

**Funktionelle Charakterisierung
der humanen
Proteinkinase Aurora-C
in Krebszellen**

vorgelegt von
Diplom-Biologe Daniel Spengler
aus Bingen

Bingen 2006

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Daniel Spengler

aus Bingen

Tag der mündlichen Prüfung:

**Funktionelle Charakterisierung
der humanen
Proteinkinase Aurora-C
in Krebszellen**

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ingrid Hoffmann
Dr. Oliver Gruss

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	V
Summary.....	VI
Abkürzungen.....	VII
1.0 Einleitung.....	1
1.1 Zellteilung und Krebs.....	1
1.2 Molekulare Regulation der Zellteilung.....	4
1.2.1 Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline.....	4
1.2.2 Proteolyse und Zellteilungszyklus.....	6
1.2.3 Zellzyklus-Kontrollpunkte.....	7
1.3 Die Aurora-Kinase-Familie.....	9
1.3.1 Aurora-A.....	12
1.3.2 Aurora-B.....	15
1.3.3 Aurora-C.....	17
2.0 Ziel der Arbeit.....	20
3.0 Material.....	21
3.1 Bakterienstämme.....	21
3.2 Hefestämme.....	21
3.3 Zelllinien.....	21
3.4 Plasmide.....	22
3.5 Oligonukleotide.....	25
3.6 Antikörper.....	27
3.7 Chemikalien und Lösungen.....	28
3.7.1 Spezielle Reagenzien und Chemikalien.....	28
3.7.2 Radiochemikalien.....	28
3.7.3 Lösungen und Puffer.....	29
4.0 Methoden.....	30
4.1 Arbeiten mit Bakterien.....	30
4.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
4.1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation.....	30
4.1.2.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Hitzeschock.....	30
4.2 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.2.1 Transformation von Hefen mit der Lithiumacetatmethode.....	31
4.3 Two-Hybrid-Screen in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.4 Arbeiten mit Sf9-Zellen und rekombinanten Baculoviren.....	32

4.4.1	Kultivierung von Sf9-Zellen	32
4.4.2	Herstellung von rekombinanten Aurora-C-Baculoviren	33
4.4.3	Plaque-Aufreinigung von Baculoviren.....	33
4.4.4	Virusamplifikation von Baculoviren.....	33
4.5	Arbeiten mit Säugerzellen.....	34
4.5.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	34
4.5.2	Zellernte von adhärennten Säugerzellen	34
4.5.3	Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	34
4.5.3.1	Transiente Transfektion von U2OS-Zellen.....	34
4.5.3.2	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen.....	35
4.5.3.3	Transiente Transfektion von 293T-Zellen.....	35
4.5.4	Durchflusszytometrie (FACS-Scan-Analyse) zur Bestimmung des DNA-Gehalts von HeLa-Zellen.....	35
4.5.5	Immunfärbung von Zellen und Mikroskopie	36
4.5.6	Zellzyklusarrest und Synchronisation von HeLa-Zellen.....	36
4.5.6.1	Zellzyklusarrest von HeLa-Zellen in der G2/M-Phase	36
4.5.6.2	Zellzyklusarrest von HeLa-Zellen in der G1-Phase.....	37
4.6.	DNA-chemische Methoden.....	38
4.6.1	Standardmethoden.....	38
4.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
4.6.3	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
4.6.4	Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden	38
4.6.5	Spezifische Mutagenese von Plasmiden	39
4.6.6	Methoden zur Präparation von DNA	39
4.6.6.1	Minipräparation von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	39
4.6.6.2	Maxipräparation von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	39
4.6.6.3	Präparation von Plasmiden aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
4.6.7	Klonierung von Plasmiden.....	41
4.6.7.1	PCR-Klonierung von pGBKT7-Aurora-C-K72R	41
4.6.7.2	PCR-Klonierung von pAcHLT-A-Aurora-C-WT und -K72R.....	42
4.6.7.3	PCR-Klonierung von pGEX-4T-1-Aurora-C-WT und -K72R	43
4.6.7.4	Klonierung von pTriEx-1-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21- und -TRF2-Fragment.....	43
4.6.7.5	Klonierung von pcDNA-Myc-TRF2-WT	44
4.6.7.6	Klonierung von pcDNA-HA-Aurora-C-WT und -K72R.....	44
4.6.7.7	Klonierung von pSuper-Aurora-C-1	45
4.7	Protein-chemische Methoden.....	46
4.7.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
4.7.2	Nachweis von Proteinen im Western-Blot.....	46

4.7.3	Immunpräzipitation	47
4.7.4	Aufreinigung von rekombinanten His ₆ -Aurora-C-Fusionsprotein.....	47
4.7.5	Aufreinigung von rekombinantem GST-Aurora-C-Fusionsprotein.....	48
4.7.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	49
4.7.7	Herstellung von [³⁵ S]-markierten Proteinen durch <i>in vitro</i> Translation.....	49
4.7.8	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien zwischen Aurora-C und potentiellen Interaktionspartnern	49
4.7.9	<i>In vitro</i> Kinasereaktion mit der Proteinkinase Aurora-C	50
4.7.9.1	<i>In vitro</i> Kinasereaktion mit His ₆ -Aurora-C-Fusionsprotein.....	50
4.7.9.2	<i>In vitro</i> Kinasereaktion mit immobilisiertem HA-Aurora-C-Protein.....	51
4.7.10	Aufreinigung von Antikörpern mit Antigensäulen	51
4.7.11	Herstellung von Proteinextrakten aus Hefen.....	52
4.7.12	Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen und Sf9-Zellen.....	52
5.0	Ergebnisse	53
5.1	Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern.....	53
5.2	Untersuchung von HeLa-Zellen nach Überexpression von Aurora-C	54
5.2.1	Aurora-C-T191D besitzt eine höhere Kinaseaktivität als Aurora-C-WT <i>in vitro</i>	55
5.2.2	Untersuchung von HeLa-Zellen in der Mitose nach Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate	57
5.2.3	Untersuchung von HeLa-Zellen in der Interphase nach Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate	59
5.3	Funktionelle Analyse von Aurora-C durch RNA-Interferenz.....	65
5.3.1	Abnahme des HA-Aurora-C-Proteins nach Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C	65
5.3.2	Morphologische Veränderungen von HeLa-Zellen nach Behandlung mit shRNAs gegen Aurora-C	68
5.3.3	Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C hat einen Effekt auf den Zellzyklus	71
5.4	Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern der Kinase Aurora-C	75
5.4.1	Identifizierung von Interaktionspartnern der Kinase Aurora-C durch einen Two-Hybrid-Screen in der Hefe.....	75
5.4.2	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien mit Aurora-C-K72R und potentiellen Interaktionspartnern	77
5.4.3	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien mit Aurora-C-K72R, TRF2 und Calpain-4.....	78
5.4.4	Phosphorylierung von TRF2 durch die Kinase Aurora-C <i>in vitro</i>	78
5.4.5	Die Aminosäure TRF2-T358 ist eine <i>in vitro</i> Phosphorylierungsstelle der Kinase Aurora-C	80
5.4.6	TRF2 hat zwei <i>in vitro</i> Aurora-C-Phosphorylierungsstellen	82
5.4.7	Mikroskopische Untersuchung von TRF2 und Aurora-C	83

5.4.8	Mikroskopische Untersuchung von Calpain-4 und Aurora-C.....	84
6.0	Diskussion	86
6.1	Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern	86
6.2	Untersuchung verschiedener Aurora-C-Derivate nach transienter Überexpression.....	87
6.2.1	Proteinchemische Untersuchung der Aurora-C-Derivate	87
6.2.2	Untersuchung der Aurora-C-Derivate in der Mitose bzw. Cytokinese.....	89
6.2.3	Untersuchung der Aurora-C-Derivate in der Interphase	90
6.3	RNAi-Experimente.....	92
6.4	Two-Hybrid-Screen in der Hefe mit Aurora-C als Köder-Protein.....	95
6.4.1	Untersuchung der Interaktion zwischen Aurora-C und Calpain-4.....	97
6.4.2	Untersuchung der Interaktion zwischen Aurora-C und TRF2	100
6.5	Ausblick	101
7.0	Literaturverzeichnis.....	103

Zusammenfassung

Aurora-Kinasen sind eine konservierte Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die an der Regulation der Mitose und Meiose in eukaryotischen Organismen beteiligt sind. Die Aurora-Subfamilie in Säugern besteht aus drei Kinasen, die Aurora-A, -B und -C bezeichnet werden. Im Gegensatz zu Aurora-A und -B sind die physiologischen Funktionen der Kinase Aurora-C unbekannt. Aurora-Kinasen vom Typ C konnten bisher nur in Säugerzellen nachgewiesen werden. Die Expression der Kinase scheint sich dabei auf die männlichen und weiblichen Keimdrüsen sowie bestimmte Krebszelllinien und Tumoren zu beschränken.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der humanen Proteinkinase Aurora-C in Krebszellen. Die Untersuchung verschiedener Aurora-C-Derivate im Rahmen dieser Arbeit hat gezeigt, dass die Mutante Aurora-C-T191D im Vergleich zu anderen Aurora-C-Derivaten (WT, K72R T198D, T202D) eine erhöhte Kinaseaktivität *in vitro* aufweist und als hyperaktiv bezeichnet werden kann. Die proteinchemische Untersuchung der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D hat außerdem ergeben, dass das überexprimierte Protein in HeLa-Zellen posttranslational modifiziert wird. Die physiologischen Auswirkungen dieser Modifikation sind allerdings unbekannt.

Die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass der Kinase Aurora-C eine Funktion bei der Regulation der Zellmorphologie in Epithelzellen zukommt. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C und die Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D in HeLa-Zellen bewirken den Verlust des cytoplasmatischen Raums und der Zellpolarität in den betroffenen Zellen.

Ein weiterer Schwerpunkt im Rahmen dieser Arbeit bildete die Identifizierung von Interaktionspartnern der Kinase Aurora-C durch einen Two-Hybrid-Screen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Unter anderem wurden drei Proteine (Calpain-4, Epiplakin, Interleukin-15) identifiziert, die wie Aurora-C eine Veränderung der Zellmorphologie bewirken können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von den drei Proteinen allerdings nur Calpain-4 näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Calpain-4 *in vitro* kein Substrat der Kinase Aurora-C ist und dass die beiden Proteine nach Überexpression spezifisch im Zellkern, an der postmitotischen Brücke und am Zellrand kolokalisieren.

Ein weiteres Protein, das im Two-Hybrid-Screen identifiziert wurde, ist das Telomerbindeprotein TRF2. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kinase Aurora-C das Substrat TRF2 *in vitro* an der Position Threonin 358 spezifisch phosphorylieren kann.

Summary

Aurora kinases are a family of highly conserved Serine/Threonine kinases, involved in the regulation of mitosis and meiosis in all eukaryotes. In mammals, the Aurora subfamily constitutes three kinases: Aurora-A, Aurora-B and Aurora-C. Aurora-A is implicated primarily in centrosome maturation and microtubule nucleation, whereas Aurora-B is proposed to regulate cytokinesis, the spindle assembly checkpoint, chromosome condensation and segregation. In contrast, the function of Aurora-C is poorly understood. Aurora-C has been so far only described in mammalian cells. The expression of Aurora-C is restricted to testis and certain tumour cell lines.

In our studies, we have undertaken a functional analysis of the human protein kinase Aurora-C in cancer cell lines. Mutational analysis of human Aurora-C revealed that the Aurora-C-T191D mutant is hyperactive. The kinase activity of Aurora-C-T191D is increased compared to other Aurora-C derivatives (WT, T198D, T202D, K72R). In addition, the expression of Aurora-C-T191D in HeLa cells causes a posttranslational modification of the protein. The physiological consequences of the modification remain unclear.

RNA interference, as well as ectopic expression of Aurora-C demonstrated that Aurora-C takes part in the regulation of the cell morphology in epithelial cells. The overexpressions of the hyperactive Aurora-C-T191D mutant and silencing of Aurora-C by shRNA result in a loss of cytoplasm and cell polarity in HeLa cells.

In our studies, we performed a yeast two-hybrid to identify potential Aurora-C interacting proteins. We identified three proteins (Calpain-4, Epiplakin, Interleukin-15) involved in the regulation of cell morphology. Further studies showed that *in vitro* Calpain-4 is not a substrate for the kinase Aurora-C. When co-overexpressed, both proteins co-localize specifically in the cytoplasm, at the post mitotic bridge and at the cell membrane.

Another potential Aurora-C interacting protein identified in the two-hybrid-screen, was the telomere-binding protein TRF2. Mutational analysis showed that Aurora-C phosphorylates TRF2 specifically on Threonine 358 *in vitro*.

Abkürzungen

% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
&	und
α-	anti-
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Asparaginsäure
Abb.	Abbildung
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aur-C-1	shRNA gegen Aurora-C-mRNA gerichtet
Aur-C-2	shRNA gegen Aurora-C-mRNA gerichtet
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA; complementary DNA
cm ²	Quadratcentimeter
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alli
FACS	Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FKS	fötale Kälberserum
Flag	Epitop aus bestehend aus dem synthetischen Flag-Peptid
g	Gramm
G	G-Zahl
GL2	shRNA gegen Luciferase-mRNA gerichtet
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Epitop aus Influenzavirus
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIS ₆	Polyhistidin-Epitop bestehend aus 6 Histidin-Aminosäuren
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktose
K	Lysin
kb	1000 Basenpaare

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
M	Molar (mol/l)
mA	Milliamper
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA; messenger RNA
Myc	Epitop bestehend aus einem Peptid des Proto-Onkogens c-Myc
ng	Nanogramm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pg	Picogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz; RNA interference
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
T	Threonin
t	Zeit
TLCK	1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon
TPCK	1-Chloro-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane
U	Enzymeinheit (μmol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
Y	Thyrosin
z.B.	zum Beispiel

1.0 Einleitung

1.1 Zellteilung und Krebs

Die Zelle ist die elementare strukturelle und funktionelle Einheit aller lebenden Organismen. Zellen vermehren sich durch den Prozess der Zellteilung bzw. des Zellzyklus. Der Zellzyklus ist eine Abfolge von koordinierten Vorgängen, die zur Teilung einer Zelle in zwei genetisch identische Tochterzellen führt. Die Entwicklung und das Wachstum aller lebenden Organismen unterliegen dem Prozess der Zellteilung. Das Verständnis der Vorgänge im Zellzyklus ist deshalb von fundamentalem Interesse für die Biologie (Nurse, 2000; Nurse, 2002).

Die Kenntnisse der Vorgänge sind aber auch von medizinischer Relevanz. Während eine Deregulierung des Zellzyklus bei einzelligen Organismen in der Regel zum Zelltod führt, kann sie in multizellulären Organismen Krankheiten wie z.B. Krebs verursachen. In Krebszellen sind die Kontrollmechanismen des Zellwachstums und der Zellteilung defekt, weshalb sie sich unkontrolliert vermehren können (Hanahan & Weinberg, 2000; Hahn & Weinberg, 2001; Malumbres & Barbacid, 2001).

Der eukaryotische Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt: Die genetische Erbinformation wird in der S-Phase (Synthese) repliziert und in der M-Phase (Mitose) auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Beide Phasen werden durch die G1- bzw. G2-Phase (gap) miteinander verbunden.

Im Folgenden werden die verschiedenen Phasen der Zellteilung am Beispiel des somatischen Zellzyklus von Säugerzellen näher beschrieben (Abb.1): Die G1-Phase ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Zellmasse. In dieser Phase trifft die Zelle die wichtige Entscheidung, ob sie sich teilen wird. Durchläuft die Zelle den so genannten Restriktionspunkt in der G1-Phase, beginnt ein neuer Zellzyklus verbunden mit der Teilung. Wird der Restriktionspunkt nicht überschritten, tritt die Zelle entweder in einen Ruhezustand ein, der als G_0 bezeichnet wird, oder sie nimmt einen postmitotischen Zustand ein. Zellen, die sich im Ruhezustand G_0 befinden, können erneut in den Zellzyklus eintreten und sich teilen (z.B. unipotente und multipotente Stammzellen). Zellen im postmitotischen Zustand sind ausdifferenziert und haben damit die Fähigkeit verloren sich weiter zu teilen. Extrazelluläre Signale, die das Wachstum positiv und negativ beeinflussen und das Nährstoffangebot, spielen bei der Entscheidung der Zelle für oder gegen eine Teilung eine zentrale Rolle. Ein Merkmal aller Krebszellen ist die Deregulierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Massague, 2004). Aufgrund von genetischen Defekten wird die Zellteilung in Krebszellen konstitutiv stimuliert. Zusätzlich reagieren Krebszellen nicht auf extrazelluläre Signale, die das Wachstum negativ

beeinflussen (Hanahan & Weinberg, 2000; Hahn & Weinberg, 2001; Malumbres & Barbacid, 2001).

