2. Transduktion. Dafür wurde der alte Virusüberstand abgesaugt und die Zielzellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der neuen Virensuspension. Die Inkubation der beiden Transduktionen fand im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

Am dritten Tag erfolgte erneut ein Mediumwechsel und eine 3. Transduktion. Der alte Überstand wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und das entsprechende Virus vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte wieder im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach weiteren 8h wurde die Virensuspension entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und gegen das entsprechende Medium (komplett) ersetzt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.3.3 Selektion der transduzierten Zellen mit Puromycin

Nach der Inkubation der Zellen über Nacht erfolgte morgens ein einmaliges Waschen mit 1x PBS sowie ein Austausch des Mediums gegen neues Puromycin-haltiges (5 μ g/ml) Medium und eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 10 - 12 h. Nachfolgend wurde diese Prozedur mit frischem Puromycin-haltigem Medium wiederholt und die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Kontrolle der Selektion über die 24h dienten Wells, die jeweils mit nicht-transduzierten Zellen belegt waren. In diesen Wells waren nach 24h keine lebenden, adhärenen Zellen mehr sichtbar.

Am nächsten Morgen wurde das Puromycin-haltige Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit dem entsprechenden frischen Medium für bei 37°C kultiviert.

2.2.1.3.4 Selektion der transduzierten Zellen mit Hygromycin

Nachdem die Zellen mit einem retroviralen Vektor transduziert wurden, der für einen Hygromycin-Selektionsmarker kodiert, erfolgte ein Mediumwechsel mit

Komplettmedium und eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 80 %. Dann wurde das alte Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, für ca. 3 min bei 37°C abtrypsiniert und in T75 Flaschen mit frischen Hygromycin-haltigen Medium (300 - 500 µg/ml) überführt. Die Zellen blieben dann über mehrere Passagen unter Selektionsdruck bis keine nicht-transduzierten Kontrollzellen mehr leben.

2.2.1.4 Zellyse zur Proteingewinnung

Zur Proteingewinnung aus eukaryotischen Zellen wurde von den gewünschten Wells einer 6-Wellplatte bzw. 10 cm Schale (Greiner Bio-one) der Mediumüberstand abgenommen und in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 200 - 1000 µl Trypsin für 3 min abtrypsiniert. Die Reaktion wurde mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Lösung ebenfalls zu dem Überstand in die 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 4°C, 1200 rpm für 8 min abzentrifugiert.

Die pelletierten Zellen wurden mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und nochmals bei 4°C, 1200 rpm für 8 min zentrifugiert.

Nach dem Entfernen des Überstandes erfolgte die Zellyse in 100 - 500 µl eiskaltem Protein-Lysepuffer. Dabei wurde ordentlich resuspendiert (vortexen) und das Zellysate in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt.

Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 4°C und max. Geschwindigkeit. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt bzw. bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen aus einer Zellsuspension fokussiert und einzeln durch eine dünne Kapillare gezogen. Dabei treffen sie in einem Sensormodul auf einen Laserstrahl. Das dabei emittierte gebeugte Streulicht gibt Aufschluss über bestimmte Eigenschaften der Zelle wie Zellgröße und wird von einem Forward Scatter detektiert. Der Side Scatter analysiert durch Brechung gestreutes Licht und gibt Aufschluss über die Granularität und

Struktur der Zelle. Des Weiteren können Fluoreszenzfarbstoffe analysiert werden.

Die Transduktionsmessung von EGFP-markierten Zellen, die BrdU Messungen sowie die Zellzyklus Analyse von Propidiumiodid gefärbten Zellen allein bzw. in Kombination mit einer Antikörperfärbung erfolgte am Durchflusszytometer (FACS - fluoreszenz activated cell sorter, FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg). Die Färbung mit Propidiumiodid ermöglicht eine genaue Darstellung des DNA-Gehaltes einer Zelle und gibt Aufschluss über den Zellzyklus, Apoptose und auch Polyploidie. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software „CellQuest Pro“ (Becton Dickinson) und „Flowjo“ (Tree Star; Ashland, USA).

2.2.1.5.1 Zellzyklusanalyse (SubG1)

Die Zellen sowie der Zellkulturüberstand wurden in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt. Adhärenz Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA Verdau abgelöst.

Danach erfolgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 4°C und 1200 rpm für 8 min sowie das Absaugen des Überstandes.

Das Zellpellet wurde mit 100 μ l 1 x PBS resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol (-20°C) unter Schütteln (Vortexer) für mindestens 24h bei -20°C fixiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS, die Zentrifugation der Zellen bei 4°C und 1200 rpm für 5 min sowie die vorsichtige Absaugung des Überstandes.

Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte mit 500 μ l PBS mit 1 % BSA. Dann wurde 500 μ l DNA-Extraktionspuffer zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem erneuten Abzentrifugieren (1200 rpm; 8 min; 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 50 μ l Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert und 30 min inkubiert. Vor dem Messen am FACS wurde die Zellsuspension optional noch mit 1 x PBS verdünnt.

2.2.1.5.2 Zellzyklusanalyse in Kombination mit einer Antikörper Färbung

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.1.5.1 beschrieben, gewonnen und in Ethanol für mindestens 24h fixiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl/ml wurden 2×10^5 Zellen/Ansatz in FACS Röhrchen überführt und nach Zugabe von 500 μ l PBS zentrifugiert (1200 rpm; 8 min; 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zellen in 500 μ l 1% BSA in PBS + 0,3 % Triton-X-100 Permeabilisierungslösung resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1200 rpm; 8 min; 4°C) und anschließend das Entfernen des Überstandes.

Die primären Antikörper wurden, wie in der Tabelle (siehe 2.1.6.1) beschrieben, entsprechend in Permeabilisierungslösung (1 % BSA in PBS + 0,3% Triton-X-100) verdünnt und das Zellpellet in 50 μ l der Antikörperlösung resuspendiert. Nach einer Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur für 1h erfolgte eine Zugabe von 0,5 ml PBS sowie eine erneute Zentrifugation (1200 rpm; 8 min; 4°C) und das vorsichtige Verwerfen des Überstandes. Danach folgte ein Waschschrift mit 0,5 ml PBS sowie eine Zentrifugation (1200 rpm; 8 min; 4°C) und das vorsichtige Verwerfen des Überstandes.

Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper (siehe 2.1.6.2) wurden ebenfalls in Permeabilisierungslösung verdünnt und davon 50 μ l dem Zellpellet zugefügt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 1h bei Raumtemperatur, gefolgt von der Zugabe von 0,5 ml PBS, einer Zentrifugation (1200 rpm; 8 min; 4°C) und dem vorsichtigem Abkippen des Überstandes.

Zuletzt wurde die DNA der Zellen mit einer Propidiumiodidlösung angefärbt und der Ansatz im Dunkeln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Messen im FACS wurden dem Ansatz noch 300 μ l PBS zugegeben.

2.2.1.5.3 Bromdesoxyuridin (BrdU) Inkorporations Analyse

Bromdesoxyuridin ist ein Analog der Base Thymidin und kann an dessen Stelle bei der DNA Synthese in die DNA eingebaut werden. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen BrdU ist es möglich, die DNA Synthese immunhistochemisch nachzuweisen. Damit ist eine Untersuchung der Proliferationseigenschaften von Zellen möglich.

Den Zellen wurde 30 - 60 min vor dem Fixieren BrdU (Sigma) in einer Endkonzentration von 10 μ M direkt ins Medium gegeben. Nachfolgend wurde der Überstand in ein beschriftetes 15 ml Greiner Röhrchen überführt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und bei 37°C für 3 min abtrypsinisiert. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgte eine Zugabe von eiskalten PBS und danach die Überführung der Lösung in das entsprechende 15 ml Röhrchen. Nach dem Zentrifugieren bei 4°C, 1200 rpm für 8 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50 - 100 μ l PBS resuspendiert. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen unter gleichzeitiger Durchmischung auf einem Vortexer und tropfenweiser Zugabe von 0,5 - 1 ml 70 % Ethanol (-20°C) sowie der Lagerung für mindestens 24h bei -20°C.

Zur BrdU Färbung wurden die Zellen gezählt und für jeden Ansatz 2 x 10⁵ Zellen in FACS Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 μ l PBS zu jedem Ansatz und einem Zentrifugationsschritt bei 4°C, 1200 rpm für 8 min wurde der Überstand verworfen und die DNA durch Zugabe von 1 ml Denaturierungspuffer denaturiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C, 1200 rpm für 8 min und dem Verwerfen des Überstandes wurde die Zellsuspension mit 1 ml Neutralisierungspuffer für 30 min bei Raumtemperatur neutralisiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellen bei 4°C, 1200 rpm für 8 min.

Der FITC gekoppelt Maus anti-BrdU Antikörper (Bectorn Dickinson) wurde 1:12.5 in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton-X-100 Permeabilisierungslösung verdünnt, 50 μ l dieser Lösung dem Pellet zugegeben und der Ansatz für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l PBS und einer Zentrifugation der Proben bei 4°C, 1200 rpm für 8 min erfolgte die Färbung der DNA mit einer Propidiumiodidlösung für 30 min bei Raumtemperatur. Vor der Messung der Proben am FACS wurden noch 300 μ l PBS hinzu gegeben.

Um unspezifische Signale durch den anti-BrdU- Antikörper auszuschließen, wurde ein FITC gekoppelter Maus Antikörper (Isotypkontrolle) sowie Zellen, die nicht mit BrdU behandelt wurden, in Kombination mit dem FITC gekoppelten Maus anti-BrdU Antikörper, als Kontrollen eingesetzt und im FACS analysiert.

2.2.1.5.4 Annexin-V Färbung

Die Annexin-V Färbung ist eine Methode, um apoptotische und tote bzw. nekrotische Zellen darzustellen.

Phosphatidylserin (PS) befindet sich an der Innenseite der Zellmembran von intakten, lebenden Zellen. In der frühen Phase der Apoptose kommt es zu Membranstörungen und einer Translokation von PS von der Innenseite zur Außenseite der Membran, dem sogenannte flip-flop. An das auf der Außenseite der Zellmembran präsentierte PS von apoptotischen Zellen kann nun mit hoher Affinität Annexin-V binden und direkt über eine Fluoreszenzmarkierung oder Antikörper nachgewiesen werden. Annexin-V ist ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipidbindendes Protein. Durch Kombination der Annexin-V Färbung mit einer Propidiumiodidfärbung (PI) ist es auch möglich, nekrotische bzw. tote Zellen in der Durchflusszytometrie zu identifizieren. Nekrotische Zellen sind charakterisiert durch Membranrupturen. Hier kann Propidiumiodid in die Zelle eindringen und die genomische DNA bzw. Zellkern anfärben. D.h. doppelt positive Zellen (Annexin-V und PI) sind nekrotisch bzw. tot, Annexin-V positive Zellen befinden sich in einer frühen Apoptosephase und Zellen doppelt negativ für Annexin-V und PI stellen vitale Zellen dar.

Die Durchführung der Färbung und Messung erfolgte wie im Protokoll des Kits beschrieben. (Annexin-V-FITC Kit; Becton Dickinson, Heidelberg)(siehe 2.1.11)

2.2.1.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden, durch primäre Antikörper und Fluorochrom-konjugierte sekundäre Antikörper, spezifisch Proteine und Strukturen der Zelle angefärbt, die dann unter einem Fluoreszenz- oder konfokalen Mikroskop sichtbar werden. Der primäre Antikörper bindet dabei an das gewünschte Protein bzw. Antigen, während der sekundäre Antikörper, speziesabhängig den konstanten Bereich des ersten Antikörpers bindet.

Da für das Ausschalten von Survivin durch Vektoren mit einer Puromycin-resistenz keine Zellgrenzen mehr sichtbar sind, wurde für das Anfärben der Membranen ein mit Texas Red (TR) gekoppeltes „wheat germ agglutinin“ (WGA-TR; Invitrogen) verwendet. WGA sind kationische Lektine, die

an N-Acetylglucosamine und N-Acetylneuraminsäuren in der Zellmembran binden können.

Die Zellen, welche auf Deckgläschen in 6-Well-Platten transduziert und kultiviert worden waren, wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend fixiert, indem man sie mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei 37°C inkubierte. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS erfolgte die Anfärbung der Membran. Dazu wurde die WGA-TR Stocklösung (1 mg/ml) in HBSS 1:300 verdünnt, auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit HBSS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 1 ml Permeabilisierungslösung (1% BSA in PBS + 0,3% Triton-X-100) für 30 min bei RT, danach wieder dreimaliges Waschen mit PBS.

Die DNA kann mit dem Hoechst 33342-Farbstoff angefärbt und auf diese Weise im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu wurde eine Hoechst 33342-Färbelösung (1 mg/ml) 1:1000 verdünnt und die Zellen damit für 3-5 min bei RT inkubiert.

Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBS wurden 60 µl primäre Antikörper-Lösung (siehe 2.1.6.1.) auf die Deckgläschen gegeben und diese in einer feuchten Kammer bei RT für 1 -2 Stunden inkubiert.

Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS und eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe 2.1.6.2.) unter den Bedingungen, wie schon für den primären Antikörper beschrieben.

Nachdem die Zellen 2x mit PBS gewaschen wurden, erfolgte zuletzt ein einmaliges Waschen mit ddH₂O.

Anschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Vertiefungen der Zellkulturschale entnommen, auf einem Objektträger in Eindeckmedium (Vectashield) eingebettet und an den Seiten mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem „Leica SP5 upright Laser Scanning Confocal Microscope“. Da mehrere Fluoreszenzen in einer Probe detektiert werden mussten, wurde ein sogenannter „Sequential Scan“ durchgeführt, d.h. jeder Farbstoff wurde einzeln, wie in der folgenden Tabelle beschrieben,

Lasers (nm)	Fluoreszenzfarbstoff	Emission (nm)
405	Hoechst 33342	415-478
488	FITC/EGFP	498-533
543	Cy3	553-584
594	Texas Red	604-623
633	Alexa Fluor 633	> 643

mit dem entsprechenden Laser angeregt und mit speziell, an das Emissionsspektrum angepassten Filtern detektiert. Somit wurde die Überlappung der Fluoreszenzspektren von verschiedenen Farbstoffen minimiert. Des Weiteren wurden, gerade im Hinblick auf die Kollokalisationsanalysen, Einzelfärbungen als Kontrollen verwendet, um eine unspezifische Bindung zwischen den verwendeten primären und sekundären Antikörper unterschiedlicher Spezies auszuschließen.

Die Auswertung der Bilder, die Kollokalisationsanalyse sowie das Markieren der Zellen erfolgte mit dem „open-source“ Programm Fiji.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) nutzt man die Bindung des Coomassie-Brilliant-Blue Farbstoffes an hydrophobe Seitenketten der Proteine. Durch diese Komplexbildung kommt es zu einem Verschieben des Absorptionmaximums von 470 nm nach 590 nm, das mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden kann.

Als Standard zur Bestimmung der Eichkurve wurde eine 0 - 1,4 mg/ml BSA Lösung in Protein-Lysepuffer hergestellt.

Von den unbekanntem Proteinproben (siehe 2.2.1.4) wurden, je nach Zelllysatzmenge, unterschiedliche Konzentrationen hergestellt und davon jeweils 5 μ l auf eine 96-Wellplatte aufgetragen. Die Verdünnungen erfolgten in PBS. Von jeder Konzentration wurden von der Standardkurve als auch von den unbekanntem Proben eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Zu den 5 μl Probe pro Well wurden noch 250 μl Bradfordreagenz (Sigma) hinzugegeben, danach erfolgte eine Inkubation für 30 - 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Die Messung der 96-Wellplatte erfolgte an einem Biotec Plate-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Anhand der bekannten BSA-Konzentrationen konnte dann eine Eichkurve erstellt werden, indem man die Konzentration gegen die Optische Dichte (OD) aufträgt. Der Proteingehalt der unbekanntenen Proben wurde manuell an dieser Eichkurve bestimmt.

Die Proben wurden, in Vorbereitung auf die SDS-PAGE (siehe 2.2.2.2), noch 1:1 mit 2x Laemmlipuffer versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.2.2.2 Das Auftrennen von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wird das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (Laemmli 1970) eingesetzt. Durch die Zugabe von SDS erfolgt eine Maskierung der Eigenladung der Proteine. Alle Proteine besitzen dann die gleiche negative Ladung und wandern dementsprechend, anhand ihres Molekulargewichtes, in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die SDS-PAGE folgende Gele verwendet:

	Trenngel (1 Gel)				Sammelgel
	6	10	12	15	
A.dest	5,9 ml	4,9 ml	4,4 ml	3,7 ml	2,8 ml
40 % Acrylamid	1,45	2,5 ml	3 ml	3,8 ml	0,6 ml
Trenngelpuffer	2,5	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-		0,6 ml
20 % SDS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	25 μl
10 % APS	80 μl	80 μl	80 μl	80 μl	50 μl
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	5 μl

Nach dem Zusammensetzen der Gelkammern und dem Gießen des Trenngel erfolgte eine Überschichtung mit Isopropanol, um einen geraden Abschluss der

Trenngelgrenze zu erreichen. War das Gel auspolymerisiert, wurde das Isopropanol entfernt und auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen.

Eine Denaturierung der Proben erfolgte durch Kochen bei 95°C und für 10 min in einem Heizblock. Danach wurden 30 - 60 µg Protein in die Taschen des Sammelgels gegeben. Die Gele wurden in Elektrophoresekammern eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet.

Die Auftrennung der Proben erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V. Die Stromstärke betrug nicht mehr als 20 mA. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard aufgetragen.

2.2.2.3 Der Westernblot

Bei einem Westernblot werden die negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine PDVF-Membran übertragen.

Die transferierten Proteine können dann spezifisch durch Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden.

Generell gibt es beim elektrophoretischen Blotten zwei Arten, Semidry und Nassblot. Der Vorteil des Semidry's liegt in der Schnelligkeit und im geringeren Verbrauch an Transferpuffer. Nassblots sind aufgrund der höheren Effizienz beim Blotten von Proteinen >100 kDa. empfohlen. Speziell für den Transfer von ATM und phosphorylierten ATM (370 kDa) wurde in dieser Arbeit ein Nassblot-System (Bio-Rad) verwendet.

2.2.2.3.1 „Semidry-Blotting“ von Proteinen auf Membranen

In Vorbereitung des Blottens wurden die Filterpapiere in entsprechenden Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkt sowie die PDVF-Membran 10 min in Methanol äquilibriert. Dann erfolgte der Aufbau des Westernblots. Dazu wurden auf die Anode drei, in Anodenpuffer I getränkte, Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, gefolgt von drei Lagen Whatman-Filterpapier mit Anodenpuffer II. Mit einer Pipette wurde vorsichtig über die Filterpapiere gerollt, um etwaige Blasen zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden vorsichtig nacheinander Membran und Gel platziert. Zuletzt kamen weitere vier Lagen Whatman-Filterpapier mit Kathodenpuffer auf das Gel und wurden vorsichtig mit einer Pipette von Blasen befreit. Zum Schließen der

Kammer wurde der obere Deckel mit der Kathode auf den Blot gedrückt. Das Blotten der Proteine auf die Membran erfolgte bei 25V für 1 Stunde.

2.2.2.3.2 Nassblot von Proteinen auf Membranen

Alle für den Transfer benötigten Filterpapiere und Schaumstoffmatten wurden in eiskalten 1x WBTP getränkt. Eine PVDF Membran wurde für 3 min in Methanol äquilibriert und ebenfalls in 1x WBTP gegeben. Zudem erfolgte eine Äquilibrierung des Trenn- und Sammelgels vor dem Blotten für 30 - 60 min in 1x WBTP.

Beim Aufbau des Blots wurde eine Schaumstoffmatte auf die schwarze Spange (Kathode) gelegt und mit einer Pipette von Blasen befreit. Darauf wurde ein Filterpapier gelegt, gefolgt von dem Proteingel und der äquilibrierten Membran. Auf die Membran wurden vorsichtig ein Whatman-Filterpapier sowie ein weitere Schaumstoffmatte gelegt und der ganze Blot mit der weissen Spange geschlossen und verriegelt. Diese Kasette wurde mit einem Eispack in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Transfer bei 4°C, 100 V und 350 mA für 90 min durchgeführt.

2.2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Antikörper. Dabei erkennt der erste Antikörper spezifisch bestimmte Epitope des Zielproteins. Ein zweiter Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, bindet spezieabhängig an den konstanten Bereich des ersten Antikörpers. Durch Zugabe einer Substrats kann dann an einem Luminometer die durch eine Enzymreaktion freigesetzte Chemilumineszenz gemessen werden.

Um eine Bindung der Antikörper direkt an der Membran zu verhindern, erfolgte zuerst eine Blockierung der freien Bindungsstellen mit einer Block-Lösung. Dafür wurde, abhängig vom Antikörper, meist eine 5 % Milchpulverlösung verwendet.

Die Blockierung erfolgte für mindestens 15 min. Danach wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS/TT gewaschen. Die Inkubation des ersten Antikörpers (siehe 2.1.6.1) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht auf einem

Schüttler bei 4°C. Am nächsten Tag wurde wiederum 3x für 5 min mit TBS/TT gewaschen und die Membran 1h mit dem sekundären Antikörper (siehe 2.1.6.2) bei RT inkubiert. Nach dem Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Membran wieder 3x für 5 min in TBS/TT gewaschen.

Zur Detektion der Signale wurde das ECL Plus System (Amersham Biosciences) oder Luminata forte (Millipore) verwendet. Dazu wurde der Blot für 5 min in Detektionslösung inkubiert, anschließend gut getrocknet und in eine Klarsichtfolie gelegt. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Bioimager LAS 3000 (Fujifilm) bei verschiedenen Belichtungszeiten gemessen.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem „Gel Analyzer Tool“ von Fiji. Durch das Vermessen der Peaks von den einzelnen Banden jeder Spur konnte die relative Pixeldichte (RD) bestimmt werden. Dabei wurde eine Spur, entweder unbehandelte wt oder shLuc Zellen, als Standard mit der RD von 1 gesetzt. Die dabei ermittelten Werte für die relative Pixeldichte jeder Probe wurden mit der RD für Tubulin normalisiert.

2.2.2.5 „Stripping“ von PDVF-Membranen und erneute AK-Inkubation

Diese Methode ermöglicht eine erneute Detektion von Proteinen auf der Membran mit verschiedenen Antikörpern.

Die Membran wurde dabei für 30 bis 60 min in einem 50°C-Wasserbad in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit TBS/TT und zweimal für 5 min mit TBS gewaschen. Danach erfolgte erneut eine Inkubation in Blockierungslösung unter kontinuierlichem Schütteln. Das weitere Vorgehen entsprach dem wie unter 2.2.2.4 schon beschrieben.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode der DNA Amplifikation *in vitro*, die 1983 von Kary Mullis (Saiki et al. 1988) entwickelt wurde. Dazu wird die doppelsträngige DNA bei 95°C denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten. Speziell synthetisierte DNA Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden dann temperaturabhängig an die jeweiligen komplementären Bereiche der DNA-Matrize. In der darauf folgenden

Elongationsphase wird die zur Matrize komplementäre DNA, unter Verbrauch an Nukleotiden, durch eine thermostabile DNA-abhängige-DNA-Polymerase synthetisiert. Die Dauer der Elongationsphase ist dabei abhängig von der Länge des zu synthetisierenden DNA Fragmentes und der verwendeten Polymerase. Im nächsten Schritt erfolgt wieder eine Denaturierungsphase bei 95°C, um die doppelsträngigen Amplifikate zu trennen. Durch die Wiederholung dieser Schritte, bis zu 35 Zyklen, kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Zielsequenz.

Für die Amplifikation des Hygromycin Resistenzgens wurde folgender PCR Ansatz gewählt:

Zutaten	1 Ansatz
Template DNA (10 ng)	10 ng
10x Puffer	5 μ l
Primer vorwärts (100 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer rückwärts (100 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Taq Polymerase	0,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
dNTPs (25 mM)	0,5 μ l
DMSO	2 μ l
mit A. dest auf 50 μ l auffüllen	

	Dauer	Temperatur	Zyklen
initiale Denaturierung	2 min	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	31
Annealing	30 sec	Gradient 60°C - 70°C	31
Elongation	1 min 10 sec	72 °C	31
Endsynthese	10 min	72°C	1

2.2.3.2 DNA-Gelelektrophorese

Mit dieser Methode ist es möglich, in einem angelegten elektrischen Feld die negativ geladene DNA anhand ihrer Größe aufzutrennen. Über die verwendete Menge an Agarose (w/v) kann die Porengröße des Gels variiert und der genaue Trennbereich definiert werden. In der Molekularbiologie werden häufig Agarosegele zwischen 0,8 %, für große DNA-Fragmente und 2 % für kleine DNA-Fragmente verwendet.

Dafür wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen, in 1x TAE Puffer gelöst und in einer Mikrowelle vollständig aufgeköcht.

Vor dem Gießen, bei ca. 60 °C Lösungstemperatur, wurde noch Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml hinzugegeben und das Gel auf einem Gelträger gegossen

Nach dem Aushärten wurde das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer gesetzt und diese mit 1 x TAE aufgefüllt.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proben mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 0,9 V/cm.

Nach Laufende war es möglich, die DNA aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids im UV-Licht zu analysieren. Durch das Mitführen eines DNA-Größenstandards konnten den Banden die entsprechende Größe zugeordnet werden.

2.2.3.3 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Da das Ethidiumbromid mit doppelsträngiger DNA interkaliert, können unter UV-Licht DNA-Banden sichtbar werden. Beim Ausschneiden dieser Banden aus dem Agarosegel wurde die Exposition mit UV-Licht so gering wie möglich gehalten, um Basenveränderungen zu verhindern.

Die DNA wurde anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aus dem Gel eluiert.

2.2.3.4 Die Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Bei der Ligation können ein enzymatisch geöffneter Vektor und ein DNA-Fragment (Insert) durch eine Ligase miteinander verknüpft werden. Dabei werden durch das Enzym die 3'-Hydroxy- mit den 5'-Phosphat Enden von Nucleinsäuren verbunden.

Für die Ligation sollte das Vektor : Insertverhältnis bei 1:3 liegen. Man geht davon aus, dass bei der Elution der DNA 30 % Verlust auftreten. Daraus berechnet sich dann die Menge an Insert und Vektor in Abhängigkeit von der Größe der Fragmente.

Die Ligation wurde mit dem „Fast-Link™ DNA Ligation Kit“ (Epicentre Biotechnologies) in einem 15 μ l Ansatz durchgeführt.

1,5 μ l 10x Fast-Link Ligations Puffer
1,5 μ l 10 mM ATP
1 μ l Fast-Link DNA Ligase
x μ l Vektor DNA
x μ l Insert DNA
bis 15 μ l mit A.dest auffüllen

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Ligase für 15 min bei 70°C inaktiviert.

2.2.3.5 Herstellung kompetenter E. coli

Zur Herstellung kompetenter Bakterien nach Hanahan (1983) wurde eine einzelne Kultur der Wirtsbakterien über Nacht in 2ml 2xYT-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde die stationäre Kultur auf 1:100 verdünnt und in 1,5 - 3,5 h in die exponentielle Wachstumsphase gebracht. Von dieser Vorkultur wurden dann 5ml zu 100 ml vorgewärmten 2xYT-Medium gegeben und so lange kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde anschließend für 5 min auf Eis gestellt und schnell auf 4°C abgekühlt. Die Bakterien wurden dann auf zwei 50 ml Falconröhren aufgeteilt und bei 5000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte das

Verwerfen des Überstandes, die Resuspendierung des Zellpellets auf Eis in 20 ml eiskalten Transformationspuffer I (TFB I: 30 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl_2 , 10 mM CaCl_2 und 15% Glycerin) sowie eine Inkubation auf Eis für 10min. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem sterilen Transformationspuffer II (TFB II: 10 mM NaMOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl_2 und 15% Glycerin) resuspendiert und in Aliquots von jeweils 100 μl in einem Trockeneisbad schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 Transformation von E.coli

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente prokaryotische Zellen. Dadurch soll eine Vermehrung der Plasmid-DNA erreicht werden.

Ein Aliquot von 50 bis 100 μl kompetenten Bakterienzellen (*E. coli*) wurde in 5-10 min auf Eis aufgetaut. Den Bakterien wurden 0,5 - 1 μg DNA zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Einer Inkubation für 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock für exakt 2 min in einem 42°C warmen Wasserbad. Die Bakterien wurden anschließend sofort wieder auf Eis abgekühlt.

Nach Zugabe von 900 bis 950 μl LB-Medium, ohne Zusatz von Antibiotika, erfolgte die Inkubation der Suspension für 1 h bei 37°C im Schüttler. Anschließend wurde der Ansatz in Verdünnungen auf LB_{Amp} -Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert.

2.2.3.7 Plasmid-Minipräparation aus E.coli, modifiziert nach *Holmes & Quigley*

In Vorbereitung der DNA Präparation wurde einen Tag zuvor eine Bakteriensuspension angesetzt. Dazu wurde von einer Bakterienplatte (siehe 2.2.3.6) mit einem sterilen Zahnstocher eine Bakterienkolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium, mit dem entsprechendem Antibiotikum, über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation (Tischzentrifuge: 13000 rpm, 1 min, RT) von 1,5 ml dieser Bakteriensuspensionen in einem Eppendorfgefäß

und das Verwerfen des Überstandes. Das Bakterienpellet wurde in 350 μ l STET-Puffer gut resuspendiert und der Suspension zusätzlich noch 25 μ l Lysozym-Lösung hinzugefügt. Nach dem Kochen des Ansatzes für 40 s erfolgte anschließend eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und RT.

Nach der Entfernung der pelletierten Zellreste mit einem sterilen Zahnstocher wurden 40 μ l einer 2,5 M NaAcetat-Lösung (pH 5,2) und 420 μ l Isopropanol dem verbleibenden Überstand zugegeben. Es folgte eine Fällung der DNA für 5 min bei RT.

Durch erneutes Zentrifugieren bei 12000 g und 4°C für 5 min wurde die Plasmid-DNA sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 150 μ l 70 % igem Ethanol gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation (12000 g, 4°C, 5 min) und dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet ca. 15 min an der Luft getrocknet.

Zuletzt erfolgte noch ein RNA Verdau. Dazu wurde das Pellet in 50 μ l A.dest. gelöst und mit 1 μ l RNase versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 10 min. Für einen analytischen Restriktionsverdau (2.2.3.10) wurden dann 5 μ l eingesetzt.

2.2.3.8 Plasmid-Maxipräparation

Braucht man größere Mengen an Plasmid-DNA für Klonierungen oder Experimente in der Zellkultur, wird viel und vor allem saubere DNA benötigt. Dazu wurden so genannte Plasmid-DNA-Maxipräparationen aus Maxikulturen von Bakterien durchgeführt.

Einen Tag vor der Präparation wurde eine Bakterienkultur angeimpft. Dafür wurden 50 μ l einer Minikultur (siehe 2.2.3.7) zu 150 ml LB_{Amp}-Medium gegeben und über Nacht für ca. 15 -17 Stunden auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert.

Die DNA- Präparation erfolgte mit dem Invisorb® Plasmid Maxi Kit (Invitex).

2.2.3.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm an einem Photometer gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 g/ml in

Wasser. Die Konzentration errechnet sich aus dem OD260 Wert, der Verdünnung und dem Multiplikationsfaktor von 50 für doppelsträngige DNA.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen. Da Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen, gibt der Quotient aus OD260 und OD280 Aufschluss über den Grad der Verunreinigung der DNA/RNA-Probe mit Proteinen. Eine proteinarmer Nukleinsäurelösung weist eine OD-Quotienten 260/280 zwischen 1,8 – 2,0 auf. Die DNA aus einer Plasmid-Maxipräparation wurde 1:100 mit A.dest verdünnt. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette (BioRad) am „SmartSpec Plus“ Photometer (BioRad).

2.2.3.10 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau dient der Analyse von DNA als auch zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten für die Klonierung.

Es kommen dabei Restriktionsenzyme, die aus Bakterien gewonnen wurden, zum Einsatz. Diese Enzyme erkennen in der DNA bestimmte palindromische Sequenzen, die meist 4 bis 8 Basenpaare umfassen. Abhängig vom Enzym entstehen nach dem Schneiden glatte oder überhängende Enden.

Die Reaktionsbedingungen (Puffer, Inkubationstemperatur) waren dabei vom Hersteller vorgegeben. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer stammten von Fermentas. Die Inkubationsdauer betrug 2 Stunden, die Inkubationstemperatur war abhängig vom gewählten Enzym.

Ein typischer Restriktionsansatz für eine Restriktionsanalyse bestand aus:

5 μ l	DNA-Lösung der Minipräparation (~ 0,5 – 1 μ g DNA)
0,5 μ l	Restriktionsenzym(e) (10 U/ μ l)
2 μ l	Reaktionspuffer 10x
	auf 20 μ l mit ddH ₂ O auffüllen

Für einen präparativen Restriktionsansatz wurde folgende Zusammensetzung gewählt:

x μ l	DNA aus Maxipräparation (insgesamt 5 μ g)
0,5 μ l	Restriktionsenzym (10 U/ μ l)
3 μ l	Reaktionspuffer 10x

auf 30 μ l mit ddH₂O auffüllen

Die Analyse erfolgte über eine Gel-Elektrophorese (siehe 2.2.3.3).

2.2.3.11 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Klonierungen wurde eine DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger & Coulson 1975) durchgeführt.

Dafür wurde ein folgender Ansatz verwendet:

20 pmol Primer

600 ng Plasmid DNA

bis zu 5 μ l mit 10 mM Trispuffer (pH 8) auffüllen

Die Sequenzierungen wurden von Seqlab; Göttingen, Germany durchgeführt.

2.2.4 Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Die spektrale Karyotypisierung (SKY) ist eine Methode, mit der es möglich ist, sämtliche Chromosomen eines Chromosomensatzes in unterschiedlichen Farben darzustellen (Schrock et al. 1996). Mit dieser Technik können spezielle Chromosomenaberrationen wie Translokationen, Deletionen oder andere interchromosomale Aberrationen detektiert werden. Die Verwendung von Chromosomen spezifischen, fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden erlaubt eine farblich differenzierte Darstellung der Chromosomen eines Chromosomensatzes.

Dazu werden die Sonden mit fünf Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt (in der vorliegenden Arbeit Rhodamin 110, Spectrum Orange, Texas Red, Cy (Cyanin) 5 und Cy5.5). Die Markierung erfolgt dabei mittels PCR durch drei Fluoreszenzfarbstoffe (Rhodamin 110, Spectrum Orange, Texas Red) und zwei Haptene (Biotin, Digoxigenin), die alle an dUTP (desoxy-Uraciltriphosphat) gebunden sind. Die Haptene werden später durch Fluoreszenzmarkierte Antikörper bzw. Avidin (Cy5, Cy5.5) nachgewiesen, um Fluorochromkonjugate während der PCR zu vermeiden. Die Sonden für jedes Chromosom besitzen dabei eine spezifische Kombination an Fluoreszenzfarbstoffen, die eine spätere individuelle Unterscheidung ermöglichen (Tabelle 1).