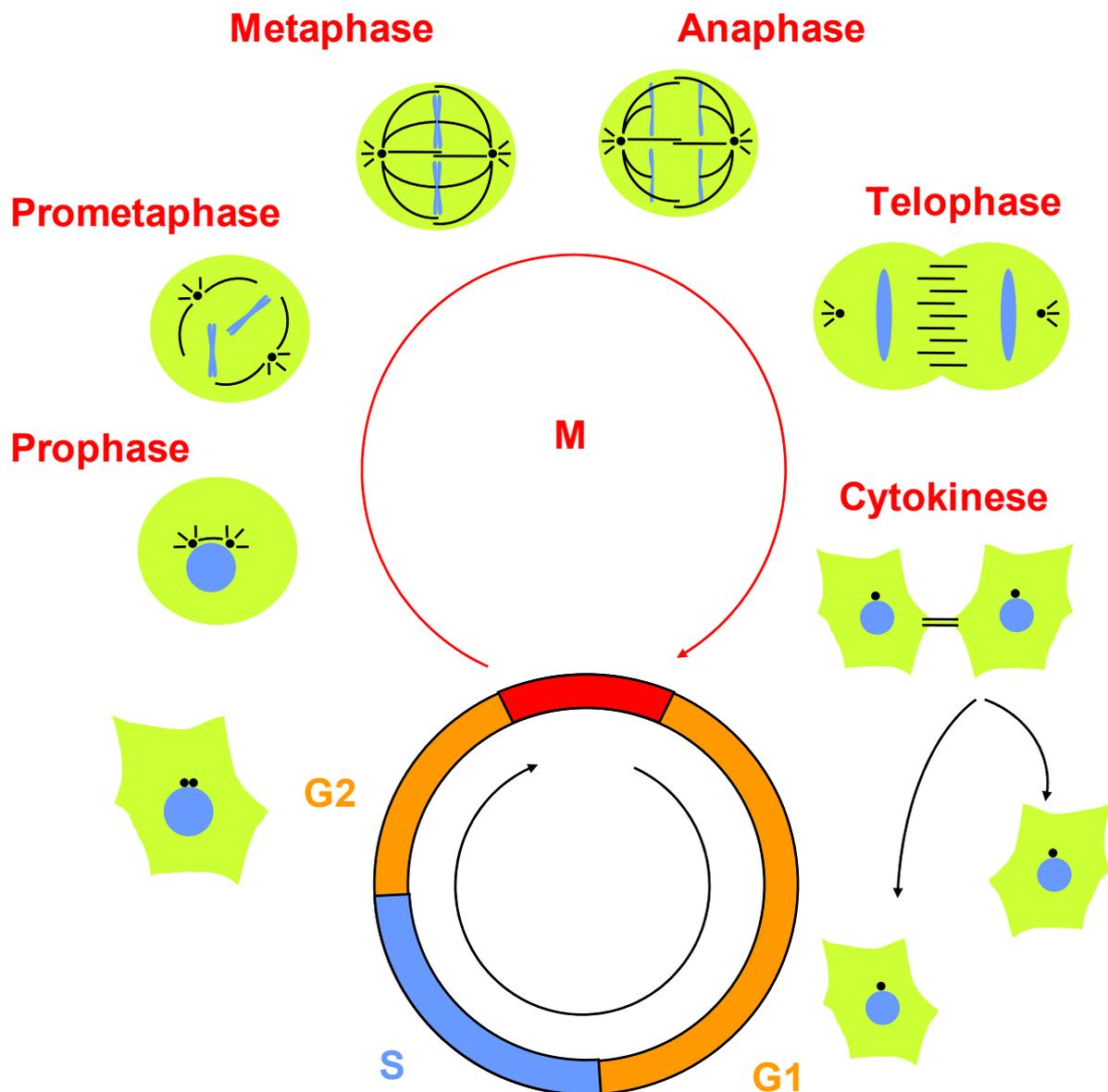


Abb.1: Der eukaryotische Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt.

Die genetische Erbinformation wird in der S-Phase (Synthese) repliziert und in der M-Phase (Mitose) auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Beide Phasen werden durch die G1- bzw. G2-Phase (gap) miteinander verbunden. Die M-Phase besteht aus fünf Subphasen: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Während der Cytokinese wird das Cytoplasma geteilt und der Zellzyklus durch die endgültige Trennung der beiden Tochterzellen abgeschlossen.

In der S-Phase werden die Chromosomen repliziert, und es kommt zur Paarung der Schwesterchromatiden (Cohesion von Schwesterchromatiden) (Takeda & Dutta, 2005). Das zweite wichtige Ereignis, das die S-Phase kennzeichnet, ist die Centrosomen- bzw. Centriolen-Duplikation. In höheren eukaryotischen Organismen sind die Centrosomen die Organisationszentren des Tubulin-Cytoskeletts und der mitotischen Spindel (Rieder et al., 2001). Der Centrosomenzyklus ist an den Zellzyklus gekoppelt (Doxsey et al., 2005). Die Kopplung beider Zyklen stellt sicher, dass das Centrosom in einer Zelle nur einmal während des Zellzyklus dupliziert wird. Die Deregulierung des Centrosomenzyklus verursacht Centrosomen-Amplifikation und genomische Instabilität, ein Merkmal, das in allen Krebszellen zu beobachten ist (Nigg, 2002; Storchova & Pellman, 2004; Badano, 2005).

In der G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die folgende M-Phase vor. Die Zelle prüft ob unreplizierte oder geschädigte DNA nach der Replikation in der Zelle vorliegt und behebt gegebenenfalls die Mängel (Stark & Taylor, 2004).

In der M-Phase wird die Erbinformation und weitere zelluläre Komponenten (z.B. Centrosomen) auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt (Mitchison & Salmon, 2001; Scholey et al., 2003; Bladgen & Glover, 2003; Blow & Tanaka, 2005). In der Prophase beginnen die Chromosomen einen kompakteren Zustand einzunehmen und kondensieren. Die beiden Centrosomen bzw. Centriolenpaare werden getrennt (centrosom separation) und wandern zu entgegengesetzten Zellpolen. In der Prometaphase wird die Kernmembran aufgelöst, und es kommt zur Ausbildung der bipolaren Spindel, bei deren Ausbildung die Chromosomen durch Mikrotubuli mit beiden Spindelpolen verbunden werden. Wenn alle Chromosomen in der Äquatorialebene zwischen den beiden Spindelpolen (Metaphasen-Platte) angeordnet und mit beiden Spindelpolen verknüpft sind, befinden sich die Zellen in der Metaphase.

Die Anaphase ist gekennzeichnet durch die Trennung der beiden Schwesterchromatiden. Zunächst bewegen sich in der Anaphase A die getrennten Schwesterchromatiden auf die beiden Spindelpole zu. In der sich anschließenden Anaphase B bewegen sich die beiden Spindelpole auseinander. In der dann beginnenden Telophase werden Kernmembranen um die getrennten Schwesterchromatiden gebildet, und es entstehen so zwei getrennte Zellkerne. In dieser Phase beginnen auch die Chromosomen zu dekontensieren. Die Cytokinese schließt die Zellteilung ab. In ihr wird das Cytoplasma der mitotischen Zelle geteilt, und es entstehen zwei Tochterzellen mit Zellkern, die in die G1-Phase eintreten.

1.2 Molekulare Regulation der Zellteilung

Trotz ihrer relativ geringen genetischen Komplexität sind die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* wichtige Modellorganismen zur Erforschung grundlegender zellulärer Prozesse in eukaryotischen Organismen. Pionierarbeiten in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* haben wesentlich zum heutigen Verständnis der Zellzyklus-Regulation auf molekularer Ebene beigetragen (Nurse, 2002). Spätere Arbeiten haben gezeigt, dass die grundlegenden Prinzipien der Zellzyklus-Regulation in allen eukaryotischen Organismen konserviert sind (Nurse, 2000; Nurse, 2002). In den folgenden Kapiteln werden die grundlegenden molekularen Mechanismen der Zellzyklus-Regulation vorgestellt.

1.2.1 Cyclin-abhängige Kinasen und Cycline

Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) sind eine konservierte Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die von zentraler Bedeutung für die Regulation des eukaryotischen Zellteilungszyklus sind (Nurse, 2000). Charakteristischerweise bestehen Cyclin-abhängige Kinasen aus einer katalytischen Untereinheit (~300 Aminosäuren), die keine regulatorische Domänen enthält. Die katalytische Untereinheit allein weist als Monomer keine enzymatische Aktivität auf. Erst nach Ausbildung eines Heterodimers mit einer positiven regulatorischen Untereinheit, einem Cyclin, ist eine Aktivität nachweisbar. Die regulatorische Untereinheit ist für die transiente Bindung des Substrates an den Cdk/Cyclin-Komplex verantwortlich und bestimmt somit die Substratspezifität des Komplexes (Morgan, 1995; Nigg, 1995; Morgan 1997).

Cycline sind eine außerordentlich heterogene Proteinfamilie, deren Mitglieder nur geringe Sequenz-Homologie aufweisen. Häufig beschränkt sich die Homologie auf einen Sequenzabschnitt, der als Cyclin-Box (~100 Aminosäuren) bezeichnet wird und charakteristisch für diese Proteinfamilie ist. Dabei ist die Cyclin-Box der Sequenzabschnitt eines Cyclins, der für die Bindung und Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase benötigt wird. Während die Proteingehalt nahezu aller Cdks im Verlauf des Zellzyklus konstant bleibt (Ausnahmen: Cdk4 und Cdk6), zeigen die Cycline dahingehend deutliche Unterschiede. Die verschiedenen Cycline treten charakteristischerweise nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus auf (Morgan, 1997; Roberts, 1999; Miller & Cross, 2001).

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* benötigt nur eine Cyclin-abhängige Kinase (Cdk1 bzw. Cdc28) und neun Cyclin-Untereinheiten (Cln1-3, Clb1-6) für die Regulation des Zellzyklus (Nasmyth, 1996; Morgan, 1997; Humphrey & Pearce, 2005).

Im Gegensatz zur Bäckerhefe wird der Zellzyklus von Metazoen durch mehrere Cyclin-abhängige Kinasen reguliert. In Säugerzellen sind neun Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk1-9) und sechzehn Cycline beschrieben (Baltimore, 2001). An der Regulation des Zellzyklus in Säugerzellen sind fünf Cdks (Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6) beteiligt (Morgan, 1997). Die frühe G1-Phase wird durch Cdk4 und Cdk6 im Komplex mit Cyclin-D reguliert. Der G1/S-Übergang wird von Cdk2/Cyclin-E gesteuert. Für die Regulation der S-Phase und G2-Phase ist der Komplex Cdk2/Cyclin-A verantwortlich. Der G2/M-Übergang und die Mitose werden von Cdk1/Cyclin-B reguliert. Für den Wiedereintritt von Säugerzellen aus dem Ruhezustand G₀ in den Zellzyklus wird der Komplex Cdk3/Cyclin-C benötigt (Ren & Rollins, 2004).

In den letzten Jahren mehrten sich Befunde, die im Widerspruch zu dem etablierten Modell der Zellzyklus-Regulation durch das Cdk/Cyclin-System in Säugerzellen standen (Morgan, 1997; Gladden & Diehl, 2003; Roberts & Sherr, 2003). Möglicherweise benötigen Säugerzellen weniger Cdks und Cycline für die Regulation des Zellzyklus als bisher angenommen. Untersuchungen mit embryonalen Mausfibroblasten hatten überraschenderweise gezeigt, dass Cdk2, Cdk4 und Cdk6 nicht wie angenommen essentiell für die Regulation des Zellzyklus sind (Ortega et al., 2003; Malumbres et al., 2004). Weitere Untersuchungen haben dann gezeigt, dass Cyclin-D (D1, D2, D3) und -E (E1, E2) für die Proliferation von embryonalen Mausfibroblasten nicht benötigt werden (Parisi et al., 2003; Geng et al., 2003; Kozar et al., 2004).

Neben der positiven Regulation von Cyclin-abhängigen Kinasen durch Cyclin-Untereinheiten existiert auch eine negative Regulation durch CDK-Inhibitoren (Cyclin dependent kinase inhibitor, CKI). Die CDK-Inhibitoren der INK4-Familie (p15, p16, p18, p19) binden an Cdk4 und Cdk6 und unterbinden die Assoziation mit Cyclin-D (Ortega et al., 2002). Die CDK-Inhibitoren der WAF/KIP-Familie (p21, p27, p57) binden an die Cdk/Cyclin-Komplexe und inhibieren die Substratbindung (Sherr & Roberts, 1999). Die Expression von CDK-Inhibitoren wird als Antwort auf verschiedene zelluläre Prozesse induziert.

Cyclin-abhängigen Kinasen werden auch durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Die Aktivierung von Cdk2 und Cdk4 durch den Komplex Cdk7/Cyclin-H (CAK, CDK-activating kinase) erfolgt durch Phosphorylierung einer Threonin-Aminosäure im Aktivierungsmotif der Kinasen (T172 in Cdk4 und T160 in Cdk2) (Fisher, 2005). Cdk1 wird von den dual-spezifischen Kinasen Wee1 und Myt1 an Threonin T14 und Tyrosin Y15 phosphoryliert und inhibiert (Morgan, 1997). Die Dephosphorylierung von Cdk1 an T14 und Y15 durch Mitglieder der Cdc25-Phosphatase-Familie (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) heben die

Inhibierung von Cdk1 auf und ermöglichen den Eintritt in die Mitose (Morgan, 1997; Nilsson & Hoffmann, 2000).

1.2.2 Proteolyse und Zellteilungszyklus

Ein weiteres wichtiges Regulationsprinzip der Zellteilung ist die spezifische Degradation von regulatorischen Proteinen (z.B. Cycline, CKI) durch das Ubiquitin/Proteasom-System. Das Ubiquitinsystem katalysiert dabei die spezifische Polyubiquitinierung von Zellzyklus-Regulatoren, die anschließend vom 26S Proteasom erkannt und degradiert werden. Die spezifische Degradation von Zellzyklus-Regulatoren vermittelt oftmals einen irreversiblen Übergang zwischen zwei Zellzyklusphasen (Reed, 2003; Vodermaier, 2004; Hershko, 2005; Castro et al., 2005).

Im eukaryotischen Zellzyklus haben zwei konservierte E3-Ligasen eine entscheidende Bedeutung bei der Substraterkennung und Ubiquitinierung von Zellzyklus-Regulatoren (Reed, 2003; Vodermaier, 2004; Hershko, 2005). Beide Ligasen vermitteln die Interaktion zwischen dem Substrat und dem E2-Enzym, welches das Ubiquitin auf das Substrat überträgt (Hochstrasser, 2000; Hochstrasser, 2006).

Beim Übergang von der G1-Phase zur S-Phase hat das Skp1-Cdc53-F-box-Protein (SCF) eine große Bedeutung bei der Ubiquitinierung und Degradation von Zellzyklus-Regulatoren (Cardozo & Pagano, 2004; Vodermaier, 2005). Der SCF ist ein konservierter Multiproteinkomplex, der aus einem festen Grundgerüst und einer variablen Komponente besteht. Das Grundgerüst des SCF besteht aus den Proteinen Skp1, Cdc53 (Cullin), Roc1/Rbx1 (Ringfinger-Protein) und dem E2-Enzym Cdc34 (Ubc3). Über das F-Box-Motiv von Skp1 können unterschiedliche F-Box-Proteine (z.B.: Cdc4, Skp2, β -TrCP) als variable Komponente an den Komplex gebunden werden. Das F-Box-Protein bestimmt die Substratspezifität des Komplexes und bindet die Substrate an den Komplex, die zuvor durch Phosphorylierung aktiviert werden müssen. Bindet beispielsweise das F-Box-Protein Cdc4 an den Komplex, wird das aktivierte Substrat Cyclin-E erkannt (Koepp et al., 2001; Strohmaier et al., 2001; Rajagopalan et al., 2004). In einigen Krebszelllinien ist Cyclin-E aufgrund einer Mutation in Cdc4 stabilisiert. Diese Stabilisierung des Tumor-Suppressor-Proteins Cyclin-E ist nicht letal, aber verursacht in den betroffenen Zellen genomische Instabilität (Strohmaier et al., 2001; Devoy et al., 2005). Für die Ubiquitinierung und Degradation der aktivierten S-Phase-Inhibitoren p27 und p21 benötigt der Komplex das F-Box-Protein Skp2 (Reed, 2003).