Die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Sonden erfolgt mit Metaphasen-Chromosomen in Kombination mit C₀t-1-DNA, um repetitive Sequenzen zu blockieren.

Zur spektralen Analyse der Fluoreszenzemissionen wird das interferometrische Prinzip genutzt. Die gesamte Fluoreszenz des mikroskopischen Objekts wird mittels eines Sagnac-Interferometers aufgenommen, das an eine hochauflösende CCD-Kamera gekoppelt ist. Das aufgezeichnete Interferogramm jedes Bildpunktes (Pixel) wird mit Fouriertransformation analysiert. Ausgehend von den ermittelten Spektren wird ein Falschfarbenbild hergestellt, das den spektralen Verteilungen des Originalbildes entspricht. Die Bilder wurden mit dem zum Spectra CubeTM-System gehörigen Programm „Spectral Imaging“ (Applied Spectral Imaging, Eding-Neckarhausen, Germany) aufgenommen und über das SkyViewTM-System (Applied Spectral Imaging Inc, Migdal Ha'Emek, Israel) ausgewertet.

Die SKY Analysen wurden in Kooperation mit Frau Dr. Barbara Klink (Klinische Genetik, Medizinische Fakultät „Carl Gustav Carus“, TU Dresden) durchgeführt.

2.2.4.1 Präparation von Metaphasenchromosomen

Die HCT116 p53^{-/-} Zellen wurden, wie unter (Abschnitt Transduktion/Selektion) beschrieben, mit pRVH-N-Puro-shLuc bzw. pRVH-N-Puro-shSurv transduziert und mit Puromycin für 24h selektioniert. Nach 72h Kultivierung erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml Colcemid für 1h, um die Zellen in der Metaphase zu arretieren. Für die Ablösung der Zellen wurde Trypsin hinzu gegeben und der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation der mitotischen Zellen bei 1000 rpm für 10 min und der Resuspendierung bzw. Inkubation des Zellpellets in einer hypotonen 0,4% KCL Lösung (37°C) für 20 min, wurden die Zellen erneut bei 1000 rpm abzentrifugiert und schließlich fixiert. Die Fixierung erfolgte in sechs Schritten in einem Methanol/Eisessig (3:1) Gemisch. Zuletzt wurden die Zellen über einem heißen Wasserbad auf saubere Objektträger getropft und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) dehydriert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.4.2 Hybridisierung und Detektion von SKY Sonden

Für die Hybridisierung der Sonden wurden die Objektträger zuerst mit 2xSSC äquilibriert und mit RNase (0,1 mg/ml in 2xSSC) für 45 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt sollte eine DNA-RNA Hybridisierung der Sonden verhindern. Daraufhin folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 2xSSC für jeweils 5 min. Um Zytoplasmareste zu entfernen, wurden die Objektträger mit einer 0,01 M HCL (pH 2,0) + 3 mg/ml Pepsin Lösung bei 37°C für 5 min behandelt und danach zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nach einem erneuten Waschen in PBS/MgCl₂ (0,05M MgCl₂ in PBS) wurden die Objektträger für 10 min in PBS/MgCl₂ + 1% Formaldehyd fixiert und dann einmal in PBS gewaschen. Die Dehydrierung und Lufttrocknung der Objektträger erfolgte anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70%, 90% und 100% igem Ethanol.

Im nächsten Schritt mussten die Chromosomen für die Hybridisierung mit den DNA-Sonden denaturiert werden, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Dazu wurden auf die getrockneten Objektträger 120 µl Denaturierungslösung (70% Formamid/2xSSC, pH 7,0) gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zudem erfolgte eine Inkubation der Objektträger bei 75°C für 90 sec und eine sofortige Überführung in eiskalten 70% igen Ethanol. Die Objektträger wurden zum Schluss wieder mit 90% und 100% igen Ethanol dehydriert.

Die DNA-Sonden wurden von Frau Prof. Schröck (Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden) zu Verfügung gestellt.

Um die repetitiven Sequenzen der DNA Sonde mit C₀t-1-DNA zu blockieren, wurde der Sonden-Mix erst bei 80°C für 5 min denaturiert und anschließend für 1h bei 37°C prähybridisiert.

Die eigentliche Hybridisierung der Objektträger mit den Metaphasen Chromosomen und der Sonden-DNA erfolgte für 48 h bei 37°C. Dazu wurde der Sonden Mix auf den Objektträger aufgebracht, mit einem Deckgläschen abgedeckt und luftdicht mit Fixogum verschlossen.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger, um ungebunden Sonden zu entfernen, dreimal für 5 min in FA/SSC (50% Formamid in 2xSSC; pH 7,0) bei 45°C und anschließend 3x 5 min mit 1xSSC bei 45°C gewaschen.

Daraufhin erfolgte eine Blockierung der Präparate, um eine unspezifische Bindung der Antikörper bzw. Avidinkonjugate an die DNA zu vermeiden.

Chromosom	Rhodamine 110	Spectrum Orange / Tamra	Texas Red	Biotin (Cy5)	Digoxigenin (Cy5,5)
1	+	+		+	
2				+	
3		+			+
4	+	+	+		
5					
6		+	+	+	+
7		+		+	
8		+	+		
9					
10				+	
11			+	+	
12	+			+	+
13		+	+	+	
14		+		+	+
15	+	+			
16		+			
17			+		+
18	+		+	+	
19	+				+
X	+				
Y	+		+		

Tabelle 1: Farbkombination der humanen Chromosomen für die SKY Analyse

Dazu wurden die Objektträger mit 4xSSC/0,1% Tween20 benetzt, anschließend mit 120 μ l Blockierungslösung (3% BSA in 4xSSC/Tween20) versehen, eingedeckelt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 4xSSC/Tween20 sowie die Zugabe der ersten Antikörper- bzw. Avidinlösung. Die Reaktionen wurden jeweils mit 50 ng Antikörper/Avidin in 4xSSC/Tween20 in einem 120 μ l Volumen für 45 min bei 37°C durchgeführt, gefolgt von drei Waschschriften für 5 min mit 4xSSC/Tween20. Der Schritt der Antikörper Inkubation, samt des darauf folgenden Waschschriftes, wurde dann mit dem anti-Maus-Cy5.5 Antikörper wiederholt.

Die finale individuelle Markierung der Chromosomen ist in Tabelle 1 dargestellt. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Gegenfärbung der Chromosomen mit 1 μ g/100ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) in 2xSSC für 10 Minuten. Überschüssiger DAPI-Farbstoff wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten entfernt, die Objektträger in der Alkoholreihe dehydriert, an der Luft getrocknet und letztlich mit 32 μ l Antifade (1mg/ml 1,4- Phenylendiamin pH 8,0 und 80% Glycerol in PBS) eingedeckelt.

Die Detektion der Präparate erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems DM RXA, Wetzlar, Deutschland), des SKY-Systems (ASI, Applied Spectral Imaging Inc., Migdal Ha'Emek, Israel) mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung von retroviralen pRVH-N-shSurv-puroR und pRVH-N-shluc-puroR-Vektoren

Für RNAi-Experimente standen bereits retrovirale „shRNA-targeting“-Vektoren zum „Knock down“ des Survivins bzw. der Luciferase zur Verfügung, welche über einen internen CMV-Promoter das Reporter-gen EGFP exprimieren konnten. Im Zuge von in dieser Arbeit geplanten Zellzyklusanalysen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern und DNA Farbstoffen mussten nun Vektoren generiert werden, die eine Puromycinresistenz aufweisen.

Puromycin ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces alboniger*, das die Proteintranslation sowohl bei Eukaryonten als auch bei Prokaryonten hemmt (DARKEN 1964). Es eignet sich hervorragend zum Selektionieren transduzierter Zellen, bei denen z.B. essentielle Proteine ausgeschaltet wurden, da innerhalb von 24h nicht-transduzierte Zellen sehr effektiv eliminiert werden können (siehe 2.2.1.3.3).

Die Resistenz gegenüber Puromycin wird durch das PAC-Gen vermittelt, welches für eine N-Acetyl-Transferase codiert (Lacalle et al. 1989).

Dazu wurden aus den Vektoren pRVH-N-RFP-shluc und pRVH-N-RFP-shSurv die shRNA's samt H1 Promoter mit XhoI/EcoRI ausgeschnitten und in pRVH-N-PuroR einkloniert (Abb. 13 A). Die resultierenden Vektoren waren pRVH-N-PuroR-shluc bzw. pRVH-N-PuroR-shSurv. Die Kontrolle der Insertion erfolgte durch eine zusätzliche DNA-Sequenzierung der in den Vektor eingebrachten Sequenz.

3.2 Generierung und Charakterisierung von MCF-7 und U87-MG Zellen mit stabilem „Knock down“ des Tumor- Suppressorproteins p53

Durch die Verwendung retroviraler shluc/shSurv Vektoren mit Puromycinresistenz mussten auch neue p53-defiziente Zelllinien geschaffen werden, da bereits vorhandene Vektoren zum Ausschalten von p53 (pRVH-N-PuroR-shp53) ebenfalls eine Puromycinresistenz aufwiesen. Zu diesem Zweck sollte ein modifizierter pRVH-N Vektor mit einer Hygromycin B Resistenz etabliert werden.

Hygromycin B ist ein Aminoglykosid und hemmt ebenfalls die Proteinsynthese (Gritz & Davies 1983) von Eu- und Prokaryonten. Allerdings ist im Vergleich zu Puromycin für die Selektion eine höhere Dosis ($> 100 \mu\text{g/ml}$) über einen längeren Zeitpunkt nötig.

Die Resistenz gegenüber Hygromycin B wird durch das *Hph*-Gen von *E.Coli* vermittelt, welches für eine Hygromycin B Phosphotransferase codiert, die wiederum Hygromycin B zu 7^o-O-phosphoryl-hygromycin B phosphoryliert und damit inaktiviert (Pardo et al. 1985).

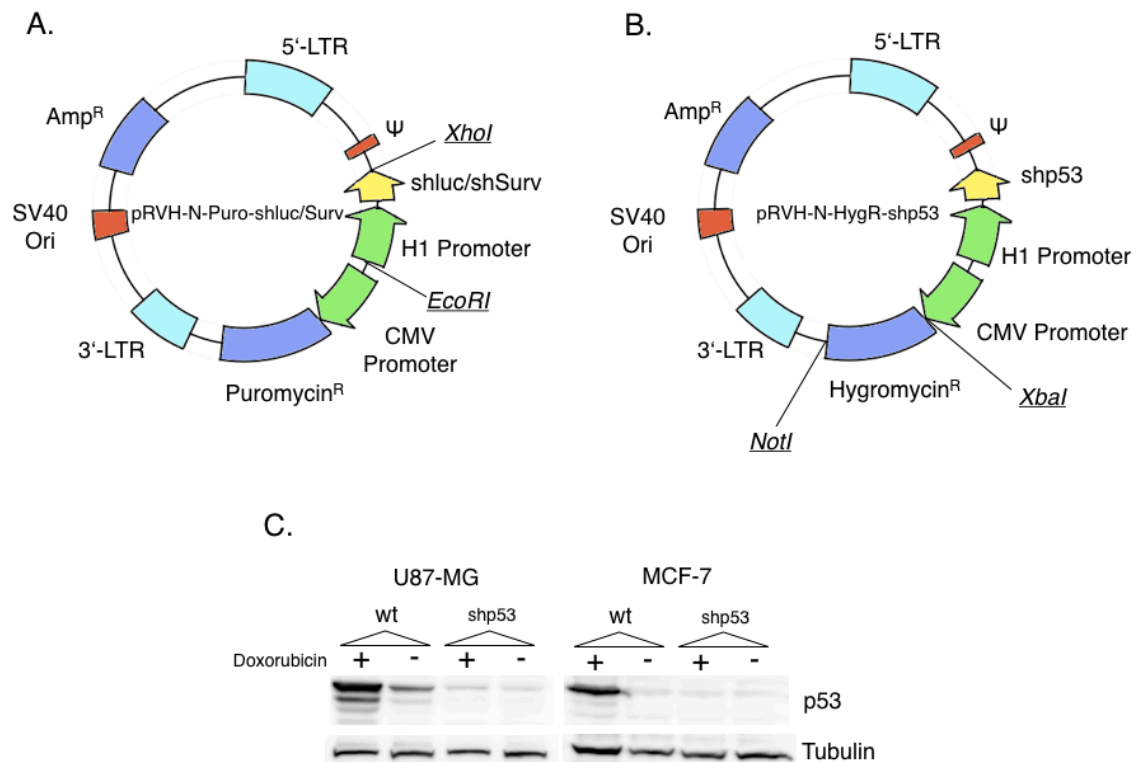


Abb. 13. schematische Darstellung der verwendeten pRVH-N-Puro-shluc, pRVH-N-Puro-shSurv und pRVH-N-HygR-shp53 Vektoren. (A) Die Klonierung der shRNA Sequenzen mit H1 Promoter für Luciferase und Survivin erfolgte über XhoI:EcoRI. (B) Das Hygromycin Resistenz Gen wurde von pRev-CMV über eine PCR amplifiziert, in pCR2.1 zwischenkloniert und dann über XbaI:NotI mit dem Puromycin Resistenz Gen aus pRVH-N-Puro ausgetauscht. Einbringen des Hairpins erfolgte über XhoI:EcoRI. (C) „Knock down“ von p53 mit dem neuen pRVH-N-HygR-shp53 Vektor in U87-MG und MCF-7 Zellen. Um p53 zu induzieren, wurden die Zellen 24h mit Doxorubicin ($0,25 \mu\text{g/ml}$) behandelt. (LTR: Long Terminal Repeats; Ψ : Verpackungssignal; Amp: Ampizillin; R: Resistenz; shp53: Sequenz der shRNA gegen p53; Doxo: Doxorubicin)

Als Template für die Amplifizierung des *Hph*-Gens diente der retrovirale Vektor pREV-CMV. Es wurden sequenzspezifische Primer angefertigt, die an ihren 5'-Enden zum Vektor kompatible XbaI bzw. NotI Restriktionsschnittstellen

aufwiesen (siehe 2.1.13.1). Die Amplifizierung erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben. Eine ca. 1,1 kb große Bande des Amplicons wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und in einen pCR2.1 Vektor subkloniert. Nach Überprüfung der DNA-Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte die Umklonierung der Hph Gens mit XbaI und NotI aus dem pCR2.1-HygR in den ebenfalls mit XbaI und NotI verdauten retroviralen Vektor pRVH-N-PuroR. Die Puromycin Resistenz wurde somit gegen eine Hygromycin Resistenz ausgetauscht (resultierender Vektor: pRVH-N-HygR).

Im nächsten Schritt erfolgte das Umklonieren des shp53 Hairpins aus pRVH-N-EGFP-shp53 in den neu generierten pRVH-N-HygR Vektor über XhoI und EcoRI-Schnittstellen. Eine ca. 6,7 kb Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und mit der H1-Promoter-shp53 RNA-Hairpin-Kassette zu dem neuen Vektor pRVH-N-HygR-shp53 ligiert (Abb. 13 B).

Zur Generierung der p53-defizienten U87-MG und MCF-7 Zelllinien wurden die Zellen mit dem Vektor pRVH-N-HygR-shp53 transduziert und mit Puromycin selektioniert.

Um die Effektivität der p53 shRNA zu testen, erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Doxorubicin im Medium (0,25 $\mu\text{g/ml}$) für 24 h. Doxorubicin ist eine DNA interkalierende Substanz und Inhibitor der Topoisomerase II und führt somit zu DNA-Strangbrüchen (Tewey et al. 1984). Eine Doxorubicin-Behandlung von Zellen sollte über den DNA Damage Checkpoint zu einer Akkumulation von p53 führen (Waldman et al. 1995; Kurz et al. 2004).

Durch die Verwendung des neuen Vektors konnte p53 in MCF-7 und U87-MG Zellen sehr effektiv ausgeschaltet werden. Die p53 Induktion durch Doxorubicin führte wie erwartet zu einem Anstieg in der Expression des p53-Proteins in Wildtyp-Zellen, während in den shp53 Zellen endogenes p53 sowohl in unbehandelten Zellen als auch in Doxorubicin-behandelten Zellen nicht zu detektieren war. Hier konnte somit eindeutig ein effizienter RNAi-Effekt nachgewiesen werden (Abb.13 C).

Somit standen für die weiteren Versuche mit HCT 116 (Kolonkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom) und U87-MG (Glioblastom) insgesamt drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie ihre isogenetischen p53-defizienten Varianten zur Verfügung.

3.3 Survivin-RNAi führt zu Zellteilungsdefekten und einem p53-unabhängigen Anstieg an polyploiden Zellen

Die neu generierten pRVH-N-puroR-shSurv bzw. pRVH-N-PuroR-shluc Vektoren wurden, wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben, eingesetzt und die transduzierten Zellen für 24h mit Puromycin selektioniert. 72-100 h nach der letzten Transduktion erfolgte die Zelllyse bzw. die Fixierung der Zellen für Western-Blot Analysen und FACS Messungen (siehe 2.2.1.4 und 2.2.1.5.1).

Der „Knock Down“ des Survivins durch eine stabile shRNA-Expression führte in allen drei verwendeten Zelllinien zu einem graduellen Anstieg in der Fraktion von polyploiden Zellen. Dieser Anstieg in der Polyploidie konnte gut mittels FACS Analyse dargestellt werden. Hier konnte man eindeutig Zellen mit distinkten 2n und 4n-Chromosomensatz und nach 72h signifikant vermehrt Zellen mit einem DNA Gehalt > 4n identifizieren. Dieser RNAi Phänotyp trat allerdings sowohl bei Wildtyp-Zellen als auch bei isogenetischen Zellen mit „Knock Down“ des p53 auf (Abb. 14 C).

Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtyp- und p53^{-/-}-HCT116-Zellen, welche stabil die Kontroll-shRNA gegen Luciferase exprimierten (Abb. 14 B, C), ein normales Bild, bestehend aus einem größerem Anteil an Zellen mit 2n (G1 Phase), Zellen in der Synthesephase und einem kleinerem Anteil mit einem Chromosomensatz von 4n (G2 Phase).

Mit shluc transduzierte Wildtyp und p53^{-/-} HCT116 Zellen (Abb. 14 B,C) besitzen zudem einen geringen Anteil an apoptotischen (wt: MW \pm SD, 4,7% \pm 2,6%; n=5; p53^{-/-}: MW \pm SD, 7,7% \pm 4,2%; n=5) und polyploiden Zellen (wt: MW \pm SD, 12,3% \pm 4,2%; n=5; p53^{-/-} : MW \pm SD, 16,3% \pm 7,5%; n=5), wobei der Anteil in den p53^{-/-} Zellen dabei minimal größer ist. Offensichtlich hat der Verlust von p53 in den Zellen unter optimalen Zellkulturbedingungen keinen Einfluss auf Proliferation und Apoptose.

Durch die Verwendung des pRVH-N-PuroR-shSurv-Vektors und die nachfolgende Puromycin Selektion konnte sehr effektiv eine deutliche Inhibition der Survivin-Expression in HCT116 und U87-MG Zellen in der Western Blot-Analyse festgestellt werden (Abb. 14 A).

Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Depletion von Survivin mittels shRNA in sowohl HCT 116, MCF-7- als auch U87-MG Wildtyp-Zellen zu einem Anstieg

des Proteinlevels an p53 sowie p21^{waf/cip}, einem direkten transkriptionellen Target von p53, im Vergleich zu den shLuc Kontrollen führte. In den jeweiligen isogenetischen aber p53-defizienten Zellen trat dieser Effekt nicht auf (Abb. 14 A, Abb. 25).

Alle drei getesteten Wildtyp-Zelllinien besitzen demnach ein funktionelles p53 Protein und zeigen einen Anstieg an p53 und p21^{waf/cip} nach Survivin Depletion, während in isogenetischen, p53-defizienten Zellen kein Anstieg von p21^{waf/cip} detektierbar war.

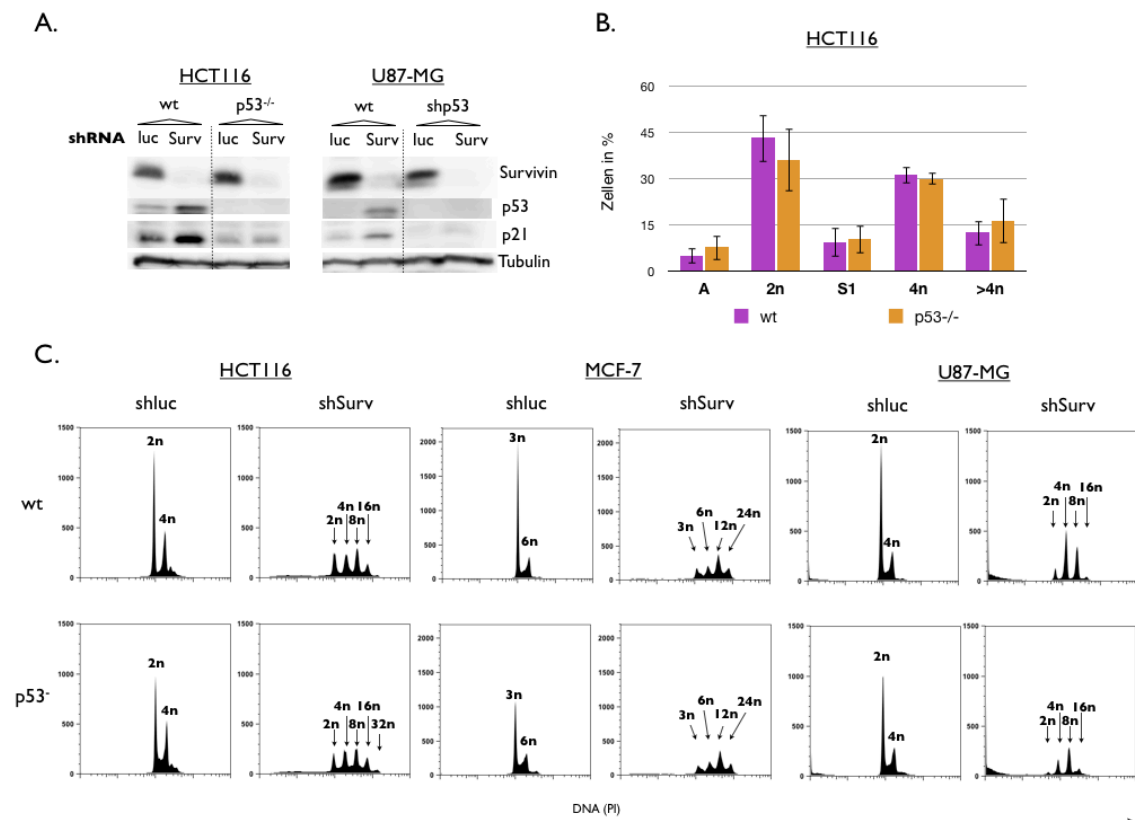


Abb. 14. shRNA vermittelte Survivin Depletion in wt und p53-defizienten HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen. (A) Western Blot von HCT116 und U87-MG Zellen, die mit den neuen retroviralen Vektoren pRVH-N-Puro mit shRNA's gegen Survivin (shSurv) und Luciferase (shLuc) transduziert und nach 72h fixiert wurden. (B) Vergleich des DNA-Gehaltes zwischen HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen, die mit shLuc transduziert wurden. (Mittelwerte mit Standardabweichung, n=6) (C) FACS-Analyse des DNA Gehaltes 72h nach Transduktion von shSurv bzw. shLuc in wt und p53-defizienten (p53^{-/-}) HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen. Es zeigte sich in allen shSurv Zellen eine Zunahme an Polyploidie. MCF-7 Zellen sind stabil triploid (ATCC). (A: Apoptose; S1: Synthesephase)

3.4 p53-positive Zellen mit „Knock down“ des Survivins zeigen biochemisch Zeichen eines G1-Zellzyklus-Arrests

p53 ist ein zentrales Molekül, was die Integration verschiedener Signale nach DNA Schäden, Stress und Onkogenaktivierung übernimmt und durch Aktivierung diverser Zielgene einen Zellzyklusarrest oder gegebenenfalls Apoptose initiieren kann (Giono & Manfredi 2006). Insofern war es sehr auffällig, dass in allen der getesteten Wildtyp-Zelllinien nach Survivin-Depletion verstärkt p53 und p21^{waf/cip} akkumulierten, gleichzeitig diese aber auch einen ähnlichen Grad an Polyploidie erreichten wie die isogenetischen, aber p53-defizienten Zellen.

Um den Effekt der p53/p21^{waf/cip} Akkumulation und dessen Einfluß auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zelllysate gesammelt und diese hinsichtlich der Zellzyklus-abhängigen Cycline analysiert. Dabei zeigte sich in der Western Blot-Analyse ein zeitabhängiger und gradueller Anstieg an p53 und p21^{waf/cip} in HCT116-Wildtyp Zellen mit „knock down“ des Survivins (shSurv; Abb. 15 A). Gleichzeitig detektiert man nach 48h und 72h eine Akkumulation von Cyclin D1- und Cyclin E-Proteinlevels. Beide Cycline sind an dem Übergang der G1-Phase in die S-Phase beteiligt und direkte Ziele des Cdk-Inhibitors p21^{waf/cip} (He et al. 2005), aber nicht von Cyclin B (G2-Phase -> Mitose). Interessanterweise ging die Akkumulation der Cycline D1, E sowie p21^{waf/cip} und p53 parallel einher mit einer zeitabhängigen Zunahme an polyploiden HCT 116 wt Zellen (shSurv) nach 48h bzw. 72h (Abb. 15 B).

Im Vergleich dazu zeigten die Zellen, welche mit dem Kontrollvektor pRVH-N-PuroR-shluc transduziert wurden, keine Akkumulation von p53, p21^{waf/cip} und den Cyclinen D1 und -E (Abb. 15 A). Das Gleiche galt auch für die p53-defizienten und Survivin-depletierten HCT116 Zellen, wobei diese allerdings eine zeitabhängige Zunahme an polyploiden Zellen aufwiesen (Abb. 15 B).

Survivin depletierte U87-MG Wildtyp Zellen zeigten nach 72h in der Westernblot Analyse ebenfalls eine Akkumulation von Cyclin D1 und Cyclin E im Vergleich zu den Luciferase Kontrollen und den p53-defizienten, Survivin-depletierten Zellen (Abb. 15 A).

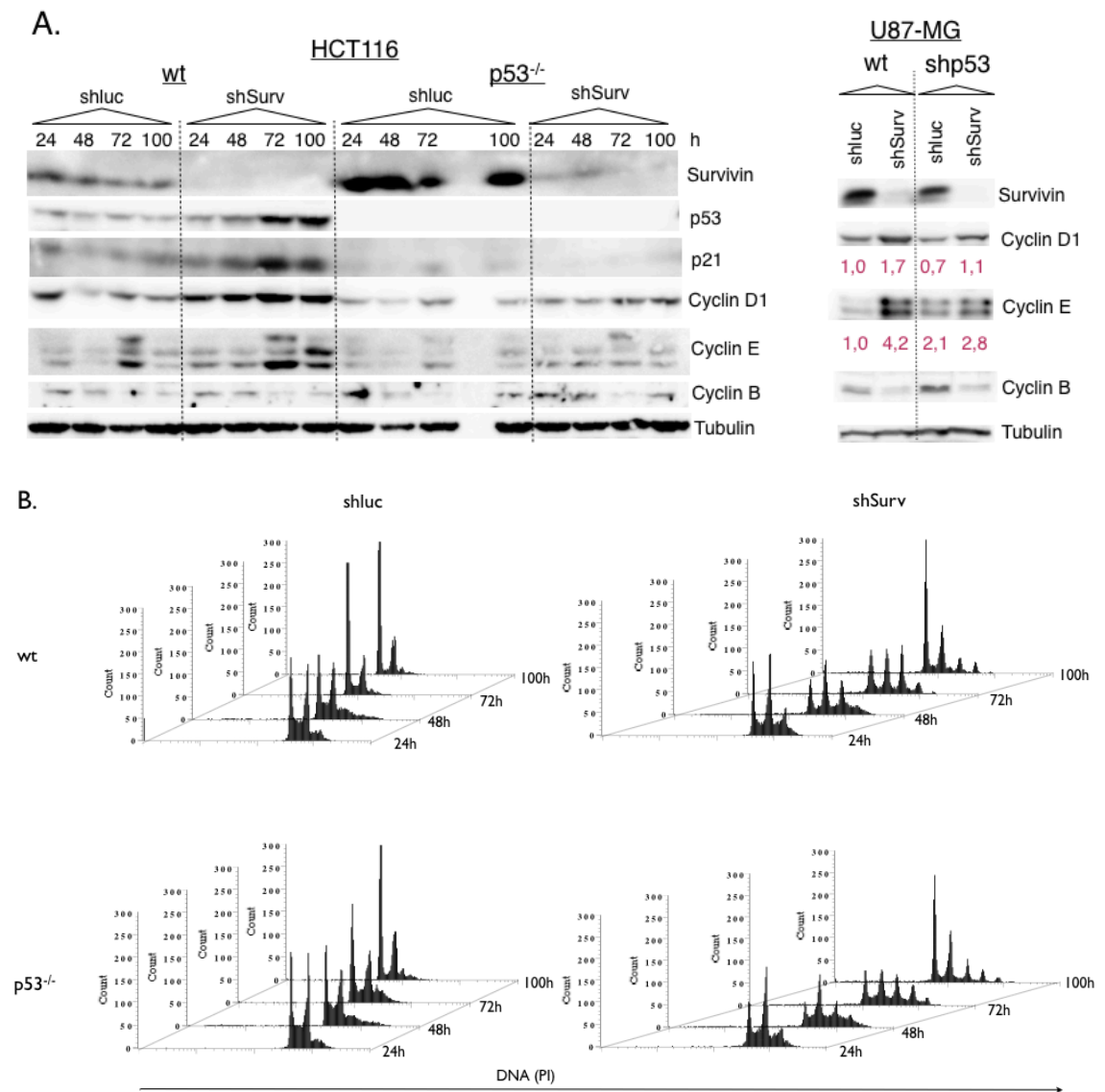


Abb. 15. Detaillierte Analyse des Survivin Verlustes in HCT 116 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten sowie U87-MG Zellen. (A) Eine Western Blot Analyse zeigt einen p53-abhängigen biochemischen G1 Arrest in den shSurv-depletieren HCT116 und U87-MG Wildtyp Zellen (72h) durch die Akkumulation von p53, p21^{waf/cip}, Cyclin D1 und E. Die p53/p21^{waf/cip} Expression der U87 Zellen ist in Abb14 A gezeigt. Die Werte repräsentieren die relative Dichte (RD) der densitometrischen Auswertung. (B) Die Akkumulation geht einher mit der Zunahme an Polyploidie bei den mit shSurv transduzierten HCT116 wt Zellen in einer FACS Analyse.

3.5 Ein Anstieg in der Expression von p21^{waf/cip} und von Cyclin D1 in p53-positiven Zellen korreliert mit dem zunehmenden Polyploidiegrad nach Survivin-RNAi

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass ein Ausschalten der Survivin-Expression mittels shRNA in p53-positiven HCT 116, MCF-7 und U87-MG-Wildtyp-Zellen zu einer Aktivierung von p53 und zu einer Expression des Cdk-

Inhibitors p21^{waf/cip} führte. Gleichzeitig akkumulierten Cyclin D1 und E, die beide die Transition von der G1-Phase in die Synthesephase einleiten, nicht aber Cyclin B, welches für einen Arrest der Zellen in G1 spricht. Es zeigte sich aber auch, dass die Akkumulation dieser Proteine assoziiert war mit der Zunahme des DNA Gehaltes nach Endoreplikation des Genoms. Unerklärlich blieb jedoch die Beobachtung, dass Wildtyp-Zellen trotz im Western Blots gezeigten G1-Arrests weiter im Zellzyklus verblieben und polyploid wurden.

Insofern stellte sich die Frage, ob die erhöhte Expression von p21^{waf/cip} und den Cyclinen D1 und E in den Wildtyp-Zellen überhaupt zu einem robusten Zellzyklusarrest führte, da die gemessenen Unterschiede in dem Anteil an polyploiden Zellen, zwischen Wildtyp- und p53-defizienten Zellen marginal waren (Abb. 15 A, B).

Um den Zusammenhang zwischen Aktivierung von p53, p21^{waf/cip}, G1-Arrest und dem zunehmenden DNA Gehalt (Polyploidie) näher zu untersuchen, mussten FACS Messungen des DNA Gehaltes mit einer gleichzeitigen immunhistochemischen Färbung etabliert werden. Dadurch konnte auf Einzelzellenebene, neben dem DNA-Gehalt bzw. Polyploidiegrad einer Zelle, eine erhöhte Expression von z.B. p21^{waf/cip} oder Cyclin D1 korreliert werden.

Des Weiteren sollte durch BrdU-Inkorporations-Experimente geklärt werden, ob Survivin-depletierte Wildtyp-Zellen trotz Aktivierung von p53 und p21^{waf/cip} weiterhin im Zellzyklus fortschreiten konnten.

Eine vergleichende Zellzyklusanalyse von HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen, die mit einer shRNA gegen Survivin transduziert wurden, zeigte lediglich im Bereich des Chromosomensatzes von 8n und >8n Unterschiede, die auf eine potentielle Beeinträchtigung der Proliferation durch p21^{waf/cip} und p53 Aktivierung schließen lassen (Abb. 16 A). So wiesen HCT 116 wt (MW \pm SD, 20,1% \pm 4,7%; n=6) Zellen mehr Zellen mit einem DNA Gehalt von 8n auf als die p53-defizienten (MW \pm SD, 16,6% \pm 4,7%; n=6), allerdings ist dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,17 (zweiseitiger Student's t-test mit unbekanntem Variablen; p<0,05) nicht signifikant (Abb. 16 B). Bei einem DNA Gehalt >8n verhält es sich genau umgekehrt. In dieser Phase befinden sich wiederum mehr p53-defiziente Zellen (MW \pm SD, 18,3% \pm 7,7%; n=6) als wt Zellen (MW \pm SD, 13,5% \pm 5,4%; n=6), aber dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,24 wiederum nicht signifikant (Abb. 16 B).

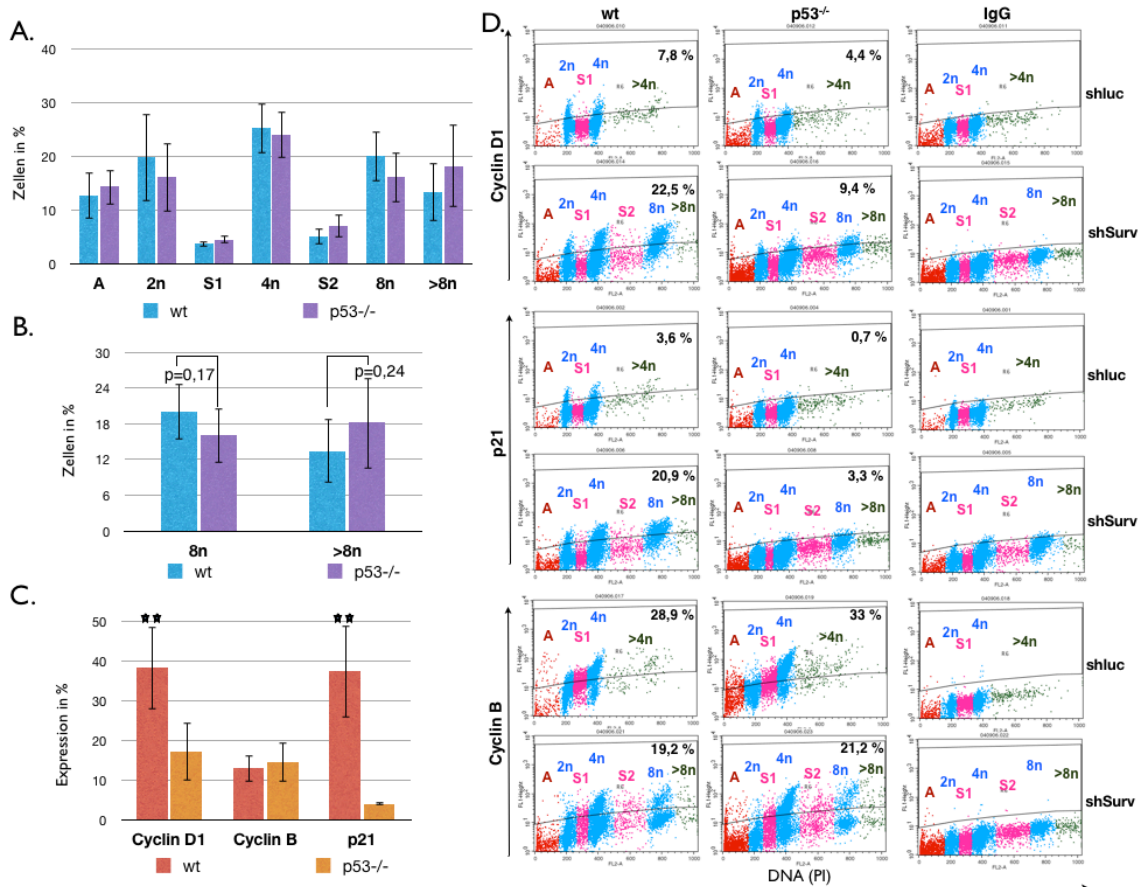


Abb. 16: DNA-FACS Analyse von HCT116 Zellen mit kombinierter $p21^{waf/cip}$, Cyclin B und Cyclin D1 Antikörperfärbung 72h nach Survivin knock down. (A) Vergleich des DNA Gehaltes von Survivin depletierten HCT116 wt und $p53^{-/-}$ Zellen. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung ($n=6$). (B) Explizite Darstellung des DNA Gehaltes für 8n und $>8n$ von HCT116 wt und $p53^{-/-}$ Zellen nach Survivin RNAi. (C) Vergleich der Expression von Cyclin D1, Cyclin B und $p21^{waf/cip}$ in Survivin depletierten HCT116 wt und $p53^{-/-}$ Zellen (Mittelwerte mit Standardabweichung; $n=5$; $**p<0,01$). (D) repräsentative Darstellung der FACS Färbungen für Cyclin D1, Cyclin B und $p21^{waf/cip}$ von HCT116 wt und $p53^{-/-}$ Zellen die mit einer shRNA gegen Survivin (shSurv) bzw. Luciferase (shLuc) transduziert wurden.

Um die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen mit den proteinbiochemischen Daten aus den Western Blots in Einklang zu bringen, wurden eine PI-Färbungen der zellulären DNA mit Antikörperfärbungen kombiniert. Die gleichzeitige Analyse des Zellzyklus und der Cyclin D1-Expression zeigte bei HCT116 wt Zellen einen Anstieg in der Fraktion von Cyclin D1-positiven Zellen von 7,8% auf 22,5% nach Survivin-Depletion. Bei den $p53$ -defizienten HCT 116 Zellen fiel dieser Anstieg von 4,4% auf 9,4% nach Survivin Verlust deutlich geringer aus (Abb. 16 D). Im direkten Vergleich von wt- und $p53^{-/-}$ -HCT116 Zellen war eine signifikant höhere Cyclin D1 Expression (zweiseitiger Student's t-test mit unbekanntem Variablen; $p<0,01$) bei den wt (MW \pm SD, 38,3% \pm 10,5%; $n=5$) Zellen gegenüber den

p53^{-/-} Zellen (MW \pm SD, 17,2% \pm 7,4%; n=5) nach Survivin knock down festzustellen (Abb. 16 C).

Ähnlich verhielt es sich bei p21^{waf/cip}. Auch hier war wieder ein Anstieg in der Fraktion von p21^{waf/cip}-positiven Zellen von 3,6 % auf 20,9 % bei den HCT 116 wt Zellen nach „Knock down“ des Survivins im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Der Anstieg der p21^{waf/cip}-positiven Zellfraktion in den p53 defizienten Zellen nach „Knock down“ des Survivins fiel mit 0,7 % auf 3,3 % deutlich geringer aus und stellt eher ein basales Level dar (Abb. 16 D).

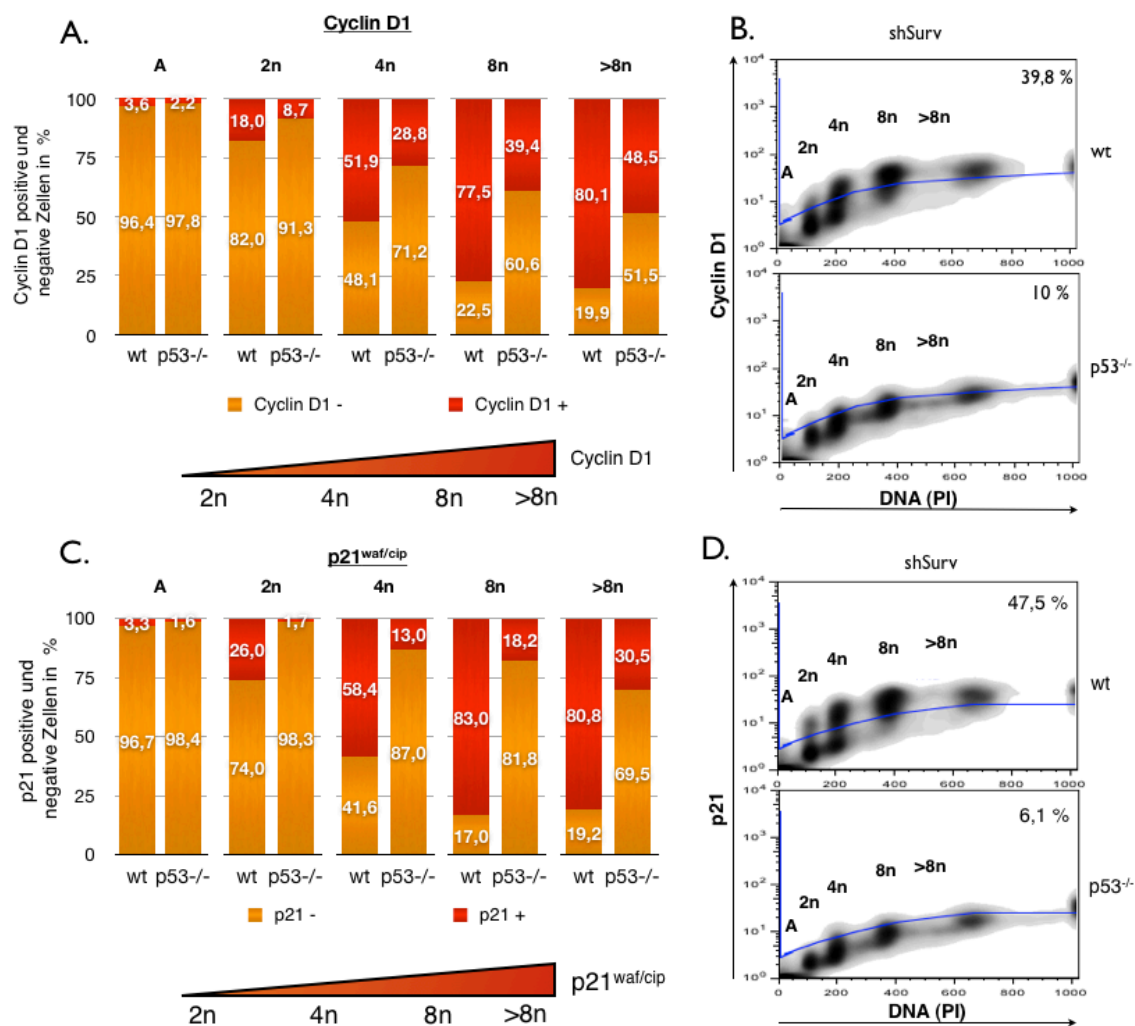


Abb. 17: Verteilung der Cyclin D1 und p21^{waf/cip} Expression in Survivin depletierten HCT116 Zellen, bezogen auf den DNA Gehalt nach 72h. (A) Prozentuale Verteilung der Cyclin D1 positiven und negativen Zellen in den einzelnen Phasen. (B) FACS Analyse einer Cyclin D1 Färbung als Density-Blots von wt und p53^{-/-} HCT116 Zellen in denen Survivin mittels shRNA ausgeschaltet wurde. (C) Prozentuale Verteilung p21^{waf/cip} positiver und negativer Zellen in den einzelnen Phasen. (D) p21^{waf/cip} Färbung als Density-Blots. Die Ergebnisse für (A) und (C) sind repräsentativ für zwei unabhängige Untersuchungen.

Der p53 Verlust in Survivin-depletierten HCT 116 Zellen (MW \pm SD, 4% \pm 0,5%; n=4) führte zu einer signifikanten Abnahme der p21^{waf/cip} Expression im Vergleich zu den wt Zellen (MW \pm SD, 37,3% \pm 11,5%; n=4)(Abb. 16 C).

Die Cyclin B Expression verringerte sich sowohl bei den Wildtyp-Zellen als auch bei den p53^{-/-}-Zellen um ca. 10 % durch den Verlust von Survivin im Vergleich zu den Luciferase Kontrollen (Abb. 16 D). Im direkten Vergleich der Survivin-depletierten Zellen spielte der p53 Status keine Rolle. Sowohl p53-positive (MW \pm SD, 13 % \pm 3,5 %; n=6) als auch p53^{-/-} (MW \pm SD, 14,4 % \pm 5,1%; n=6) HCT 116 Zellen zeigten im Mittel die gleiche Cyclin B Expression (Abb. 16 C).

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Western Blot Analysen. HCT 116 wt Zellen, in denen Survivin mittels einer shRNA ausgeschaltet wurde, zeigten einen Anstieg an p21^{waf/cip} und Cyclin D1, nicht aber Cyclin B im Vergleich zu den p53-defizienten HCT 116 Zellen.

Schaut man sich bei HCT 116 wt Zellen nach Survivin Depletion die Verteilung von Cyclin D1 und p21^{waf/cip}, bezogen auf den DNA Gehalt an, kann man feststellen, dass bei einem Chromosomensatz von 2n kaum p21^{waf/cip}/Cyclin D1 positive Zellen auftauchen, während bei 8n ein Großteil der Zellen nunmehr p21^{waf/cip}/Cyclin D1 positiv sind (Abb. 17 B, D).

Im Detail betrachtet zeigte sich für HCT 116 wt Zellen, dass bei 4n 52%, 8n 77,5% und bei >8n 80,1% Cyclin D1 positiv und damit in der G1-Phase waren. Im Vergleich dazu waren bei den p53-defizienten Zellen in 4n 28,8%, 8n 39,4% bzw. >8n 48,5% Cyclin D1 positiv (Abb. 17 A). Diese Werte waren deutlich niedriger als bei den entsprechenden Wildtyp-Zellen in den jeweiligen Phasen.

Der gleiche Effekt tritt ebenfalls für p21^{waf/cip} auf. So sind bei HCT 116 wt Zellen mit 4n 58,4%, 8n 83% und >8n 81% p21^{waf/cip} positiv, wohin gegen die Werte für die p53-defizienten Zellen wieder deutlich niedriger liegen 4n 13%, 8n 18%, >8n 30,5% (Abb. 17 C).

Zusammenfassend zeigte sich, dass p53-positive Tumorzellen, in denen Survivin mittels shRNA ausgeschaltet wurde, mit zunehmendem DNA Gehalt der CdK-Inhibitor p21^{waf/cip} exprimierten und zudem eine Akkumulation des Cyclin D1 feststellbar war.

3.6 Der Anstieg im Polyploidiegrad nach Survivin-Depletion durch RNAi bewirkt eine Hemmung der G1/S-Transition in HCT116- Wildtypzellen

Schaltet man Survivin in Tumorzellen mit funktionellem p53 aus, kommt es primär zu Mitosedefekten und der Zunahme des Polyploidiegrads, verbunden mit einer Induktion von p21^{waf/cip} und einer Akkumulation von Cyclin D1. Um nachzuweisen, dass diese Zellen tatsächlich in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren und somit nicht mehr in die DNA-Synthesephase (S-Phase) eintreten können, wurden BrdU-Inkorporationsexperimente durchgeführt (siehe 2.2.1.5.2).

Hier zeigte sich, dass p53-defiziente HCT 116 Zellen, in denen Survivin zudem mittels shRNA ausgeschaltet wurde, insgesamt mehr BrdU inkorporierten (38% vs. 23%) und häufiger in die S-Phase eintreten konnten und damit besser proliferierten als Survivin-depletierte Wildtyp-Zellen (Abb. 18 B).

Die Analyse des BrdU-Einbaus in HCT116-Zellen nach Survivin-RNAi musste aufgrund der Entwicklung des Polyploidie-Phänotyps zwangsläufig davon ausgehen, dass zwischen jeder Verdopplung des Chromosomensatzes eine S-Phase lag, in der BrdU eingebaut werden konnte. Die Auswertung des BrdU-Einbaus wurde in eine erste S-Phase (S1), zweite S-Phase (S2) und in Zellen aufgeteilt, welche einen DNA-Gehalt > 8N aufwiesen.

Ein Vergleich der Synthesephasen S1 und S2 (Abb. 18 A) zeigte bei BrdU positiven Wildtyp-Zellen nach Survivin-RNAi einen stärkeren Rückgang der DNA-Syntheserate, von 61,1% auf 34,5%, als bei den p53-defizienten Zellen (68,1% auf 55,6%). Diese Beobachtung setzte sich fort, wenn man Zellen mit Chromosomensätzen von 4n mit 8n vergleicht (Abb. 18 A). Hier zeigte sich, dass bei Wildtyp-Zellen die BrdU positiven Zellen mit 25% auf 11,6 % stark abnahmen, wohin gegen die Werte für die p53-defizienten Zellen nahezu unverändert blieben (31% zu 28,4%). Zwischen 2n und 4n war kaum ein Unterschied in der BrdU Inkorporation zwischen Survivin-depletierten Wildtyp und p53^{-/-} Zellen zu erkennen. Erst mit zunehmendem DNA Gehalt und Polyploidiegrad kam es in Zellen mit funktionsfähigen p53 zu einer Abnahme an BrdU-positiven Zellen und gleichzeitig zu einer Hemmung der G1/S-Transition des Zellzyklus (Abb. 18 C).

Diese Ergebnisse belegen, dass die verstärkte Expression des CdK-Inhibitors p21^{waf/cip} in polyploiden Zellen von HCT 116 wt Zellen mit „Knock down“ des Survivins zu einer Verlangsamung der Zellproliferation führen.

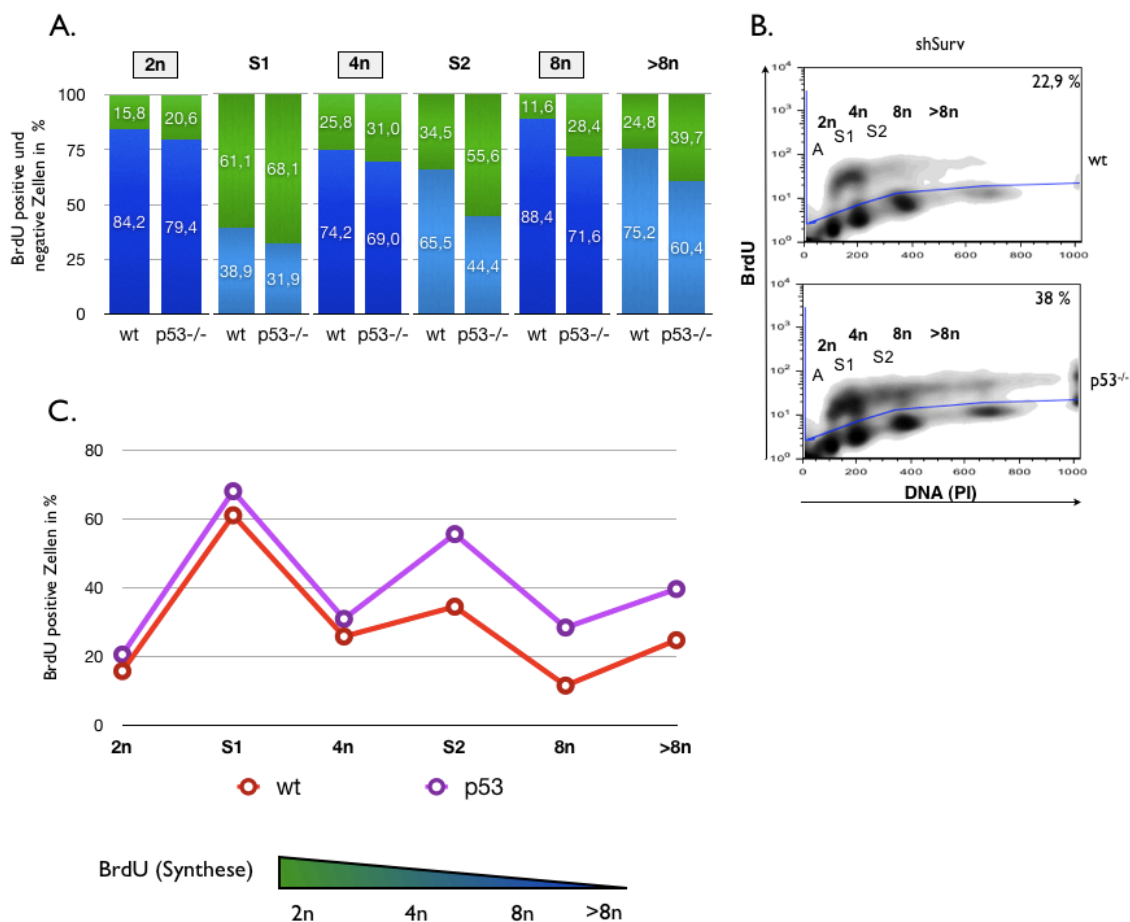


Abb. 18: FACS Analyse der BrdU Inkorporation in Survivin depletierten HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen nach 72h. (A) Prozentuale Verteilung der BrdU positiven (BrdU+) und negativen Zellen (BrdU-) bezogen auf den DNA Gehalt. (B) Density-Blots der BrdU Färbung von Survivin-depletierten HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen. (C) Vergleich der BrdU positiven Zellen zwischen Survivin-depletierten HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen. Mit zunehmenden DNA Gehalt bauen Wildtyp Zellen weniger BrdU ein. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

3.6 Der „Knock down“ des Survivins resultiert in einem Caspase 3-unabhängigen Anstieg an toten Zellen

In den FACS Analysen konnte nach Survivin Depletion in allen drei getesteten Zelllinien ein Anstieg an Zellen mit hyploidiplen DNA-Gehalt (< 2n) festgestellt werden (Abb. 19 A). Diese Fraktion konnte aus toten bzw. apoptotischen Zellen bestehen.

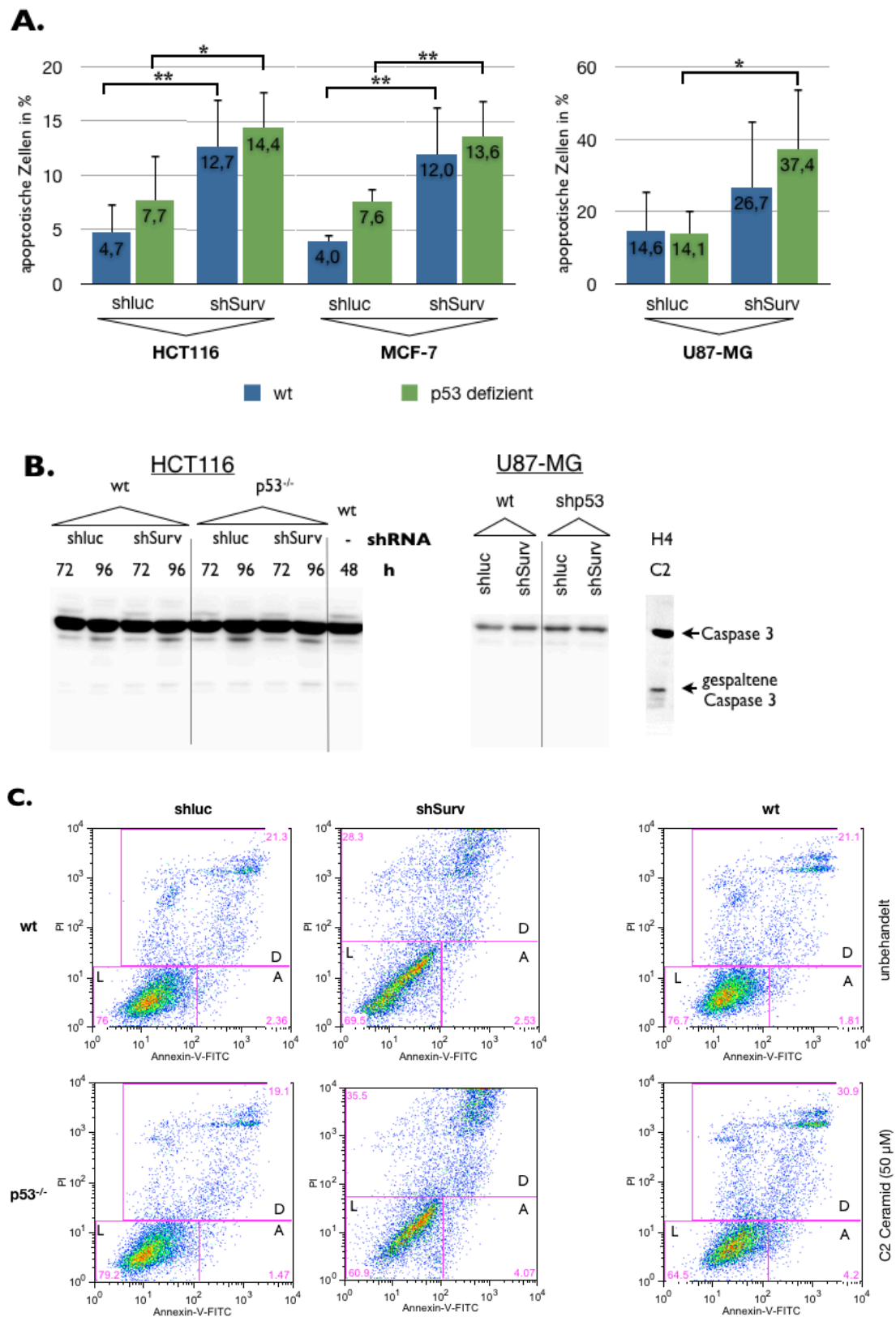


Abb. 19: RNAi vermittelter Survivin Verlust führt zu einer Zunahme an apoptotischen und toten Zellen. (A) Vergleich der <math><2n</math> Fraktion, 72 h nach Survivin Depletion in HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen (zweiseitiger Student's t-test mit unbekanntem Variablen, Mittelwerte mit Standardabweichung; HCT116 shLuc, n=5; HCT116 shSurv, n=6; MCF-7, n=3; U87-MG, n=5; **p<0,01; *p<0,05). (B) Caspase 3 Westernblot von mit pRVH-N-Puro-shLuc/shSurv transduzierten HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie U87-MG

Zellen nach 72h. Der Antikörper erkennt ungespaltene und gespaltene Caspase 3. Die Positivkontrolle für diesen Antikörper Nachweis sind die Glioblastomzellen H4, die mit 50 μ M C2 Ceramid behandelt wurden. (C) Annexin-V-FITC Färbung von HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen, in denen Survivin bzw. Luciferase mittels shRNA ausgeschaltet wurde. Als Positivkontrolle dienten mit C2 Ceramid (50 μ M, 24h) behandelte HCT116 wt Zellen. Die Zellen wurden transduziert und für 72h kultiviert. Dabei erfolgte nach der Puromycin Selektion nach 48h ein MW mit frischem Medium (A: Apoptose; D: tote Zellen; L: lebende Zellen)

So führte die Survivin-RNAi sowohl in HCT116 wt (MW \pm SD, 12,7% \pm 4,4%; n=6) als auch HCT116 p53^{-/-} Zellen (MW \pm SD, 14,4% \pm 3,3%; n=6) zu einem signifikantem Anstieg an offensichtlich toten Zellen mit einem DNA Gehalt $< 2n$ im Vergleich zu den jeweiligen shluc-transduzierten Kontrollen (wt shluc: MW \pm SD, 4,7% \pm 2,6%; n=5; p53^{-/-} shluc: MW \pm SD, 7,7% \pm 4,2%; n=5). Das Gleiche galt auch für die Caspase 3-defizienten MCF-7 Zellen. Auch hier führte die Transduktion eines retroviralen Vektors mit einer shRNA gegen Survivin in MCF-7 wt (MW \pm SD, 12,5% \pm 1,5%; n=3) und shp53 Zellen (MW \pm SD, 13,6% \pm 1,5%; n=3) zu einem signifikanten Anstieg an toten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (wt shluc: MW \pm SD, 4,7% \pm 2,6%; n=3; shp53 shluc: MW \pm SD, 7,7% \pm 4,2%; n=3). In der Glioblastomzelllinie U87-MG resultierte die RNAi vermittelte Survivin Depletion ebenfalls zu einem Anstieg toter Zellen im Vergleich zur shluc-Kontrolle (MW \pm SD; wt shluc: 14,6% \pm 11%; shp53 shluc: 14,1% \pm 6,4%; wt shSurv: 26,7% \pm 18,6; shp53 shSurv: 37,4% \pm 16,8)(Abb. 19 A).

Um die Art des Zelltodes der hypodiploiden Zellen näher zu bestimmen, wurde eine Annexin-V-Färbung in Kombination mit einer Propidiumiodidfärbung (siehe 2.2.1.5.4) durchgeführt (Abb. 19 C). HCT116-Wildtyp-Zellen als auch HCT116-Zellen mit „Knock out“ des p53 wurden mit shSurv bzw. shluc-Vektoren transduziert und nach 72h mit Annexin-V-FITC gefärbt.

Auch hier zeigte sich ein Anstieg an toten Zellen nach Survivin-RNAi im Vergleich zur shluc-Kontrolle als auch zu unbehandelten HCT116-Wildtyp-Zellen. So stieg der Anteil an toten Wildtyp-Zellen (Gate D+A) insgesamt um ca. 7% von 23,7% (shluc) auf 30,8% (shSurv). Dabei blieb der Anteil der apoptotischen Zellen (Gate A), die Annexin-V positiv und PI positiv sind, nahezu gleich (2,4% vs. 2,5%). Bei den p53-defizienten Zellen stieg der Anteil an toten Zellen (Gate D+A) insgesamt um 19% von 20,6% (shluc) auf 39,6 (shSurv) und der Anteil von apoptotischen Zellen (Gate A) von 1,5% (shluc) auf 4% (shSurv).

Ein direkter Vergleich der Survivin-depletierten Zellen zeigte einen Anstieg an toten Zellen in den p53-defizienten Zellen (39,6%) gegenüber dem wt (30,8%). Diese Ergebnisse bestätigten die Daten der SubG1-Analyse und zeigten, dass der Verlust des Survivins zu einer höheren zellulären Letalität führte. Interessanterweise zeigten zum Zeitpunkt zwischen 48h und 72 nach Survivin-RNAi nur 2,5% (wt shSurv) und 4,1% (p53^{-/-} shSurv) Zeichen der Apoptose (Gate A). Im Gegensatz dazu war hier der überwiegende Teil der toten Zellen sowohl positiv für Annexin-V-FITC als auch für Propidiumiodid (Gate D), was auf andere Formen des Zelltodes wie Nekrose oder eine „Mitotische Katastrophe“ hindeutet. Dafür spricht auch, dass die Apoptose der Survivin-depletierten Zellen Caspase 3-unabhängig erfolgte. Das zeigt zum einen die erhöhte Anzahl von toten Caspase 3-defizienten MCF7-Zellen nach Survivin-RNAi (Jänicke et al. 1998)(Abb. 19 A) und zum anderen konnte man in HCT116 als auch U87-MG Zellen, die mit pRVH-N-Puro-shSurv bzw mit dem shluc-Kontrollkonstrukt transduziert wurden, keine vermehrte Menge an gespaltener Caspase 3 in Relation zur Gesamt-Caspase 3-Menge in der Western Blot-Analyse feststellen (Abb. 19 B).

3.7 Der Survivin-„Knock down“ führt in Tumorzellen zur Endoreplikation des Genoms und multipolaren Spindeln

Es wurde schon mehrfach von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine Hemmung des Survivins oder eines seiner Partnerproteine im „Chromosomalen Passenger Complex“ in einer unvollständigen Zytokinese resultiert. Letztendlich können sich die Tochterzellen nicht vollständig abschnüren und die nun tetraploide Zelle tritt in die nächste G1-Phase ein. Da während der Mitose bzw. Metaphase/Anaphase-Transition auch bei polyploiden Zellen der Spindel Checkpoint übergangen werden kann, kommt es zu einer fortlaufenden Endoreplikation der genomischen DNA der Zelle (Beltrami et al. 2004; Jun Chen 2000).

Survivin-depletierte, polyploide Zellen zeigen Ansätze einer Mitose. Das Chromatin kondensiert während der Prophase und die Chromosomen versuchen sich in der Metaphase entlang der Äquatorialebene anzuordnen. Allerdings kommt es dabei bei 8n Zellen zu einer propellerförmigen Anordnung der Chromosomen.

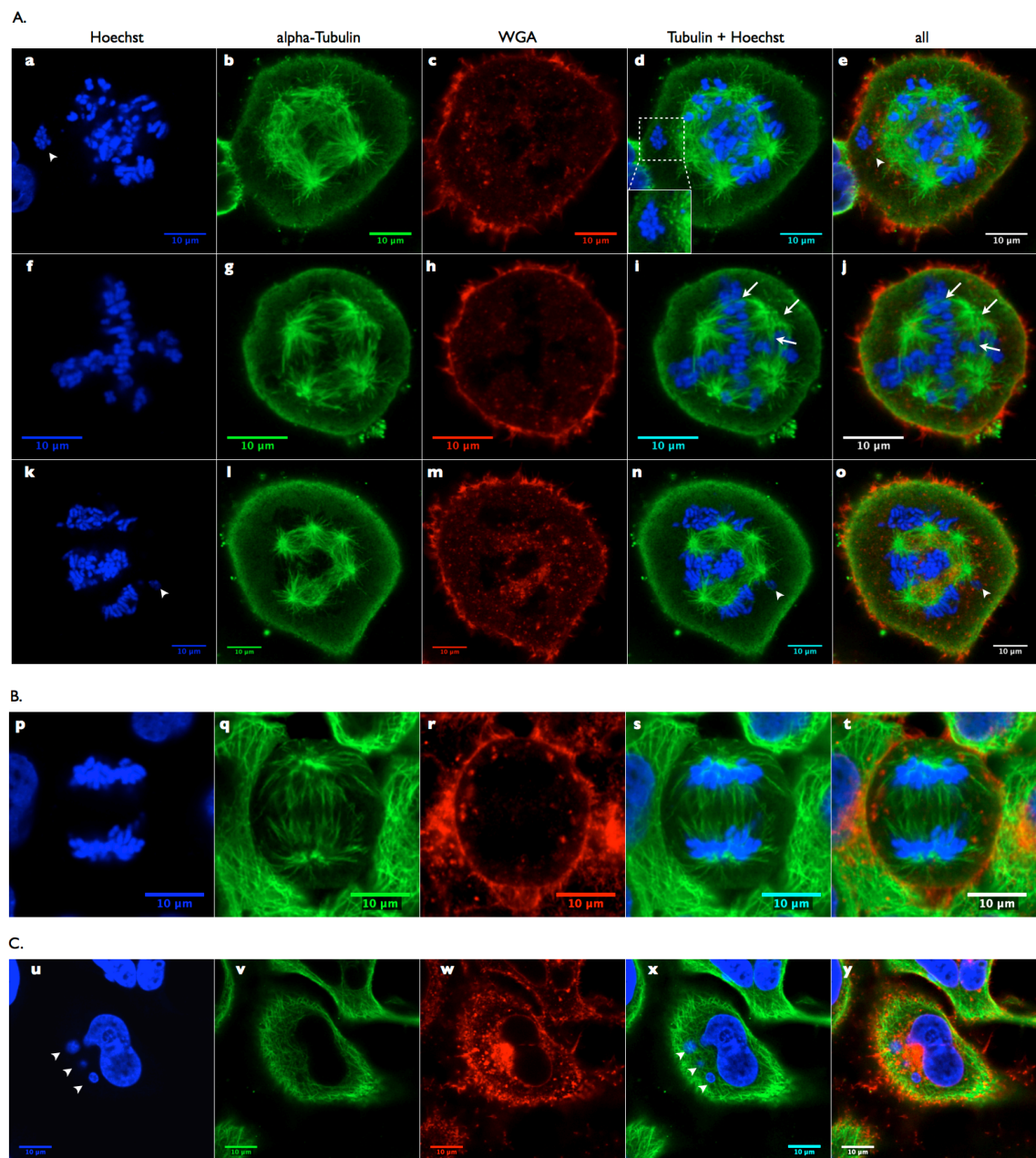


Abb. 20: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von einer alpha-Tubulin Färbung zeigen, dass der Verlust von Survivin in MCF-7 Zellen zu einer Bildung von multipolaren Spindeln während der Mitose führt. (A) Polyploide MCF-7 wt Zellen mit unterschiedlichen DNA Gehalt, in den Survivin mittels shRNA ausgeschaltet wurde. 8n Karyotyp (f-j) mit propellerförmiger Anordnung der Chromosomen. Mikrotubuli eines Centrosoms ziehen jeweils zu den senkrecht als auch zu den waagrecht angeordneten Chromosomen (Pfeile i,j). Zellen mit einem DNA Gehalt von ca. 16n mit multipolaren Spindeln. Im z-Stack waren jeweils acht Centrosomen zu erkennen (a-e; k-o). Dabei traten häufig Chromosomen auf, die keine Verbindung zu den Mikrotubuli hatten (Pfeilkopf, a,d,e bzw. k,n,o). (B) späte Anaphase einer mit shLuc transduzierten Zelle zeigt eine normale bipolare Mitose. (C) Survivin depletierte MCF-7 wt Zelle in der Interphase. Polymorpher großer Zellkern mit drei Mikronuklei im Cytosol (Pfeilkopf, u,x)

Die Äquatorialebenen liegen in einem Winkel von 90°C zueinander. Bedingt wird diese Ausrichtung durch die Verdopplung der Centrosomen auf vier und

die damit verbundene zweite Teilungsebene. Von den Centrosomen aus ziehen Mikrotubuli jeweils zu Chromosomen aus der senkrechten und der waagerechten Äquatorialebene (Abb. 20 A, f-j). Bei einem DNA-Gehalt von $16n$ haben sich schon acht Centrosomen mit multipolaren Spindeln gebildet. (Abb. 20 A, a-e; k-o).