Der „Anaphase Promoting Complex“ (APC oder Cyclosom) ist eine E3-Ligase, die bei der Degradation von regulatorischen Proteinen in der Mitose eine große Bedeutung hat (Reed, 2003; Wasch & Engelbert, 2004; Vodermaier, 2005). Der APC ist ein Multiproteinkomplex. Nach heutigem Stand des Wissens besteht der konservierte Komplex aus 12 Untereinheiten in Säugerzellen und 13 Untereinheiten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Peters, 1999; Passmore, 2005). Für die Regulation und Substraterkennung benötigt der APC-Komplex zusätzliche Faktoren. Vom G2/M-Übergang bis zur Anaphase wird der APC-Komplex durch Cdc20 aktiviert; von der Anaphase bis in die G1-Phase wird der Komplex durch Cdh1 reguliert. Während der Interphase ist der Komplex durch die Bindung des negativen Regulators Emi1 inaktiviert (Reimann et al., 2001; Hsu et al. 2002). Substrate des APC-Komplexes enthalten spezifische intrinsische Sequenzen bzw. Signale (Degrons), die für die Bindung des Substrats an den Komplex durch Cdc20 oder Cdh1 essentiell sind. Bisher konnten zwei Degrons identifiziert werden: Der Komplex APC^{CDC20} erkennt Substrate, die eine so genannte D-Box (destruction box) als Signal enthalten. Für die Substraterkennung des Komplex APC^{Cdh1} ist neben der D-Box noch ein weiteres Signal von Bedeutung, die so genannte KEN-Box.

In eukaryotischen Zellen reguliert der Komplex APC^{Cdc20} die Degradation des Anaphase-Inhibitors Securin (Jallepalli & Lengauer, 2001; Peters, 2002; Nasmyth, 2005). Die APC-vermittelte Degradation von Securin (Pds1) ist essentiell für den Übergang von der Metaphase zur Anaphase in der Bäckerhefe und führt zur Trennung der Schwesterchromatiden. Securin inhibiert während der Metaphase durch Bindung den Anaphase-Aktivator Separin (Protease). Die Degradation von Securin zu Beginn der Anaphase aktiviert die Protease Separin und löst die proteolytische Zerstörung der Cohesin-Komplexe aus, welche die Schwesterchromatiden zusammenhalten. Die Komplexe APC^{Cdc20} und APC^{Cdh1} sind für die Degradation von Cyclin-B in der Mitose verantwortlich (Peters, 2002; Reed, 2003). Die Inaktivierung von Cyclin-B ist in eukaryotischen Zellen ein essentieller Vorgang, um die Mitose abzuschließen und in die G1-Phase einzutreten.

1.2.3 Zellzyklus-Kontrollpunkte

Für das Überleben von Zellen ist die fehlerfreie Replikation und Weitergabe des genetischen Erbmaterials essentiell. Zellzyklus-Kontrollpunkte (cell cycle checkpoints) garantieren dabei die richtige Abfolge der Vorgänge im Zellzyklus und tragen die Verantwortung dafür, dass kritische Prozesse (Replikation, Segregation) mit höchster Präzision durchgeführt werden. Zellzyklus-Kontrollpunkte sind Mechanismen, die prüfen ob zelluläre Bedingungen vorlie-

gen, die es einer Zelle erlauben, in die nächste Phase des Zellzyklus einzutreten. Kontrollpunkte können den Zellzyklus unterbrechen, bis Bedingungen vorliegen, die es einer Zelle erlauben, den Zellzyklus fortzusetzen (Elledge, 1996; Kastan & Bartek, 2004). Die Deregulierung und Inaktivierung von Kontrollpunkten verursacht genomische Instabilität und hat große Bedeutung bei der Entstehung und Entwicklung von Krebserkrankungen (Bharadwaj & Hu, 2004; Jallepalli & Lengauer, 2001; Storchova & Pellman, 2004; Kastan & Bartek, 2004).

Kontrollpunkte können je nach Mechanismus in zwei Gruppen unterteilt werden. Intrinsische Kontrollpunkte (z.B. Metaphase-Kontrollpunkt) sind in den Zellzyklus eingebunden und während jeder Zellteilung aktiv. Extrinsische Kontrollpunkte werden in der Regel als Antwort auf Defekte (z.B. DNA-Schäden) aktiviert (Elledge, 1996).

Der bekannteste Kontrollpunkt ist der konservierte DNA-Schadenskontrollpunkt (DNA-damage checkpoint). Treten DNA-Schäden während des Zellzyklus auf, können die Zellen den extrinsischen Kontrollpunkt in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktivieren. Die Aktivierung des Kontrollpunkts führt zu einem Arrest (G1-, G2-Phase) oder zu einer Verzögerung des Zellzyklus (S-Phase) durch die Inhibierung von Zellzyklus-Regulatoren. Der Zellzyklusarrest ermöglicht den Zellen die DNA-Schäden zu beseitigen und verhindert die Weitergabe geschädigter DNA an die Tochterzellen (Zhou & Elledge, 2000; Kastan & Bartek, 2004).

Der konservierte Metaphase-Kontrollpunkt (spindel assembly checkpoint) in der Mitose ist ein intrinsischer Kontrollpunkt. Der Kontrollpunkt ist während jeder Zellteilung aktiv und verhindert den Übergang von der Metaphase zur Anaphase, so lange bis alle Chromosomen mit beiden Spindelpolen verknüpft und in der Äquatorialebene zwischen den beiden Spindelpolen (Metaphasen-Platte) angeordnet sind. Der aktive Kontrollpunkt verhindert die Trennung der Schwesterchromatiden durch Inhibierung des Komplexes APC^{Cdc20}. Er verhindert eine Fehlverteilung der Schwesterchromatiden und stellt sicher, dass die beiden Tochterzellen einen vollständigen Chromosomensatz erhalten (Nasmyth, 2005; Kops et al., 2005).

Ein wichtiger Kontrollpunkt in höheren eukaryotischen Zellen ist der postmitotische G1-Kontrollpunkt (post-mitotic G1-checkpoint; tetraploidy checkpoint). Dieser wird in polyploiden Zellen aktiviert und verursacht einen Zellzyklusarrest und den Zelltod. Der Kontrollpunkt überprüft in der G1-Phase den DNA-Gehalt von Zellen und verhindert den Eintritt von polyploiden Zellen in den Zellzyklus. Der molekulare Mechanismus der Aktivierung ist bisher ungeklärt. Allerdings finden sich Hinweise, dass nach Aktivierung des Kontrollpunkts die Induktion des Zellzyklusarrest in der G1-Phase und der Zelltod in Abhängigkeit des

Tumor-Suppressor-Proteins p53 erfolgen (Margolis et al., 2003; Andreassen et al., 2003; Storchova & Pellman, 2004; Giet et al., 2005).

Treten beispielsweise in einer Zelle Cytokinese-Defekte auf, führt dies nicht zu zwei diploiden Tochterzellen, sondern einer tetraploiden Zelle mit zwei Zellkernen. In der G1-Phase wird in tetraploiden p53^{+/+}-Zellen der Kontrollpunkt aktiviert und als Antwort der Zellzyklusarrest und der Zelltod induziert. In tetraploiden p53^{-/-}-Zellen (z.B. HeLa-Zellen) wird der Kontrollpunkt möglicherweise aktiviert, aber der Zellzyklusarrest und der Zelltod kann in diesen Zellen nicht induziert werden. Die p53^{-/-}-Zellen entkommen dem Zellzyklusarrest und setzen ihren Zellzyklus fort. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass tetraploide p53^{-/-}-Zellen mit hoher Effizienz in Mäusen Tumore induzieren können (Shi & King, 2005; Fujiwara et al., 2005).

1.3 Die Aurora-Kinase-Familie

Für die Regulation der Zellteilung werden neben den Cdk/Cyclin-Komplexen weitere Proteinkinasen (z.B. Nek2, Mps1, Polo-Kinasen, Aurora-Kinasen usw.) benötigt (Nigg, 2001). Aurora-Kinasen sind eine konservierte Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die an der Regulation der Mitose und Meiose beteiligt sind. Untersuchungen in verschiedenen Modellorganismen haben gezeigt, dass der Einfluss der Aurora-Kinasen von der G2-Phase bis zur Cytokinese reicht. Sie regulieren die Reifung und Trennung der Centrosomen, die Bildung und Stabilität der mitotischen Spindel, die Segregation der Chromosomen und die Bildung und Positionierung der Teilungsfurche (Andrews et al., 2003; Katayama et al., 2003; Carmena & Earnshaw, 2003; Ducat & Zheng, 2004; Meraldi et al., 2004; Giet et al., 2005).

Aurora-Kinasen sind in allen eukaryotischen Lebewesen konserviert (Nigg, 2001; Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005). Einzellige eukaryotische Organismen haben nur ein Aurora-Gen. Multizelluläre Lebewesen besitzen mindestens zwei Aurora-Gene. In Säugern und in höheren Pflanzen konnten bisher jeweils drei Aurora-Gene nachgewiesen werden (Demidov et al., 2005; Kawabe et al., 2005). Die Aurora-Kinasen bzw. Gene können entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation drei Subtypen zugeordnet werden (Abb.2A; Nigg, 2001; Crane et al., 2004a; Giet et al., 2005). Aurora-Kinasen vom Typ A und B werden in allen Metazoen (Tiere) exprimiert. Zusätzlich wird in Säugern noch eine dritte Kinase vom Typ C exprimiert. Einzellige eukaryotische Organismen produzieren nur eine Aurora-Kinase, die dem Subtyp B am ehesten entspricht. Überraschenderweise konnte in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wie in Säugerzellen drei Aurora-Kinasen nachgewiesen werden. Allerdings ist die Charakterisierung der drei Kinasen noch nicht abgeschlossen, und es ist nicht bekannt,

welchen Subtypen die drei Kinasen zugeordnet werden können (Demidov et al., 2005; Kawabe et al., 2005).

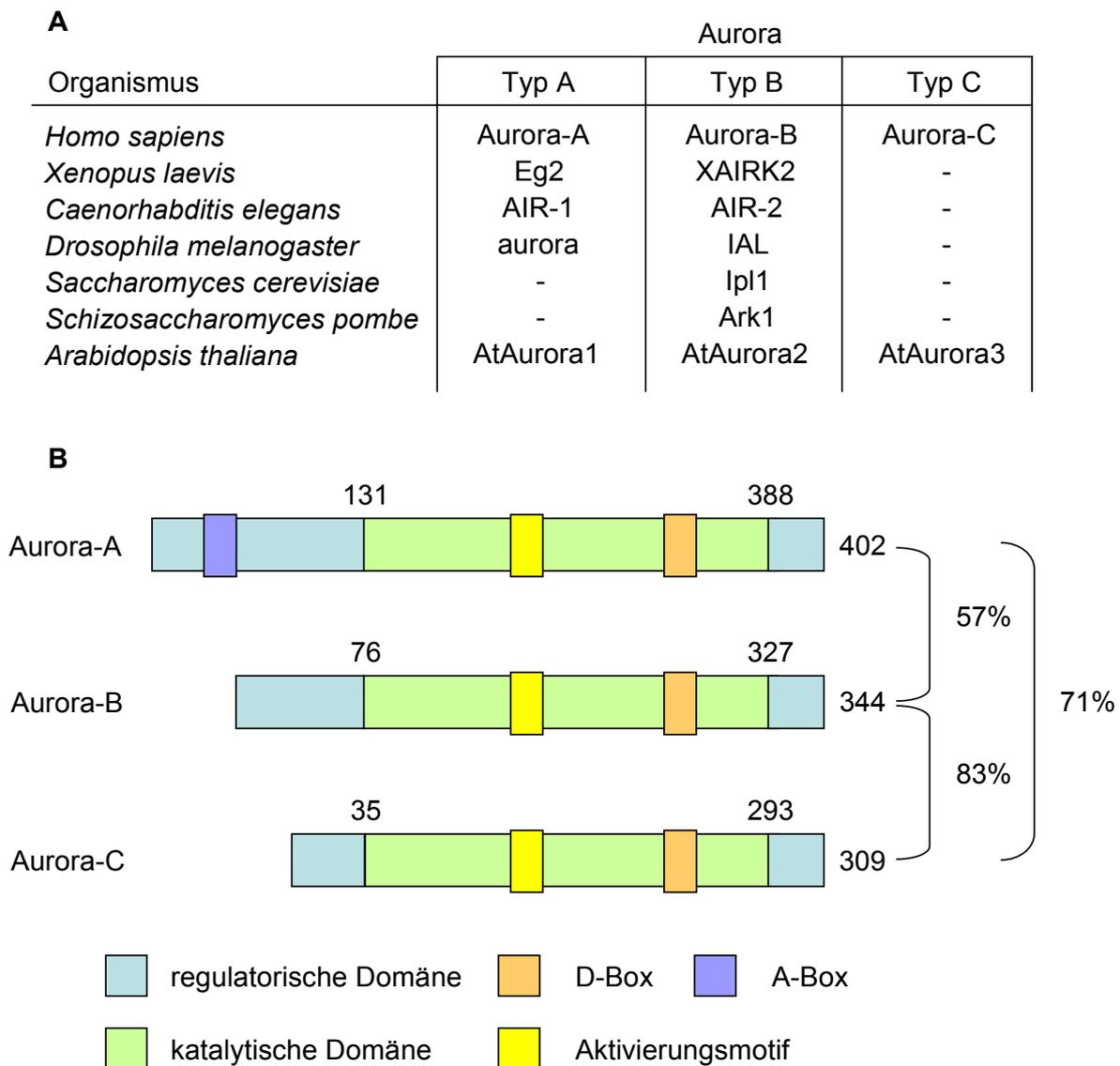


Abb.2: Eigenschaften der Aurora-Kinase-Familie.

(A) Aurora-Kinasen sind in allen eukaryotischen Lebewesen konserviert. Einzellige eukaryotische Organismen produzieren eine Aurora-Kinase vom Typ B. Metazoen produzieren mindestens zwei Aurora-Kinasen, eine vom Typ A und eine vom Typ B. Säuger produzieren eine dritte Aurora-Kinase vom Typ C. Höhere Pflanzen (*Arabidopsis*) produzieren wie Säuger drei Kinasen, die allerdings noch keinen Subtypen zugeordnet werden können.

(B) Organisation der humanen Aurora-Kinasen. Aurora-Kinasen haben einen charakteristischen Aufbau. Die katalytische Domäne ist hoch konserviert und enthält das Aktivierungsmotif der Kinase. Die katalytische Domäne wird flankiert von regulatorischen Domänen mit variabler Länge. Die Zahlen auf der rechten Seite der Abbildung geben die Länge der Proteine in Aminosäuren wieder und die Sequenz-Homologie in %. Alle Proteine enthalten Erkennungssequenzen (A-Box und D-Box), welche die Degradation durch das Ubiquitin/Proteasom-System regulieren.

In humanen Zellen existieren drei paraloge Aurora-Kinasen, die entsprechend der Nomenklatur als Aurora-A, -B und -C bezeichnet werden (Nigg, 2001). Die Sequenz-Homologie der humanen Aurora-Kinasen und der orthologen Aurora-Kinasen ist sehr hoch (Abb.2B; Carmena & Earnshaw, 2003; Brown et al., 2004; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005). So zeigen Aurora-A und -B eine Homologie von 57%, Aurora-B und -C von 83% und Aurora-A und -C eine Homologie 71%. Trotz dieser hohen Sequenz-Homologie weisen Aurora-A und -B unterschiedliche Funktionen, Lokalisationsprofile und Substratspezifitäten auf (Bayliss et al., 2004; Eyers et al., 2005; Giet et al., 2005).

Die Kinasen der Aurora-Familie weisen alle denselben charakteristischen Aufbau auf (Abb.2A; Carmena & Earnshaw, 2003; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005): Sie besitzen eine konservierte katalytische Domäne, die von regulatorischen Domänen mit variabler Länge flankiert wird. Die Sequenz-Homologie der Aurora-Kinasen unterschiedlichen Subtyps beschränkt sich in der Regel auf den Bereich der katalytischen Domäne. Die katalytische Domäne enthält das Aktivierungsmotif und eine D-Box, die die APC-vermittelte Degradation der Kinasen durch das Ubiquitin/Proteasom-System reguliert, und wird von regulatorischen Domänen am N-terminalen und C-terminalen Ende der Kinase flankiert. Die regulatorischen Domänen sind charakteristisch für die jeweilige Aurora-Kinase. Die N-terminale Domäne der Aurora-Kinasen vom Typ A enthält einen Sequenzabschnitt der als A-Box bezeichnet wird. Diese ist ein Aurora-A-spezifisches Degron, das zusammen mit der D-Box die Degradation von Aurora-A durch das Ubiquitin/Proteasom-System reguliert (Littlepage & Ruderman, 2002; Crane et al., 2004b).

Die humanen Aurora-Kinasen weisen noch weitere Gemeinsamkeiten auf. Alle drei humanen Aurora-Gene befinden sich auf chromosomalen Abschnitten (A:20q13, B:17p13, C:19q13), die sehr häufig in Krebszellen verändert sind (Carmena & Earnshaw, 2003; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005). Die Überexpression der Kinasen konnte unabhängig voneinander in verschiedenen Krebszelllinien und primären Tumoren nachgewiesen werden. Während der Beitrag von Aurora-B und -C bei der Entwicklung und Entstehung von Krebserkrankungen ungeklärt ist, verursacht eine ektopische Expression von Aurora-A die Transformation von Säugerzellen (Zhou et al., 1998). Aurora-A gilt dabei als ein klassisches Onkogen (Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005).

Aurora-Kinasen sind von außerordentlichem Interesse bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Krebs (Keen & Taylor, 2004; Andrews, 2005; Mortlock et al., 2005). Mittlerweile konnten einige niedermolekulare Inhibitoren (Hesperadin, ZM447439, VX-680) gefunden werden, die Aurora-Kinasen spezifisch inhibieren können (Hauf et al., 2003; Ditchfield et al.,

2003, Harrington et al., 2004). Für den Inhibitor VX-680 konnte sogar eine antitumorale Wirkung in Tiermodellen nachgewiesen werden (Harrington et al., 2004; Matthews et al., 2006).

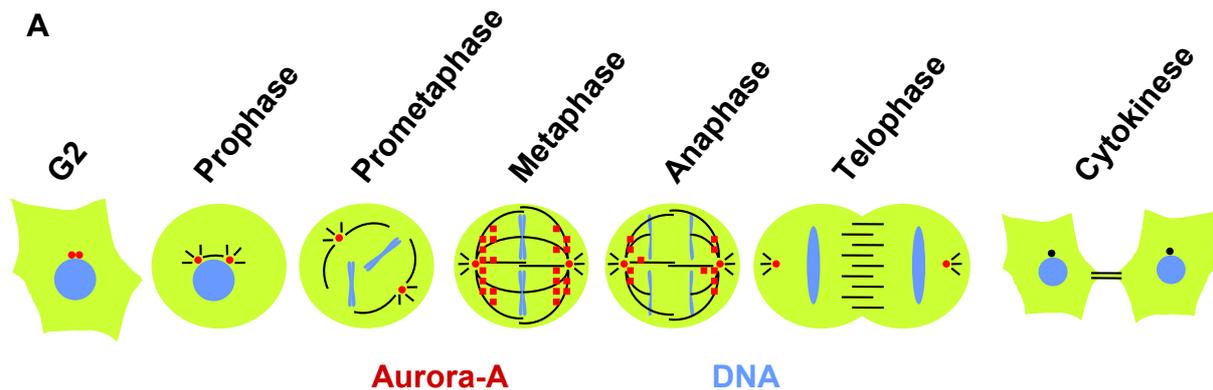
1.3.1 Aurora-A

Die erste Aurora-Kinase vom Typ A wurde in *Drosophila melanogaster* bei der Suche nach Mutanten mit defekten mitotischen Spindeln entdeckt und aufgrund der Lokalisation an den Zellpolen nach dem Polarlicht Aurora benannt (Carmena & Earnshaw, 2003). In der Folge wurden Aurora-Kinasen vom Typ A (Aurora-A) in allen Metazoen nachgewiesen. Die intensiven Untersuchungen zu Aurora-A in den unterschiedlichen Modellorganismen haben gezeigt, dass die wichtigsten physiologischen Funktionen der Kinase in den verschiedenen Systemen weitgehend konserviert sind. Aurora-A reguliert den Eintritt von Zellen in die Mitose, die Reifung und Trennung der Centrosomen und die Ausbildung und Stabilität der mitotischen Spindel (Carmena & Earnshaw, 2003; Crane et al., 2004a; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005).

Die Aurora-A-mRNA bzw. das Protein werden in allen proliferierenden Zelltypen exprimiert. Die mRNA und die Proteinmenge unterliegen Zellzyklus-abhängigen Schwankungen und werden von der G2-Phase bis zur folgenden G1-Phase exprimiert. Die Expression der mRNA bzw. des Proteins und die katalytische Aktivität der Kinase erreichen ihr Maximum zu Beginn der Mitose. In der G1-Phase wird das Protein in Abhängigkeit von APC^{Cdh1} degradiert. Von der G2-Phase bis zur folgenden G1-Phase ist das Protein an den duplizierten Centrosomen lokalisiert. Aurora-A wird deshalb auch als das centrosomale Aurora-Protein bezeichnet. Das Protein lokalisiert außerdem während der Mitose an der mitotischen Spindel (Abb.3A; Carmena & Earnshaw, 2003; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005).

RNAi-Experimente (RNA interference) in Säugerzellen haben gezeigt, dass die Aktivität von Aurora-A essentiell für den Eintritt in die Mitose ist. In Abwesenheit von Aurora-A wird einer der wichtigsten mitotischen Regulatoren, der Komplex Cdk1/Cyclin-B, nicht aktiviert (Hirota et al., 2003).

Eine ektopische Expression von Aurora-A verursacht die Transformation von Säugerzellen (Zhou et al., 1998). Obwohl Aurora-A an der Regulation der Cytokinese nicht direkt beteiligt ist, verursacht die Überexpression der Kinase Cytokinese-Defekte, die wiederum Centrosomen-Amplifikation und Aneuploidie verursachen (Meraldi et al., 2002; Carmena & Earnshaw, 2003; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005).



B

Kinase	Bindeproteine/ Substrate	Funktion
Aurora-A	Ajuba TPX2 Eg5 p53	G2/M-Übergang Bildung und Stabilität der mitotischen Spindel Reifung und Trennung der Centrosomen Tumor-Suppressor-Protein

Abb.3: Eigenschaften von Aurora-A.

(A) Lokalisationsprofil des endogenen Aurora-A während der Zellteilung. Aurora-A (rot) wird Zellzyklus-abhängig von der G2-Phase bis zur Telophase exprimiert. Von der G2-Phase bis zur Telophase ist das Protein an den duplizierten Centrosomen lokalisiert. Das Protein lokalisiert außerdem während der Metaphase und Anaphase an der mitotischen Spindel. Am Ende der Mitose wird das Protein in Abhängigkeit von APC^{Cdh1} degradiert. (B) Ausgewählte physiologische Interaktionspartner (Bindeproteine; Substrate) der Kinase Aurora-A.

Für die Aktivierung und Regulation von Aurora-A ist die Bindung an Hilfsfaktoren (auxiliary factors) von zentraler Bedeutung (Carmena & Earnshaw, 2003; Eyers et al., 2003; Giet et al., 2005). Die Kinaseaktivität von Aurora-A ist nicht absolut abhängig von der Bindung an einen Hilfsfaktor, wird aber durch diese Assoziation um ein Vielfaches erhöht und führt zur Autoaktivierung der Kinase durch Auto-Phosphorylierung des eigenen Aktivierungsmotifs. Zudem vermitteln Hilfsfaktoren die korrekte subzelluläre Lokalisation der Kinase, die Grundvoraussetzung für den Kontakt mit den Substraten ist (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005).

Ein Beispiel für die Regulation durch Hilfsfaktoren ist die Interaktion zwischen Aurora-A und TPX2 in der Mitose (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005). TPX2 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das für die Bildung und Stabilität der mitotischen Spindel und die

Regulation von Aurora-A essentiell ist (Gruss et al., 2002; Eyers & Maller, 2004; Karsenti, 2005). Während der Interphase ist TPX2 durch die Bindung an Importin- α und - β inhibiert. In der Mitose wird TPX2 durch RAN-GTP aktiviert und dissoziiert von Importin- α und - β (Gruss et al., 2001; Tsai et al., 2003). Das aktivierte TPX2 bindet dann an die mitotische Spindel und rekrutiert Aurora-A an die Spindel (Kufer et al., 2002). Die Bindung von Aurora-A an TPX2 induziert die Autoaktivierung der Kinase (Eyers & Maller, 2004). Humanes Aurora-A autophosphoryliert das eigene Aktivierungsmotif an Position T288 (Hirota et al., 2003). Außerdem phosphoryliert die Kinase auch TPX2, das nicht nur ein Aktivator von Aurora-A ist, sondern auch ein Substrat (Kufer et al., 2002). Die Strukturanalyse des Komplexes Aurora-A/TPX2 zeigt, dass die Bindung von Aurora-A an TPX2 zu einer Konformations-Änderung der Kinase führt, die eine effizientere Bindung von Substraten ermöglicht und die Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung der Kinase durch die Proteinphosphatase PP1, einem negativen Regulator von Aurora-A, verhindert (Katayama et al., 2001; Bayliss et al., 2003; Bayliss et al., 2004).

Ein ähnlicher Aktivierungs-Mechanismus ist für Aurora-A in der G2-Phase beschrieben. Am Ende der G2-Phase wird Aurora-A von dem Hilfsfaktor Ajuba aktiviert und an die Centrosomen gebunden. Diese durch Ajuba vermittelte Aktivierung von Aurora-A ist in Säugerzellen essentiell beim Übergang von der G2-Phase in die Mitose (Hirota et al., 2003).

Bisher konnten eine Vielzahl von physiologischen Substraten der Kinase Aurora-A beschrieben werden (Abb.3B; Carmena & Earnshaw, 2003; Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005). Hinsichtlich der Entstehung und Entwicklung von Krebserkrankungen ist die Interaktion von Aurora-A und dem Tumor-Suppressor-Protein p53 in Säugerzellen von besonderem Interesse (Marumoto et al., 2005; Giet et al., 2005). Aurora-A phosphoryliert p53 an den Positionen S215 und S315. Die Phosphorylierung von S215 unterbindet die Transaktivierung von p53 (Liu et al., 2004). Die Phosphorylierung von S315 destabilisiert p53 in Abhängigkeit von der Ubiquitin-Ligase Mdm2 (Katayama et al., 2004). Die Überexpression von Aurora-A, wie sie in vielen Krebszellen zu beobachten ist, inaktiviert vermutlich p53, wodurch die Zellen nicht in der Lage sind auf bestimmte zelluläre Defekte, wie z.B. DNA-Schäden, zu reagieren (Katayama et al., 2004).

1.3.2 Aurora-B

Aurora-Kinasen vom Typ B werden in Metazoen und in einzelligen eukaryotischen Organismen wie der Bäckerhefe nachgewiesen. Eine Reihe von Untersuchungen zu Aurora-B in den unterschiedlichen Modellorganismen hat gezeigt, dass die wichtigsten physiologischen Funktionen der Kinase stark konserviert sind. Aurora-B reguliert die Kondensation der Chromosomen, die Verknüpfung der Kinetochoren mit der mitotischen Spindel und die Ausbildung und Positionierung der Teilungsfurche während der Cytokinese (Carmena & Earnshaw, 2003; Crane et al., 2004a; Ducat & Zheng, 2004; Meraldi et al., 2004; Giet et al., 2005).

Aurora-B wird in allen proliferierenden Zelltypen von der G2-Phase bis zur folgenden G1-Phase exprimiert (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005). Die mRNA bzw. Proteinmenge unterliegen Zellzyklus-abhängigen Schwankungen, wobei die Expression der mRNA bzw. des Proteins ihr Maximum in der Mitose erreichen. Die katalytische Aktivität der Kinase hat ihr Maximum innerhalb der Metaphase und der Telophase. In der G1-Phase wird das Protein schließlich in Abhängigkeit von APC^{Cdh1} degradiert (Stewart & Fang, 2005). Die Behandlung von Zellen mit siRNAs gegen Aurora-B sowie die Überexpression von Kinase-inaktiven Aurora-B verursachen Cytokinese-Defekte (Honda et al., 2003).

Aurora-B wird als „Chromosomal-Passenger-Protein“ eingeordnet (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005). Zu diesen zählen Proteine, die während der Metaphase zunächst an den Kinetochoren bzw. Centromeren lokalisieren, in der anschließenden Anaphase dagegen an der Zentralspindel nachweisbar sind (Vagnarelli & Earnshaw, 2004). Aurora-B ist von der Prophase bis zur Metaphase an den Kinetochoren lokalisiert, während der Anaphase an der Zentralspindel, während der Telophase an der Teilungsfurche und schließlich während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper (midbody) (Abb.4A; Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005).

Aurora-B ist Teil des „Chromosomal-Passenger-Komplex“ (Carmena & Earnshaw, 2003; Vagnarelli & Earnshaw, 2004; Giet et al., 2005). Der „Chromosomal-Passenger-Komplex“ ist ein konservierter Proteinkomplex, der sich aus verschiedenen „Chromosomal-Passenger-Proteinen“ zusammensetzt. In Säugerzellen besteht der Komplex aus Aurora-B, INCENP (inner centromere protein), Survivin und Borealin (Giet et al., 2005). Die Lokalisation und Aktivität von Aurora-B wird von den anderen Bausteinen des Komplexes reguliert. Die Regulation von Aurora-B durch „Chromosomal-Passenger-Proteine“ weist Parallelen zur Regulation von Aurora-A durch Hilfsfaktoren auf (Carmena & Earnshaw, 2003). Fehlt ein Baustein des Komplexes, sind die verbleibenden Komponenten nicht in der Lage an die Kinetochoren bzw. Zentralspindel zu binden. Die Bindung von Aurora-B an INCENP oder

Survivin stimuliert die Aktivität der Kinase *in vitro* und *in vivo* (Honda et al., 2003; Wheatley et al., 2004; Giet et al., 2005). Die Bindung der Kinase an INCENP oder Survivin stimuliert die Auto-Phosphorylierung des eigenen Aktivierungsmotifs an T232 (Yasui et al., 2004). Borealin dagegen kann die Aktivität von Aurora-B nicht stimulieren, ist aber ebenso wie INCENP ein Substrat der Kinase (Gassmann et al., 2004; Sampath et al., 2004).