Multipolare Spindeln in polyploiden Zellen können zur Ausbildung von syntelischen und merotelischen Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen (Ganem et al. 2009) und damit zu DNA Schäden, „lagging Chromosoms“ und anderen chromosomalen Abberationen führen (Guerrero, Gamero, et al. 2010a).

Häufig fanden sich auch Chromosomen bzw. DNA Fragmente in Survivin-depletierten polyploiden Zellen in der Metaphase, die keine Verbindung zum Spindelapparat aufwiesen und meist am Rand der Zelle auftraten (Abb. 20 A, a, d, e, k, n, o). Das gleiche zeigte sich auch bei Zellen in der Interphase, die meist einen polymorphen polyploiden Zellkern aufwiesen und im Zytoplasma zusätzliche isoliert-liegende Mikronuklei enthielten (Abb. 20 C).

Im Vergleich zu den Survivin-depletierten, polyploiden MCF-7 wt Zellen zeigen die mit der shRNA gegen Luciferase transduzierten MCF-7 Zellen eine normale bipolare Mitose (Abb. 20 B).

3.8 Der „Knock down“ des Survivins führt zu einer posttranslationalen Modifikation von p53 in Form einer Phosphorylierungen an S15

Die Regulation von p53 erfolgt über posttranslationale Modifikationen. Heute sind ca. 50 Stellen des Proteins beschrieben, die phosphoryliert, acetyliert, methyliert, ubiquitinyliert und glykosyliert werden, wobei die Funktion der Modifikation und die dazugehörigen Signalwege noch immer nicht endgültig geklärt sind (Meek & Anderson 2009).

Um Kandidaten zu identifizieren, die nach Survivin-Depletion p53 posttranslational modifizieren und aktivieren, wurden Zelllysate von HCT 116 wt und p53^{-/-} nach Survivin-RNAi (shSurv) mittels eines Phosphokinase-Proteomprofiler (siehe 2.1.11) untersucht und mit Kontrollzelllysaten (shluc) verglichen (Abb. 21). Auf diesem Proteomprofiler befanden sich „Capture“-Antikörper gegen 46 Phosphorylierungsstellen verschiedenster Kinasen.

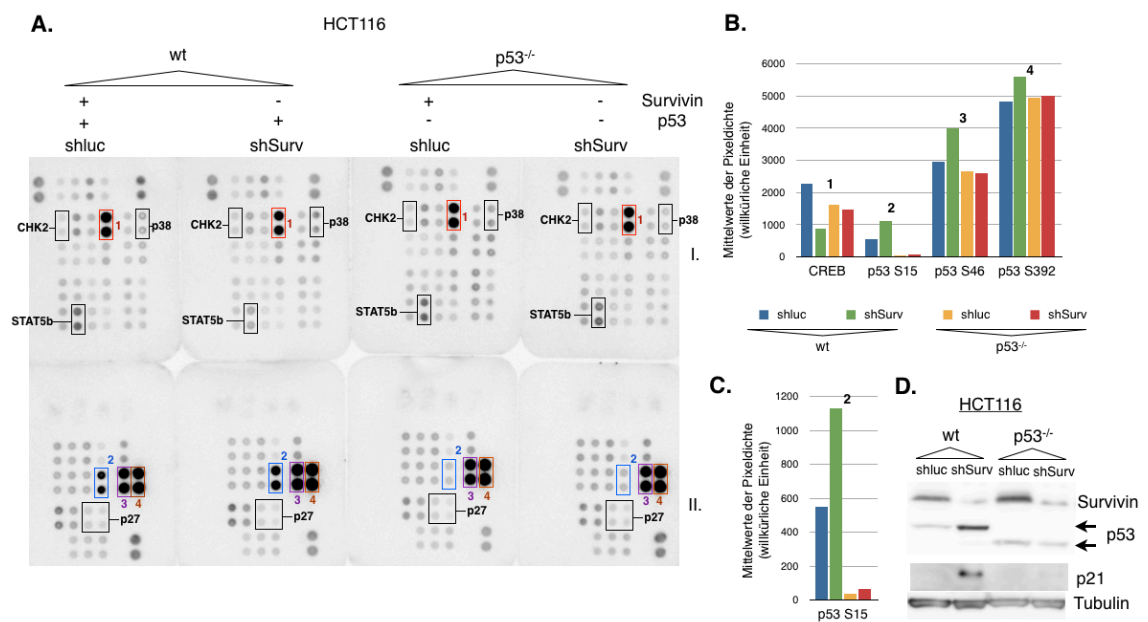


Abb. 21. Proteomprofiler Analyse von HCT116 Zellen nach Survivin Depletion. (A) Jeweils zwei Membranen (I. und II.) eines Phospho-Kinase Proteomprofilers mit Zelllysaten von HCT 116 wt und p53^{-/-} Zellen, in denen Survivin bzw. Luciferase mittels shRNA ausgeschaltet wurde. Pro Ansatz können 46 Phosphorylierungsstellen von Kinasen überprüft werden. Sehr starke Signale für CREB S133 (1), p53 S15 (2); p53 S46 (3) p53 S392 (4). Schwarze Boxen zeigen Phosphorylierungsstellen von Proteine für Zellzyklusregulation (p27 T157, T198) und p53 Aktivierung (p38 T180/Y182; CHK2 T68), bei denen keine Unterschiede in der Expression vorhanden waren. (B) Densitometrische Auswertung der unterschiedlichen Expressionsniveaus von CREB, p53 S15, p53 S46, p53 S392. (C) Explizite Darstellung von p53 S15 mit veränderter Skalierung. (D) Western Blot Analyse und Nachweis der angegebenen Proteine von den HCT116 Zelllysaten, die für den Proteomprofiler eingesetzt wurden. Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche (CREB: cAMP responsive Element-binding Protein; S: Serin)

Die höchste Signalaktivität zeigte sich bei den Phosphorylierungsstellen von p53 und CREB. Nach der densitometrische Auswertung (Abb. 21 B) dieser zwei Moleküle gab es die größten Unterschiede zwischen HCT116 wt Zellen nach Survivin „knock down“. In den p53^{-/-} Zellen blieb das Expressionsniveau von beiden gleich. So ist in HCT116 wt Zellen, in denen Survivin mittels shRNA ausgeschaltet wurde, die Phosphorylierung an CREB S133 (MW 870) niedriger als in der Luciferase Kontrolle (MW 2273). CREB (cAMP response element-binding protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der auf DNA Ebene an einem 8-Basenpaarmotiv, dem „cAMP response element“, binden kann und der bei Neuronen eine wichtige Rolle für Entwicklung und Überleben spielt (Lonze & Ginty 2002). Für seine transkriptionelle Aktivität ist die Phosphorylierung an Serin 133 (S133) durch PKA und PKC nach verschiedenen Stimuli wie UV Licht, cAMP und Ca²⁺ notwendig (Johannessen & Moens 2007).

Für p53 führt der „knock down“ von Survivin in Wildtyp Zellen zu einer stärkeren Phosphorylierung an Serin 15 (S15), Serin 46 (S46) und Serin (S392). Dabei ist bei p53 S15 der desitometrisch ermittelte Wert für shSurv (MW 1127) doppelt so hoch wie für shluc (MW 549) (Abb. 21 C). Die Phosphorylierung an p53 S15 erfolgt meist nach DNA Schäden durch ATM, ATR und DNA-PK (Banin et al. 1998; Tibbetts et al. 1999; Lees-Miller et al. 1992) und geht einher mit einer Stabilisierung und Resistenz gegenüber Mdm2 (Meek & Anderson 2009).

p53-defiziente HCT116 Zellen haben einen Bereich des Exon 2 des TP53 Gens, welches in der Transaktivierungsdomäne von p53 liegt, eine Deletion und zeigen dadurch kein Signal im entsprechenden Dot des Proteome-Profilers (Bunz et al. 1998).

Einen leichten Anstieg an Phosphorylierung nach Survivin Depletion ist auch für p53 S46 (MW shSurv: 3991; MW shluc: 2966) und p53 S392 (MW shSurv: 5590; MW shluc: 4834) zu verzeichnen (Abb. 21 B). Die Phosphorylierung an p53 S46 erfolgt unter anderem durch p38 (Bulavin et al. 1999) und DYRK2 und ist wichtig für die p53-abhängige Induktion proapoptotischer Gene (Taira et al. 2007).

Im Vergleich zum Proteomprofiler zeigten die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit den Zelllysaten, die für den Proteomprofiler eingesetzt wurden nur in den Survivin depletierten HCT116 wt Zellen eine Akkumulierung des p53 Proteins (Abb. 21 D). Dagegen war das p53-Expressionslevel der wt shluc Zellen sowie der p53-defizienten Zellen (shluc und shSurv), die wie oben beschrieben ein mutiertes, nicht funktionelles p53 Protein besitzen, auf einem Niveau.

STAT5B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Cytokine IL2, IL4 und Wachstumshormone an Y699 phosphoryliert und aktiviert wird. HCT116 wt shSurv Zellen wiesen dabei eine niedrigere Expression (MW 81) als die Wildtyp shluc Kontrollzellen (MW 297) auf (Abb. 21 A). Die Werte bei den p53-defizienten HCT116 waren dagegen auf einem Niveau (shluc, MW 196; shSurv, MW 201), unabhängig davon, welche shRNA die Zellen transduziert bekamen.

Diese Ergebnisse bestätigen anhand der Phosphorylierung an Serin 15, 46, und 392 die zuvor im Westernblot festgestellte Aktivierung und Stabilisierung von p53. Dabei ist insbesondere die Phosphorylierung des p53 am Serin15 von Interesse. Nach der Induktion von DNA-Schäden durch Strahlung oder DNA-

interkalierende Substanzen kommt es zu Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüchen der DNA und damit zur Stabilisierung von p53. Dies geht einher mit einer Phosphorylierung an Serin 15 durch ATM, ATR und DNA-PK.

3.9 Der „Knock down“ des Survivins führt in HCT116, MCF-7 und U87-MG Wildtyp-Zellen als auch isogenetischen Zellen mit Verlust von p53 zu DNA Schäden und zu einer Aktivierung von DNA Reparatur-Mechanismen

Um festzustellen, ob der Verlust des Survivins zu polyploiden Zellen und zusätzlich zu DNA Schäden führt, wurden HCT116, MCF-7 und U87-MG Wildtyp-Zellen und isogenetischen Zellen mit „Knock out“ (HCT116) oder „Knock down“ (MCF7, U87-MG) des p53, wiederum mit einer shRNA gegen Survivin bzw. Luciferase transduziert und nachfolgend auf Marker für DNA-Schäden mittels Western Blot, FACS sowie indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

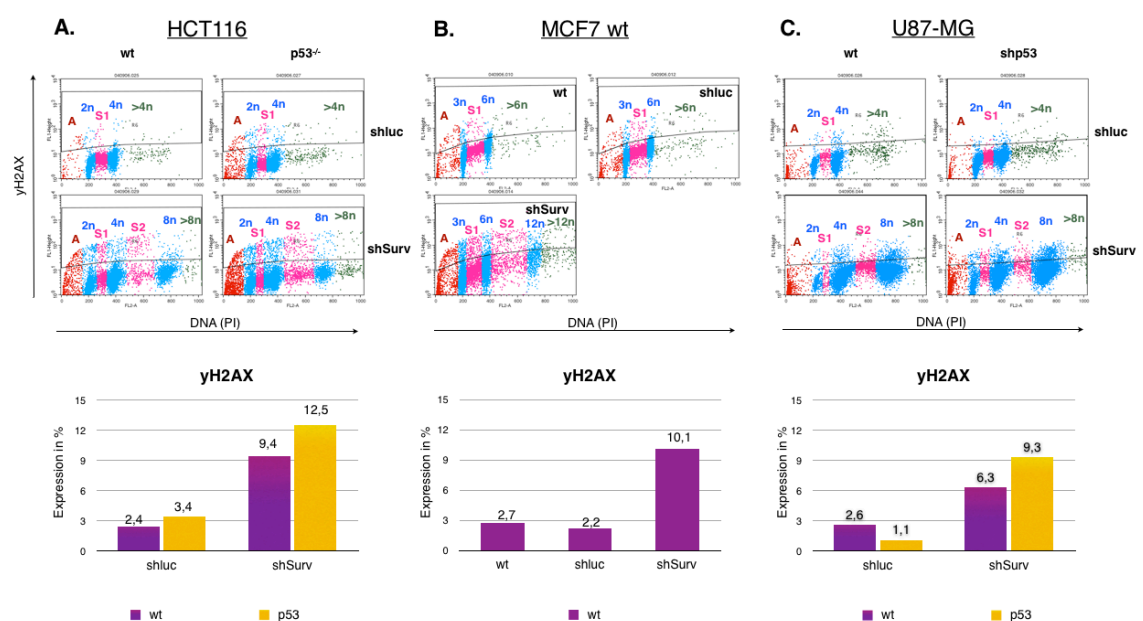


Abb 22: FACS-Analyse der Serin 139 Phosphorylierung am Histon H2AX (γ H2AX) 72h nach Survivin Knockdown mittels shRNA in (A) HCT116, (B) MCF-7 und (C) U87-MG Zellen. Die Diagramme zeigen die durch die Messung ermittelten Werte der γ H2AX Expression. Diese Daten sind repräsentativ für je zwei unabhängige Versuche pro Zelllinie.

Dabei zeigte sich in FACS-Analysen, dass in Survivin-depletierten Zellen ein Anstieg an γ H2AX zu verzeichnen war (Abb. 22). Das Histon H2AX wird nach DNA Schäden durch die Sensorinasen ATM, ATR und DNA-PK am Serin 139

phosphoryliert. Phosphoryliertes H2AX an S139 wird im Allgemeinen und in dieser Arbeit als γ H2AX bezeichnet (Kinner et al. 2008).

So beobachtete man bei HCT116 Wildtyp-Zellen (Abb. 22 A) nach „Knock down“ des Survivins eine signifikant größere Fraktion (9,4%) an γ H2AX-positiven Zellen als in den entsprechenden shLuc-Kontrollen (2,4%). Ein beinahe identisches Bild ergibt sich bei den Ergebnissen mit HCT116-p53^{-/-}-Zellen: Hier bewegt sich der Anteil an γ H2AX-positiven Zellen nach Survivin-RNAi bei 12,5% und liegt auch hier damit deutlich höher als in den shLuc-Kontrollen (3,4%). Ähnlich verhält sich die γ H2AX Expression nach Survivin Verlust bei MCF-7 Zellen. Auch hier resultiert der „Knock down“ des Survivins in einem höheren Anteil an γ H2AX-positiven Zellen (10,1%), im Vergleich zu den shLuc-Kontrollen (2,7%)(Abb. 22 B).

Auch bei U87-MG Wildtyp- und U87-MG shp53 Zellen sieht man nach Survivin Verlust eine größere Fraktion γ H2AX-positiven Zellen (Wildtyp: 6,3%; shp53: 9,3%) im Vergleich zu den shLuc-Kontrollen (Wildtyp: 2,8%; shp53: 1,1%) .(Abb. 22 C)

Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von Survivin-depletierten MCF-7 und U87-MG Zellen zeigten, dass γ H2AX Foci fast ausschließlich in Zellen mit polyploiden Zellkernen auftauchten. Im Vergleich dazu konnte in Zellen nach Transduktion der shLuc-Kontroll shRNA keine γ H2AX Färbung detektiert werden (Abb. 23 A,B,C,D). Des Weiteren waren die γ H2AX Foci von MCF-7 wt shSurv Zellen größer und hatten eine stärkere Signalintensität als die Foci, die durch DNA-Schäden nach Zeocin (500 μ g/ml, 2h) Behandlung in MCF-7 wt shLuc Zellen induziert wurden (Abb. 23 F).

Mit Zeocin behandelte Zellen zeigten zudem eine quantitativ höhere Anzahl an γ H2AX Foci pro Zelle, die auch unregelmäßig verteilt waren.

Im Gegensatz dazu konnte man in Survivin-depletierten Zellen nach Ausprägung des Polyploidie-Phänotyps immer nur vereinzelte, dafür aber wie schon erwähnt, größere γ H2AX Foci detektieren.

Eine Phosphorylierung von H2AX an Ser139 ist auch bei apoptotischen Zellen beschrieben, allerdings treten dabei keine distinkten fokalen Spots wie bei den Zeocin-behandelten bzw. Survivin-depletierten Zellen auf. Apoptotische Zellen zeigen zu Beginn in den peripheren Bereichen des Zellkerns einen γ H2AX

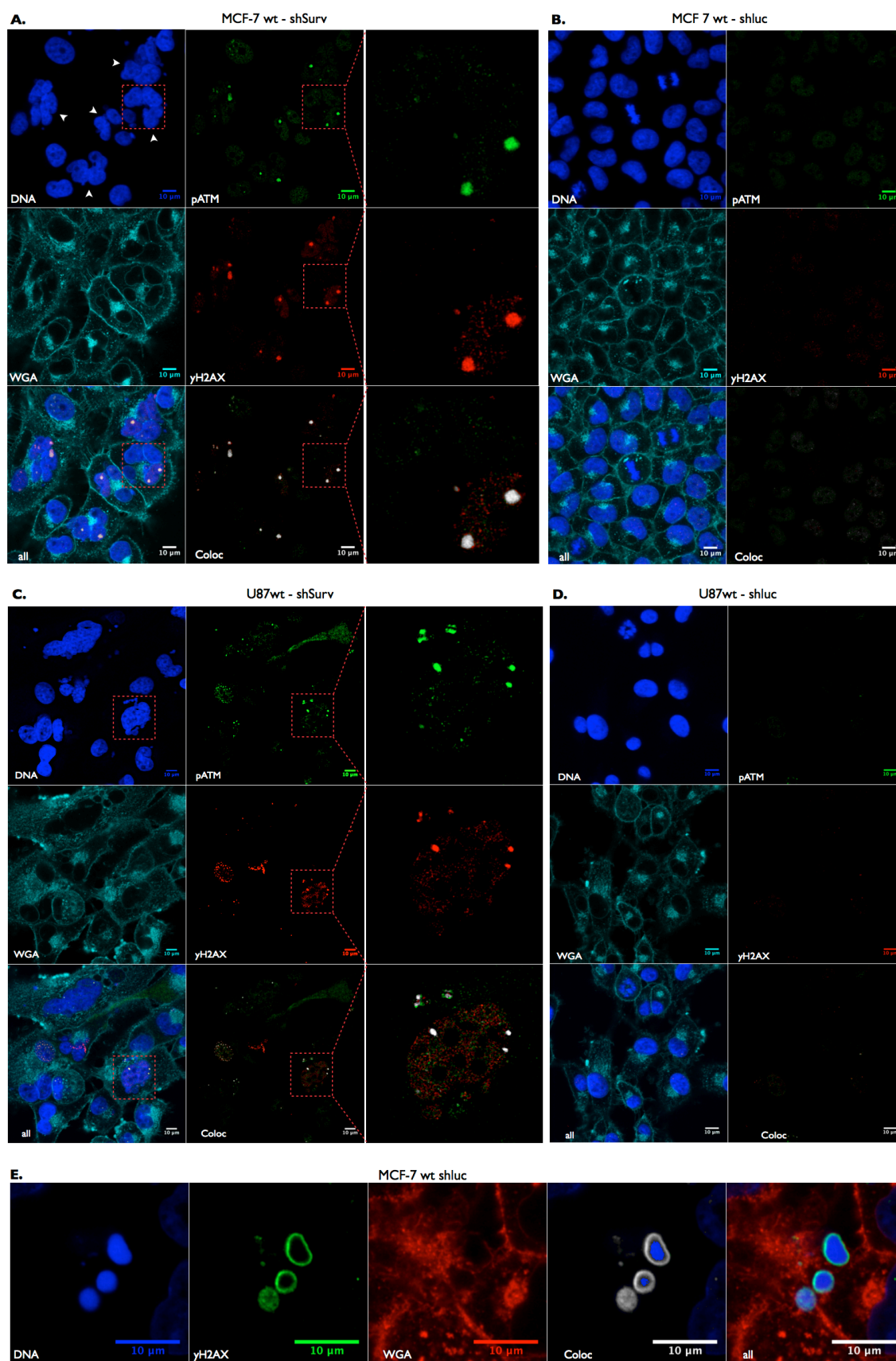
Ring, der dann in späteren Stadien den Zellkern vollständig ausfüllt (Solier et al. 2009) (Abb. 23 E). D.h. die in der Immunfluoreszenz detektierten γ H2AX-Signale nach „Knock down“ des Survivins sind unabhängig von einer Apoptose Induktion und eher mit denen zu vergleichen, die durch DNA schädigende Substanzen induziert wurden.

Die gleichzeitige Färbung der Zellen mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen ATM Serin 1981 (pATM) zeigte, dass in den γ H2AX-Foci Survivin-depletierter Zellen ebenfalls aktiviertes ATM vorzufinden war. Eine Überprüfung der Spots für γ H2AX und pATM mit dem Plugin „Colocalization Analysis“ in der Software Fiji bestätigte, dass die beiden Spots kolokalisiert vorlagen. Das gleiche Resultat ergab sich sowohl bei MCF-7 als auch bei U87-MG Zellen zu (Abb. 23 A, C). Wie erwartet wurden in shLuc-transduzierten MCF-7 Zellen bzw. U87-MG Zellen, welche auch keinen Polyploidie-Phänotyp entwickelten, keine Phosphorylierung von ATM detektiert (Abb 23 B, D)

In nachfolgenden Immunfluoreszenzanalysen konnte das Vorhandensein weiterer Kandidaten der DDR und ihrer Signaltransduktion festgestellt werden. Dabei fand sich eine Phosphorylierung an Threonin 68 von CHK2 (pCHK2) in Survivin-depletierten MCF-7 Wildtyp-Zellen. Eine Phosphorylierung an T68 erfolgt durch ATM nach DNA Schäden und führt zu einer Aktivierung von CHK2 (Ahn et al. 2000). Die Foci für pCHK2 sind mit den Foci von γ H2AX ebenfalls kolokalisiert. Im Vergleich dazu trat in MCF-7 wt Zellen, die mit der shRNA gegen Luciferase transduziert wurden, kein γ H2AX bzw. pCHK2 Signal auf (Abb. 24 A, B).

Eine weitere Kinase, die nach Doppelstrangbrüchen durch Phosphorylierung an Threonin 2609 aktiviert wird, ist die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Die Phosphorylierung an T2609 kann dabei durch Autophosphorylierung (Douglas et al. 2002) oder durch ATM (Chen et al. 2007) erfolgen.

Der „Knock down“ von Survivin mittels shRNA führte zu polyploiden MCF-7 wt Zellen mit einem Auftreten von phosphorylierten (aktiviertem) ATM (S1981) und gleichzeitig zu einer phosphorylierten DNA-PK. Beide Signale zeigten kolokalisierte distinkte Foci (Abb. 24 C). Auf der anderen Seite waren in den MCF-7 shLuc Kontrollzellen weder aktiviertes ATM noch aktivierte DNA-PK detektierbar (Abb. 24 D).



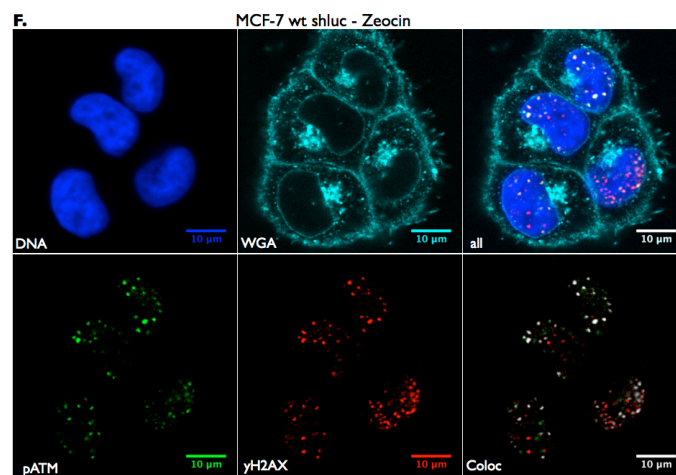


Abb. 23: Indirekte Immunfluoreszeanalyse zeigt eine Kolokalisation von γ H2AX und pATM (Serin 1981) in polyploiden Zellen, 72h nach einer Survivin Depletion mittels shRNA. MCF-7 wt Zellen, die mit einer shRNA gegen (A) Survivin (Pfeile zeigen polyploide Zellekerne) bzw. (B) Luciferase transduziert wurden. (C) Survivin depletierte U87-MG wt Zellen. (D) Mit shluc transduzierte U87-MG Zellen. (E) γ H2AX Färbung einer apoptotischen MCF-7 wt Zelle, die mit shluc transduziert wurde. (F) Mit Zeocin (500 μ g/ml; 2h) behandelte MCF-7 wt shluc Zellen zeigen ebenfalls eine Kolokalisation von pATM und γ H2AX. Kolokalisationsanalysen (Coloc) wurden mit dem Plugin „Colocalization“ von Fiji durchgeführt. (Maßstabsbalken 10 μ m)

Es konnte somit für drei unterschiedliche Zelllinien sowie ihre p53-defizienten isogenetisch-identischen Zellen gezeigt werden, dass der shRNA-vermittelte Verlust von Survivin zu einer Akkumulation von γ H2AX in ganz distinkten Foci von polyploiden Zellen führt. Gleichzeitig zeigten diese Bereiche Signale für die Kinasen ATM, DNA-PK und CHK2, die nach DNA Schäden, speziell nach Doppelstrangbrüchen, aktiviert werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Survivin-depletierte Zellen eine andere γ H2AX Färbung zeigten als apoptotische Zellen, was auf eine Apoptose unabhängige γ H2AX Induktion hindeutet. Der Verlust an Survivin führt demnach in HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen und den isogenetischen Zellen mit „Knock out“ bzw. Knock down“ des p53 zu DNA Schäden und zu einer Aktivierung der DDR bzw. ihrer initialen Signaltransduktion.

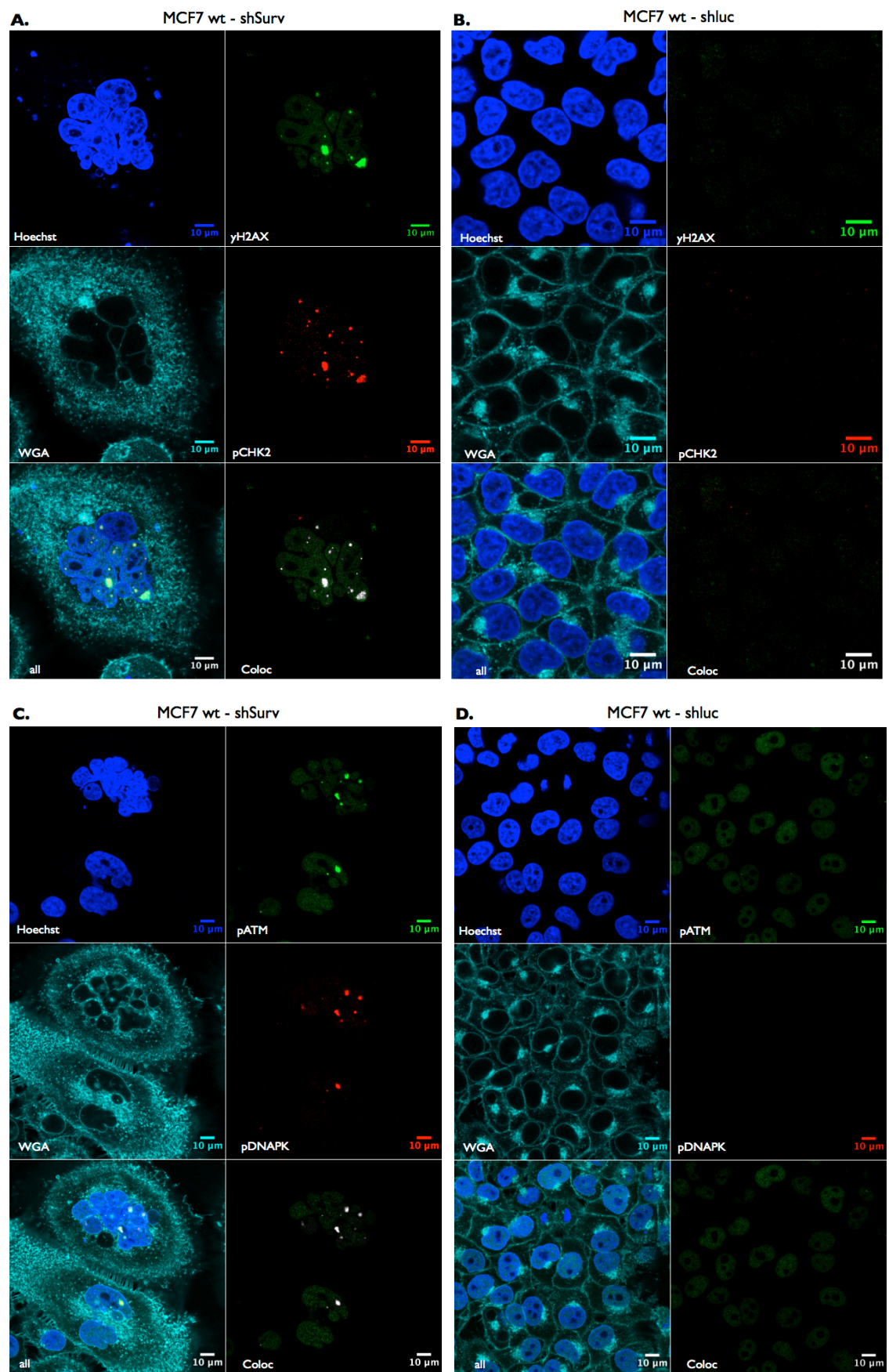


Abb. 24 Indirekte Immunfluoreszeanalyse von p^{T68}CHK2 (A,B) und p^{T2609}DNA-PK (C,D) in MCF-7 wt Zellen, die mit einer shRNA gegen Survivin (A,C) bzw. Luciferase (B,D) transduziert wurden. (nach 72h). Coloc, Kolokalisation. Maßstabsbalken 10 μ m

3.10 Survivin-depletierte MCF-7 wt Zellen mit γ H2AX Foci zeigen eine höhere Expression an p21^{waf/cip}

Um eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten von DNA-Schäden bei polyploiden Tumorzellen nach „knock down“ des Survivins und einer p53-vermittelten Induktion des p21^{waf/cip} zu beweisen, wurde eine simultane Färbung des γ H2AX und p21^{waf/cip} in einer indirekten Immunfluoreszenz durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass polyploide, Survivin-depletierte MCF-7 wt Zellen mit γ H2AX Foci gleichzeitig eine Expression von p21^{waf/cip} aufwiesen. MCF-7 shp53 Zellen, in denen Survivin ausgeschaltet wurde, besitzen zwar γ H2AX Foci, zeigten gleichzeitig aber keine oder nur selten eine Expression von p21^{waf/cip}. Im Vergleich dazu waren in den Kontrollzellen von MCF-7 Zellen wie schon zuvor keine γ H2AX Signale detektierbar. In MCF-7 wt Zellen, die mit shLuc transduziert wurden, waren vereinzelt Zellen mit p21^{waf/cip} Signal vorzufinden, bei den shp53 Zellen dagegen nicht (Abb. 25 A).

Insgesamt führte der „Knock down“ von Survivin in MCF-7 Zellen zu einem signifikanten Anstieg an γ H2AX Spots. So zeigten im Mittel 43 % der Survivin depletierten MCF7-Wildtyp-Zellen und 40,8 % der shp53 Zellen γ H2AX Foci (wt: n=764; shp53 n=571.). Gleichzeitig zeigten 51,5 % der wt Zellen eine p21^{waf/cip} Expression, verglichen mit 18,5 % in den shp53 Zellen. Bei den mit shLuc transduzierten Kontrollzellen zeigten lediglich 2,4 % der wt Zellen und 4,8 % der shp53 Zellen γ H2AX Signale (wt: n=1263; shp53 n=966). Die p21^{waf/cip} Expression war in wt shLuc Zellen im Mittel mit 16,2 % höher als die 9,1 % in den shp53 shLuc Zellen (Abb. 25 B).

Zudem zeigten 51,4 % der γ H2AX positiven, Survivin depletierten MCF-7 wt Zellen zusätzlich eine p21^{waf/cip} Expression im Vergleich zu 17,2 % an γ H2AX/p21^{waf/cip} positiven, Survivin depletierten MCF-7 Zellen, die zudem noch einen Verlust an p53 (shp53) aufwiesen. Bei den mit einer shRNA gegen Luciferase transduzierten Kontrollzellen hatten im Mittel 6,3 % der wt Zellen und 4,3 % der shp53 Zellen mit γ H2AX Foci zudem noch eine p21^{waf/cip} Expression (Abb.25 C).