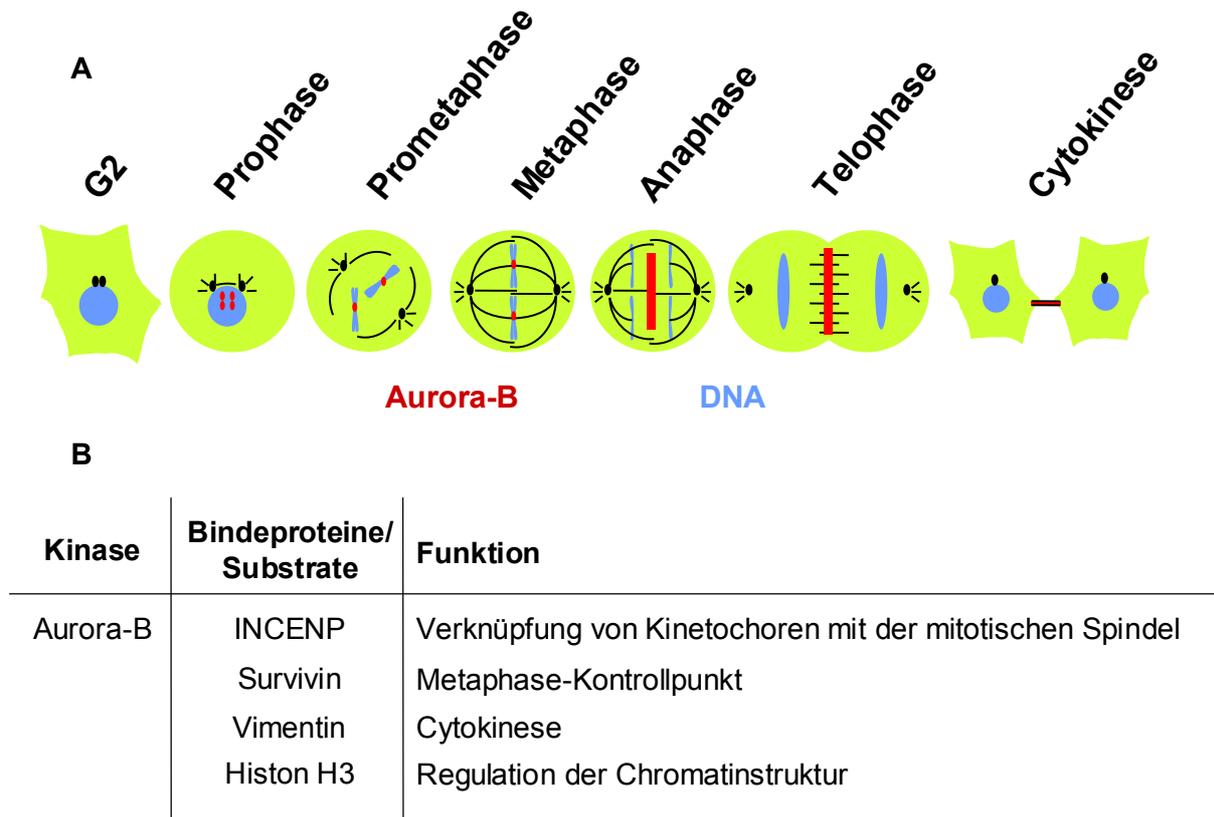


Abb.4: Eigenschaften von Aurora-B.

(A) Lokalisationsprofil des endogenen Aurora-B während der Zellteilung. Aurora-B (rot) wird Zellzyklus-abhängig von der G2-Phase bis zur Telophase exprimiert und hat das Lokalisationsprofil eines „Chromosomal-Passenger-Proteins“. Von der Prophase bis zur Metaphase lokalisiert Aurora-B an den Kinetochoren, während der Anaphase an die Zentralspindel, während der Telophase an der Teilungsfurche und schließlich während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper. Am Ende der Mitose wird das Protein in Abhängigkeit von APC^{Cdh1} degradiert. (B) Ausgewählte physiologische Interaktionspartner (Bindeproteine; Substrate) der Kinase Aurora-B.

Bisher konnten eine Vielzahl von physiologischen Substraten der Kinase Aurora-B beschrieben und sogar eine Konsensus-Phosphorylierungsstelle bestimmt werden (Abb.4B; Cheeseman et al., 2002; Meraldi et al., 2004). Die Phosphorylierung von Histon H3 an S10 durch Aurora-B ist in allen eukaryotischen Organismen konserviert (Pascreau et al., 2003; Prigent & Dimitrov, 2003). Diese Phosphorylierung reguliert die Bindung des Proteins HP1 (heteroch-

romatin protein 1), das die Chromatinstruktur reguliert (Maison & Almouzni, 2004; Hirota et al., 2005).

1.3.3 Aurora-C

Im Gegensatz zu Aurora-A und -B sind die relativ wenigen, bisher erhobenen Befunde zu Aurora-C oft widersprüchlich (Carmena & Earnshaw, 2003; Crane et al., 2004a; Ducat & Zheng, 2004; Meraldi et al., 2004; Giet et al., 2005). Während die Untersuchungen zu Aurora-A und -B in einer Vielzahl von Modellorganismen möglich sind, ist die Untersuchung von Aurora-C auf Säuger beschränkt, da in den meisten Modellorganismen keine Aurora-Kinasen vom Typ C existieren (Carmena & Earnshaw, 2003; Crane et al., 2004a; Giet et al., 2005).

Im Gegensatz zu Aurora-A und -B, die in allen proliferierenden Säugerzellen exprimiert werden, ist Aurora-C nur einigen wenigen Zelltypen nachweisbar (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005). Einige Untersuchungen sprechen dafür, dass die Aurora-C-mRNA ausschließlich in den männlichen und weiblichen Keimdrüsen exprimiert wird (Bernard et al., 1998; Tseng et al., 1998; Kimura et al., 1999; Hu et al., 2000; Yan et al., 2005b; Tang et al., 2006). Als sicher gilt, dass Aurora-C in Krebszelllinien und Tumoren exprimiert wird, wo Aurora-C auf mRNA- oder Proteinebene nachgewiesen wurde (Kimura et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Ehara et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Sasai et al., 2004; Li et al., 2004; Ulisse et al., 2006).

Die Aurora-C-mRNA ist im Gegensatz zu der Aurora-A- bzw. -B-mRNA während des ganzen Zellzyklus in gleich bleibender Konzentration nachweisbar (Sasai et al., 2004; Ulisse et al., 2006). Die Untersuchungen über das Verhalten der Proteinmenge während des Zellzyklus sind widersprüchlich (Kimura et al., 1999; Crosio et al., 2004; Sasai et al., 2004; Li et al., 2004; Ulisse et al., 2006).

Die subzelluläre Lokalisation des endogenen Proteins ist in somatischen Zellen unbekannt (Giet et al., 2005). Nach Überexpression konnte gezeigt werden, dass sich das Aurora-C in der Mitose wie Aurora-B als „Chromosomal-Passenger-Protein“ verhält (Abb.5A; Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Yan et al., 2005a; Yan et al., 2005b; Dutertre et al., 2005). Das überexprimierte Protein lokalisiert, wie bereits für das endogene Aurora-B beschrieben, von der Prophase bis zur Metaphase an den Kinetochoren, während der Anaphase an die Zentralspindel, während der Telophase an der Teilungsfurche und schließlich während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Yan et al., 2005a; Yan et al., 2005b; Dutertre et al., 2005). Die überexprimierte Kinase hat nicht nur das Lokalisationsprofil eines „Chromosomal-Passenger-Proteins“, sondern liegt

wahrscheinlich auch in einem „Chromosomal-Passenger-Komplex“ vor. Tatsächlich konnten Interaktionen mit INCENP und Survivin, aber auch Aurora-B *in vivo* nachgewiesen werden (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Yan et al., 2005a). *In vitro* wird die Kinaseaktivität von Aurora-C durch die Zugabe von INCENP stimuliert (Li et al., 2004, Sasai et al., 2004).

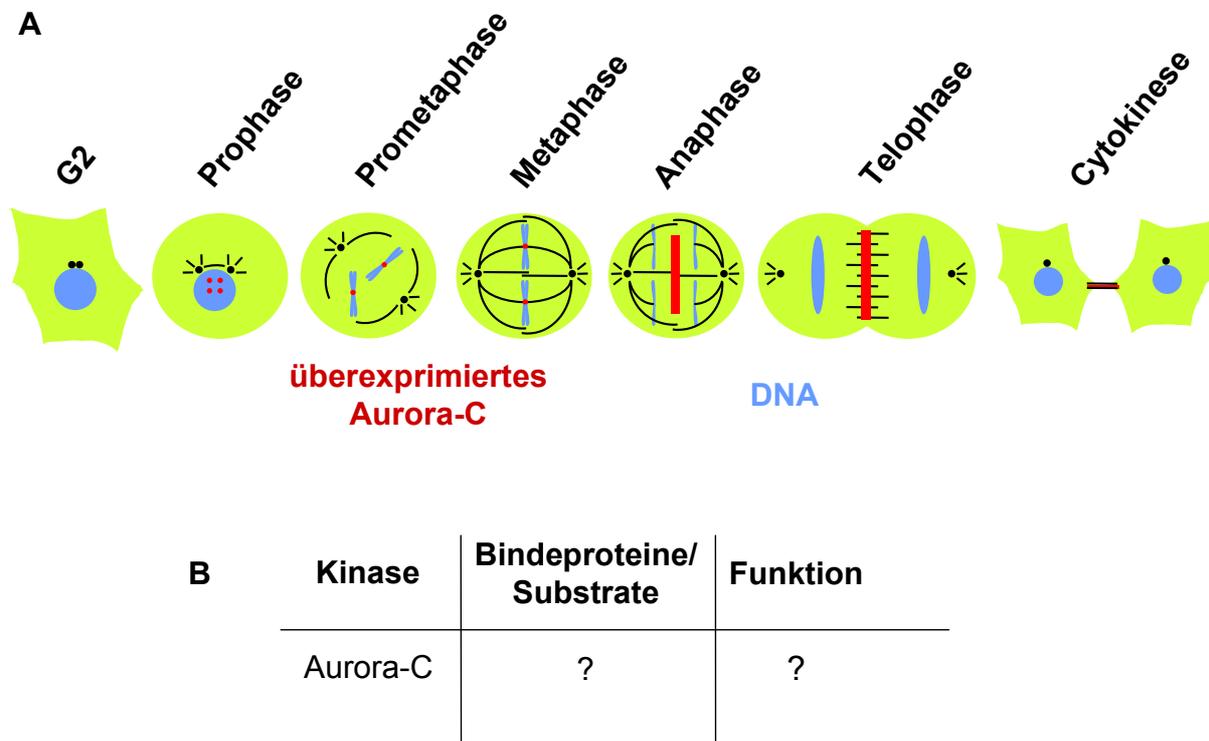


Abb.5: Eigenschaften von Aurora-C.

(A) Lokalisationsprofil des überexprimierten Aurora-C während der Zellteilung. Das überexprimierte Aurora-C (rot) hat das Lokalisationsprofil eines „Chromosomal-Passenger-Proteins“. Von der Prophase bis zur Metaphase lokalisiert Aurora-C an den Kinetochoren, während der Anaphase an die Zentralspindel, während der Telophase an der Teilungsfurche und schließlich während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper. (B) Es sind bisher keine physiologischen Interaktionspartner (Bindeproteine; Substrate) der Kinase Aurora-C bekannt.

Nach Überexpression und mit RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte Aurora-C und das endogene Aurora-B redundante Funktionen in der Mitose aufweisen (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Giet et al., 2005). Die ektopische Expression von Kinase-inaktivem Aurora-C oder -B verursacht Cytokinese-Defekte und die Akkumulation von multiplen Zellkernen in p53^{-/-}-Zellen (Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005). Die Behandlung von HeLa-Zellen mit siRNAs gegen Aurora-C bzw. Aurora-B verursacht in beiden Fällen Cytokinese-Defekte (Honda et al., 2003; Sasai et al., 2004). RNAi-Untersuchungen haben

außerdem gezeigt, dass das überexprimierte Aurora-C die Funktion von Aurora-B in Abwesenheit von Aurora-B komplementieren kann (Sasai et al., 2004).

In Zellen, die sich in der Interphase befinden, lokalisiert das überexprimierte Aurora-C wie Aurora-A allerdings mit nur schwacher Affinität an die Centrosomen (Dutertre et al., 2005). Die Zellen weisen häufig eine abnorme Centrosomenzahl auf und sind polyploid.

Eine kürzlich vorgestellte Studie beschreibt die subzelluläre Lokalisation des endogenen Aurora-C in Mausspermatozyten (Tang et al., 2006). Hier wurde gezeigt, dass sich das endogene Aurora-C in der Meiose I und II wie ein „Chromosomal-Passenger-Protein“ verhält und in mitotischen Spermatozyten nicht nachweisbar ist.

Bisher konnten keine physiologischen Funktionen für Aurora-C beschrieben werden, die sich spezifisch auf die Kinaseaktivität von Aurora-C zurückführen lassen (Giet et al., 2005). Bisher wurden auch keine physiologischen Substrate von Aurora-C identifiziert (Abb.5B). Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Aurora-C und Aurora-B *in vitro* identische Substratspezifität zeigen, die sich von der für Aurora-A nachgewiesenen Spezifität unterscheidet (Bayliss et al., 2004; Evers et al., 2005; Ferrari et al., 2005; Giet et al., 2005).

2.0 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der humanen Proteinkinase Aurora-C in Krebszellen. Nach Herstellung von Aurora-C-spezifischen Antikörpern sollte das Lokalisationsprofil des endogenen Proteins bestimmt werden. Durch ektopische Expression von verschiedenen Aurora-C-Derivaten und RNA-Interferenz sollten die physiologischen Funktionen der Kinase in Krebszellen untersucht werden. Außerdem sollte durch einen Two-Hybrid-Screen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* potentielle Interaktionspartner der Kinase Aurora-C identifiziert werden.

3.0 Material

3.1 Bakterienstämme

Folgende *Escherichia coli*-Stämme wurden verwendet:

Stamm	Genotyp
XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR27 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15</i> Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]
Rosetta (Novagen)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 pRARE2² (Cm^R) pAR5615 (Ap^R)</i>

3.2 Hefestämme

Für diese Arbeit wurde der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (Clontech) verwendet. Der Stamm hat folgenden Genotyp:

MATa, trp1-901, leu2-3, ura3-52, his3-200, GAL4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

3.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

Zelllinie	Anmerkung
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zellen
293T	humane, embryonale Nierenzellen (Adenovirus-transformiert)
U2OS	primäre, humane Osteosarcoma-Zellen
Sf9	Insektenzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>

3.4 Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet:

Name	Beschreibung
pAcHLT-A	Pharmigen
pAcHLT-A-Aurora-C-K72R	Vektor: pAcHLT-A Insert: EcoRI-Aurora-C-K72R-NotI
pAcHLT-A-Aurora-C-WT	Vektor: pAcHLT-A Insert: EcoRI-Aurora-C-WT-NotI
pBC-Myc-TRF2 ⁽¹⁾	Vektor: pBC (X78316) Insert: EcoRV-Myc-TRF2- XhoI
pcDNA3.1/Neo (-)/(+)	Invitrogen
pcDNA-Aurora-C-WT	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: HindIII-Aurora-C-XhoI
pcDNA-Calpain-4 ⁽²⁾	Vektor: pcDNA3.1/Zeo (-) Insert: XbaI-Calpain-4-HindIII
pcDNA-Flag-Calpain-4	Vektor: pcDNA3.1/Zeo (-) Insert: NheI-BamHI-Flag-XbaI-Calpain-4-HindIII
pcDNA-HA-Aurora-C-K72R ⁽³⁾	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: XbaI-HA-Aurora-C-K72R-HindIII
pcDNA-HA-Aurora-C-T191D	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: XbaI-HA-Aurora-C-T191D-HindIII
pcDNA-HA-Aurora-C-T198D	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: XbaI-HA-Aurora-C-T198D-HindIII
pcDNA-HA-Aurora-C-T202D	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: XbaI-HA-Aurora-C-T202D-HindIII
pcDNA-HA-Aurora-C-WT	Vektor: pcDNA3.1/Neo (-) Insert: XbaI-HA-Aurora-C-WT-HindIII
pcDNA-Myc-TRF2	Vektor: pcDNA3.1/Neo (+) Insert: EcoRV-Myc-TRF2-XhoI

Name	Beschreibung
pcDNA-Myc-TRF2-T358A	Vektor: pcDNA3.1/Neo (+) Insert: EcoRV-Myc-TRF2-T358A-XhoI
pcDNA-Myc-TRF2-T358A/S360A	Vektor: pcDNA3.1/Neo (+) Insert: EcoRV-Myc-TRF2-T358A/S360A-XhoI
pcDNA-Myc-TRF2-T358D	Vektor: pcDNA3.1/Neo (+) Insert: EcoRV-Myc-TRF2-T358D-XhoI
pcDNA-Myc-TRF2-T450A	Vektor: pcDNA3.1/Neo (+) Insert: EcoRV-Myc-TRF2-T450A-XhoI
pGBKT7	Clontech
pGBKT7-Aurora-C-K72R	Vektor: pGBKT7 Insert: EcoRI-Aurora-C-K72R-BamHI
pGBKT7-Aurora-C-K72R-N210As	Vektor: pGBKT7 Insert: Aurora-C K72R-N210As (siehe 4.3)
pGEX-4T-1	Amersham
pGEX-4T-1-Aurora-C-K72R	Vektor: pGEX-4T-1 Insert: EcoRI-Aurora-C-K72R-NotI
pGEX-4T-1-Aurora-C-WT	Vektor: pGEX-4T-1 Insert: EcoRI-Aurora-C-WT-NotI
pSuper	OligoEngine
pSuper-Aurora-C-1	Vektor: pSuper Insert: BglII-shRNA-Aurora-C-1-HindIII
pSuper-Aurora-C-2 ⁽³⁾	Vektor: pSuper Insert: BglII-shRNA-Aurora-C-2-HindIII
pSuper-Luciferase ⁽³⁾	Vektor: pSuper Insert: BglII-shRNA-Luciferase-HindIII
pTriEx-1	Novagen
pTriEx-1-Calpain-4-Fragment	Vektor: pTriEx Insert: BglII-Calpain-4-Fragment-XhoI

Name	Beschreibung
pTriEx-1-RBM21-Fragment	Vektor : pTriEx Insert: BglIII-RBM21-Fragment-XhoI
pTriEx-1-Tid1-Fragment	Vektor: pTriEx Insert: BglIII-Tid1-Fragment-XhoI
pTriEx-1-TRF2-Fragment	Vektor: pTriEx Insert: BglIII-TRF2-Fragment-XhoI
pX	Superti-Furga et al. (1991)
pX-HA-Aurora-C-K72R	Vektor: pX Insert: SpeI-HA-Aurora-C-K72R-EcoRI
pX-HA-Aurora-C-WT	Vektor: pX Insert: SpeI-HA-Aurora-C-WT-EcoRI
pEGFP1-C1-AuroraC-K72R ⁽³⁾	Vektor: pEGFP1-C1 Insert: XhoI-Aurora-C-K72R-HindIII
pEGFP1-C1-Aurora-C-WT ⁽³⁾	Vektor: pEGFP1-C1 Insert: XhoI-Aurora-C-WT-HindIII
pEGFP1-C1-HA-AuroraC-K72R	Vektor: pEGFP1-C1-AuroraC-K72R Insert: BsrGI-SpeI-HA-XhoI
pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT	Vektor: pEGFP1-C1-Aurora-C-WT Insert: BsrGI-SpeI-HA-XhoI

- (1) Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. V. Schreiber (Université Louis Pasteur, Strasbourg) zur Verfügung gestellt. Die TRF2-cDNA enthält ein Basentriplet weniger als die Datenbanksequenz NM_005652. Dieses Triplet kodiert ein Alanin an Position 383.
- (2) Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Jochum und Dr. S. Gil Parrado (Ludwig Maximilians Universität München) zur Verfügung gestellt.
- (3) Plasmid wurde aus institutseigener Plasmidsammlung entnommen.

Die DNA-Sequenzierungen wurden von A. Hunzicker (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Mittlerweile sind mehrere Spliceformen des humanen Aurora-C-Proteins bzw. der mRNA beschrieben worden (Bernard et al., 1998; Li et al., 2004; Yan et al., 2005b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Aurora-C-cDNA gearbeitet, die ein 309-aminosäurelange Spliceform von Aurora-C kodiert (Kimura et al., 1999; NP_001015878).

3.5 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide und Primer wurden verwendet:

Name	Sequenz
shRNA-3.3-F	5'(GATCCCCGCGAGAAATTAGATGAACATTCAAGAGATGTTTCAT-TAATTTCTCGCTTTTTA)3' (Klonierung von pSuper-Aurora-C-1)
shRNA-3.3-R	5'(AGCTTAAAAAGCGAGAAATTAGATGAACATCTCTTGAATGTTTCAT-TAATTTCTCGCGGG)3' (Klonierung von pSuper-Aurora-C-1)
T358A-F	5'(CCAAGAACAAGCGCATGGCAATAAGCAGATTGGTC)3' (Mutagenese von TRF2-T358A)
T358A-R	5'(GACCAATCTGCTTATTGCCATGCGCTTGTTCTTGG)3' (Mutagenese von TRF2-T358A)
T450A-F	5'(CAAAAAAGCAGAAGTGGGCTGTAGAAGAAAGCGAGTG)3' (Mutagenese von TRF2-T450A)
T450A-R	5'(CACTCGCTTTCTTCTACAGCCCACTTCTGCTTTTTTTG)3' (Mutagenese von TRF2-T450A)
A358D-R	5'(GCCCAAGAACAAGCGCATGGACATAAGCAGATTGGTCTTGGAGG)3' (Mutagenese von TRF2-A358D)
A358D-F	5'(CCTCCAAGACCAATCTGCTTATGTCCATGCGCTTGTTCTTGGGC)3' (Mutagenese von TRF2-A358D)
S360A-F	5'(GAACAAGCGCATGGCAATAGCCAGATTGGTCTTGGAGGAGG)3' (Mutagenese von TRF2-T358A/S360A)
S360A-R	5'(CCTCCTCCAAGACCAATCTGGCTATTGCCATGCGCTTGTTTC)3' (Mutagenese von TRF2-T358A/S360A)
HA-F	5'(GTACAAC TAGTATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCC)3' (Klonierung von HA-Tag in pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT und -K72R)
HA-R	5'(TCGAGGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATACTAGTT)3' (Klonierung von HA-Tag in pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT und -K72R)
Flag-F	5'(CTAGCGGATCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGT)3' (Klonierung von Flag-Tag in pcDNA-Calpain-4)
Flag-R	5'(CTAGACTTGTCATCGTCGTCCTTG TAGTCCATGGATCCG)3' (Klonierung von Flag-Tag in pcDNA-Calpain-4)

Name	Sequenz
AC1	5'-GCATGAATTCCAGCTGGTACCATGGAATATGAGC-3' (5'-Primer für PCR-Amplifikation, siehe 4.6.7.1, 4.6.7.2, 4.6.7.3)
AC2	5'-GCATGGATCCAACAGAGGCAGACAGGGCTCAG-3' (3'-Primer für PCR-Amplifikation, siehe 4.6.7.1)
AC3	5'-GTTGAGCGGCCGCAACAGAGGCAGACAGGGCTCAG-3' (3'-Primer für PCR-Amplifikation, siehe 4.6.7.2, 4.6.7.3)
T191D-F	5'(GGCTGGTCTGTGCACGACCCCTCCCTGAGGAGG)3' (Mutagenese von Aurora-C-T191D)
T191D-R	5'(CCTCCTCAGGGAGGGGTCGTGCACAGACCAGCC)3' (Mutagenese von Aurora-C-T191D)
T198D-F	5'(CCCTCCCTGAGGAGGAAGGACATGTGTGGGACACTGGAC)3' (Mutagenese von Aurora-C-T198D)
T198D-R	5'(GTCCAGTGTCCCACACATGTCCTTCCTCCTCAGGGAGGG)3' (Mutagenese von Aurora-C-T198D)
T202D-F	5'(GAGGAAGACAATGTGTGGGGACCTGGACTACTTGCCGCCAG)3' (Mutagenese von Aurora-C-T202D)
T202D-R	5'(CTGGCGGCAAGTAGTCCAGGTCCCCACACATTGTCTTCCTC)3' (Mutagenese von Aurora-C-T202D)

Die Primer und Oligonukleotide wurden von W. Weinig (DKFZ, Heidelberg) oder von der Firma Roth (Karlsruhe) synthetisiert.

3.6 Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Name	Herkunft	Quelle	Western-Blot	Immunfärbung
Flag (M2)	Maus	Sigma	1:500	1:1000
c-Myc (9E10)	Maus	Clontech	1:1000	1:1000
HA (3F10)	Ratte	Roche	1:2000	1:80
HIS	Maus	Prof. Zentgraf (DKFZ)	Hybridomüberstand unverdünnt	-
HA (16B12)	Kaninchen	Babco	1:5000	1:200
α -human-Trf2 (4A794)	Maus	Upstate	1:1000	1:2000
α -Tubulin (B-5-1-2)	Maus	Sigma	1:20000	1:4000

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Name	Herkunft	Quelle	Western-Blot	Immunfärbung
α -Maus-Alexa-488	Ziege	Molecular Probes	-	1:200
α -Maus-IgG-HRP	Ziege	Amersham	1:10000	-
α -Ratte-Cy3 präabsorbiert	Esel	Dianova	-	1:300
α -Kaninchen-IgG-HRP	Esel	Amersham	1:3000	-
α -human-Rhodamin	Esel	Dianaova	-	1:400

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurde in der Regel 1 μ g Antikörper (Flag, c-Myc, HA) pro 1mg Zellysate eingesetzt. Für die Immunfärbung von Kinetochoren wurde humanes CREST-Serum unverdünnt eingesetzt. Das CREST-Serum stammte von Patienten mit CREST-Syndrom und wurde freundlicherweise von Prof. Ponstingl (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Bei dem CREST-Syndrom handelt es sich um eine Sonderform der Sklerodermie.

Für den Nachweis von endogenem Aurora-C wurde in Kooperation mit Prof. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg) Maushybridoma-Zelllinien zur Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Aurora-C etabliert. Für die Immunisierungen wurden das vollständige Aurora-C-Protein und zwei unterschiedliche Aurora-C-Peptide (Epitop-1: 275-289As; Epitop-2: 11-33As) eingesetzt.

Außerdem wurde die Produktion von polyklonalen α -Aurora-C-Antikörpern in Kaninchen bei Innovagen (Schweden) und Charles River (Niederlande) in Auftrag gegeben. Für die Immuni-

sierungen wurden das vollständige Aurora-C-Protein (Charles River) und drei unterschiedliche Peptide (Innovagen; Epitop-1: 275-289As; Epitop-2: 11-33As; Epitop-3: 124-144As) eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem vier kommerzielle α -Aurora-C-Antikörper der Firma Abgent getestet. Für den Nachweis von endogenem Aurora-C wurden verschiedene Bedingungen getestet.

3.7 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma, Fluka, Merck oder Roth bezogen. Die speziellen Chemikalien und Reagenzien sind unter 3.7.1 aufgelistet. Die Reagenzien zur Durchführung des Two-Hybrid-Screens wurden von Clontech bezogen.

3.7.1 Spezielle Reagenzien und Chemikalien

1kb DNA-Leiter	Invitrogen
100bp DNA-Leiter	Invitrogen
Baculovirus Agarose	Invitrogen
BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure)	Sigma
DNase I, RNase-frei	Roche
Grace Medium (2x)	Gibco
Pfu DNA Polymerase	Promega
Protein-A-Sepharose	Amersham
Protein-G-Sepharose	Amersham
Proteinmarker	NEB
RNase-A	Roche
T4 DNA Ligase	Roche
X- α -Gal	Clontech

3.7.2 Radiochemikalien

Adenosin 5'-[γ - ³² P]-triphosphat 250 μ Ci	Amersham
L-[³⁵ S]-Methionin 15 mCi/ml	Amersham

3.7.3 Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung von Lösungen und Puffern sind in der Regel in den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil aufgeführt. Nachfolgend ist nur die Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer angegeben:

PBS

NaCl 150mM

Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ (pH7.2) 10mM

TE-Puffer

Tris-HCl (pH7.5) 10mM

EDTA (pH8.0) 1mM

4.0 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

Der Stamm *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) wurde zur Amplifikation von Plasmiden eingesetzt. Der Stamm *Escherichia coli* Rosetta (Novagen) wurde zur Produktion von rekombinantem Protein verwendet. Beide Stämme wurden bei 37°C kultiviert. Der Stamm Rosetta wurde während der Proteinproduktion bei 28°C inkubiert.

Die Stämme wurden mit LB-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl, 0.3mM NaOH) kultiviert. Festmedien enthielten 2% (w/v) Agar. Falls erforderlich, wurde den Medien zur Selektion 100µg/ml Ampicillin, 100µg/ml Chloramphenicol, 30µg/ml Kanamycin oder 10µg/ml Tetracyclin zugesetzt.

4.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

4.1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation

200ml vorgewärmtes LB-Medium wurde mit 2ml Übernachtskultur des entsprechenden Stammes (XL1-Blue oder Rosetta) angeimpft und auf einem Rotationsschüttler bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 wurden die Zellen 15min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (10min, 4000G, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100mM) aufgenommen. Die Zellen wurden zentrifugiert (10min, 4000G, 4°C), in 8ml eiskalter CaCl₂/Glycerin-Lösung (85mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und aliquotiert. Bis zum Gebrauch wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

4.1.2.2 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 100µl der Zellen wurden mit der DNA (10ng gereinigtes Plasmid; 100ng Plasmid aus Ligationsansatz) gemischt und der Ansatz 30min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde der Transformationsansatz 100s in einem 42°C-warmen Thermoblock inkubiert und 3min auf Eis gekühlt. Der Transformationsansatz wurde mit 1ml LB-Medium versetzt und 60min auf einem Thermoschüttler bei 37°C mit 800Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend 5min lang mit 5000G zentrifugiert, in 200µl LB-Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 14 bis 16h bei 37°C inkubiert.

4.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Arbeiten mit Hefen wurden entsprechend den Arbeitsanweisungen im „Yeast Protocols Handbook“ (Clontech, 2000) durchgeführt. Bei einigen Methoden wurde davon abgewichen, und es wurden alternative Protokolle verwendet (siehe: 4.2.1; 4.7.11). Die Kultivierungsbedingungen und die Zusammensetzung der Medien und Lösungen können dem „Yeast Protocols Handbook“ von Clontech entnommen werden.

4.2.1 Transformation von Hefen mit der Lithiumacetatmethode

Folgendes Protokoll wurde verwendet, um Hefen im kleinen Maßstab zu transformieren (Gietz & Sugino, 1988):

20ml YPD-Medium wurden 1:20 mit einer Übernachtskultur des Rezipientenstamms AH109 angeimpft und 4h auf einem Rotationsschüttler bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (1min, 18000G) jeweils 1.5 OD₆₀₀ Zellen für einen Transformationsansatz geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1ml H₂O und 1ml TE-LiAc-Lösung (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 100mM Lithiumacetat (pH7.5)) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 50µl TE-LiAc-Lösung aufgenommen und folgende weitere Komponenten dem Transformationsansatz zugegeben:

0.1mg Heringssperma-DNA (Träger-DNA)

1µg Plasmid-DNA

300µl PEG-Lösung (40% (w/v) PEG 3350 in TE-LiAc-Lsg.)

Der Transformationsansatz wurde 20min auf einem Inkubationsrad bei RT und anschließend 15min in einem 42°C-warmen Thermoblock inkubiert. Danach wurden die Zellen 1min mit 18000G zentrifugiert, in 150µl H₂O aufgenommen und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend ausgewertet.

4.3 Two-Hybrid-Screen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Um Protein-Interaktionspartner von Aurora-C zu identifizieren, wurde ein Two-Hybrid-Screen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Der Two-Hybrid-Screen wurde mit dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) durchgeführt. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

Da die Überproduktion der Mutante Aurora-C-K72R von den Hefen nicht toleriert wird und toxisch ist, wurde als Köder-Protein ein 210-aminosäurelanges, N-terminales Fragment von Aurora-C-K72R verwendet. Das Insert des Vektors pGBKT7-Aurora-C-K72R-N210As kodiert das 210-aminosäurelange Fragment und wurde folgendermaßen isoliert: Das Plasmid pGBKT7-Aurora-C-K72R (kodiert Aurora-C-K72R) wurde in den Hefestamm AH109 transformiert und in der Regel von den Hefen nicht toleriert. Allerdings konnte eine geringe Anzahl von Klonen (2 bis 3 Klone pro Transformation) auf der entsprechenden Selektionsplatte wachsen. Bei genauer Analyse dieser Klone wurde festgestellt, dass diese in der Lage waren verkürzte Fragmente von Aurora-C-K72R zu produzieren. Das Plasmid des Klons, der das längste Fragment exprimiert, wurde isoliert und das Insert und die Sequenz der GAL4-DNA-Bindedomäne zur Sicherheit sequenziert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pGBKT7-Aurora-C-K72R-N210As und wurde für den Two-Hybrid-Screen eingesetzt.

Die Suche nach Interaktionspartnern wurde in einer HeLa cDNA Bibliothek von Clontech (HL4048AH) durchgeführt. Die cDNA-Fragmente waren dabei in den Vektor pACT2 kloniert. Die Amplifikation der Bibliothek erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

4.4 Arbeiten mit Sf9-Zellen und rekombinanten Baculoviren

4.4.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die Insektenzelllinie Sf9 (Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda*) wurde für die Virusrekombination, Virusamplifikation und Proteinproduktion eingesetzt. Zellkulturmethoden (Subkultivierung, Kryokonservierung usw.) wurden gemäß dem Methodenbuch von O'Reilly et al. (1994) durchgeführt. Die Zellzahl bzw. Zelldichte wurde mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt.