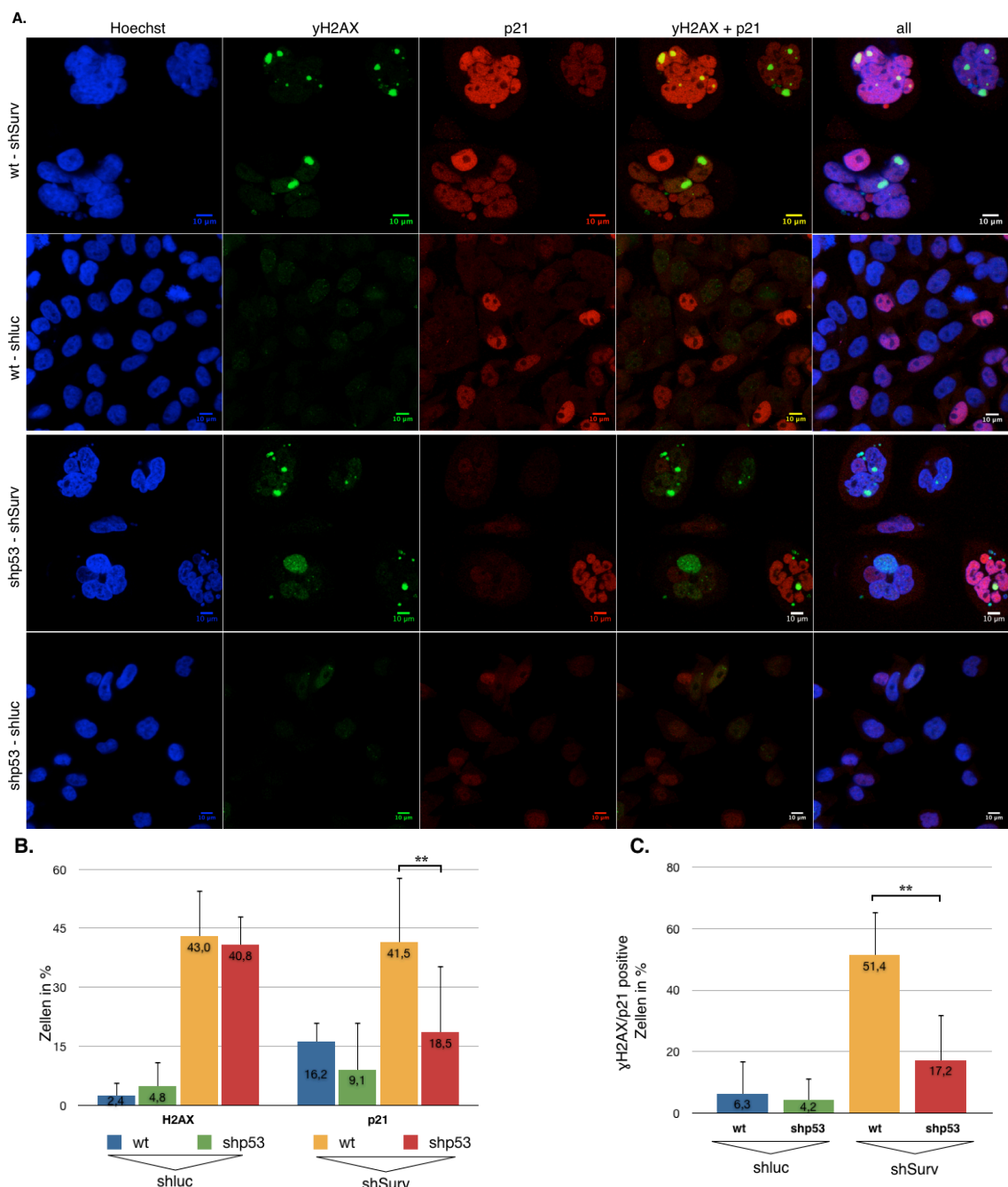


Abb. 25: Zusammenhang zwischen der γ H2AX und $p21^{waf/cip}$ Expression in Survivin depletierten MCF-7 Zellen. (A) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von γ H2AX und $p21^{waf/cip}$ in MCF wt oder shp53 Zellen, 72 h nach Survivin (shSurv) bzw. Luciferase (shluc) knock down. (B) Übersicht über den prozentualen Anteil an Zellen, die ein γ H2AX bzw. $p21^{waf/cip}$ Signal aufweisen. (C) Prozentualer Anteil an γ H2AX positiven Zellen die gleichzeitig eine $p21^{waf/cip}$ Expression zeigten. (zweiseitiger Student's t-test mit unbekanntem Variablen; Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen; Anzahl der ausgewerteten Zellen insgesamt: wt shluc 1263; shp53 shluc 966; wt shSurv 764; shp53 shSurv 571; $**p < 0,01$; Maßstabsbalken 10 μ m)

Diese Ergebnisse bestätigen noch einmal die Daten der FACS Analyse. Durch den „Knock down“ von Survivin kommt es zu einer erhöhten Expression von γ H2AX, einem Marker, der auf DNA Schäden hinweist. Gleichzeitig findet man in MCF-7 wt Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz einen Anstieg an

p21^{waf/cip}.

Zudem belegen diese Daten, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DNA Schäden (γ H2AX Foci) und der p53 abhängigen p21^{waf/cip} Expression nach Survivin Verlust gibt.

3.11 ATM/ATR Inhibierung verhindert die durch Survivin Depletion bedingte p53 und p21^{waf/cip} Akkumulation in HCT116 wt Zellen

Bisher wurde gezeigt, dass das Ausschalten von Survivin mittels shRNA zu einer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und zu einer Akkumulation von p21^{waf/cip} in HCT116 Zellen führt. Zudem konnten in den polyploiden MCF-7 Zellen nach Survivin Verlust Bereiche identifiziert werden, die aktivierte Kinasen (ATM, DNA-PK) der DNA Reparatur bzw. Signal Transduktion (CHK2) aufweisen. Für diese Kinasen ist eine Phosphorylierung von p53 an S15 beschrieben.

Um zu untersuchen, ob diese Kinasen tatsächlich für die Phosphorylierung und Aktivierung von p53 verantwortlich sind, sollten Inhibitoren für ATM (Ku55933), DNA-PK (Nu7026) und ATM/ATR (CGK733) eingesetzt werden.

In Vorversuchen konnten in HCT116 wt Zellen 10 μ M CGK733 als optimale Konzentration identifiziert werden, bei der eine p53 Akkumulation nach Doxorubicin Behandlung im Westernblot, als auch ein Zellzyklusarrest im FACS unterbunden wird.

So zeigten HCT116 wt Zellen, die mit Doxorubicin (0,25 μ g/ml) behandelt wurden, im Vergleich zur DMSO Kontrolle eine zeitabhängige Phosphorylierung von p53 an S15, was mit einer Stabilisierung und Akkumulierung von pan-p53 einhergeht. Gleichzeitig kam es zu einer zeitabhängigen Akkumulation des cdk-Inhibitors p21^{waf/cip}, Cyclin D1 und Cyclin E (Abb. 26 A). Cyclin B ist in den Doxorubicin Proben zwar stärker exprimiert, die Expression nahm aber wie in der DMSO Kontrolle nach 24h ab.

Im Vergleich dazu war die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und die damit verbundene Akkumulation von p53 in Doxorubicin behandelten HCT116 wt Zellen unterbunden, wenn sie gleichzeitig mit 10 μ M CGK733 inkubiert wurden (Abb. 26 A). Ebenfalls war in diesen Zellen kein Anstieg an p21^{waf/cip}, Cyclin D1 und Cyclin E zu verzeichnen.

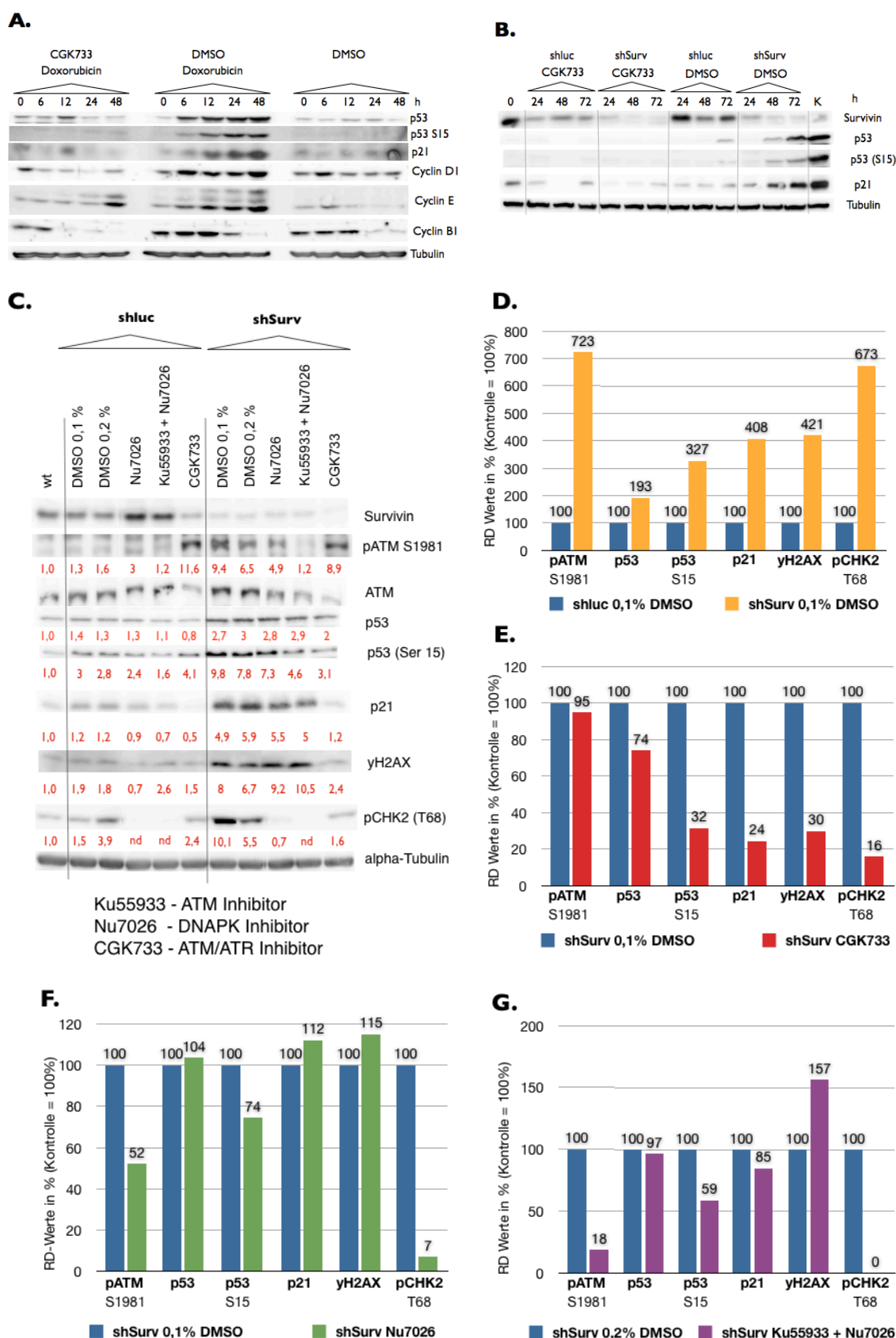


Abb. 26: ATM/ATR Inhibierung blockiert p53/p21^{waf/cip} Induktion nach Survivin „Knock down“ in HCT116 wt Zellen. (A) Test des ATM/ATR Inhibitors CGK733 (10 µM) an HCT116 wt Zellen, die mit Doxorubicin (0,25 µg/ml) behandelt wurden. Die Zellysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt, elektrophoretisch der Größe nach getrennt, auf eine PVDF Membran geblotet und mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. (B) Inhibierung von

ATM/ATR verhindert die, durch Survivin Depletion bedingte, Akkumulation von p53 und p21^{waf/cip}. Westernblot Analysen von HCT116 wt Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten, die mit einer shRNA gegen Survivin (shSurv) bzw. Luciferase (shluc) transduziert wurden. Zugabe von CGK733 (10 μ M) 24h vor der Zellyse. (K; HCT116 Zellen die 48h mit Doxorubin behandelt wurden) (C) SDS Gelelektrophorese und WB von mit shluc/shSurv transduzierten Wildtyp-HCT116 Zellen die zusätzlich mit DMSO, ATM Inhibitor (Ku55933 10 μ M), DNA-PK Inhibitor (Nu7026 10 μ M) und ATM/ATR Inhibitor (CGK733 10 μ M) inkubiert wurden. Zellyse erfolgte 72h nach der letzten Transduktion. Zugabe der Inhibitoren 24h vor der Zellyse. Die RD-Werte (relative Dichte) stellen die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung dar (nd; nicht detektierbar). Die Normalisierung der RD-Werte erfolgte über die jeweiligen Tubulin Banden. (D) Grafische Darstellung der RD-Werte von Abb. C. Der Vergleich des Expressionslevels der im Diagramm angegebenen Proteine von Survivin depletierten Zellen (shSurv DMSO 0,1%) mit shluc transduzierten Kontroll-Zellen (shluc DMSO 0,1%). Die RD-Werte der jeweiligen Proteine von shluc DMSO 0,1% entsprechen dabei 100%. (E,F,G) Grafischer Vergleich des Expressionsniveaus der angegebenen Proteine anhand der RD-Werte aus Abbildung C, von Survivin depletierten HCT116 wt Zellen nach Inhibierung von ATM, DNA-PK und ATR. Vergleich der Kontroll-Zellen DMSO 0,1% mit (E) CGK733 (ATM/ATR Inhibitor 10 μ M) und (F) Nu7026 (DNA-PK Inhibitor 10 μ M) behandelten Zellen. (G) Vergleich der Kontroll-Zellen DMSO 0,2% mit Ku55933+Nu7026 (ATM und DNA-PK Inhibitor je 10 μ M = 0,2% DMSO im Medium) behandelten Zellen. Die RD-Werte für shSurv DMSO 0,1% (E,F) bzw. shSurv DMSO 0,2% (G) entsprechen dabei 100%. (p21, p21^{waf/cip})

Diese Ergebnisse belegen, dass CGK733 in HCT116 Zellen die durch Doxorubicin induzierte Akkumulation von p53 und p21^{waf/cip} nach DNA Schäden unterbindet.

Wie bisher gezeigt wurde, führt die RNAi vermittelte Survivin-Depletion in HCT116 wt als auch HCT116 p53^{-/-}-Zellen zu DNA Schäden. Um zu beweisen, dass eine „DNA-Damage-Response“ ursächlich für die Aktivierung des p53 und Induktion des p21^{waf/cip} war, wurden mit einer shRNA gegen Luciferase (shluc) bzw. Survivin (shSurv) transduzierte HCT116 wt Zellen mit 10 μ M CGK733 bzw. DMSO behandelt (Abb. 26 B) und analysiert.

Der „knock down“ des Survivins ohne Zusatz des Inhibitors zeigte in Western Blot Analysen eine zeitabhängige Phosphorylierung von p53 an Serin15. Gleichzeitig kam es ca. 48h nach der Transduktion zu einer Akkumulation von Gesamt-p53 sowie zu einer Expressionsteigerung des p21^{waf/cip}. Diese Aktivierung nach Survivin Depletion kann durch die Verwendung des ATM/ATR Inhibitors unterbunden werden. CGK733 behandelte HCT116 Zellen (shSurv) zeigten keine Phosphorylierung von p53 an Serin15 und keinen Anstieg des Gesamt-p53 Proteinlevels bzw. nur einen leichten Anstieg an p21^{waf/cip}, der aber

auf dem Expressionsniveau der CGK733 behandelten Luciferase Kontrolle liegt.

Um die Rolle von DNA-PK und ATM nach Survivin Depletion zu bestätigen, wurden mit Nu7026 (Veuger et al. 2003) und Ku55933 (Hickson et al. 2004) spezifische Inhibitoren für DNA-PK bzw. ATM eingesetzt.

Dafür wurden HCT116 wt Zellen mit shLuc bzw. shSurv transduziert und 72h kultiviert. 24 h vor der Zelllyse erfolgte die Zugabe von Nu7026 (10 μ M), Nu7026 und Ku55933 (je 10 μ M), CGK733 (10 μ M) und 0,1% (v/v) DMSO bzw. 0,2% (v/v) DMSO (Kontrolle für Nu7026 + Ku55933). Mit Hilfe des „Gel Analyser Tools“ von Fiji wurden die Banden densitometrisch bestimmt und zum Vergleich die RD-Werte (relative Dichte) über die dazugehörige alpha-Tubulin Bande normalisiert (Abb 26 C).

Beim Vergleich der 0,1% DMSO Kontrollen, die eine shRNA gegen Luciferase (shLuc) bzw. Survivin (shSurv) transduziert bekamen, konnten im Western Blot für HCT116 wt Zellen die Ergebnisse bestätigt werden, die schon für Survivin-depletierte MCF-7 wt Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz beschrieben wurden. So führte der „Knock down“ des Survivins in HCT116 wt Zellen zu einem 7,2 fachen Anstieg an phosphorylierten ATM S1981, 6,7 fachen Anstieg an phosphorylierten CHK2 T68, 4,2 fachen Anstieg an γ H2AX und einem ca. 3,2 fachen Anstieg an phosphoryliertem p53 S15 im Vergleich zur shLuc Kontrolle. Zudem kam es zu einem fast 2 fachen Anstieg an p53 bzw. 4 fachen Anstieg an p21 in Zellen mit „Knock down“ von Survivin im Vergleich zu den shLuc-Kontrollen (Abb. 26 D).

Die Inhibierung von ATM/ATR durch CGK733 bestätigte ebenfalls die zuvor beschriebenen Ergebnisse.

So kam es in Survivin-depletierten HCT116 Zellen mit Inhibierung von ATM/ATR zu einer Abnahme von ca. 24% an p53, ca. 69% an p53 S15, ca. 75% an p21, 70% an γ H2AX und ca. 84% an pCHK2 T68 im Vergleich zur Survivin-depletierten 0,1% DMSO Kontrolle (Abb. 26 E). Allerdings ist fast keine Abnahme an pATM S1981 zu verzeichnen. Vermutlich erfolgt eine Hemmung der ATM/ATR-Kinase „Downstream“ der pATM-Monomere.

Zudem zeigte die shLuc CGK733 Probe ebenfalls eine starke pATM S1981 Bande (Abb. 26 C)

Die Inhibierung der DNA-PK durch Nu7026 führte zu einer 48% igen Verringerung an phosphorylierten ATM S1981 in Survivin-depletierten Zellen im Vergleich zur 0,1% DMSO Kontrolle (Abb. 26 F) Die Phosphorylierung an diesem Serin kann durch ATM selbst oder durch DNA-PK erfolgen. D.h. auch nach Inhibierung der DNA-PK kann auf Doppelstrangbrüche über die ATM vermittelte Homologe Rekombination auf DNA Schäden reagiert und eine Reparatur eingeleitet werden.

So zeigte sich durch DNA-PK Inhibierung ebenfalls eine Abnahme von p53 S15 um 25% und pCHK2 T68 um 93%. Allerdings hatte dies keine Auswirkung auf die Proteinlevels von p53, p21 und γ H2AX.

Die Verringerung an phosphorylierten ATM S1981, CHK2 T68 und p53 S15 deutet darauf hin, dass DNA-PK, nach RNAi induzierten DNA Schäden durch Survivin „knock down“, aktiviert wird, eine Inhibierung aber nicht ausreicht, um eine Aktivierung von p53 und p21^{waf/cip} zu unterbinden. D.h. ATM bzw. ATR können weiterhin aktiv sein und zu einer Stabilisierung von p53 beitragen.

Wurden Survivin depletierte HCT116 wt Zellen zusätzlich zu dem DNA-PK Inhibitor noch mit einem Inhibitor für ATM (Ku55933) behandelt, kam es fast zu einer vollständigen Unterbindung der Phosphorylierung an S1981 von ATM und pCHK2 T68 (Abb. 26 G) im Vergleich zur 0,2% DMSO Kontrolle. Gleichzeitig kam es zu einer 40% igen Abnahme an p53 S15. p21^{waf/cip} nahm um ca. 15% ab, pan-p53 blieb fast unverändert zur Kontrolle. Es ist allerdings auch ein Anstieg an γ H2AX um 56% zu verzeichnen.

Durch die zusätzliche Inhibierung von ATM in Zellen, die mit einer shRNA gegen Survivin transduziert und gleichzeitig mit einem DNA-PK Inhibitor behandelt wurden, konnte noch einmal verstärkt die Phosphorylierung von p53 S15, ATM S1981 und CHK2 T68 unterbunden werden als im Vergleich zu den DNA-PK inhibierten, Survivin depletierten Proben (Abb 26 F, G). Gleichzeitig führte die parallele Inhibierung von ATM/DNA-PK zu einer Verringerung der p21^{waf/cip} Expression. Dies deutet darauf hin, dass die, durch den RNAi vermittelten knock down von Survivin induzierten DNA Schäden zu einer Aktivierung von DNA-PK und ATM führen und dass diese Kinasen an der Phosphorylierung von p53 S15 beitragen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ATR/ATM den grössten Effekt auf die Verringerung der p53/p21^{waf/cip} Akkumulierung nach Survivin „knock down“ hat.

Diese Ergebnisse bestätigen, eine Survivin-RNAi vermittelte Aktivierung der DDR führt zu einer Akkumulierung des Tumorsuppressorproteins p53.

3.12 Die Inhibition der mitotischen Kinase Aurora B, einem molekularen Partner des Survivins, führt zu Polyploidie, DNA-Schäden und G1-Arrest in Zellen mit funktionellem p53

Survivin ist ein bifunktionales Protein. Es besitzt eine BIR Domäne und ist ursprünglich als Inhibitor of Apoptosis (IAP) beschrieben. Gleichzeitig ist es aber auch Bestandteil des Chromosomalen Passenger Complexes (CPC) und hat damit eine wichtige Funktion in der Zellteilung und Zytokinese (siehe 1.2.2). Um festzustellen, ob es sich bei der RNAi vermittelten Survivin Depletion und den daraus resultierenden Auftreten von DNA Schäden um einen Survivin spezifischen Effekt handelt, der auf die Funktion in der Zellteilung oder der Apoptose zurück zu führen ist, sollte ebenfalls die Aurora B Kinase mittels eines spezifischen Inhibitors AZD1152-HQPA ausgeschaltet werden. Die Aurora B Kinase ist wie Survivin Bestandteil des CPC und spielt eine bedeutende Rolle bei der Verbindung des Spindelapparates mit den Centromeren, dem Spindelcheckpoint und der Zytokinese (siehe 1.2.2.3).

AZD1152-HQPA ist ein spezifischer Inhibitor der Aurora B Kinase (Ki 0,36 nmol/L) im Vergleich zur Aurora A Kinase (Ki 1,369 nmol/L). Durch die spezifische Inhibition von Aurora B kommt es zu einer fehlerhaften Anordnung der Chromosomen, Beeinträchtigungen der Zytokinese und zu einer Apoptose Induktion (Mortlock:2007hh; Walsby:2008dc; Yang et al. 2007).

HCT116 Zellen, die mit AZD1152-HQPA für 48 h behandelt wurden, zeigten eine Zunahme an Polyploidie im Vergleich zur DMSO Kontrolle. So besitzen HCT116 wt Zellen mit Inhibitor 37,1% und p53^{-/-} 51,1% Zellen mit einem DNA Gehalt >4n. Für die DMSO Kontrolle sind es für den wt 0,9% und die p53-defizienten 2,0%.

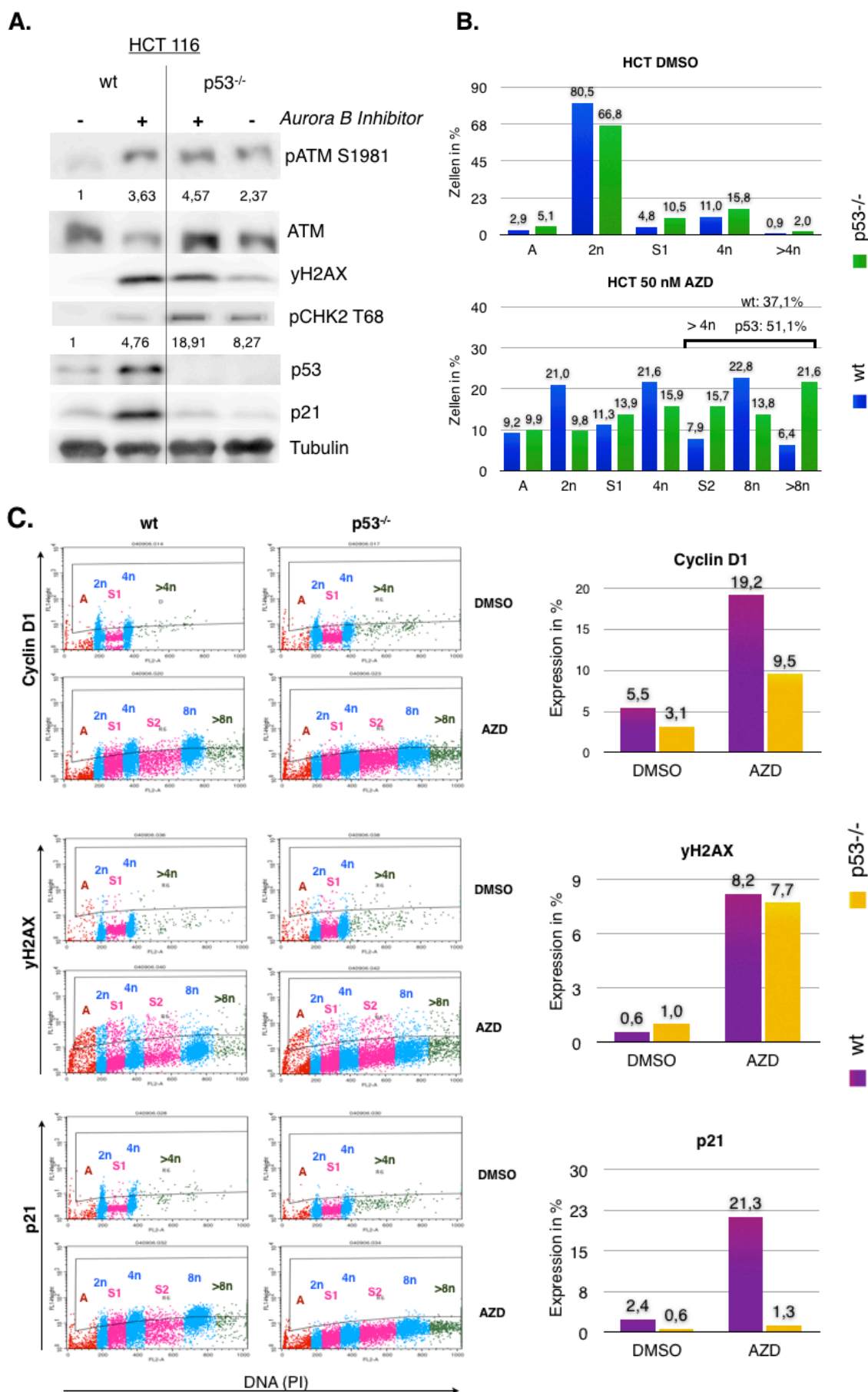


Abb. 27: Aurora B Kinase Inhibierung in HCT116 Zellen führt zu polyploiden Zellen mit einer erhöhten Expression von Markern der DNA Reparatur. (A) Western Blot von HCT116

wt und p53^{-/-} Zellen, die mit DMSO oder AZD1152-HQPA (Aurora B Kinase Inhibitor 50 nM) für 48 h behandelt wurden. Densitometrische Auswertung der über Tubulin normalisierten Banden. (B) FACS Analyse zeigt die Verteilung der HCT116 Zellen in den verschiedenen DNA Phasen. (AZD: AZD1152-HQPA) (C) Kombinierte DNA-Antikörperfärbung im FACS für p21^{waf/cip} (p21), γ H2AX und Cyclin D1. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Zudem zeigte sich hier der ähnliche Effekt wie bei den HCT116 Zellen nach Survivin-RNAi. Die wt Zellen mit Inhibitor haben 22,8% der Zellen mit einem DNA Gehalt von 8n, während die p53^{-/-} Zellen nur 13,8% aufweisen. Dafür weisen p53^{-/-} Zellen mit 21,6% deutlich mehr Zellen mit einem DNA Gehalt >4n auf als wt Zellen (6,4%). HCT116 wt Zellen wiesen demnach einen geringeren Grad an Polyploidie auf als die p53-defizienten Zellen. Die Apoptose stieg ebenfalls nach Aurora B Kinase Inhibition von 2,9% (wt) bzw. 5,1% (p53^{-/-}) auf 9,2% (wt) bzw. 9,9% (p53^{-/-})(Abb. 27 B).

Western Blot-Analysen zeigten, dass die Inhibition der Aurora B Kinase, ähnlich wie die Survivin-RNAi, in HCT116 wt Zellen zu einer Akkumulation von p53 und p21^{waf/cip} führte. p53-defiziente bzw. mit DMSO behandelte Zellen zeigten diesen Anstieg nicht (Abb. 27. A).

Gleichzeitig kommt es auch nach Inhibition der Aurora B zur Expression von Markern der DNA Reparatur. So zeigen Zellen, die mit AZD1152-HQPA behandelt wurden, unabhängig von ihrem p53 Status eine Phosphorylierung von ATM S1981, γ H2AX und CHK2 T68. p53-defiziente HCT116 Zellen, die mit DMSO behandelt wurden zeigen zwar schon *per se* eine Aktivierung dieser Proteine, dieser Effekt wird aber durch die Verwendung des Inhibitors in p53^{-/-} Zellen signifikant verstärkt (Abb. 27 A).

Eine kombinierte DNA-Antikörper-FACS Analyse (Abb. 27 C) bestätigte die Ergebnisse des Western Blots. So zeigten nur HCT116 wt Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, einen Anstieg an p21^{waf/cip} auf 21,3%. Im Vergleich dazu wiesen p53-defiziente HCT116 Zellen nach AZD1152-HQPA-Behandlung bzw. wt- und p53^{-/-}-DMSO-Kontrollen nur ein basales Proteinlevel an p21^{waf/cip} auf. Zudem zeigten die FACS Analysen, dass es ebenfalls zu einer Akkumulation von Cyclin D1 in Zellen mit Aurora B Kinase Inhibitor kommt. Dabei fällt der Anstieg von 19,2% in den wt Zellen deutlich höher aus als die 9,5% in den p53-defizienten Zellen (Abb. 27 C).

HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen zeigten nach Aurora B Inhibierung eine γ H2AX Färbung. Dabei ist das Expressionslevel in den wt mit 8,2% und p53^{-/-} mit 7,7% fast gleich hoch und bestätigt die Ergebnisse des Western Blots, wo beide eine annähernd starke γ H2AX Bande aufwiesen (Abb. 27 A, C).

Alle diese Ergebnisse zeigten auf, dass die Inhibierung der Aurora B Kinase mittels AZD1152-HQPA, ebenfalls wie die RNAi vermittelte Ausschaltung von Survivin, zu einer Zunahme an Polyploidie in HCT116 wt und p53^{-/-} Zellen führt. Gleichzeitig kam es ebenfalls zu einem Anstieg an p53, p21^{waf/cip} und einer erhöhten Expression von phosphorylierten ATM, CHK2 und γ H2AX.

Dies deutet darauf hin, dass das Auftreten von DNA Schäden nach Survivin Depletion bzw. nach Aurora B Kinase Inhibierung eher auf Mitosedefekte durch eine Beeinträchtigung der Funktion des CPC während der Metaphase-Anapase-Transition und Zytokinese zurückzuführen ist als auf einen Verlust an Survivin als IAP.

3.13 Der Survivin Verlust führt in HCT116 p53^{-/-} Zellen zu chromosomaler Instabilität und strukturellen chromosomalen Aberrationen

Um die Qualität der DNA Schäden sowie den Einfluss von merotelischen Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen auf die genomische Integrität während der Zellteilung nach Survivin-RNAi zu untersuchen, wurden Metaphase-Chromosomen von HCT116 p53^{-/-} Zellen auf Objektträger gebracht und in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Klink (Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden) mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht. Die SKY-Analyse ist besonders gut geeignet, um Translokationen zu identifizieren, die der konventionellen Karyotypisierung entgehen. Zusätzlich wurden Metaphasen mit konventioneller Giemsa- bzw. DAPI-Färbung angefärbt um Chromosomenbrüche, dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen nachzuweisen. Die Wahl fiel auf p53-defiziente HCT116 Zellen, da für die Herstellung von Metaphasenchromosomen genügend proliferierende Zellen benötigt werden und die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass diese Zellen aufgrund des fehlenden Tumorsuppressorproteins p53 keinen Zellzyklusarrest nach Survivin-RNAi initiierten.

Die HCT116 p53^{-/-} Zellen wurden, wie unter 2.2.1 beschrieben, mit retroviralen Vektoren gegen Survivin und Luziferase transduziert, selektioniert und insgesamt für 72h kultiviert. Dann erfolgte die Gewinnung der Metaphasen-Chromosomen und die Anfärbung mittels Giemsa sowie SKY-Analyse (siehe 2.2.4).

Die Analyse von 22 SKY-Karyogrammen und 20 Giemsa-gefärbten Metaphasen von HCT116 p53^{-/-} Zellen, die mit einer shRNA gegen Luziferase transduziert wurde, ergab einen hypodiploiden Karyotyp (2n-) von 45 Chromosomen (44 Autosomen und ein X-Chromosom) in 41 von 42 Metaphasen. Eine Metaphase wies eine nahezu Verdopplung des Chromosomesatzes mit 88 Chromosomen (88,XX) auf. In der SKY-Analyse von 22 Metaphasen waren mehrere Translokationen feststellbar, die sich in allen 22 untersuchten Metaphasen zeigten: eine Translokation zwischen Chromosom 5 und Chromosom 7 resultierend in einem derivativen Chromosom bestehend aus einem Stück von Chromosom 5 und Chromosom 7 [der(5;7)(q13;pter)] und einem Chromosom 5 mit Deletion eines großen Teils des langen Arms von Chromosom 5 [del(5)(q13)], ein derivatives Chromosom 10 mit Duplikation eines Stücks des langen Arms von Chromosom 10 und Translokation eines Stücks von Chromosom 16 [der(10)dup(10)(q23.1q26.1)t(10;16)(q26.1;q23)], ein derivatives Chromosom der(16)t(8;16)(q13;pter), sowie ein derivatives Chromosom der(18)t(17;18)(q21.3;pter) (Abb. 28 A). Ein Abgleich mit der „NCI and NCBI's SKY/M-FISH and CGH Database (2001), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyweb.cgi>“ bestätigte, dass dieser Karyotyp auch der vorwiegende HCT116 p53^{-/-} Karyotyp ist. Vier der 22 analysierten SKY-Karyogramme zeigten zusätzliche Aberrationen: eine Zelle wies ein Markerchromosom 4 sowie ein derivatives Chromosom der(4)t(4;4) auf, eine Zelle hatte zusätzlich ein derivatives Chromosom X mit einem Stück von Chromosom 10 (der(X)t(X;10), eine Zelle wies einen Deletion eines Stücks von Chromosom 13 auf [del(13)(q13)] und die Zelle mit verdoppeltem Chromosomensatz wies mehrere zusätzliche Aberrationen auf: eine Translokation zwischen Chromosom 19 und Chromosom 5, resultierend in einem der(5)t(5;19) sowie einem Chromosom 5 mit Verlust des kurzen Arms von Chromosom 5 [del(5)(p13)]. Auch Ried et al. fanden in 3 von 18 analysierten Metaphasen in der SKY-Analyse von HCT116^{-/-} Zellen eine abweichenden Karyotyp mit zusätzlichen Veränderungen (NCBI's SKY/M-FISH and CGH Database (2001).