Sf9-Zellen wurden bei 27°C in TC-100 Medium (Cambrex) kultiviert, nach Zusatz von 1% (v/v) Antibiotic-Antimycotic (Gibco), 1% (v/v) L-Glutamin (Sigma) und 10% (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS; Biochrom). Die Zellen wurden entweder adhärenent oder in Suspension kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden in der Regel bei einer Zelldichte von 80% subkultiviert. Die Suspensionzellen (200ml) wurden in einer Schottflasche (500ml) auf einem Magnetrührer mit 120Upm kultiviert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zelldichte der Suspension im Bereich von 0.1×10^6 bis 1.2×10^6 Zellen/ml bewegte.

4.4.2 Herstellung von rekombinanten Aurora-C-Baculoviren

Die Herstellung von rekombinanten Baculoviren erfolgte mit dem Baculovirus Expression Vector System von Pharmingen (Becton Dickinson). Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren:

Für die Virusrekombination wurden Sf9-Zellen mit der BaculoGold Virus DNA (Pharmingen) und entweder dem Transfervektor pAcHLT-A-Aurora-C-WT oder -K72R cotransfiziert. Die Transfektion wurde mit dem BaculoGold Transfection Kit (Pharmingen) durchgeführt. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

Nach 3-4 Tagen wurden die Virusüberstände mit den rekombinanten Viren geerntet. Um einzelne Viruskclone zu isolieren, wurde mit den Virusüberständen eine Plaque-Aufreinigung (siehe 4.4.3) durchgeführt. Die Virusüberstände bzw. die Viren der ersten Plaque-Aufreinigung wurden durch eine zweite Plaque-Aufreinigung nochmals aufgereinigt. Die Virusüberstände der zweiten Plaque-Aufreinigung wurden amplifiziert und für die Produktion des rekombinanten His₆-Aurora-C-Fusionsproteins eingesetzt (siehe 4.7.4).

4.4.3 Plaque-Aufreinigung von Baculoviren

Die Plaque-Aufreinigung (Plaque-Assay) wurde zur Isolierung einzelner Virenklone und zur Bestimmung von Virustitern durchgeführt. Die Plaque-Aufreinigung wurde gemäß dem Methodenbuch von O'Reilly et al. (1994) durchgeführt.

4.4.4 Virusamplifikation von Baculoviren

8×10^6 adhärenente Sf9-Zellen (in 15ml Medium) wurden mit 100µl Virusüberstand (aus Plaque-Aufreinigung oder Langzeitlagerung) infiziert. Nach 5 Tagen wurde der Virusüberstand geerntet (1000G, 10min), und 18.5×10^6 adhärenente Sf9-Zellen (in 50ml Medium) wurden mit 2ml des geernteten Virusüberstands infiziert. Nach 5 Tagen wurde der Virusüberstand geerntet und der Virustiter bestimmt. Dieser Überstand wurde zur Produktion des rekombinanten Proteins eingesetzt.

Die Virusüberstände für die Produktion wurden bei 4°C dunkel gelagert; für die Langzeitlagerung wurden die Virusüberstände bei -80°C und in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt (O'Reilly et al., 1994).

4.5 Arbeiten mit Säugerzellen

4.5.1 Kultivierung von Säugerzellen

Zellkulturmethoden (Subkultivierung, Kryokonservierung usw.) wurden gemäß dem Methodenbuch von Lindl (2000) durchgeführt. Die Zellzahl bzw. Zelldichte wurde mit einem Häemocytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt.

Für diese Studien wurden adhärente Säugerzelllinien verwendet, die bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert wurden. U2OS-Zellen (humane Osteosarcoma-Zellen) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM mit 1g Glukose/l; Sigma) kultiviert, nach Zusatz von 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma), 1% (v/v) L-Glutamin (Sigma) und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS (Biochrom). HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinom-Zellen) wurden in DMEM (1g Glukose/l) mit 1% (v/v) L-Glutamin und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS kultiviert. 293T-Zellen (humane, embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenoviren) wurden in DMEM (4,5g Glukose/l; Sigma) mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) L-Glutamin und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS kultiviert. In der Regel wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 80% subkultiviert.

4.5.2 Zellernte von adhärenenten Säugerzellen

Um adhärenente Zellen zu ernten, wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS (10ml für 10cm-Kulturschale) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 bis 10min bei 37°C mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco; 1ml für 10cm-Schale) behandelt. Die Trypsin-Behandlung wurde durch die Zugabe von 37°C-warmem Medium (9ml für 10cm-Schale) gestoppt. Anschließend wurden die abgelösten Zellen zentrifugiert (500G, 10min, 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde bei -80°C gelagert.

4.5.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen

4.5.3.1 Transiente Transfektion von U2OS-Zellen

U2OS-Zellen wurden 18 bis 24h vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 2.5×10^5 Zellen pro 6cm-Kulturschale ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektions-Reagenz Efficientene (Qiagen) und wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

4.5.3.2 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode (BES-Puffer) transfiziert. 18 bis 24h vor der Transfektion wurden HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen pro 10cm-Kulturschale ausgesät. 4h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Für einen Transfektionsansatz wurden 20µg Plasmid-DNA in 500µl CaCl_2 (0.25M) aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 500µl 2x BES-Puffer (50mM BES, 280mM NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 , pH6.95) versetzt und gemischt.

Nach 15min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 35°C und 3% CO_2 . Nach 6 bis 12h Inkubation bei 35°C wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, oder die Zellen wurden auf frische Kulturgefäße umgesetzt. Anschließend wurden die Zellen bis zur Zellernte oder Fixierung (FACS-Analyse, Immunfärbung) bei 37°C und 5% CO_2 weiter kultiviert.

4.5.3.3 Transiente Transfektion von 293T-Zellen

293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode (HBSS-Puffer) transfiziert. 18 bis 24h vor der Transfektion wurden 293T-Zellen mit einer Zelldichte von 1.5×10^6 Zellen pro 10cm-Kulturschale ausgesät. Für einen Transfektionsansatz wurden 20µg Plasmid-DNA in 1/10 TE-Puffer (1xTE-Puffer (pH8) 1:10 mit H_2O verdünnt) aufgenommen, so dass ein Gesamtvolumen von 450µl vorlag. Der Ansatz wurde mit 500µl 2x HBSS-Puffer (50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 , pH7.05) und 50µl CaCl_2 (2.5M) versetzt und gemischt.

Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 . Nach 6 bis 12h Inkubation wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden bis zur Zellernte weiter kultiviert.

4.5.4 Durchflusszytometrie (FACS-Scan-Analyse) zur Bestimmung des DNA-Gehalts von HeLa-Zellen

0.2 bis 1×10^6 HeLa-Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco; 1ml für 10cm-Schale) abgelöst, in kaltem PBS resuspendiert und zentrifugiert (10min, 500G, 4°C). Der Überstand wurde verworfen; die Zellen in 100µl eiskaltem PBS aufgenommen und in 10ml eiskaltem Ethanol (80% (v/v)) 12h bei 4°C fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zentrifugiert (10min, 500G, 4°C), in 250µl RNase A (2mg/ml) aufgenommen und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bzw. die DNA mit 250µl Propidiumiodid (0.1mg/ml PI, 0.6% (w/v) NP-40, PBS) gefärbt.

Der DNA-Gehalt der Zellen wurde mit dem FACScalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson) und der Cell Quest Software (Becton Dickinson) bestimmt.

4.5.5 Immunfärbung von Zellen und Mikroskopie

Die für die Immunfärbung benötigten Lösungen wurden in der Regel mit PBS-Puffer angesetzt. Die Zellen (HeLa, U2OS) wurden auf sterilen Deckgläsern ausgesät und vor der Fixierung mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 30min bei RT mit 3% (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (pH7.5) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 8min bei RT mit 0.2% (v/v) Triton X-100 permeabilisiert und anschließend 30min bei RT mit 3% (w/v) BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin, Sigma) behandelt.

Alle Antikörperinkubationen wurden 1h bei RT in feuchter Atmosphäre durchgeführt. Die Antikörper wurden in 1% (w/v) BSA-Lösung verdünnt. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen können Kapitel 3.6 entnommen werden. Nach jedem Antikörperinkubationsschritt wurden die Zellen 3x 5min mit PBS gewaschen.

In der Regel wurde die DNA nach dem letzten Antikörperinkubationsschritt 10min mit Hoechst 33258 (1 μ g/ml in PBS) gefärbt. Anschließend wurden die Deckgläser 3x 5min mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Mowiol (6g Glycerin, 2.4g Mowiol 4-88, 6ml H₂O, 12ml Tris-HCl (pH8.5)) auf die Objektträger aufgebracht.

Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (DMBRE Mikroskop, Leica). In der Regel wurde das 40x oder 63x Ölimmersionsobjektiv (HCX APO L40X, L63X; Leica) für die Auswertung verwendet. Bilder wurden mit einer Kamera und der OpenLab Software (Improvision) gemacht. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Adobe Photoshop (Adobe Systems).

4.5.6 Zellzyklusarrest und Synchronisation von HeLa-Zellen

4.5.6.1 Zellzyklusarrest von HeLa-Zellen in der G2/M-Phase

HeLa-Zellen wurden durch die Behandlung mit Nocodazol in der G2/M-Phase arretiert. Anschließend wurden die mitotischen Zellen (Prometaphase) von den G2-Phase-Zellen getrennt und synchron aus dem Zellzyklusarrest entlassen:

HeLa-Zellen wurden subkonfluent kultiviert und 12h mit 50ng/ml Nocodazol (Sigma) behandelt. Nach 12h wurde das Medium abgenommen und frisches Medium mit 50ng/ml Nocodazol auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die mitotischen Zellen durch Klopfen an die

Unterseite der Kulturflasche in Suspension gebracht und von den G2-Phase-Zellen getrennt, die an der Unterseite haften blieben.

Die mitotischen Zellen wurden fünfmal mit Medium gewaschen, auf frische Kulturflaschen ausgesät und synchron aus dem Zellzyklusarrest entlassen ($t=0$). Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und der DNA-Gehalt durch eine FACS-Scan-Analyse bestimmt.

4.5.6.2 Zellzyklusarrest von HeLa-Zellen in der G1-Phase

HeLa-Zellen wurden in der G1-Phase (G1/S-Übergang) durch zweimalige Behandlung durch Thymidin (double thymidine block) arretiert und synchron aus dem Zellzyklusarrest entlassen:

HeLa-Zellen wurden subkonfluent kultiviert und 19h mit 2mM Thymidin (Sigma) behandelt. Nach 19h wurden die adhärennten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 10h in frischem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 17h mit 2mM Thymidin behandelt.

Nach 17h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in frischem Medium aufgenommen und synchron aus dem Zellzyklusarrest entlassen ($t=0$). Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und der DNA-Gehalt durch eine FACS-Scan-Analyse bestimmt.

4.6. DNA-chemische Methoden

4.6.1 Standardmethoden

DNA-chemische Standardmethoden (Agarosegelelektrophorese usw.) wurden gemäß den Labormethodenbüchern von Ausubel et al. (1995) durchgeführt. Enzymatische Reaktionen (Restriktionsverdau, Ligation, Phosphatasebehandlung) wurden entsprechend den Vorgaben der Enzymhersteller (New England Biolabs; Roche) durchgeführt.

4.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eingesetzt. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

4.6.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. PCR-Produkten nach einem Restriktionsverdau wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

4.6.4 Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden

Durch die Hybridisierung von einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden wurden doppelsträngige Fragmente generiert, die in linearisierte Zielvektoren kloniert wurden. In der Regel wurde die cDNA von Genen in eukaryotischen Expressionsvektoren verändert, mit dem Ziel Epitopmarkierung (Flag, HA) am N-Terminus der entsprechenden Poteinsequenz einzuführen. Die Sequenzen der einzelsträngigen Oligonukleotide können Kapitel 3.5 entnommen werden. Folgende Plasmide wurden auf diese Art hergestellt: pcDNA-Flag-Calpain-4, pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT und -K72R (siehe 4.6.7.6).

Es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Je 10nmol der beiden komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotide (~1-2µl) wurden gemischt und mit 10mM Tris-HCl (pH8.5) auf ein Endvolumen von 100µl aufgefüllt. Der Hybridisierungsansatz wurde 5min bei 85°C inkubiert und dann langsam auf RT abgekühlt. Für die Ligation wurden jeweils der 50-, 100- und 300-fache molare Überschuss an doppelsträngigen Oligonukleotid im Verhältnis zum Vektor eingesetzt.

4.6.5 Spezifische Mutagenese von Plasmiden

Für die spezifische Mutagenese von Plasmiden wurde der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingesetzt, der auf der PCR-Methode basiert. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

In der Regel wurde ein einzelnes Basentriplett manipuliert, mit dem Ziel einen Aminosäureaustausch in der entsprechenden Proteinsequenz vorzunehmen. Die Primer für die Mutagenesen können Kapitel 3.5 entnommen werden. Folgende Plasmide wurden durch spezifische Mutagenese hergestellt: pcDNA-HA-Aurora-C-T191D, pcDNA-HA-Aurora-C-T198D, pcDNA-HA-Aurora-C-T202D, pcDNA-Myc-TRF2-T358A, pcDNA-Myc-TRF2-T358D, pcDNA-Myc-TRF2-T358A/S360A und pcDNA-Myc-TRF2-T450A. In der Regel wurde nach der Mutagenese die Sequenz des kompletten Inserts durch Sequenzierung überprüft.

4.6.6 Methoden zur Präparation von DNA

4.6.6.1 Minipräparation von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Mit dieser Methode wurde Plasmid-DNA für analytische Zwecke (Restriktionsverdau, DNA-Sequenzierung) im kleinen Maßstab isoliert. Die Präparation wurde folgendermaßen durchgeführt:

5ml Übernachtskultur des zu untersuchenden Klons wurden 10min mit 5000G zentrifugiert. Die Zellen wurden in 250µl Puffer P1 (50mM Tris-HCL (pH8), 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A) aufgenommen, mit 250µl Puffer P2 (200mM NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt und 5 min bei RT lysiert. Die Zellyse wurde durch die Zugabe von 350µl Puffer P3 (3M Na-Acetat pH5.5) gestoppt und der Ansatz 10min mit 18000G zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und die DNA im Überstand durch die Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol (100% (v/v)) gefällt. Nach 5min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 5min mit 18000G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500µl Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und 5min mit 18000G zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet 10min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50µl H₂O gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

4.6.6.2 Maxipräparation von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Für die Isolierung von DNA zu Klonierungszwecken oder zur Langzeitlagerung bei -20°C wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparation wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der Isolierung von Plasmiden für die Transfektion von Säugerzellen wurden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgebrochen und die DNA anschließend durch einen CsCl-Gradienten aufgereinigt. Es wurde folgendermaßen verfahren:

250ml Übernachtskultur wurden zentrifugiert (20min, 6000G, 4°C). Die Zellen wurden in 6ml Glucoselösung (50mM Glucose, 20mM EDTA (pH8.0), 25mM Tris-HCl (pH 8.0)) aufgenommen und der Ansatz mit einer kleinen gestrichenen Spatelspitze Lysozym (Sigma) versetzt. Nach 5min Zelllyse bei RT wurden die Zellen mit 12ml eiskaltem Lysepuffer (1% (w/v) SDS, 0.2M NaOH) behandelt und weitere 10min auf Eis lysiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 9ml eiskaltem Neutralisationspuffer (3M Na-Acetat pH5.2) gestoppt, und nach 5min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (30min, 20000G, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, 10mg/ml RNase A (10mg/µl) zugesetzt und ein 10minütiger RNase-Verdau bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA im Überstand durch die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol (100% (v/v)) gefällt und der Ansatz zentrifugiert (30min, 8000G, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 4ml TE-Puffer (pH8) gelöst und die RNA mit 4ml eiskaltem LiCl (5M) gefällt. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (10min, 5000G, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die DNA im Überstand durch Zugabe von 2.5 Volumen Ethanol (100% (v/v)) gefällt. Nach 15min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (20min, 8000G, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 20min an der Luft getrocknet und in 3,5ml TE-Puffer (pH8) gelöst.