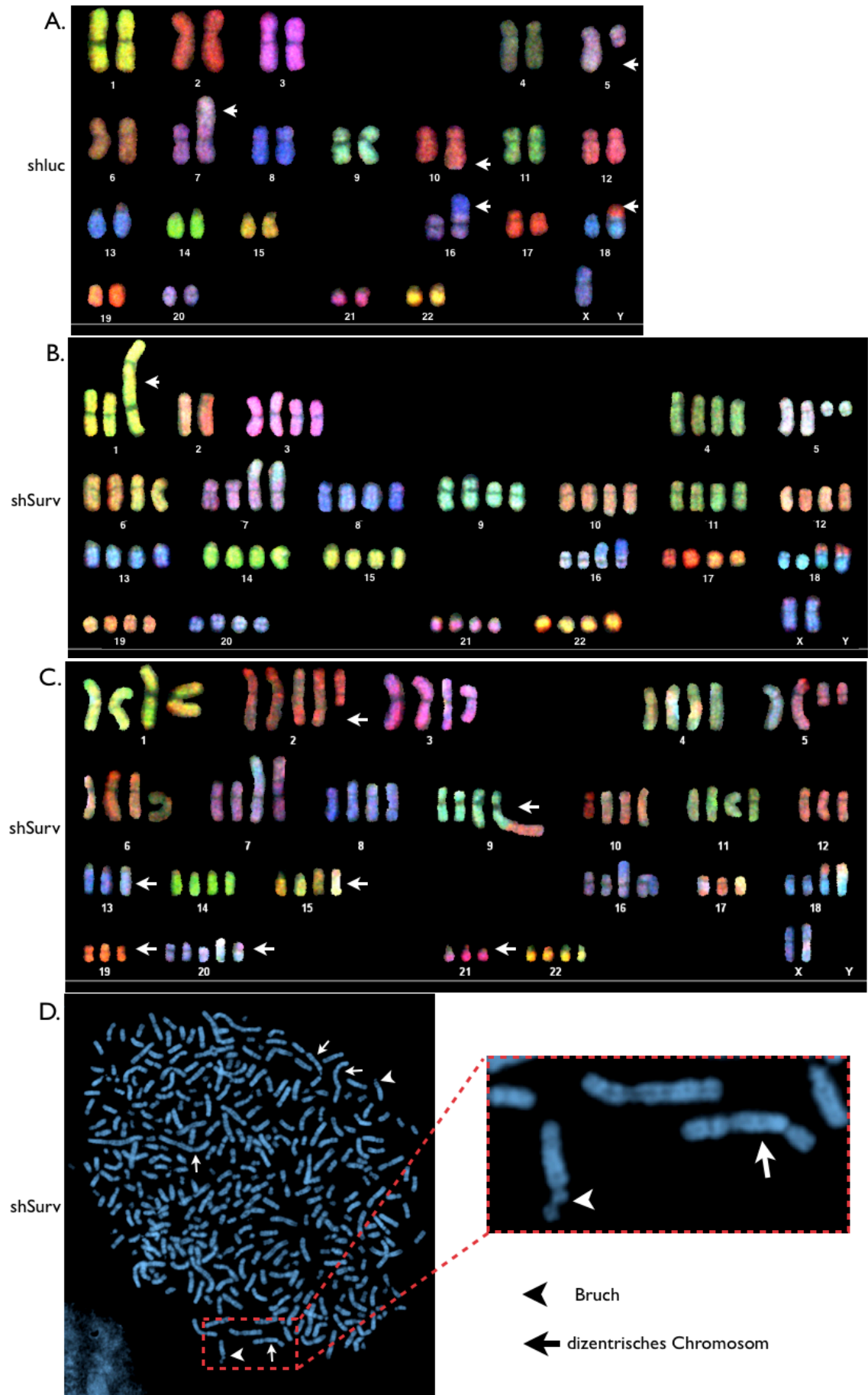


Abb. 28: Repräsentative SKY-Karyogramme von HCT116 p53^{-/-} Zellen, 72h nachdem sie mit einer shRNA gegen Luziferase (shluc) oder Survivin transduziert (shSurv) wurden. (A) shluc Zellen mit einem Karyotyp 45,X,-Y,t(5;7)(q13;pter), der(10)dup(10)(q23.1q26.1)t(10;16)(q26.1;q23), der(16)t(8;16)(q13;pter), der(18)t(17;18)(q21.3;pter)(Pfeilköpfe). (B) Eine Survivin-depletierte, nahezu tetraploide HCT116 p53^{-/-} Zelle (87,XX) mit den für shluc beschriebenen Aberrationen sowie zusätzlich einem dizentrisches Chromosom 1 (Pfeil) und Verlust zweier Chromosomen 2. (C) shSurv Zelle mit 87 Chromosomen (nahezu tetraploider Chromosomensatz) mit zusätzlich del(2)(q13), der(9)t(9;12), der(15)t(15;17), der(20)t(3;20) und zusätzlichem Verlust von Chromosom 13, 19, 21. (Pfeile). (D) Dapi-Färbung einer Metaphase einer Survivin-depletierten (shSurv) aneuploiden Zelle mit nahezu hexadecaploidem Chromosomensatz (360 Chromosomen = 16n-, 8x45 Chromosomen), die dizentrische Chromosomen (Pfeile) und Chromosomenbrüche (Pfeilköpfe) aufweist. (t, Translokation; del, Deletion; der, derivatives Chromosom; q, langer Arm des Chromosoms; p, kleiner Arm des Chromosoms; dup, Duplikation; ter, terminal).

SKY-Analysen sowie die DAPI-Gegenfärbungen der Metaphasenchromosomen von Survivin depletierten HCT116 p53^{-/-} Zellen zeigten neben wenigen Zellen mit nahezu diploidem Chromosomensatz überwiegend Zellen mit nahezu tetraoctaploiden- und hexadecaploidem Chromosomensatz (4n-, 8n-, 16n-) bestehend aus Metaphasen mit 85-96 bzw. 172-179 und 332-360 Chromosomen. Es wurden 16 SKY-Karyogramme ausgewertet, davon 6 nahezu diploid, 8 nahezu tetraploid und 2 nahezu octaploid. In allen ließen sich die oben beschriebenen, bekannten Aberrationen nachweisen, mit Ausnahme von 3 Zellen, in denen das derivative Chromosom 10 nicht mehr nachweisbar war. Interessanterweise fanden sich in der SKY-Analyse in allen 10 Zellen mit vervielfachtem Chromosomensatz multiple zusätzliche strukturelle Aberrationen, wie Translokationen, dizentrische Chromosomen, Verluste von chromosomalem Material und Markerchromosomen sowie numerische Veränderungen, überwiegend Verluste einzelner Chromosomen (Abb. 28 B, C). Von den 6 Zellen mit nahezu diploidem Chromosomensatz wiesen zwei den bekannten Karyotyp unverändert auf, die übrigen 4 zeigten jedoch auch zusätzliche Veränderungen.

Die meisten der Aberrationen traten jeweils nur in einer der Zellen auf, es fanden sich jedoch auch wiederkehrende Aberrationen: Verlust des langen Arms von Chromosom 2 (5/18), Markerchromosom 3 (3/16), Markerchromosom 2 (2/16) und ein dizentrisches Chromosom 1 (2/16). Die Auswertung von 19 mit Giemsa- bzw. DAPI-gefärbten Metaphasen zeigte außerdem das Auftreten von dizentrischen Chromosomen in 10/19 Metaphasen, von Chromosomenbrüchen in 6/19 Metaphasen und von Ringchromosomen in 2/19 Metaphasen. (Abb. 28 D). Insgesamt zeigten 13 von 19 Zellen (shSurv) mindestens eine der oben

beschriebenen Aberrationen, 6 von 7 davon mit einem Ploidiegrad $>4n$. Im Vergleich dazu fanden sich in 20 Metaphasen der Kontrolle (Luciferase) niemals dizentrische Chromosomen oder Ringchromosomen. In 4 von 20 Metaphasen zeigte sich ein Bruch in einem Chromosom auch in der Kontrolle. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Survivin-depletierte HCT116 p53^{-/-} Zellen zusätzliche numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen im Vergleich zu den Kontrollzellen (shluc) aufwiesen.

Insbesondere dizentrische Chromosomen sind Folge von Doppelstrangbrüchen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beeinträchtigung des SAC und der Zytokinese durch den Survivin Verlust, zu strukturellen chromosomalen Aberrationen und DNA Brüchen führt, die daraufhin die „DNA Damage Response“ und DNA Reparaturmechanismen initiieren sowie zu Chromosomaler Instabilität mit Fehlverteilung bzw. Verlust von Chromosomen in der Mitose (numerische Aberrationen) führen.

4. Diskussion

Survivin zählt aufgrund seiner BIR Domäne zu den so genannten Inhibitor der Apoptose Proteinen. Diese Gruppe an Proteinen interferiert negativ mit der Aktivierung von Caspasen und wirkt somit einer Induktion der Apoptose entgegen, was wiederum das Überleben von Zellen fördert. Die Rolle des Survivins in der Apoptose ist seit seiner Entdeckung Gegenstand intensiver Forschungen und kontroversen Diskussionen (Lens, Vader, et al. 2006b; Altieri 2006). Aufgrund der Tatsache, dass Survivin in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert ist, galt es als universelles Tumor-assoziiertes Antigen (Andersen et al. 2002) und wurde lange als ideales molekulares Ziel für eine Krebstherapie mittels RNA Interferenz oder spezifischer pharmakologischer Inhibitoren gehandelt. Tatsächlich führt das Ausschalten von Survivin mittels RNAi oder ektopischer Expression von dominant-negativen Proteinen zu einer erhöhten Apoptose und Hemmung der Proliferation, aber auch zu schweren Zellteilungsdefekten (F Li et al. 1999; Jun Chen 2000; Temme et al. 2003; Temme et al. 2005; Hendruschk et al. 2011).

Neben seiner beschriebenen anti-apoptischen Funktion besitzt das Survivin zudem eine essentielle Rolle bei der chromosomalen Segregation und während der Zytokinese. Die Generierung einer homozygoten Maus mit Deletion der *BIRC5*-Allele, welche für das Survivin Protein kodieren, ergab einen embryonal letalen Phänotyp. Die Embryonen verstarben sehr früh aufgrund von Spindeldefekten, die zu mehrkernigen Riesenzellen führten (Uren et al. 2000). Mit dem „Inner Centromere Protein“ (INCENP), Borealin und der mitotischen Aurora B Kinase bildet Survivin den Chromosomalen Passenger Complex (CPC) (Earnshaw & Bernat 1991; Temme et al. 2003; Vagnarelli & Earnshaw 2004).

Eine Vielzahl an Studien beschäftigte sich mit der Rolle des Survivins im Spindle Checkpoint und der Apoptoseinduktion. Einige Untersuchungen zeigten Hinweise einer Verbindung des Survivins mit dem Tumorsuppressorprotein p53, einem wichtigen Mediator der Zellzyklusregulation.

So konnte gezeigt werden, dass Wildtyp p53 in der Lage ist, die Transkription des *BIRC5*-Gens zu unterdrücken (Hoffman et al. 2002; Mirza et al. 2002; M. Zhou et al. 2002). Hierbei ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese

transkriptionelle Repression durch eine direkte Bindung von p53 an ein p53-reponsibles Element im Survivin Promoter erfolgt (Hoffman et al. 2002) oder durch eine Unterdrückung der Histon Acetylierung des Survivin-Promoters hervorgerufen wird (Mirza et al. 2002).

Frühe Studien an HCT116 und HCT116 p21^{-/-} Zellen, die mit einer siRNA gegen Survivin bzw. einer dominant negativer Survivin Mutante transfiziert wurden, zeigten einen höheren Anteil an polyploiden Zellen in den p21^{waf/cip}-defizienten Zellen (F Li et al. 1999). Zudem konnte eine Kolokalisation von Survivin, Caspase 3 und p21^{waf/cip} in den Zentrosomen detektiert werden, was durch die Verwendung der Survivin Mutante oder Antisense RNA gestört wurde und daraufhin in einer Caspase 3-abhängigen Spaltung von p21^{waf/cip} resultierte. Dies führte zu der Vermutung, dass Survivin den Cdk Inhibitor p21^{waf/cip} reguliert.

In den darauffolgenden Jahren konnte in T-Lymphozyten mit einem Knock out des Survivin Gens ein Zellzyklusarrest, Defekte in der mitotischen Spindel und eine erhöhte Apoptoserate sowie eine Induktion an p53 und p21^{waf/cip} festgestellt werden (Okada et al. 2004). Eine weitere Studie sah nach einem siRNA vermittelten Survivin Verlust in HCT116 Zellen eine Zunahme an Polyploidie und eine p53-abhängige p21^{waf/cip}-Induktion (Beltrami et al. 2004). Erst kürzlich konnte in Survivin depletierten Neuroblastom-Zellen eine p53 und Caspase 2 Aktivierung festgestellt werden (Lamers et al. 2011).

Wang et al. beschreibt eine Repression von p53 nach einer ektopischen Expression des Survivins in Doxorubicin behandelten Zellen aufgrund einer erhöhten p53 Degradation, die aus einer Survivin-abhängigen Inhibierung der Spaltung von Mdm2 durch Caspasen resultiert (Z. Wang et al. 2004b). Eine Hemmung der Survivin Funktion durch dominant-negative Mutanten bzw. siRNA führte zu einer erhöhten Caspase 3 Aktivität, Spaltung von mdm2 und damit zu einem Anstieg bzw. Stabilisierung des p53 Tumor-Suppressorproteins. Diese Arbeit sieht die Funktion des Survivin eindeutig in der Apoptose und geht dabei von der Inhibition von Caspasen durch Survivin aus. Allerdings ist der inhibitorische Einfluss von Survivin auf Caspasen umstritten (Banks et al. 2000; Verdecia et al. 2000; Changqing Li et al. 2008). Zudem setzt diese Arbeit eine negative Regulation von Mdm2 durch die Caspase 3 voraus (L. Chen et al. 1997; Erhardt et al. 1997), doch die verwendeten MCF-7 Zellen sind aufgrund

einer Deletion im Exon 3 des *CASP-3* Gens Caspase 3-defizient (Jänicke et al. 1998; Jänicke 2008).

Nichtsdestotrotz belegen die Abbildungen von Wang et al. einen Anstieg an p53 in MCF-7 Zellen nach der Transfektion von siRNA gegen Survivin bzw. von T34 Survivin-Mutanten, bevor die Zugabe von Doxorubicin erfolgte.

Bis heute ist es weitgehend unklar, wie eine Aktivierung von p53 nach einem Survivin Verlust erfolgen kann. Zudem stellte sich die Frage, ob eine therapeutische Intervention, welche die Ausschaltung des Survivin-Proteins zum Ziel hat, neben Tumorzellen auch normales Gewebe schädigen kann. Da Tumorzellen sich von normalen Zellen insbesondere dadurch unterscheiden, dass sie Defekte in p53-Signalwegen bzw. eine inaktivierende p53-Mutation oder Gendeletion besitzen, wurde die Auswirkung einer Survivin- Depletion auf p53-positive Tumorzellen und auf isogene Tumorzellen mit ausgeschalteten p53 untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit wird anhand von drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie ihrer isogenetischen p53-defizienten Varianten der Effekt der Survivin RNAi beschrieben. Der Verlust an Survivin führte dabei zu Polyploidie, einer gestörten Zytokinese und multipolaren Spindeln und bestätigt die bisher beschriebenen Funktionen des Survivins als Bestandteil des Chromosomalen Passenger Complexes. Zusätzlich konnte eine erhöhte Apoptose sowie die Induktion an p53/p21^{waf/cip} festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression an p21^{waf/cip} sowie seines potentiellen Targets Cyclin D mit der Zunahme an Polyploidie nach Survivin RNAi korreliert. Zudem wird zum ersten Mal eine ATM/ATR abhängige „DNA Damage Response“ (DDR) in Survivin-depletierten p53-defizienten und Wildtyp Zellen beschrieben, die zu einer Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 führt. Sky-Analysen bestätigten numerische als auch schwere chromosomale Aberrationen wie Translokationen und dizentrische Chromosomen in Survivin-depletierten polyploiden Zellen. Die Inhibierung der Aurora B Kinase, einem weiteren Bestandteil des CPC, mittels eines chemischen Inhibitors zeigt analog das Auftreten von DNA Schäden, eine p53/p21^{waf/cip} Aktivierung sowie eine Zunahme an Polyploidie, wie sie für Survivin beschrieben wurde. Diese gewonnenen Ergebnisse der Induktion von DNA Schäden und einem p53/p21^{waf/cip}-abhängigen G1 Arrest nach dem knock down von Survivin belegen, dass sie eher auf eine gestörte Mitose als auf eine Funktion des Survivin als IAP zurückzuführen sind.

Das Ausschalten von Survivin mittels RNAi führte in HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen sowie deren isogenetischen, aber p53-defizienten Varianten zu einer Zunahme an polyploiden Zellen in der FACS- und indirekten Immunfluoreszenzanalyse im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-shRNA transduziert wurden (Abb. 14 C). Dies deutet auf schwere Zytokinesedefekte hin, da ein Abschnüren bzw. Trennen der Zellen nicht mehr möglich war. Die z.B. tetraploiden Zellen gehen dann in eine erneute Runde des Zellzyklus, d.h. nach der defekten Zytokinese wird die G1-Phase, eine erneute Endoreplikation der DNA und die G2 Phase durchlaufen bis zu einem erneuten Mitoseversuch. 72h nach Transduktion der shRNA gegen Survivin konnten so Zellen mit einem DNA Gehalt von bis zu 32n für HCT116, 24n für MCF-7 und 16n in U87-MG Zellen festgestellt werden.

Anhand einer alpha-Tubulin Färbung konnte gezeigt werden, dass der Verlust an Survivin in polyploiden MCF-7 wt Zellen in der Mitose zu einem Auftreten von mehreren Metaphaseebenen führt, an denen sich die Chromosomen anordnen (Abb. 20). Gleichzeitig traten auch mehrere Spindelapparate (multipolare Spindeln) auf, die auf eine Centrosomenamplifikation hindeuten (Abb. 20). Diese Ergebnisse lassen auf eine direkte Funktion von Survivin in der Mitose als Bestandteil des CPC schließen. Dazu stimmen diese Daten mit einer Vielzahl an Untersuchungen in unterschiedlichen Zelllinien überein, wo nach dem Ausschalten von Survivin mittels RNAi, dominant-negativer Protein oder siRNA, polyploide bzw. multinukleäre Zellen und multipolare Spindeln auftraten (Uren et al. 2000; Beltrami et al. 2004; F Li et al. 1999; Hendruschk et al. 2011; Temme et al. 2005; Okada et al. 2004; Kappler et al. 2004). Erst kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der siRNA-vermittelte Ausschalten von Survivin zu einer Centrosomenamplifikation in zwei Glioblastomzelllinien führte (Saito et al. 2008).

SubG1 Analysen von HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen sowie Annexin-V-FITC Färbungen von HCT116 Zellen bestätigten eine p53-unabhängige Zunahme an toten Zellen nach dem RNAi vermittelten Ausschalten von Survivin. Western Blot Analysen von Caspase 3 in HCT116 und U87-MG Zellen sowie das Auftreten von toten Zellen in Caspase 3-defizienten MCF-7 Zellen belegen, dass die Zunahme von apoptotischen Zellen Caspase 3-unabhängig

erfolgte. Diese Daten stimmen mit Studien überein, die nach dem Ausschalten von Survivin durch siRNA, shRNA oder dominant negative Proteine einen Caspase-unabhängigen Zelltod beobachteten (Temme et al. 2005; Croci et al. 2008; Hendruschk et al. 2011). Allerdings ist in der Literatur nach Survivin Verlust auch ein Caspase-abhängiger Zelltod beschrieben (Zhen et al. 2007; George et al. 2010; Uchida et al. 2004). Es ist spekulativ zu vermuten, welchen Einfluss der genetische Hintergrund der unterschiedlichen Zelllinien auf diese Beobachtungen hat. Die Annexin-V Färbungen zeigten zudem, dass in HCT116 Zellen nach Survivin Verlust nur sehr wenig Zellen in der apoptotischen Fraktion (Gate A) auftraten im Vergleich zu shLuc transduzierten Zellen und im Vergleich zu der toten Fraktion (Gate D). Der Survivin Verlust führt demnach vermutlich nicht zu einer primär aktivierten intrinsischen Apoptose. Dafür spricht auch eine aktuelle Studie in Neuroblastom-Zellen, wo Survivin mittels shRNA ausgeschaltet wurde und eine Zunahme an apoptischen Zellen resultierend aus einer „Mitotic catastrophe“ beobachtet wurde (Lamers et al. 2011). Zudem wurde gezeigt, dass die eingeleitete Apoptose mit aktiviertem p53 und Caspase 2 assoziiert war. Im Vergleich zu den Daten dieser Arbeit hatte der p53 Status für die Apoptose keinen Einfluss, da in Survivin-depletierten Wildtyp-Zellen von HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen keine Zunahme in der Fraktion apoptotischer Zellen zu verzeichnen war als in den jeweiligen p53-defizienten Zellen (Abb. 19). Ganz im Gegenteil, der Verlust von p53 war mit einer leicht erhöhten Zunahme an toten Zellen verbunden. Es wäre interessant zu wissen, welche Auswirkung das Ausschalten von p53 in der Studie von Lamers et al. auf die Apoptose gehabt hätte.

Die Verwendung von Annexin-V zeigte insgesamt höhere Werte für tote Zellen als die SubG1 Analyse, wobei die Survivin-vermittelten Effekte in beiden Analysemethoden sichtbar wurden. Der Ansatz des Apoptose Nachweises ist bei beiden Methoden grundsätzlich verschieden. Annexin-V führt den Nachweis über Veränderungen der Zellmembran von apoptotischen Zellen. Es ist möglich, dass diese Methode sensitiver ist als das Auswaschen von DNA Fragmenten in der SubG1 Analyse. Empirisch gesehen ist dieser generelle Anstieg an toten Zellen in der Annexin-V-Analyse vermutlich auf die Verwendung von Trypsin zum Ablösen adhärenter Zellen zurückzuführen, was einen Einfluss auf die Membranintegrität der Zellen hat. Zudem ist diese Methode anfälliger gegenüber Zentrifugations- und Resuspendierungsschritten.

Über die Beeinträchtigung der Zytokinese durch zunehmende Polyploidie sowie das Auftreten von multipolaren Spindeln hinaus zeigen die Ergebnisse der FACS-, indirekten Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analyse einen Anstieg an p53 und p21^{waf/cip} in Wildtyp HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen mit funktionellem p53 nach einer Survivin Depletion, im Vergleich zu den Kontroll-shRNA-transduzierten bzw. Survivin-depletierten und p53-defizienten Zellen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass mit zunehmenden Polyploidiegrad der Zellen ein zeitabhängiger Anstieg an p53 und p21^{waf/cip} in Survivin-depletierten HCT116 wt Zellen zu verzeichnen war (Abb 15).

Auffällig war, dass in der FACS-Analyse (Abb. 15 B) in den Survivin-depletierten Zellen nach 100h ein erneut starker (hoher) 2n Peak auftrat. Ein ähnliches Bild zeigen auch die shLuc transduzierten Kontrollzellen, dort allerdings schon nach 72h. Generell konnte man dieses Bild häufiger beobachten, wenn Zellen länger kultiviert wurden und sie in ihrer Kultivierungskammer (Well) eine Konfluenz von fast 100 Prozent erreichten. Dieser Anstieg im 2n Peak ist demnach vermutlich dem Platzmangel geschuldet, der die Zellen mit 2n in der G1 Phase arretierte. Von den Survivin depletierten Zellen waren zwar zu den jeweiligen Zeitpunkten empirisch gesehen weniger Zellen aufgrund der Zytokinesdefekte vorhanden, die Wells oder Schalen aber wegen der Größe der Zellen (polyploid) trotzdem dicht. Durch die Puromycin-Selektion der Zellen sollten nicht-transduzierte Zellen zwar eliminiert werden, es garantiert aber nicht, dass Zellpopulationen existieren, die eine basale Survivin Expression aufweisen, weil eventuell der Provirus/Zelle nicht ausreichend war. Das führte auch dazu, dass die weiteren Versuche nach 72h beendet wurden um diese Effekte zu minimieren.

p21^{waf/cip} ist ein transkriptionelles Ziel von p53 (el-Deiry et al. 1993) und ein Cdk-Inhibitor, der nach DNA Schäden Komplexe aus Cdk4/6 und Cyclin D sowie Cdk2 und Cyclin E binden und inhibieren kann (He et al. 2005) und im G1 als auch im G2 Kontrollpunkt eine Rolle spielt (Giono & Manfredi 2006). Die Analyse von Zellzyklus-abhängigen Cyclinen zeigte parallel zu der p53/p21^{waf/cip} Akkumulierung eine zeitabhängige Zunahme an Cyclin D1 und Cyclin E in FACS und Western Blot-Analysen von Survivin-depletierten HCT116 wt und U87-MG wt Zellen. Dies deutet auf einen p53-abhängigen Arrest der Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus hin. In einer kombinierten FACS-Analyse konnte

zudem festgestellt werden, dass die Expression des Cdk Inhibitors $p21^{waf/cip}$ sowie Cyclin D1 tatsächlich mit dem Polyploidiegrad von Survivin depletierten Wildtyp-Zellen korreliert (Abb. 17), d.h. nur die polyploiden HCT116 Zellen mit funktionellem p53 zeigen einen $p21^{waf/cip}$ -abhängigen G1 Arrest.

Interessanterweise zeigte die quantitative Analyse der 8n und >8n Phasen keinen signifikanten Unterschied im Polyploidiegrad, wenn man Survivin depletierte HCT116 Wildtyp Zellen mit p53-defizienten Zellen vergleicht (Abb. 16 B), wohl wissend, dass die Wildtyp Zellen biochemisch einen Arrest aufweisen. Eine BrdU Inkorporationsanalyse zeigte, 72h nach der Transduktion einer shRNA gegen Survivin, dass HCT116 Zellen mit funktionellem p53 weniger BrdU inkorporierten und damit langsamer proliferierten als die p53-defizienten isogenetischen Zellen (Abb. 18 B). Ein Vergleich zwischen beiden Gruppen, bezogen auf die BrdU Inkorporation in S1-, S2- sowie 2n, 4n und 8n-Phasen, machte deutlich, dass zwischen 2n und 4n der p53 Status keine Rolle spielte. Erst mit einem DNA Gehalt > 4n zeigen Wildtyp Zellen eine Abnahme des BrdU Einbaus (Abb 18b) und korrelieren dadurch negativ mit den Ergebnissen für Cyclin D/ $p21^{waf/cip}$.

Aber es zeigte sich auch, dass polyploide Wildtyp Zellen mit einem DNA Gehalt > 4n BrdU einbauten. Die Endoreplikation von Wildtyp Zellen nach einem RNAi vermittelten Survivin „knock down“ trotz der Expression von $p21^{waf/cip}$ sowie der weitere Einbau von BrdU in Zellen mit einem DNA Gehalt >4n deutet darauf hin, dass diese Zellen einen p21-abhängigen G1 Arrest initiieren, dieser aber nur transient ist.

Eine Abnahme in der BrdU Inkorporation war auch in polyploiden HCT116 $p53^{-/-}$ zu detektieren. Wie bereits erwähnt, fiel diese Abnahme geringer aus als im Vergleich mit den Wildtyp Zellen. Dies deutet ebenfalls auf einen p53-unabhängigen Mechanismus hin, der in polyploiden Zellen für eine langsamere Proliferation sorgt. Die Erfahrungen der Immunfluoreszenzanalysen von polyploiden MCF-7 Zellen zeigen, dass hochgradig polyploide Zellen fast dreimal bis viermal so groß sind im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zudem muss während der Synthesephase bei 8n mit normaler Chromosomenzahl ($n=23$) schon 184 Chromosomen repliziert werden. Der transkriptionelle und translationale Aufwand zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase muss demnach immens sein.

Anfang der Jahrtausendwende wurde von Andreassen ein „Tetraploidie Checkpoint“ diskutiert, der auf den Ergebnissen von Untersuchungen mit Spindel Giften wie Colchicin, Cytochalasin und Nocadazol beruhte. Diese Substanzen beeinträchtigen die Zytokinese bzw. Mitose, indem sie mit dem Spindelapparat interagieren und den SAC aktivieren (Andreassen et al. 2001). Nach einer Weile wird dieser Checkpoint übergangen, was als „mitotic Slippage“ bezeichnet wird. Die Zellen traten ohne vollständige Zytokinese mit einem tetraploiden DNA-Gehalt in die G1 Phase ein, wo sie p53-abhängig arretierten (Rieder & Maiato 2004).

Dieser Kontrollpunkt sollte die Anzahl an DNA bzw. Chromosomen detektieren und so von Aneuploidy und einer Tumorgenese schützen. In den letzten Jahren ist dieser „Tetraploidy Checkpoint“ aus dem Focus geraten, da Untersuchungen zeigten, dass die p53 Aktivierung auf eine hohe Konzentration der Substanzen zurück zu führen war (Uetake & Sluder 2004) und durch Fusion generierte tetraploide Zellen durchaus proliferierten (C. Wong & Stearns 2005). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dagegen. Survivin-depletierte polyploide Zellen mit funktionellem p53 zeigen keine Anzeichen eines permanenten Arrestes nach einer fehlerhaften Zytokinese wie die BrdU Inkorporationsanalyse belegt. Auch HCT116 wt, MCF-7 wt und U87 wt Zellen proliferieren weiter und erreichen nach 72h einen DNA Gehalt von >16n.

Anhand des Proteomprofilers sowie der Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers in einer Westernblot Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die RNAi vermittelte Survivin Depletion in HCT116 Wildtyp Zellen zu einer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 führte (Abb. 21, Abb 26). Die Phosphorylierung an p53 S15 erfolgt nach DNA Schäden durch die DNA Sensorinasen ATM, ATR und DNA-PK bzw. durch die Effektorinasen CHK1 und CHK2 (Banin et al. 1998; Tibbetts et al. 1999; Lees-Miller et al. 1992; Appella & Anderson 2001; Kastan et al. 1991; Kruse & Gu 2009) und trägt zur Stabilisierung und Resistenz gegenüber Mdm2 bei (Meek & Anderson 2009). Die Auswertung der densitometrisch bestimmten Werte sowohl für den Proteomprofiler als auch für die Western Blot Analyse für die Phosphorylierung an S15 ergab, dass durch den Survivin Verlust in Wildtyp Zellen das Expressionslevel an phosphorylierten p53 S15 im Vergleich zur shLuc Kontrolle um den Faktor 2 und 3 stieg. Die Phosphorylierungen hingegen an S46 und

S392 verzeichneten durch den Survivin Verlust nur einen Anstieg um den Faktor 1,3 (S46) bzw. 1,2 (S392). Interessanterweise war in den Zelllysaten nur eine Aktivierung des Volllängen-p53 Proteins in den Survivin-depletierten Wildtyp Zellen zu verzeichnen, was darauf hin deutet, dass die Phosphorylierung an S15 für die Stabilisierung des Proteins wichtig ist. Es ist nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von p53 an S15, T18 und S20 im Bereich der Transaktivierungs Domäne 1 die Interaktion mit Mdm2 stört und dadurch p53 stabilisiert wird (Shieh et al. 1997; Sakaguchi et al. 2000; Schon et al. 2002; Chehab et al. 1999; Unger et al. 1999). Gleichzeitig wird dadurch die Interaktion von p53 mit dem p300/CPB Komplex gesteigert (Lambert et al. 1998; Finlan & Hupp 2004; Dornan et al. 2003). p300/CBP ist ein Koaktivator von p53 (Avantaggiati et al. 1997; Gu & Roeder 1997) der p53 am C-Terminus acetyliert, was die Ubiquitylierung durch Mdm2 und damit die Degradation von p53 unterbindet (Gu & Roeder 1997; Tang et al. 2008; Muiyang Li et al. 2002; Ito et al. 2001). Des Weiteren verhindert die Acetylierung von Mdm2 durch p300/CBP die Interaktion von p53-Mdm2 (X. Wang et al. 2004a).

Die Daten des Proteomprofilers zeigten ebenfalls einen Rückgang an phosphorylierten STAT5b Y699 sowie phosphorylierten CREB S133 in Survivin-depletierten Wildtyp Zellen im Vergleich zur shLuc Kontrolle. STAT5b ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Cytokine IL2 und IL4 an Tyrosin 699 phosphoryliert und aktiviert wird (Lin et al. 1996) und antiapoptotisch bzw überlebensfördernd wirkt. Mit STAT5a hat es ca. 94% der Aminosäuresequenz gemeinsam. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass p53 die Transkription eines STAT5-abhängigen Reportergens reprimiert und diese Repression nicht auf ein verändertes Proteinlevel von STAT5 zurückzuführen war (Fritsche et al. 1998). Es ist zu vermuten, dass die verringerte Phosphorylierung von STAT5b Y699 in Survivin-depletierten HCT116 Wildtyp Zellen auf die p53 Induktion durch den Verlust an funktionalen Survivin zurückzuführen ist und es dadurch zur Unterbindung der Transkription von anti-apoptotischen Genen kommt.

Die Phosphorylierung von CREB an S133 ist wichtig für die Bindung mit dessen Coaktivator CBP (CREB Binding Protein) und die damit verbundene Expression von Zielgenen (Johannessen & Moens 2007). Auch durch ATM kann CREB nach DNA Schäden an T100, S111 und S121 phosphoryliert werden. Diese ATM induzierte Phosphorylierung wirkt der Bindung von CREB und CBP entgegen (Yuling Shi et al. 2004). Eine aktivierte ATM Kinase konnte in

Survivin-depletierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Vermutlich unterbindet die ATM-abhängige Phosphorylierung von T100, S111 und S121 in unmittelbarer Nachbarschaft die Phosphorylierung an S133, indem Bindungsstellen für weitere Kinasen blockiert werden.

Weitere Kinasen wie p38 α oder CHK2, die p53 an verschiedenen Serin- und Threoninresten phosphorylieren können sowie Cdk Inhibitoren wie p27 zeigten im Proteomprofiler dagegen keine erhöhte Expression. Es ist nicht auszuschließen, dass man mit dieser Methode falsch negative Ergebnisse erhält, da Antikörper eine unterschiedliche Affinität zu ihrem Epitop haben. Die sehr starke Signalaktivität der p53 und CREB Spots limitierte die Detektionszeit der Membranen. So konnte in weiteren Western Blot bzw. indirekten Immunfluoreszenz-Analysen mit einem CHK2 T68-phosphospezifischen Antikörper durchaus eine Aktivierung von CHK2 festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Aktivierung der DNA Reparatur Mechanismen durch das Ausschalten von Survivin mittels shRNA beschrieben werden. So konnte in FACS-, indirekten Immunfluoreszenz- und Westernblot-Analysen von Survivin-depletierten HCT116, MCF-7 und U87-MG Zellen die aktivierten Sensorinasen ATM, DNA-PK und Effektor kinase CHK2 sowie eine erhöhte γ H2AX Expression festgestellt werden. Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von MCF-7 und U87-MG Zellen bestätigten, dass aktivierte DNA-PK, ATM, CHK2 und γ H2AX kolokalisiert vorlagen und distinkte Foci bildeten. Diese distinkten γ H2AX Foci unterschieden sich dabei von γ H2AX Färbungen, die durch Apoptose induziert wurden (Solier et al. 2009). γ H2AX ist ein Marker, der Chromatin in unmittelbarer Nähe von Doppelstrangbrüchen (DSB) markiert. Das Auftreten von DSB nach Survivin Verlust konnte demnach in drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie ihren isogenetischen p53-defizienten Varianten durch drei unterschiedliche Methoden detektiert werden. Zudem wurde anhand von SKY-Karyogrammen nachgewiesen, dass Survivin depletierte, polyploide Zellen numerische als auch strukturelle Chromosomenaberration in Form von Brüchen, dizentrischen Chromosomen und Translokation aufweisen. Der Verlust an Survivin induziert demnach DNA Schäden und eine Aktivierung der „DNA Damage Response“.

Verschiedene Studien berichteten von DNA Schäden und numerischen bzw. chromosomalen Aberration nach einer Beeinträchtigung der Chromosomen-segregation in der Mitose durch Spindelgifte (Aardema et al. 1998; Quignon et al. 2007; Dalton et al. 2007; Janssen et al. 2011) sowie dem Ausschalten oder der Überexpression von Proteinen des SAC (Rajagopalan et al. 2004; Sotillo et al. 2007; Guerrero, Gamero, et al. 2010a). So führte die Interferenz mit Kinetochorproteinen sowie mit Regulatoren des SAC ebenso zu Chromosomenbrüchen, dizentrischen Chromosomen γ H2AX Foci, Mikronuklei und Spindeldefekten in Form von multipolaren Spindeln (Dalton et al. 2007; Rajagopalan et al. 2004; Guerrero, Gamero, et al. 2010a). Dalton et al. konnte nachweisen, dass die γ H2AX Foci unabhängig von einer Apoptose sind (Dalton et al. 2007). Zwei Studien beschreiben zudem einen G1 Arrest durch die Akkumulierung von p53, einhergehend mit der Phosphorylierung an p53 S15, p21 und Cyclin D (Quignon et al. 2007) sowie ATM/CHK2 (Janssen et al. 2011). Als eine Ursache für das Auftreten von DNA Schäden wird dabei die Ausbildung von merotelischen Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen gesehen (Guerrero, Gamero, et al. 2010a; Crasta et al. 2012; Janssen et al. 2011). So führen merotelische Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen zu Chromosomenbrüchen durch die auf die Centromeren wirkende physikalischen Kräfte (Guerrero, Martínez-A, et al. 2010b). Bei einer einzelnen merotelischen Verbindung reichen ca. 10 Mikrotubuli vom Kinetochor zu einem Pol und fünf zu dem entgegengesetzten (Cimini et al. 2001). Die dabei durch die 15 Mikrotubuli generierte Kraft von 750 pN ist deutlich höher als die Zugfestigkeit der DNA von 250 pN (MacKerell & Lee 1999). Ein weiteres Merkmal für eine fehlerhafte Segregation der Chromosomen aufgrund merotelischer Verbindungen ist die Existenz von Mikronuklei (Abb. 20), DNA Fragmenten die zusätzlich zu einem primären Nukleus im Zytosol existieren, und durch „lagging Chromosomes“ oder auch azentrische Chromosomen-fragmente entstehen können. Zwei Studien zeigen, dass „lagging Chromosomes“ aufgrund merotelischer Verbindungen bei der einsetzenden Zytokinese (Janssen et al. 2011) oder spätere Replikation der DNA (Crasta et al. 2012) beschädigt bzw. zerstört werden. Merotelische Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen können spontan während der Prometaphase oder auch durch multipolare Spindeln entstehen (Ganem et al. 2009; Silkworth et al. 2009; Paul et al. 2009; Gregan et al. 2011).

Es ist demnach anzunehmen, dass die Ausbildung multipolarerer Spindeln sowie die Beeinträchtigung des SAC in Survivin-depletierten Zellen zu einer Bildung merotelischer Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen führen. Survivin ist ein Bestandteil des „Chromosomalen Passenger Complexes“, der eine bedeutende Rolle im SAC und der Zytokinese spielt. In zwei unabhängigen Arbeiten (Carvalho et al. 2003; Lens et al. 2003) konnte nachgewiesen werden, dass Survivin für die Lokalisation von BubR1 und Mad2, zwei Sensormolekülen des SAC, an den Kinetochoren benötigt wird, wenn eine Aktivierung des Spindle Checkpoints durch eine fehlende Zugspannung erfolgt. In Survivin-defizienten Zellen fehlte Mad2 und BubR1 im Bereich der Kinetochoren nach Aktivierung des Spindle Checkpoints durch Taxol. Gleichzeitig sorgt Survivin für die Lokalisation der Aurora B Kinase im Bereich der Centromeren (Vader, Kauw, et al. 2006a; Vader, Medema, et al. 2006b). Eine Vielzahl an Studien belegt die Rolle der Aurora B Kinase in der Korrektur merotelischer Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen (Knowlton et al. 2006; Cimini et al. 2006; D. Liu et al. 2009). Aurora B akkumuliert in Bereichen fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen und eine Aurora B Inhibierung führt zu einer Zunahme an merotelischen Verbindungen (Knowlton et al. 2006; Cimini et al. 2006). Gleichzeitig ist anzunehmen, dass es durch den Survivin Verlust zu einer Beeinträchtigung der Aurora B Lokalisation in der Zytokinese kommt, wo die Aurora B Kinase an der Ausbildung des kontraktilen Ringes beteiligt ist (Carmena et al. 2009). Das führt zu einem Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus und zu einer erneuten Endoreplikation der DNA. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Aurora B Inhibierung durch AZD1152-HQPA (Abb. 27), die wie der Survivin Verlust zu Polyploidie, einer Aktivierung der DNA Damage Response als auch zu einer Induktion von p53/p21^{waf/cip} in Wildtyp HCT116 Zellen führen. Dies lässt den Schluss zu, dass die beobachteten Effekte des Survivin Verlustes primär auf die Rolle des Survivins als Bestandteil des CPC zurückzuführen sind.

Auffällig war, dass die SKY Analysen von Survivin-depletierten Zellen auch numerische Chromosomenaberrationen aufwiesen (Abb. 28). Ursache für den Verlust können dabei „lagging Chromosomes“ aber auch Brüche von Chromosomen in der Centromerregion (azentrische Chromosomen) sein, die keine Verbindungen zum Spindelapparat herstellen können und dann in der Interphase als Mikronuklei degradiert werden.

Die Verwendung eines Inhibitors gegen ATM und ATR (CGK733) konnte in Survivin depletierten HCT116 wt Zellen die Akkumulierung von p53 und p21 sowie die Phosphorylierung an S15 von p53 unterbinden (Abb. 26). D.h. die Aktivierung von p53 erfolgt über ATM und ATR.

CGK733 ist 2006 als Inhibitor von ATM und ATR beschrieben wurden, der in der Lage ist, seneszente Zellen umzuprogrammieren und wieder zum proliferieren zu bringen. Allerdings wurde die Originalveröffentlichung 2008 zurückgezogen (Won et al. 2006). Die Kritikpunkte bezogen sich auf die Identifizierung von CGK733 an sich und die Identifizierung von ATM als Ziel von CGK733 mittels MAGIC. Seitdem erschienen mehrere Veröffentlichungen mit dieser Substanz als ATM/ATR Inhibitor (Cruet-Hennequart et al. 2008; Goldstein et al. 2008; Bhattacharya et al. 2009; Hill et al. 2011; Neganova et al. 2011), allerdings bleibt die Wirkungsweise dieser Substanz umstritten (Alao & Sunnerhagen 2009; Choi et al. 2011; Kim 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CGK733 durchaus in der Lage ist, die Signaltransduktion nach Doxorubicin induzierten DNA Schäden zu inhibieren und eine Akkumulation von p53/p21^{waf/cip} sowie damit einhergehend Cyclin D1/E zu unterbinden. Es ist zu vermuten, dass CGK733 das ATM Dimer auch nach Phosphorylierung von S1981 stabilisiert, und es dadurch keine aktiven Monomere bilden kann. Das würde den inhibitorischen Effekt der Substanz auch nach einer Phosphorylierung von ATM an S1981 sowohl in shLuc transduzierten als auch shSurv transduzierten HCT116 wt Zellen erklären.

Die Inhibition von DNA-PK durch Nu7026 hatte keinen Einfluss auf die Gesamt-Proteinlevel von p53 und p21. Allerdings trägt die DNA-PK zur Phosphorylierung von p53 an S15 und CHK2 T68 bei. Die Kombination des DNA-PK Inhibitors mit einem ATM Inhibitor führte ebenfalls zu einem Rückgang an phosphorylierten ATM S1981, p53 S15 und CHK2 T68, der stärker ausfiel als der DNA-PK Inhibitor allein, was keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Gesamt Proteinlevel von p53 und p21 hat. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen von Survivin depletierten MCF-7 Zellen konnte eine aktive DNA-PK, die mit den γ H2AX und ATM Foci kolokalisiert ist, nachgewiesen werden. Die Kolokalisation erklärt auch den Rückgang der Phosphorylierung von ATM an S1981 in Survivin-defizienten HCT116 wt Zellen. Bisherige Studien zeigen,

dass DNA-PK nach DNA Schäden ATM S1981, p53 S15 und CHK2 T68 phosphorylieren kann (Lees-Miller et al. 1992; Jia Li & Stern 2005; Chen et al. 2007; Yajima et al. 2006). Eine bedeutende Rolle spielt die DNA-PK in „Non Homologous End Joining“-Reparatur (NHEJ) von DNA Schäden (Kurimasa et al. 1999; Kienker et al. 2000), wo es an die Doppelstrangbruchenden binden kann und weiterer Reparaturmoleküle rekrutiert (Ciccia & Elledge 2010). Dabei werden die DSB Enden, unabhängig von einer Homologie, miteinander verbunden. Dieser Prozess ist sehr schnell und effizient, allerdings kann es zu Sequenzänderungen und damit zu Mutationen kommen, da die DSB Enden meist modifiziert werden müssen, um Ligations fähige Enden zu erhalten und es nicht garantiert ist, dass die ursprünglichen Enden miteinander ligiert werden (Critchlow & Jackson 1998; Mahaney et al. 2009). Die NHEJ vermittelte DNA Reparatur kann in allen Phasen des Zellzyklus auftreten, bevorzugt aber in G1 (Takata et al. 1998; Rothkamm et al. 2003). Im Vergleich zur DNA-Reparatur durch Homologe Rekombination (HR) benötigt die NHEJ ca. 30-90 min, wohingegen die HR ca. 7h für die Reparatur von DNA Schäden benötigt (Z. Mao et al. 2008; Metzger & Iliakis 1991). Die Reparatur der DNA Schäden nach Survivin Verlust, primär durch NHEJ, würde auch den transienten Arrest der Zellen mit funktionellem p53 in G1 erklären, da die Reparatur sehr schnell vollzogen ist und in den Sky Karyogrammen fehlerhafte Chromosomenligationen in Form von Translokationen, dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen auftraten. Die Verwendung der Inhibitoren unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, d.h. des retroviralen, shRNA-vermittelten Ausschalten von Survivin, war schwierig über einen längeren Zeitpunkt durchzuführen. Insgesamt wurden die Zellen von der ersten Transduktion bis zur Zelllyse bzw. Zellfixierung für fünf Tage kultiviert. Die Inhibitoren wurden erst 24h vor der Zelllyse hinzu gegeben. Ein längere Anwendung >24 h war auch in Kontrollzellen mit Nebeneffekten in Form von morphologischen Veränderungen, einer geringeren Proliferation und erhöhten Apoptose verbunden. Dies hätte dann wiederum die Effekte des Survivin Verlustes maskiert, da nur proliferierende Zellen eine Endoreplikation durchführen bzw. in die Mitose gehen. Insofern müssen weiterführende Studien, in denen ATM, DNA-PK und ATR mittels RNA-Interferenz spezifisch ausgeschalten werden, zeigen, welchen Einfluss die einzelnen Kinasen auf die Stabilisierung von p53 haben. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass

DNA-PK. ATM und ATR für eine Phosphorylierung an S15 von p53 verantwortlich sind.

Obwohl die Verwendung eines ATM/ATR Inhibitors die Stabilisierung von p53 in Survivin-depletierten Zellen unterband, ist nicht auszuschließen, dass durch die Beeinträchtigung der Mitose und den daraus entstehenden Defekten wie abnormale Centrosomen oder Zellstress aufgrund der Größe der Zellen weitere Faktoren existieren, die zu einer Stabilisierung von p53 beitragen.

So zeigten Studien, dass abnormale Centrosomen zu einem p53/p21^{waf/cip}-abhängigen G1 Arrest führen, der über die Stresskinase p38 erfolgte (Srsen et al. 2006; Mikule et al. 2007). Anhand der auf dem Proteomprofiler befindlichen Antikörper gegen p38 T180/Y182 konnte jedoch keine Aktivierung festgestellt werden. Allerdings ist eine Aktivierung durch die schon diskutierten Limitierungen des Proteomprofilers nicht auszuschließen. Ein weiteres Molekül ist das centrosomale Protein Lats2. In Zellen, in denen der Spindelapparat durch Nocadazol zerstört wurde, kam es zu einer Translokation des Moleküls vom Centrosom in den Zellkern und zu einer Interaktion und Inhibierung von Mdm2, dass zu einer Stabilisierung von p53 und zu einem tetraploiden G1 Arrest führte (Aylon et al. 2006). Dagegen sprechen allerdings die Beobachtungen von Survivin-depletierten Zellen, die trotz funktionellem p53 einen Karyotyp $> 4n$ erreichen.

Zuletzt zeigten Ha et al., dass BubR1, eine mitotische Checkpointkinase, nach Störung des Spindelapparates durch Nocadazol in der Lage ist, p53 direkt zu phosphorylieren. Ein „knock down“ von BubR1 führte in Nocadazol behandelten HCT116 Zellen zu einer Endoreplikation, wie es auch bei p53 negativen Zellen beschrieben ist (Ha et al. 2007).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse folgenden Schluss zu (Abb. 29). Der Verlust an Survivin betrifft primär seine Rolle als CPC. Eine Interferenz mit Survivin führt zu einer Beeinträchtigung des SAC und der Zytokinese, was zu polyploiden Zellen führt. Durch die Beeinträchtigung des SAC können sich merotelische Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen bilden, die nochmal verstärkt in polyploiden Zellen durch multipolaren Spindeln auftreten.

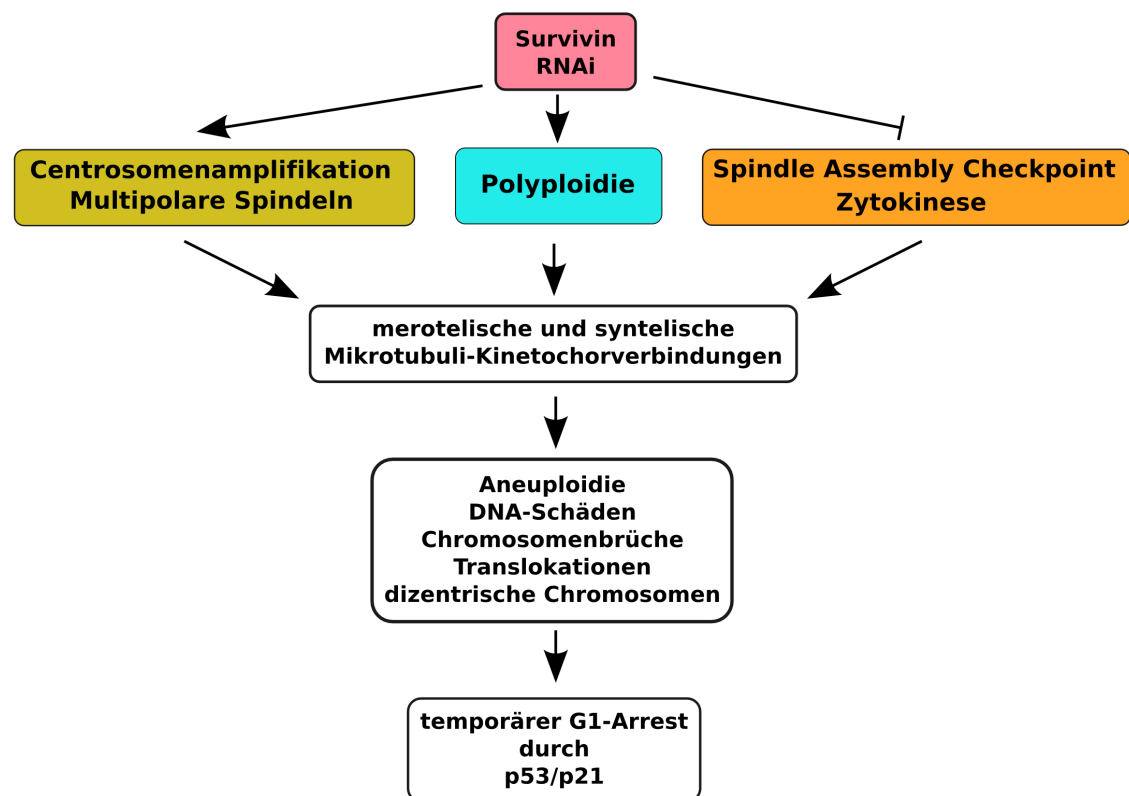


Abb. 29 Modell für die Aktivierung von p53 und p21^{waf/cip} (p21) nach Survivin RNAi. Der „knock down“ von Survivin führt zu einer Beeinträchtigung des Spindle Assembly Checkpoints (SAC) sowie der Zytokinese. Gleichzeitig treten durch den Survivin Verlust Polyploidie und multipolare Spindeln auf. Die multipolaren Spindeln als auch der beeinträchtigte SAC führen zur Ausbildung von mero- und syntelischen Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen. Dadurch kommt es zu numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Die Aktivierung der DNA Damage Response, durch auftretende DNA Schäden, führt zur Stabilisierung von p53 und der Induktion von p21^{waf/cip}, was letztlich in einem G1 Arrest resultiert bis die DNA Schäden behoben sind.

Merotelische Verbindungen führen initial durch die physikalischen Kräfte zu Brüchen der Chromosomen, die daraufhin die DNA-Reparatur Mechanismen aktivieren und in Zellen mit funktionellem p53 einen transienten, p53/p21^{waf/cip}-abhängigen G1 Arrest initiieren. In dieser Phase können die Brüche der Chromosomen durch NHEJ repariert werden und die Zellen starten eine neue Runde der Endoreplikation und einen neuen Mitoseversuch, der wieder durch merotelische Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen neue DNA Schäden induziert. Verstärkt wird dieser Effekt vermutlich durch einen Break-Fusion-Break Mechanismus (Martínez-A & van Wely 2010), d.h. durch die NHEJ Reparatur der Brüche können dizentrische Chromosomen entstehen, die in der darauffolgenden Mitose durch eine Verbindung der zwei Centromeren mit entgegengesetzten Spindelpolen, auseinander gerissen werden.

Weiterführende Studien müssen anhand von indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit einer kombinierten Färbung von Kinetochorstrukturen und alpha-Tubulin die Existenz merotelischer Mikrotubuli-Kinetochor-verbindungen zeigen. Gleichzeitig kann durch Live-Cell-Imaging mit Histon H3-EBFP (Enhanced Blue Fluorescent Protein) und alpha-Tubulin-EGFP Proteinen Auskunft über das Auftreten von „lagging Chromosomes“ sowie das Schicksal der daraus resultierenden Mikronuklei gegeben werden. Ein weiterer Aspekt betrifft die Untersuchung der beobachteten Apoptose in Survivin depletierten Zellen durch „Mitotic Catastrophe“, resultierend aus einer Aktivierung von Caspase 2 (Lamers et al. 2011). Erst kürzlich wurde eine spektakuläre Methode beschrieben, die es ermöglicht, visuell bzw. experimentell die Zellzyklusphasen von Zellen zu verfolgen (Sakaue-Sawano et al. 2008). Live-Cell-Imaging Untersuchungen könnten so Aufschluss über die spatio-temporale Dynamik polyploider Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen, gerade in Hinblick eines temporären G1 Arrestes, geben. Das Ausschalten von ATM, DNA-PK und ATR durch spezifische siRNA oder shRNA würde einen genaueren Einblick in die Rolle dieser Moleküle nach Survivin Verlust ermöglichen, als die dagegen unspezifischen Inhibitoren, wo weitere Effekte auf andere Signalwege nicht ausgeschlossen werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass eine Interferenz mit Regulatoren des SAC zu Aneuploidie in Form von Chromosomaler Instabilität (CIN) führt. CIN, d.h. der Verlust ganzer Chromosomen bzw. Translokationen werden mit einer Tumorgenese diskutiert (Martínez-A & van Wely 2010). Dies sollt man auch in Studien, die Survivin als Target einer Therapie sehen, in Betracht ziehen, wo temporär mittels siRNA oder chemischer Substanzen Tumorzellen angegriffen werden aber auch letztendlich normale, proliferierende Zellen davon betroffen sind. Nach Absetzung der Therapie könnten diese eine Zytokinese beenden und Tochterzellen mit aneuploidem Chromosomensatz bilden. Weitere Studien müssen deshalb den Effekt des Survivin Verlustes sowie dessen Konsequenz in nicht transformierten Zellen evaluieren.

5. Zusammenfassung

Das nur 16,5 kDa große Survivin ist ein bifunktionales Protein, welches eine bedeutende Rolle in zwei wichtigen zellulären Prozessen spielt, der Apoptose und der Mitose. Aufgrund seiner BIR Domäne wird es zu den Inhibitor der Apoptose Proteine (IAP) gezählt. Diese Gruppe an Proteinen interferiert negativ mit der Aktivierung der Caspasen und wirkt somit einer Induktion der Apoptose entgegen. Neben seiner anti-apoptotischen Funktion besitzt das Survivin zudem eine essentielle Rolle bei der Segregation der Chromosomen und während der Zytokinese. In der Mitose bildet Survivin mit Borealin, INCENP und der mitotische Aurora B Kinase den Chromosomalen Passenger Complex (CPC).

Das Survivin besitzt zudem eine grosse medizinische Relevanz und gilt als Tumor-assoziiertes Antigen, da es zu den Top vier Transkripten zählt, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorentitäten überexprimiert werden, aber nicht in Normalgewebe. Diese Überexpression geht einher mit einer erhöhten Resistenz der Tumore gegenüber Chemo- und Strahlentherapie und macht Survivin zu einem idealen molekularen Ziel einer Krebstherapie mittels RNA Interferenz oder spezifischer pharmakologischer Inhibitoren.

In einer Vielzahl an Studien, in denen das Survivin-Protein mittels RNAi, dominant negativer Proteine oder „knock out“ des Survivin Genes (*BIRC5*) ausgeschaltet wurde, konnte eine Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53, einem wichtigen Mediator der Zellzyklusregulation, beobachtet werden.

Bis heute ist es weitgehend unklar, wie eine Aktivierung von p53 nach einem Survivin Verlust erfolgen kann. Zudem stellte sich die Frage, ob eine therapeutische Intervention, welche die Ausschaltung des Survivin-Proteins zum Ziel hat, neben Tumorzellen auch normales Gewebe schädigen kann. Da Tumorzellen sich von normalen Zellen insbesondere dadurch unterscheiden, dass sie Defekte in p53-Signalwegen bzw. eine inaktivierende p53-Mutation oder Gendeletion besitzen, wurde die Auswirkung einer Survivin-Depletion auf p53-positive Tumorzellen und auf isogene Tumorzellen mit ausgeschalteten p53 untersucht.

Zu diesem Zweck wurde p53 mittels RNAi in U87-MG und MCF-7 Zellen ausgeschaltet und stabile p53-defiziente Zellen generiert. Insgesamt standen

für die Untersuchungen mit HCT116, MCF-7 und U87-MG drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie ihre isogenetischen, aber p53-defizienten Derivate zur Verfügung. Survivin wurde in diesen Zellen durch einen retroviralen Vektor, der für eine shRNA (small hairpin RNA) gegen Survivin codiert, ausgeschaltet. Der Verlust an Survivin führte dabei in Wildtyp- als auch in den p53-defizienten Zellen zu Polyploidie, einer gestörten Zytokinese und multipolaren Spindeln. Zusätzlich konnte eine Induktion an p53/p21^{waf/cip} sowie eine erhöhte, p53- und Caspase 3-unabhängige Apoptose festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression an p21^{waf/cip} in Wildtyp-Zellen sowie seines potentiellen Targets Cyclin D1 mit der Zunahme an Polyploidie nach Survivin RNAi korreliert. Allerdings führt die Expression des Cdk Inhibitors p21^{waf/cip} nur zu einem transienten Arrest der Zellen, da polyploide, Survivin-depletierte Zellen BrdU inkorporierten und dadurch proliferierten. Zudem wird zum ersten Mal eine ATM/ATR abhängige „DNA Damage Response“ (DDR) in Survivin-depletierten p53-defizienten und Wildtyp Zellen beschrieben, die zu einer Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 führt. Sky-Analysen bestätigten numerische als auch schwere chromosomale Aberrationen wie Translokationen und dizentrische Chromosomen in Survivin-depletierten polyploiden Zellen. Die Inhibierung der Aurora B Kinase, einem weiteren Bestandteil des CPC, mittels eines chemischen Inhibitors zeigt analog das Auftreten von DNA Schäden, eine p53/p21^{waf/cip} Aktivierung sowie eine Zunahme an Polyploidie, wie sie für Survivin beschrieben wurde. Diese Erkenntnisse zeigen deutlich auf, dass die DNA Schäden und der p53/p21^{waf/cip}-abhängige G1 Arrest nach dem „knock down“ von Survivin aufgrund einer gestörten Mitose hervorgerufen wurde, während eine IAP-Funktion des Survivins unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht festzustellen war.

6. Literatur

- Aardema, M.J. et al., 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation research*, 410(1), pp.3–79.
- Abraham, R.T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 15(17), pp.2177–2196.
- Adams, R.R. et al., 2001. Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *The Journal of cell biology*, 153(4), pp.865–880.
- Adams, R.R. et al., 1998. pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes & Development*, 12(10), pp.1483–1494.
- Ahn, J.-Y. et al., 2002. Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *The Journal of biological chemistry*, 277(22), pp.19389–19395.
- Ahn, J.Y. et al., 2000. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer research*, 60(21), pp.5934–5936.
- Akagi, T. et al., 1999. A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene*, 18(42), pp.5785–5794.
- Alao, J.P. & Sunnerhagen, P., 2009. The ATM and ATR inhibitors CGK733 and caffeine suppress cyclin D1 levels and inhibit cell proliferation. *Radiation oncology (London, England)*, 4, p.51.
- Altieri, D.C., 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature reviews Cancer*, 8(1), pp.61–70.
- Altieri, D.C., 2006. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Current opinion in cell biology*, 18(6), pp.609–615.
- Altieri, D.C., 2001. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine*, 7(12), pp.542–547.
- Altieri, D.C., 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature reviews Cancer*, 3(1), pp.46–54.
- Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D.C., 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*, 3(8), pp.917–921.
- Andersen, M.H. et al., 2002. [Immunotherapy of cancer]. *Ugeskrift for laeger*, 164(23), pp.3008–3016.
- Andreassen, P.R. et al., 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Molecular biology of the cell*, 12(5), pp.1315–1328.
- Andrews, P.D. et al., 2004. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Developmental cell*, 6(2), pp.253–268.

- Antoni, L. et al., 2007. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nature reviews Cancer*, 7(12), pp.925–936.
- Appella, E. & Anderson, C.W., 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(10), pp.2764–2772.
- Ashkenazi, A., 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(3-4), pp.325–331.
- Avantaggiati, M.L. et al., 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, 89(7), pp.1175–1184.
- Aylon, Y. et al., 2006. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes & Development*, 20, pp.2687–2700.
- Azuhata, T. et al., 2006. Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*, 41(8), pp.1431–1440.
- Badran, A. et al., 2004. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochemical and biophysical research communications*, 314(3), pp.902–907.
- Banin, S. et al., 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, NY)*, 281(5383), pp.1674–1677.
- Banks, D.P. et al., 2000. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*, 96(12), pp.4002–4003.
- Barr, F.A. & Gruneberg, U., 2007. Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell*, 131(5), pp.847–860.
- Barrett, R.M.A., Osborne, T.P. & Wheatley, S.P., 2009. Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 8(2), pp.278–283.
- Beltrami, E. et al., 2004. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), pp.2077–2084.
- Bhattacharya, S., Ray, R.M. & Johnson, L.R., 2009. Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cellular Signalling*, 21(4), pp.509–522.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J. & Miller, L.K., 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology*, 68(4), pp.2521–2528.
- Blankenship, J.W. et al., 2009. Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *The Biochemical journal*, 417(1), pp.149–160.
- Blomberg, I., 1999. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G1/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Molecular and cellular biology*.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Branzei, D. & Foiani, M., 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(4), pp.297–308.
- Brenner, C. & Grimm, S., 2006. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*, 25(34), pp.4744–4756.
- Bringmann, H. & Hyman, A.A., 2005. A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature*, 436(7051), pp.731–734.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R., 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, NY)*, 296(5567), pp.550–553.
- Bulavin, D.V. et al., 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *The EMBO journal*, 18(23), pp.6845–6854.
- Bunz, F. et al., 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (New York, NY)*, 282(5393), pp.1497–1501.
- Büttner, S. et al., 2007. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Molecular cell*, 25(2), pp.233–246.
- Caldas, H. et al., 2005. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene*, 24(12), pp.1994–2007.
- Caldas, H., Honsey, L.E. & Altura, R.A., 2004. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer*, 4(1), pp.11–11.
- Capalbo, G. et al., 2010. Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 77(1), pp.226–234.
- Carlton, J.G. et al., 2012. ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science (New York, NY)*.
- Carmena, M., 2008. Cytokinesis: the final stop for the chromosomal passengers. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 3), pp.367–370.
- Carmena, M., Ruchaud, S. & Earnshaw, W.C., 2009. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Current opinion in cell biology*, 21(6), pp.796–805.
- Carvalho, A. et al., 2003. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *Journal of cell science*, 116(Pt 14), pp.2987–2998.
- Chai, J. et al., 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406(6798), pp.855–862.
- Chai, J. et al., 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, 104(5), pp.769–780.
- Chalamalasetty, R.B.R. et al., 2006. Influence of human Ect2 depletion and overexpression on cleavage furrow formation and abscission. *Journal of cell science*, 119(Pt 14), pp.3008–3019.

- Chantalat, L. et al., 2000. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Molecular cell*, 6(1), pp.183–189.
- Cheeseman, I.M. et al., 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, 127(5), pp.983–997.
- Chehab, N.H. et al., 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), pp.13777–13782.
- Chellappan, S.P. et al., 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6), pp.1053–1061.
- Chen, B.P.C. et al., 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *The Journal of biological chemistry*, 282(9), pp.6582–6587.
- Chen, J.-S. et al., 2004. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer gene therapy*, 11(11), pp.740–747.
- Chen, L. et al., 1997. Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272(36), pp.22966–22973.
- Chen, R.-H., 2002. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *The Journal of cell biology*, 158(3), pp.487–496.
- Chen, Z.Z. et al., 1999. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 264(3), pp.847–854.
- Choi, S. et al., 2011. CGK733 does not inhibit ATM or ATR kinase activity in H460 human lung cancer cells. *DNA repair*, 10(10), pp.1000–1; author reply 1002.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular cell*, 40(2), pp.179–204.
- Cimini, D. et al., 2006. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Current biology : CB*, 16(17), pp.1711–1718.
- Cimini, D. et al., 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *The Journal of cell biology*, 153(3), pp.517–527.
- Cobrinik, D., 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24(17), pp.2796–2809.
- Colnaghi, R. & Wheatley, S.P., 2010. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), pp.22592–22604.
- Colnaghi, R.R. et al., 2006. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *The Journal of biological chemistry*, 281(44), pp.33450–33456.
- Cosgrave, N., Hill, A.D.K. & Young, L.S., 2006. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. *Journal of molecular endocrinology*, 37(3), pp.377–390.

- Costanzo, V. et al., 2003. An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Molecular cell*, 11(1), pp.203–213.
- Crasta, K. et al., 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 482(7383), pp.53–58.
- Crescenzi, E. et al., 2008. Ataxia Telangiectasia Mutated and p21CIP1 Modulate Cell Survival of Drug-Induced Senescent Tumor Cells: Implications for Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 14(6), pp.1877–1887.
- Critchlow, S.E. & Jackson, S.P., 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends in biochemical sciences*, 23(10), pp.394–398.
- Croci, D.O. et al., 2008. Silencing survivin gene expression promotes apoptosis of human breast cancer cells through a caspase-independent pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 105(2), pp.381–390.
- Crook, N.E., Clem, R.J. & Miller, L.K., 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology*, 67(4), pp.2168–2174.
- Cruet-Hennequart, S. et al., 2008. Enhanced DNA-PK-mediated RPA2 hyperphosphorylation in DNA polymerase eta-deficient human cells treated with cisplatin and oxaliplatin. *DNA repair*, 7(4), pp.582–596.
- Dallaglio, K., Marconi, A. & Pincelli, C., 2012. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *The Journal of investigative dermatology*, 132(1), pp.18–27.
- Dalton, W.B. et al., 2007. Human cancer cells commonly acquire DNA damage during mitotic arrest. *Cancer research*, 67(24), pp.11487–11492.
- DARKEN, M.A., 1964. PUROMYCIN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS. *Pharmacological reviews*, 16, pp.223–243.
- Davenport, J., Harris, L.D. & Goorha, R., 2006. Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Experimental cell research*, 312(10), pp.1831–1842.
- Davoodi, J. et al., 2010. Neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP, is an inhibitor of procaspase-9. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), pp. 958–964.
- Davoodi, J.J. et al., 2004. Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.40622–40628.
- Dechant, R. & Glotzer, M., 2003. Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Developmental cell*, 4(3), pp.333–344.
- DeLuca, J.G. et al., 2006. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell*, 127(5), pp.969–982.
- DeLuca, J.G. et al., 2003. Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Current biology : CB*, 13(23), pp.2103–2109.
- Dierlamm, J. et al., 1999. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*, 93(11), pp.3601–3609.

- Ditchfield, C. et al., 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology*, 161(2), pp.267–280.
- Dohi, T. & Altieri, D.C., 2004. Mitochondrial dynamics of survivin and “four dimensional” control of tumor cell apoptosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 4(1), pp.21–23.
- Dohi, T., Xia, F. & Altieri, D.C., 2007. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Molecular cell*, 27(1), pp.17–28.
- Dohi, T.T. et al., 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, 114(8), pp.1117–1127.
- Dornan, D. et al., 2003. The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Molecular and cellular biology*, 23(23), pp.8846–8861.
- Douglas, P. et al., 2002. Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *The Biochemical journal*, 368(Pt 1), pp.243–251.
- Du, C. et al., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), pp.33–42.
- DuBridge, R.B. et al., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and cellular biology*, 7(1), pp.379–387.
- Duckett, C.S. et al., 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO journal*, 15(11), pp.2685–2694.
- Earnshaw, W.C. & Bernat, R.L., 1991. Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, 100(3), pp.139–146.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S. & Scott, F.L., 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 7(10), pp.988–994.
- el-Deiry, W.S. et al., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), pp.817–825.
- Elbashir, S.M. et al., 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods (San Diego, Calif)*, 26(2), pp.199–213.
- Erhardt, P., Tomaselli, K.J. & Cooper, G.M., 1997. Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *The Journal of biological chemistry*, 272(24), pp.15049–15052.
- Falck, J. et al., 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), pp.842–847.
- Finlan, L. & Hupp, T.R., 2004. The N-terminal interferon-binding domain (IBiD) homology domain of p300 binds to peptides with homology to the p53 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry*, 279(47), pp.49395–49405.

- Fortugno, P. et al., 2003. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp. 13791–13796.
- Fortugno, P. et al., 2002. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *Journal of cell science*, 115(Pt 3), pp.575–585.
- Fritsche, M. et al., 1998. p53 suppresses cytokine induced, Stat5 mediated activation of transcription. *Molecular and cellular endocrinology*, 143(1-2), pp.143–154.
- Fulda, S. & Debatin, K.M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), pp.4798–4811.
- Fulda, S. & Vucic, D., 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(2), pp.109–124.
- Fulda, S., Galluzzi, L. & Kroemer, G., 2010. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(6), pp.447–464.
- G J Den Haese, N.W.A.M.C.K.L.G., 1995. The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Molecular biology of the cell*, 6(4), p.371.
- Gadea, B.B. & Ruderman, J.V., 2006. Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), pp.4493–4498.
- Gadea, B.B. & Ruderman, J.V., 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. *Molecular biology of the cell*, 16(3), pp.1305–1318.
- Ganem, N.J., Godinho, S.A. & Pellman, D., 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*, 460(7252), pp.278–282.
- Gassmann, R. et al., 2004. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *The Journal of cell biology*, 166(2), pp.179–191.
- George, J., Banik, N.L. & Ray, S.K., 2010. Survivin knockdown and concurrent 4-HPR treatment controlled human glioblastoma in vitro and in vivo. *Neuro-oncology*, 12(11), pp.1088–1101.
- Ghosh, J.C. et al., 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 283(8), pp.5188–5194.
- Giono, L.E. & Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of cellular physiology*, 209(1), pp.13–20.
- Glotzer, M., 2009. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1), pp.9–20.
- Glotzer, M., 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science (New York, NY)*, 307(5716), pp.1735–1739.
- Goldberg, Z. et al., 2002. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *The EMBO journal*, 21(14), pp.3715–3727.

- Goldstein, M., Roos, W.P. & Kaina, B., 2008. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 229(1), pp.20–32.
- Goto, H. et al., 2003. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *The Journal of biological chemistry*, 278(10), pp.8526–8530.
- Gregan, J. et al., 2011. Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends in cell biology*, 21(6), pp.374–381.
- Gritz, L. & Davies, J., 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 25(2-3), pp.179–188.
- Gruneberg, U. et al., 2004. Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology*, 166(2), pp.167–172.
- Gu, W. & Roeder, R.G., 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90(4), pp.595–606.
- Guerrero, A.A., Gamero, M.C., et al., 2010a. Centromere-localized breaks indicate the generation of DNA damage by the mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), pp.4159–4164.
- Guerrero, A.A., Martínez-A, C. & van Wely, K.H., 2010b. Merotelic attachments and non-homologous end joining are the basis of chromosomal instability. *Cell division*, 5, p.13.
- Gyrd-Hansen, M. et al., 2008. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nature cell biology*, 10(11), pp.1309–1317.
- Ha, G.-H. et al., 2007. p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer research*, 67(15), pp. 7155–7164.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hao, Y. et al., 2004. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature cell biology*, 6(9), pp.849–860.
- Harbour, J.W. et al., 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98(6), pp.859–869.
- Hauf, S. et al., 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of cell biology*, 161(2), pp.281–294.
- Hauser, H.P. et al., 1998. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *The Journal of cell biology*, 141(6), pp.1415–1422.
- He, G. et al., 2005. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*, 24(18), pp.2929–2943.

- Hegde, R. et al., 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *The Journal of biological chemistry*, 277(1), pp.432–438.
- Hemann, M.T. & Lowe, S.W., 2006. The p53-Bcl-2 connection. *Cell death and differentiation*, 13(8), pp.1256–1259.
- Hendruschk, S. et al., 2011. RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. *Neuro-oncology*.
- Hermeking, H. et al., 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell*, 1(1), pp.3–11.
- Hickson, I. et al., 2004. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research*, 64(24), pp.9152–9159.
- Hiebert, S.W. et al., 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes & Development*, 6(2), pp.177–185.
- Hill, R. et al., 2011. DNA-PKCS binding to p53 on the p21WAF1/CIP1 promoter blocks transcription resulting in cell death. *Oncotarget*.
- Hinds, M.G. et al., 1999. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nature structural biology*, 6(7), pp.648–651.
- Hoffman, W.H.W. et al., 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), pp.3247–3257.
- Honda, R., Körner, R. & Nigg, E.A., 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Molecular biology of the cell*, 14(8), pp.3325–3341.
- Howell, B.J. et al., 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *The Journal of cell biology*, 155(7), pp.1159–1172.
- Howell, B.J. et al., 2000. Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *The Journal of cell biology*, 150(6), pp.1233–1250.
- Howell, B.J.B. et al., 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Current biology : CB*, 14(11), pp.953–964.
- Huang, Y. et al., 2003. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp.49517–49522.
- Huang, Y. et al., 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, 104(5), pp.781–790.
- Hümmer, S. & Mayer, T.U., 2009. Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current biology : CB*, 19(7), pp.607–612.
- Ito, A. et al., 2001. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *The EMBO ...*

- Janssen, A. et al., 2011. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science (New York, NY)*, 333(6051), pp. 1895–1898.
- Jantsch-Plunger, V. et al., 2000. CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 149(7), pp.1391–1404.
- Jänicke, R.U., 2008. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment*, 117(1), pp.219–221.
- Jänicke, R.U. et al., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), pp.9357–9360.
- Jessus, C. & Ozon, R., 1995. Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis. *Progress in cell cycle research*, 1, pp.215–228.
- Jeyaprakash, A.A. et al., 2007. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*, 131(2), pp.271–285.
- Jiang, W. et al., 1998. PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Molecular cell*, 2(6), pp.877–885.
- Jiang, Y. et al., 2004. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.40511–40520.
- Johannessen, M. & Moens, U., 2007. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, pp.1814–1832.
- Joza, N. et al., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), pp.549–554.
- Jun Chen et al., 2000. Down-regulation of Survivin by Antisense Oligonucleotides Increases Apoptosis, Inhibits Cytokinesis and Anchorage-Independent Growth. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(3), p.235.
- Kaitna, S. et al., 2000. Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Current biology : CB*, 10(19), pp.1172–1181.
- Kalajzic, I. et al., 2001. Use of VSV-G pseudotyped retroviral vectors to target murine osteoprogenitor cells. *Virology*, 284(1), pp.37–45.
- Kallio, M.J. et al., 2002. Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Current biology : CB*, 12(11), pp.900–905.
- Kang, B.H. & Altieri, D.C., 2006. Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), pp. 24721–24727.
- Kappler, M. et al., 2004. Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line. *Oncology reports*, 13(1), pp.167–172.

- Karimpour, S., Davoodi, J. & Ghahremani, M.-H., 2011. Integrity of ATP binding site is essential for effective inhibition of the intrinsic apoptosis pathway by NAIP. *Biochemical and biophysical research communications*, 407(1), pp.158–162.
- Kasof, G.M. & Gomes, B.C., 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), pp.3238–3246.
- Kastan, M.B. & Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), pp.316–323.
- Kastan, M.B. et al., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 51(23 Pt 1), pp.6304–6311.
- Kawajiri, A. et al., 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 coordinately with Rho-kinase. *Molecular biology of the cell*, 14(4), pp.1489–1500.
- Kawakami, H. et al., 2005. Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *International journal of cancer Journal internationale du cancer*, 115(6), pp.967–974.
- Khan, S. et al., 2009. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *British journal of cancer*, 100(7), pp.1073–1086.
- Khan, S. et al., 2011. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 16(1), pp.1–12.
- Kienker, L.J., Shin, E.K. & Meek, K., 2000. Both V(D)J recombination and radioresistance require DNA-PK kinase activity, though minimal levels suffice for V(D)J recombination. *Nucleic acids research*, 28(14), pp.2752–2761.
- Kim, T.K., 2011. This is the response to the Letter to the Editor by Bakkenist et al. regarding article “CGK733 does not inhibit ATM or ATR kinase in H460 human lung cancer cells.” *DNA repair*, 10(10), p.1002.
- Kinner, A. et al., 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17), pp. 5678–5694.
- Knecht, D.A. & Loomis, W.F., 1987. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in Dictyostelium discoideum. *Science (New York, NY)*, 236 (4805), pp.1081–1086.
- Knowlton, A.L., Lan, W. & Stukenberg, P.T., 2006. Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Current biology : CB*, 16(17), pp. 1705–1710.
- Kobayashi, K. et al., 1999. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), pp.1457–1462.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A. & Cleveland, D.W., 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews Cancer*, 5(10), pp.773–785.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1), pp.99–163.

- Kruse, J.-P. & Gu, W., 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4), pp.609–622.
- Kurimasa, A. et al., 1999. Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Molecular and cellular biology*, 19(5), pp.3877–3884.
- Kurz, E.U., Douglas, P. & Lees-Miller, S.P., 2004. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 279(51), pp.53272–53281.
- Lacalle, R.A. et al., 1989. Molecular analysis of the pac gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene*, 79(2), pp.375–380.
- LaCasse, E.C. et al., 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), pp.6252–6275.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lagacé, M. et al., 2001. Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics*, 77(3), pp.181–188.
- Lambert, P.F. et al., 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *The Journal of biological chemistry*, 273(49), pp.33048–33053.
- Lamers, F. et al., 2011. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocrine-related cancer*, 18(6), pp.657–668.
- Lan, W. et al., 2004. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Current biology : CB*, 14(4), pp.273–286.
- Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), pp.15–16.
- Lees-Miller, S.P. et al., 1992. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Molecular and cellular biology*, 12(11), pp.5041–5049.
- Lens, S.M.A. et al., 2003. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *The EMBO journal*, 22(12), pp.2934–2947.
- Lens, S.M.A., Rodriguez, J.A., et al., 2006a. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Molecular biology of the cell*, 17(4), pp.1897–1909.
- Lens, S.M.A., Vader, G. & Medema, R.H., 2006b. The case for Survivin as mitotic regulator. *Current opinion in cell biology*, 18(6), pp.616–622.
- Leung, C.G. et al., 2007. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), pp.1603–1611.
- Li, Changqing et al., 2008. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Science*, 17(9), pp.1624–1629.
- Li, F & Altieri, D.C., 1999a. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical journal*, 344 Pt 2, pp.305–311.

- Li, F et al., 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396(6711), pp.580–584.
- Li, F et al., 1999. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature cell biology*, 1(8), pp.461–466.
- Li, F F & Altieri, D.C.D., 1999b. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer research*, 59(13), pp.3143–3151.
- Li, Jia & Stern, D.F., 2005. Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 280(12), pp.12041–12050.
- Li, Jing et al., 2010. Cytokinesis and cancer: Polo loves ROCK“n” Rho(A). *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 37(3), pp.159–172.
- Li, L-Y, Luo, X. & Wang, X., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), pp.95–99.
- Li, Muyang et al., 2002. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *The Journal of biological chemistry*, 277(52), pp.50607–50611.
- Li, P et al., 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), pp.479–489.
- Lin, J.X. et al., 1996. Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(18), pp.10738–10744.
- Liston, P. et al., 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379(6563), pp.349–353.
- Liu, D. et al., 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science (New York, NY)*, 323(5919), pp.1350–1353.
- Liu, Q.Q. et al., 2000a. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development*, 14(12), pp.1448–1459.
- Liu, Z. et al., 2000b. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, 408(6815), pp.1004–1008.
- Lonze, B.E. & Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), pp.605–623.
- Lopez-Girona, A.A. et al., 2001. Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp.11289–11294.
- Lundberg, A.S. & Weinberg, R.A., 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and cellular biology*, 18(2), pp.753–761.
- Luo, X. et al., 2004. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nature structural & molecular biology*, 11(4), pp.338–345.

- Luo, X.X. et al., 2001. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Molecular cell*, 9 (1), pp.59–71.
- Mabuchi, I. & Okuno, M., 1977. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *The Journal of cell biology*, 74(1), pp.251–263.
- Mackay, A.M. et al., 1998. A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 140(5), pp.991–1002.
- MacKerell, A.D. & Lee, G.U., 1999. Structure, force, and energy of a double-stranded DNA oligonucleotide under tensile loads. *European biophysics journal : EBJ*, 28 (5), pp.415–426.
- Mahaney, B.L., Meek, K. & Lees-Miller, S.P., 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal*, 417(3), pp.639–650.
- Mahotka, C. et al., 1999. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer research*, 59(24), pp.6097–6102.
- Mailand, N. et al., 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science (New York, NY)*, 288(5470), pp.1425–1429.
- Mailand, N. et al., 2002. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5911–5920.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer*, 9(3), pp.153–166.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), pp.630–641.
- Mao, Y., Abrieu, A. & Cleveland, D.W., 2003. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell*, 114(1), pp.87–98.
- Mao, Z. et al., 2008. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA repair*, 7(10), pp.1765–1771.
- Martínez-A, C. & van Wely, K.H.M., 2010. Are aneuploidy and chromosome breakage caused by a CINGle mechanism? *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 9(12), pp.2275–2280.
- Marusawa, H. et al., 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO journal*, 22(11), pp.2729–2740.
- Matsumura, F., 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends in cell biology*, 15(7), pp.371–377.
- Maya, R. et al., 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & Development*, 15(9), pp.1067–1077.
- Meek, D.W. & Anderson, C.W., 2009. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), p.a000950.

- Mehlen, P. & Bredesen, D.E., 2011. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science signaling*, 4(157), p.mr2.
- Mendoza, M. et al., 2009. A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nature cell biology*, 11(4), pp.477–483.
- Mera, S.S. et al., 2007. Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(1), pp.149–155.
- Metzger, L. & Iliakis, G., 1991. Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells. *International journal of radiation biology*, 59(6), pp.1325–1339.
- Mikule, K. et al., 2007. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nature cell biology*, 9(2), pp.160–170.
- Minoshima, Y. et al., 2003. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Developmental cell*, 4(4), pp.549–560.
- Mirza, A. et al., 2002. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 21(17), pp.2613–2622.
- Mishima, M. et al., 2004. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*, 430(7002), pp.908–913.
- Mishima, M., Kaitna, S. & Glotzer, M., 2002. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Developmental cell*, 2(1), pp.41–54.
- Mollinari, C. et al., 2002. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *The Journal of cell biology*, 157(7), pp.1175–1186.
- Murata-Hori, M., Tatsuka, M. & Wang, Y.-L., 2002. Probing the dynamics and functions of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, 13(4), pp.1099–1108.
- Murthy, K. & Wadsworth, P., 2008. Dual role for microtubules in regulating cortical contractility during cytokinesis. *Journal of cell science*, 121(Pt 14), pp.2350–2359.
- Musacchio, A. & Salmon, E.D., 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), pp.379–393.
- Neef, R. et al., 2007. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nature cell biology*, 9(4), pp.436–444.
- Neef, R. et al., 2006. Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis. *Current biology : CB*, 16(3), pp.301–307.
- Neganova, I. et al., 2011. An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(4), pp.651–659.
- Nezi, L. & Musacchio, A., 2009. Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Current opinion in cell biology*, 21(6), pp.785–795.

- Niiya, F. et al., 2006. Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene*, 25(6), pp.827–837.
- Norden, C. et al., 2006. The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell*, 125(1), pp.85–98.
- Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344(6266), pp.503–508.
- O'Connor, D.S. et al., 2000. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp.13103–13107.
- Ohi, R. et al., 2004. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Molecular biology of the cell*, 15(6), pp.2895–2906.
- Okada, H. et al., 2004. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *The Journal of experimental medicine*, 199(3), pp.399–410.
- Pardo, J.M. et al., 1985. Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*--the producing organism. *Journal of general microbiology*, 131(6), pp.1289–1298.
- Paul, R. et al., 2009. Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), pp.15708–15713.
- Pavicic-Kaltenbrunner, V.V., Mishima, M.M. & Glotzer, M.M., 2007. Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Molecular biology of the cell*, 18(12), pp.4992–5003.
- Peng, C.Y. et al., 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science (New York, NY)*, 277(5331), pp.1501–1505.
- Pennati, M., Folini, M. & Zaffaroni, N., 2008. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(4), pp.463–476.
- Peters, J.-M., 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(9), pp.644–656.
- Peters, J.-M., 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell*, 9(5), pp.931–943.
- Piekny, A., Werner, M. & Glotzer, M., 2005. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends in cell biology*, 15(12), pp.651–658.
- Pines, J. & Hunter, T., 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346(6286), pp.760–763.
- Pinsky, B.A. & Biggins, S., 2005. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in cell biology*, 15(9), pp.486–493.

- Poddar, A., Stukenberg, P.T. & Burke, D.J., 2005. Two complexes of spindle checkpoint proteins containing Cdc20 and Mad2 assemble during mitosis independently of the kinetochore in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 4(5), pp.867–878.
- Qiu, X.-B.X. & Goldberg, A.L.A., 2005. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), pp.174–182.
- Quignon, F. et al., 2007. Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene*, 26(2), pp. 165–172.
- Raich, W.B. et al., 1998. Cytokinesis and midzone microtubule organization in *Caenorhabditis elegans* require the kinesin-like protein ZEN-4. *Molecular biology of the cell*, 9(8), pp.2037–2049.
- Rajagopalan, H. et al., 2004. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, 428(6978), pp.77–81.
- Reichert, S. et al., 2011. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: A molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*.
- Richter, B.W. et al., 2001. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Molecular and cellular biology*, 21(13), pp.4292–4301.
- Rieder, C.L. et al., 1994. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *The Journal of cell biology*, 127(5), pp.1301–1310.
- Rieder, C.L.C. & Maiato, H.H., 2004. Stuck in Division or Passing through What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint. *Developmental cell*, 7(5), pp.637–651.
- Riedl, S.J. et al., 2001. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104(5), pp.791–800.
- Rothe, M. et al., 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83(7), pp. 1243–1252.
- Rothkamm, K. et al., 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp.5706–5715.
- Roy, N. et al., 1995. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 80(1), pp.167–178.
- Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W.C., 2007a. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), pp.798–812.
- Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W.C., 2007b. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*, 131(2), pp.230–231.
- Rusan, N.M. et al., 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein- α tubulin. *Molecular biology of the cell*, 12(4), pp.971–980.

- Ryan, B.M., O'Donovan, N. & Duffy, M.J., 2009. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer treatment reviews*, 35(7), pp.553–562.
- Sah, N.K. et al., 2006. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer letters*, 244(2), pp.164–171.
- Saiki, R.K. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)*, 239(4839), pp.487–491.
- Saito, T. et al., 2008. Centrosome amplification induced by survivin suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells. *British journal of cancer*, 98(2), pp.345–355.
- Sakaguchi, K. et al., 2000. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *The Journal of biological chemistry*, 275(13), pp.9278–9283.
- Sakaue-Sawano, A. et al., 2008. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 132(3), pp.487–498.
- Sancar, A. et al., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73, pp.39–85.
- Sanger, F. & Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), pp.441–448.
- Schon, O. et al., 2002. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *Journal of molecular biology*, 323(3), pp.491–501.
- Schrock, E. et al., 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science (New York, NY)*, 273(5274), pp.494–497.
- Schütze, S., Tchikov, V. & Schneider-Brachert, W., 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(8), pp.655–662.
- Segurado, M. & Tercero, J.A., 2009. The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 101(11), pp.617–627.
- Sellitto, C.C. & Kuriyama, R.R., 1988. Distribution of a matrix component of the midbody during the cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of cell biology*, 106(2), pp.431–439.
- Shah, J.V. et al., 2004. Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Current biology : CB*, 14(11), pp.942–952.
- Shankar, S.L. et al., 2001. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *Journal of neurochemistry*, 79(2), pp.426–436.
- Shi, Yuling et al., 2004. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp.5898–5903.
- Shieh, S.-Y. et al., 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), pp.325–334.

- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399 (6735), pp.483–487.
- Shin, S. et al., 2001. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, 40(4), pp.1117–1123.
- Shiozaki, E.N. & Shi, Yigong, 2004. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 29(9), pp.486–494.
- Shiozaki, E.N. et al., 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell*, 11(2), pp.519–527.
- Siddiquee, K. et al., 2007. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp. 7391–7396.
- Silke, J. et al., 2001. Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *The EMBO journal*, 20(12), pp.3114–3123.
- Silkworth, W.T. et al., 2009. Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS ONE*, 4(8), p.e6564.
- Sironi, L. et al., 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a “safety belt” binding mechanism for the spindle checkpoint. *The EMBO journal*, 21(10), pp.2496–2506.
- Solier, S. et al., 2009. Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways. *Molecular and cellular biology*, 29(1), pp.68–82.
- Somers, W.G. & Saint, R., 2002. A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Developmental cell*, 4(1), pp.29–39.
- Soneoka, Y. et al., 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic acids research*, 23(4), pp.628–633.
- Sotillo, R. et al., 2007. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer cell*, 11(1), pp.9–23.
- Srinivasula, S. & al, E., 2008. IAPs: what's in a name? *Molecular cell*, 30(2), pp.123–135.
- Srinivasula, S.M. et al., 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), pp. 112–116.
- Srinivasula, S.M. et al., 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *The Journal of biological chemistry*, 275(46), pp.36152–36157.
- Srsen, V. et al., 2006. Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *The Journal of cell biology*, 174, pp.625–630.

- Steigemann, P. & Gerlich, D.W., 2009. Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends in cell biology*, 19(11), pp.606–616.
- Steigemann, P. et al., 2009. Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, 136(3), pp.473–484.
- Stewart, N. et al., 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, 10(1), pp.109–115.
- Straight, A.F. et al., 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science (New York, NY)*, 299(5613), pp.1743–1747.
- Su, L. et al., 2010. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 110(4), pp.484–491.
- Sudakin, V., Chan, G.K. & Yen, T.J., 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*, 154(5), pp.925–936.
- Sun, C. et al., 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*, 401(6755), pp.818–822.
- Sun, C. et al., 2000. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *The Journal of biological chemistry*, 275(43), pp.33777–33781.
- Sun, C. et al., 2005. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry*, 44(1), pp.11–17.
- Susin, S.A. et al., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), pp.441–446.
- Suzuki, A. et al., 2000. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene*, 19(10), pp.1346–1353.
- Sørensen, C.S.C. et al., 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature cell biology*, 7(2), pp.195–201.
- Taira, N. et al., 2007. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Molecular cell*, 25(5), pp.725–738.
- Tait, S.W.G. & Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), pp. 621–632.
- Takata, M. et al., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO*
- Tamm, I. et al., 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research*, 58(23), pp.5315–5320.

- Tanaka, T.U. et al., 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, 108(3), pp.317–329.
- Tang, Y. et al., 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, 133(4), pp. 612–626.
- Taubert, H. et al., 2010. Expression of survivin detected by immunohistochemistry in the cytoplasm and in the nucleus is associated with prognosis of leiomyosarcoma and synovial sarcoma patients. *BMC cancer*, 10, p.65.
- Temme, A. et al., 2005. Inhibition of malignant glioma cell growth by a survivin mutant retrovirus. *Human gene therapy*, 16(2), pp.209–222.
- Temme, A. et al., 2003. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Molecular biology of the cell*, 14(1), pp.78–92.
- Tewey, K.M. et al., 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science (New York, NY)*, 226(4673), pp.466–468.
- Tibbetts, R.S. et al., 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 13(2), pp.152–157.
- Tournebise, R. et al., 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nature cell biology*, 2(1), pp.13–19.
- Tsukahara, T., Tanno, Y. & Watanabe, Y., 2010. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*, 467(7316), pp.719–723.
- Uchida, H. et al., 2004. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(1), pp.162–171.
- Uetake, Y. & Sluder, G., 2004. Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a “tetraploidy checkpoint.” *The Journal of cell biology*, 165(5), pp.609–615.
- Ulasov, I.V. et al., 2007. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma. *Human gene therapy*, 18(7), pp.589–602.
- Unger, T. et al., 1999. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *The EMBO journal*, 18(7), pp.1805–1814.
- Uren, A.G. et al., 1996. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), pp.4974–4978.
- Uren, A.G. et al., 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current biology : CB*, 10(21), pp.1319–1328.
- Vader, G., Kauw, J.J.W., et al., 2006a. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO reports*, 7(1), pp.85–92.

- Vader, G., Medema, R.H. & Lens, S.M.A., 2006b. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *The Journal of cell biology*, 173(6), pp.833–837.
- Vagnarelli, P. & Earnshaw, W.C., 2004. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, 113(5), pp.211–222.
- Varfolomeev, E. & Vucic, D., 2008. (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFkappaB signaling pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 7(11), pp.1511–1521.
- Varfolomeev, E. et al., 2006. The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *The Journal of biological chemistry*, 281(39), pp.29022–29029.
- Vaux, D.L. & Silke, J., 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(4), pp.287–297.
- Velculescu, V.E. et al., 1999. Analysis of human transcriptomes. *Nature genetics*, 23(4), pp.387–388.
- Verdecia, M.A. et al., 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature structural biology*, 7(7), pp.602–608.
- Verhagen, A.M. et al., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), pp. 43–53.
- Veuger, S.J. et al., 2003. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer research*, 63(18), pp.6008–6015.
- Vong, Q.P. et al., 2005. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science (New York, NY)*, 310(5753), pp.1499–1504.
- Vucic, D. et al., 2005. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *The Biochemical journal*, 385(Pt 1), pp.11–20.
- Vucic, D. et al., 2000. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Current biology : CB*, 10(21), pp.1359–1366.
- Wajant, H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, NY)*, 296(5573), pp.1635–1636.
- Waldman, T., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer research*, 55(22), pp.5187–5190.
- Walworth, N.C.N. & Bernards, R.R., 1996. rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science (New York, NY)*, 271(5247), pp.353–356.
- Wang, X. et al., 2004a. Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS letters*, 561(1-3), pp.195–201.
- Wang, Z., Fukuda, S. & Pelus, L.M., 2004b. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene*, 23(49), pp.8146–8153.

- Wassmann, K.K. & Benezra, R.R., 1998. Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), pp.11193–11198.
- Werner, M., Munro, E. & Glotzer, M., 2007. Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis. *Current biology : CB*, 17(15), pp.1286–1297.
- Wheatley, S.P. & McNeish, I.A., 2005. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International review of cytology*, 247, pp.35–88.
- Wheatley, S.P. & Wang, Y., 1996. Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 135(4), pp.981–989.
- Wheatley, S.P. et al., 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. *The Journal of biological chemistry*, 279(7), pp.5655–5660.
- Wheatley, S.P. et al., 2007. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 6(10), pp.1220–1230.
- Williams, G.H. & Stoeber, K., 2012. The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), pp.352–364.
- Willis, N. & Rhind, N., 2009. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell division*, 4(1), p.13.
- Wilmanski, J.M., Petnicki-Ocwieja, T. & Kobayashi, K.S., 2008. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(1), pp.13–30.
- Wojcik, E. et al., 2001. Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nature cell biology*, 3(11), pp.1001–1007.
- Won, J. et al., 2006. Small molecule-based reversible reprogramming of cellular lifespan. *Nature chemical biology*, 2(7), pp.369–374.
- Wong, C. & Stearns, T., 2005. Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *Bmc Cell Biology*, 6, pp.–.
- Wong, R.S.Y., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30, p.87.
- Wu, G. et al., 2000. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, 408(6815), pp.1008–1012.
- Xiaoyuan, C. et al., 2010. Survivin: a potential prognostic marker and chemoradiotherapeutic target for colorectal cancer. *Irish journal of medical science*, 179(3), pp.327–335.
- Xiong, Y. et al., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366(6456), pp.701–704.
- Xu, X., Tsvetkov, L.M. & Stern, D.F., 2002. Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and cellular biology*, 22(12), pp.4419–4432.

- Yajima, H., Lee, K.-J. & Chen, B.P.C., 2006. ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Molecular and cellular biology*, 26(20), pp.7520–7528.
- Yang, J. et al., 2007. AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 110(6), pp.2034–2040.
- Yasui, Y. et al., 1998. Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. *The Journal of cell biology*, 143(5), pp.1249–1258.
- Yue, Z. et al., 2008. Deconstructing Survivin: comprehensive genetic analysis of Survivin function by conditional knockout in a vertebrate cell line. *The Journal of cell biology*, 183(2), pp.279–296.
- Yüce, O., Piekny, A. & Glotzer, M., 2005. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of cell biology*, 170(4), pp.571–582.
- Zaffaroni, N. et al., 2002. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(8), pp.1406–1412.
- Zaffaroni, N., Pennati, M. & Daidone, M.G., 2005. Survivin as a target for new anticancer interventions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(2), pp. 360–372.
- Zhan, Q. et al., 1994. The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer research*, 54(10), pp.2755–2760.
- Zhen, H.-N. et al., 2007. Short hairpin RNA targeting survivin inhibits growth and angiogenesis of glioma U251 cells. *International journal of oncology*, 31(5), pp. 1111–1117.
- Zhou, H., Du, M.-Q. & Dixit, V.M., 2005. Constitutive NF-kappaB activation by the t (11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity. *Cancer cell*, 7(5), pp.425–431.
- Zhou, M. et al., 2002. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 303(1), pp.124–131.
- Zhu, C. & Jiang, W., 2005. Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), pp.343–348.
- Zhu, C. et al., 2006. Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), pp.6196–6201.
- Zou, H. et al., 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), pp. 405–413.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti	EGFP	Enhanced Green
Abb.	Abbildung		Fluorescent Protein
Ak	Antikörper	et al.	und andere
AF	Alexa Fluor	FACS	„fluorescence activated
Amp	Ampicillin		cell sorting”
ATM	ataxia telangiectasia	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	mutated	g	relative Zentrifugal-
ATR	ataxia telangiectasia		beschleunigung oder
	mutated related		Gramm
AS	Aminosäure	gag	Gruppenspezifisches
BIR	Baculovirus IAP Repeats		Antigen
bp	Basenpaar	GAP	GTPase-activating Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin	GEF	GDP-GTP Exchange
BSA	Bovine Serum Albumin		Factor
Cdk	Cyclin dependent Kinase	h	Stunden
CMV	„human cytomegalovirus	H1	Promoter für RNA-
	immediate-early promoter“		Polymerase III
Coloc	Kolokalisation	HygR	Hygromycin Resistenz
CPC	„Chromosomal Passenger	HR	Homologe Rekombination
	Complex“	IAP	„Inhibitor of Apoptosis“
CPP	„Chromosomal Passenger	IRES	„Internal Ribosome Entry
	Protein“		Site“
CtIP	CtBP Interacting Protein	kDa	Kilodalton
DDR	DNA Damage Response	LB	Luria-Bertani
der	derivates	LTR	„Long Terminal Repeats“
del	Deletion	luc	Luciferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	Molar
DNA-PK	DNA abhängige	MCC	Mitotic Checkpoint
	Proteinkinase		Complex
DSB	Doppelstrangbrüche	MCS	„multiple cloning site“
dsRNA	doppelsträngige RNA	min	Minute
dsDNA	doppelsträngige DNA	MPF	„Mitosis Promoting Factor“
dup	Duplikation	mRNA	„messenger RNA“

MW	Mittelwert	siRNA	„small interfering“ RNA
nd	nicht detektierbar	SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases
NHEJ	Nonhomologous End Joining		
NLS	nukleäres Lokalisations-signal	SSB	Einzelstrangbrüche „Single Strand Breaks“
q	langer Chromosomarm	Surv	Survivin
p	„petit“, kleiner Chromosomarm	T	Threonin
PEI	Polyethylenimin	t	Translokation
PI	Propidiumiodid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
POD	Meerrettich-Peroxidase	ter	terminal
pol	Polymerase	VSV-G	Glykoproteins des vesikulären Stomatitis Virus
PolyA	Polyadenylierung		
PS	Phosphatidylserin		
PuroR	Puromycin Resistenz	wt	Wildtyp
Rho	Ras homologous	WGA	Wheat germ agglutinin
RNA	Ribonukleinsäure	WBTP	Western Blot Transfer Puffer
RNAi	RNA Interferenz		
RNase	Ribonuklease	Ub	Ubiquitin
Rb	Retinoblastom	°C	Grad Celsius
RING	Really Interesting New Gen		
ROS	reaktive Sauerstoffspezies		
rpm	Umdrehung pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
S	Serin		
SAC	Spindle Assembly Checkpoint		
SD	Standardabweichung		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
shRNA	„small hairpin“ RNA		
shluc	shRNA gegen Luciferase		
shp53	shRNA gegen p53		
shSurv	shRNA gegen Survivin		

7.2 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur Funktion des Inhibitor der Apoptose Proteins Survivin in der chromosomalen Stabilität und „DNA Damage Response“ von Tumorzellen“ selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. H. A. Temme sowie Herrn Prof. Dr. H. O. Gutzeit angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Es hat kein früheres Promotionsverfahren stattgefunden.

Dresden, den 10. Juli 2012

(Ralf Wiedemuth)

7.3 Publikationen

Hendruschk, S., Wiedemuth, R., Aigner, A., Töpfer, K., Cartellieri, M., Martin, D., Kirsch, M., et al. (2011). RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. *Neuro-oncology*. doi:10.1093/neuonc/nor098

Temme, A., Geiger, K. D., Wiedemuth, R., Conseur, K., Pietsch, T., Felsberg, J., Reifenberger, G., et al. (2010). Giant cell glioblastoma is associated with altered aurora b expression and concomitant p53 mutation. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(6), 632–642. doi:10.1097/NEN.0b013e3181e4c06e