4,4g CsCl wurden in dem Ansatz gelöst. Der Ansatz wurde in ein Ultracrimp-Röhrchen (Kendro) überführt und das Röhrchen mit 300µl Ethidiumbromid (10mg/ml) und TE-Puffer (pH8) aufgefüllt. Nach Versiegeln des Röhrchens wurde der Ansatz in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (15h, 48000Upm, 20°C; CombiPlus Sorvall; Rotor TV-865). Nach der Zentrifugation wurde das Ultracrimp-Röhrchen entlüftet (mit einer Kanüle am Hals des Röhrchen) und die entsprechende DNA-Bande unter kurzzeitigem UV-Licht mit einer Spritze und Kanüle abgezogen.

Die gelöste DNA wurde mit TE-Puffer (pH8) 1:5 verdünnt. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, wurde der Ansatz mit 2ml wassergesättigtem n-Butanol gemischt und 1min mit 4000G zentrifugiert. Die Butanolphase wurde verworfen und das Ausschütteln so oft wiederholt, bis in der Butanolphase keine Spuren von Ethidiumbromid mehr sichtbar waren.

Zuletzt wurde die DNA 30min mit 2.5 Volumen Ethanol (100% (v/v)) auf Eis gefällt und anschließend zentrifugiert (30min, 8000G, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet

20min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 500µl H₂O gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

4.6.6.3 Präparation von Plasmiden aus *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Präparation von Plasmiden aus Hefen wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

4.6.7 Klonierung von Plasmiden

4.6.7.1 PCR-Klonierung von pGBKT7-Aurora-C-K72R

Das Plasmid pGBKT7-Aurora-C-K72R wurde für den Yeast-Two-Hybrid-Screen (siehe 4.3) eingesetzt. Durch PCR wurde ein EcoRI-Aurora-C-K72R-BamHI-Fragment amplifiziert, das in das Plasmid pGBKT7 (Clontech) kloniert wurde. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Pfu DNA Polymerase 10x Puffer	5µl
dNTP Mix (je 5mM)	1µl
AC1 (Primer1)	20pmol
AC2 (Primer2)	20pmol
pEGFP1-C1-Aurora-C-K72R (template)	80pg
Pfu DNA Polymerase (Promega;1,5U)	1.5µl
ad. H ₂ O	50µl

Temperaturprofil:	1x	[3min 95°C]
	35x	[1min 95°C; 30s 51°C; 2min 72°C]
	1x	[5min 72°C]

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt (~1kb) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und ein Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und das PCR-Produkt in das Plasmid pGBKT7 kloniert, das mit EcoRI und BamHI geschnitten wurde. Das neue Plasmid erhielt die Bezeichnung pGBKT7-Aurora-C-K72R. Die Sequenz des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft.

4.6.7.2 PCR-Klonierung von pAcHLT-A-Aurora-C-WT und -K72R

Die Plasmide pAcHLT-A-Aurora-C-WT und pAcHLT-A-Aurora-C-K72R wurden für Herstellung von rekombinanten Baculoviren benötigt (siehe 4.4.2). Durch PCR wurden ein EcoRI-Aurora-C-WT-NotI-Fragment und ein EcoRI-Aurora-C-K72R-NotI-Fragment amplifiziert, die in das Plasmid pAcHLT-A (Pharmigen) kloniert wurden. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Pfu DNA Polymerase 10x Puffer	5µl
dNTP Mix (je 5mM)	1µl
AC1 (Primer1)	20pmol
AC3 (Primer2)	20pmol
pEGFP1-C1-Aurora-C-WT/-K72R (template)	80pg
Pfu DNA Polymerase (Promega;1,5U)	1.5µl
ad. H ₂ O	50µl

Temperaturprofil:	1x	[3min 95°C]
	35x	[1min 95°C; 30s 51°C; 2min 72°C]
	1x	[5min 72°C]

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte (~1kb) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und ein Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI durchgeführt. Die Restriktionansätze wurden anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die PCR-Produkte in das Plasmid pAcHLT kloniert, das mit EcoRI und NotI geschnitten wurde. Die neuen Plasmide erhielten die Bezeichnung pAcHLT-A-Aurora-C-WT und pAcHLT-A-Aurora-C-K72R. Die Sequenz der Inserts wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

4.6.7.3 PCR-Klonierung von pGEX-4T-1-Aurora-C-WT und -K72R

Die Plasmide pGEX-4T-1-Aurora-C-WT und pGEX-4T-1-Aurora-C-K72R wurden für die Proteinproduktion von rekombinanten Aurora-C in *Escherichia coli* eingesetzt (siehe 4.7.5). Durch PCR wurden ein EcoRI-Aurora-C-WT-NotI-Fragment und ein EcoRI-Aurora-C-K72R-NotI-Fragment amplifiziert, die in das Plasmid pGEX-4T-1 (Amersham) kloniert wurden. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Pfu DNA Polymerase 10x Puffer	5µl
dNTP Mix (je 5mM)	1µl
AC1 (Primer1)	20pmol
AC3 (Primer2)	20pmol
pEGFP1-C1-Aurora-C-WT/-K72R (template)	80pg
Pfu DNA Polymerase (Promega;1,5U)	1.5µl
ad. H ₂ O	50µl

Temperaturprofil:	1x	[3min 95°C]
	35x	[1min 95°C; 30s 51°C; 2min 72°C]
	1x	[5min 72°C]

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte (~1kb) mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und ein Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die PCR-Produkt in das Plasmid pGEX-4T-1 kloniert, das mit EcoRI und NotI geschnitten wurde. Die neuen Plasmide erhielten die Bezeichnung pGEX-4T-1-Aurora-C-WT und pGEX-4T-1-Aurora-C-K72R. Die Sequenz der Inserts wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

4.6.7.4 Klonierung von pTriEx-1-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21- und -TRF2-Fragment

Die Vektoren pTriEx-1-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21- und -TRF2-Fragment wurden für die Produktion von Proteinfragmenten durch *in vitro* Translation benötigt (siehe 4.7.7). Die Vektoren pACT2-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21- und -TRF2-Fragment wurden durch den Two-Hybrid-Screen isoliert und enthielten als Insert cDNA-Fragmente der Gene Tid1, Calpain-4,

RBM21 und TRF2. Die Vektoren wurden mit BglII und XhoI geschnitten und die Fragmente in das Plasmid pTriEx-1 kloniert, das mit BglII und XhoI geschnitten wurde. Die neuen Plasmide erhielten die Bezeichnung pTriEx-1-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21- und -TRF2-Fragment.

4.6.7.5 Klonierung von pcDNA-Myc-TRF2-WT

Das Plasmid pcDNA-Myc-TRF2-WT wurde für die Expression von TRF2 in höheren Säugerzellen verwendet. Die TRF2-cDNA wurde aus dem Plasmid pBC-Myc-TRF2-WT isoliert, das mit EcoRV und XhoI geschnitten wurde. Das EcoRV-Myc-TRF2-WT-XhoI-Fragment (~1,5 kb) wurde in das Plasmid pcDNA3.1/Neo (+) (Invitrogen) kloniert, das mit EcoRV und XhoI geschnitten wurde. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pcDNA-Myc-TRF2-WT und diente als Ausgangskonstrukt bei der Herstellung unterschiedlicher TRF2-Derivate durch spezifische Mutagenese (siehe 4.6.5).

4.6.7.6 Klonierung von pcDNA-HA-Aurora-C-WT und -K72R

Die Plasmide pcDNA-HA-Aurora-C-WT und pcDNA-HA-Aurora-C-K72R wurden für die Expression von Aurora-C in höheren Säugerzellen verwendet. Durch Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurde ein BsrGI-SpeI-HA-XhoI-Epitop generiert (siehe 4.6.4). Das Epitop wurde in die Plasmide pEGFP1-C1-Aurora-C-WT und -K72R kloniert, die mit BsrGI und XhoI geschnitten wurden. Um die Integration des HA-Epitops in den Plasmiden zu überprüfen, wurden die Plasmide mit SpeI geschnitten. War das Epitop in den Plasmiden integriert, konnten die Plasmide linearisiert werden. Die Plasmide erhielten die Bezeichnung pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT und -K72R.

Die Plasmide pEGFP1-C1-HA-Aurora-C-WT und -K72R wurden mit SpeI und EcoRI geschnitten. Das SpeI-HA-Aurora-C-WT-EcoRI-Fragment (~1kb) und SpeI-HA-Aurora-C-K72R-EcoRI-Fragment wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pX kloniert, der mit SpeI und EcoRI geschnitten wurde (Superti-Furga et al. ,1991). Die Plasmide erhielten die Bezeichnung pX-HA-Aurora-C-WT und -K72R.

Bei der transienten Transfektion von pX-HA-Aurora-C-WT und -K72R in Säugerzellen und der anschließenden Untersuchung der Zellextrakte im Western-Blot konnten zwei Signale mit dem HA-Antikörper detektiert werden. Bei der einen Bande handelte es sich um das epitopmarkierte HA-Aurora-C-Protein (~36kDa); bei der anderen Bande vermutlich um ein unspezifisches HA-Aurora-C-Fusionsprotein (~60kDa). Die Inserts der Plasmide wurden zur

Sicherheit durch Sequenzierung überprüft und anschließend eine Subklonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Neo (-) (Invitrogen) durchgeführt.

Die Plasmide pX-HA-Aurora-C-WT und -K72R wurden mit XbaI und HindIII geschnitten. Das XbaI-HA-Aurora-C-WT-HindIII-Fragment (~1kb) und das XbaI-HA-Aurora-C-K72R-HindIII-Fragment wurden in das Plasmid pcDNA3.1/Neo (-) (Invitrogen) kloniert, das mit XbaI und HindIII geschnitten wurde. Die Plasmide erhielten die Bezeichnung pcDNA-HA-Aurora-C-WT und pcDNA-HA-Aurora-C-K72R.

Bei der transienten Transfektion von pcDNA-HA-Aurora-C-WT und -K72R in Säugerzellen und der anschließenden Untersuchung der Zellextrakte im Western-Blot wurde nur ein Signal mit dem HA-Antikörper detektiert. Das Signal entsprach dem epitopmarkierten HA-Aurora-C-Protein.

Das Plasmid pcDNA-HA-Aurora-C-WT diente als Ausgangskonstrukt bei der Herstellung unterschiedlicher Aurora-C-Derivate durch spezifische Mutagenese (siehe 4.6.5).

4.6.7.7 Klonierung von pSuper-Aurora-C-1

Das Plasmid pSuper-Aurora-C-1 wurde für die Expression von shRNAs (short hairpin RNA) in Säugerzellen eingesetzt, die gegen das Aurora-C-Gen bzw. mRNA gerichtet waren. Die Hybridisierung der komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotide und die Klonierung des Hybridisierungsprodukts in das Plasmid pSuper (OligoEngine) erfolgte nach den Vorgaben von OligoEngine: Durch Hybridisierung von Oligonukleotiden (siehe 3.5) wurde ein doppelsträngiges BglII-shRNA-Aurora-C-1-HindIII-Fragment generiert. Das Fragment wurde in das Plasmid pSuper kloniert, das mit BglII und HindIII geschnitten wurde. Das Insert wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die Auswahl der Zielsequenz wurde mit Hilfe der Software von Dharmacon (Dharmacon *si-DESIGN* Center: Stand 10.10.2004) durchgeführt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Zielsequenz Aurora-C-spezifisch ist und eine möglichst geringe Sequenzähnlichkeit zu Aurora-A und -B aufweist.

4.7 Protein-chemische Methoden

4.7.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer vertikalen Gelkammer aufgetrennt. In der Regel wurden 10 bis 12%ige Polyacrylamidgele für die Auftrennung der Proteine verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 50 bis 150V (Laufpuffer: 190mM Glycin, 25mM Tris-HCl (pH 8.3), 0,1% (w/v) SDS).

Für die Auftrennung der Proteine wurde das Minigel System von Bio-Rad oder ein nichtkommerzielles Elektrophoresesystem verwendet. Das nichtkommerzielle System wurde für die Auftrennung von Proteinen nach *in vitro* Kinasereaktionen eingesetzt.

4.7.2 Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden mit einer horizontalen Transferapparatur in einem Semidry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte 40min mit einer konstanten Stromstärke von $3\text{mA}/\text{cm}^2$.

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde folgender Aufbau gewählt: Anode / 3 Filterpapiere/ Nitrozellulosemembran/ Gel/ 3 Filterpapiere/ Kathode. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden vor dem Aufbau in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris-HCl (pH7.5), 3.7% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran 5min mit Ponceau S gefärbt und eine Fotokopie gemacht (Ladekontrolle). Die Membran wurde dann 1h auf einem Wipptisch bei RT in 5% (w/v) Magermilch (Magermilchpulver in PBS mit 0.05% (v/v) Tween-20 gelöst) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch mit dem Primärantikörper (siehe 3.6) inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran 3x 5min in PBS-T (PBS mit 0.05% (v/v) Tween-20) gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (siehe 3.6) 1h bei RT auf einem Wipptisch inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3x 5min in PBS-T gewaschen, in PBS aufgenommen und entwickelt.

Die Membran wurde mit einem Chemilumineszenzsubstrat (Perkin Elmer) entwickelt. Das Substrat wurde von der Meerrettich-Peroxidase oxidiert, die an den Sekundärantikörpern ge-

koppelt war. Das emittierte Licht wurde mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einer Entwicklermaschine.

Die Quantifizierung von Signalen erfolgte durch Fluoreszenz-Messung mit dem Bio-Rad Fluor-S MultiImager und der Software Quantity One (Bio-Rad).

4.7.3 Immunpräzipitation

In der Regel wurden die Zellextrakte vor der Immunpräzipitation mit gewaschener Protein-G-Sepharose (Amersham; 3x mit Lysepuffer gewaschen; 15µl Sepharose pro Ansatz) 30min auf einem Inkubationsrad vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde die Protein-G-Sepharose entfernt und die Immunpräzipitation mit dem Antikörper bei 4°C durchgeführt. Die Immunpräzipitation für die Untersuchung von Proteininteraktionen erfolgte über Nacht; die Immunpräzipitation von Proteinen für enzymatische Reaktionen erfolgte für 3h. In der Regel wurde 1µg Antikörper pro 1mg Zelllysat für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Anschließend wurden die Ansätze mit gewaschener Protein-G-Sepharose (3x mit Lysepuffer gewaschen; 15µl Sepharose pro Ansatz) versetzt und 2h bei 4°C auf einem Inkubationsrad inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Protein-G-Sepharose 5x mit Lysepuffer (siehe 4.7.12) gewaschen. Die immunpräzipitierten Proteine wurden entweder für enzymatische Reaktionen eingesetzt oder durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot untersucht.

4.7.4 Aufreinigung von rekombinanten His₆-Aurora-C-Fusionsprotein

Das rekombinante His₆-Aurora-C-Fusionsprotein wurde für *in vitro* Kinasereaktionen und für die Immunisierung von Tieren zur Antikörperproduktion eingesetzt. Die Produktion des Fusionsproteins erfolgte in Sf9-Zellen, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert wurden. Folgendes Protokoll wurde für die Produktion und Aufreinigung des His₆-Aurora-C-Fusionsproteins verwendet:

1x 10⁸ Sf9-Zellen wurden mit 10ml Virusüberstand infiziert. 40h nach der Infektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund der Kulturgefäße abgeschabt und in Suspension gebracht. Die Zellen wurden zentrifugiert (10min, 1000G, 4°C) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Das Zellpellet wurde in 12ml eiskaltem Lysepuffer (20mM Tris-HCl (pH8), 300mM KCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5mM PMSF, 10mg/ml PIN, 1mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen und die Zellen 30min auf Eis lysiert. Nach 30min wurde der Ansatz zentrifugiert (30min, 20000G, 4°C) und der Überstand abgenommen. Der Überstand wurde mit 300µl gewaschener Ni²⁺-

Agarose (Qiagen; 3x mit Lysepuffer gewaschen) versetzt und 30min bei 4°C auf einem Inkubationsrad inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (2min, 5000G, 4°C) und die Ni²⁺-Agarose 2x mit 4ml Puffer 1 mit 1mM Imidazol (20mM Tris-HCl (pH8), 300mM KCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5mM PMSF, 10mg/ml PIN, 1mM β-Mercaptoethanol), 1x mit 4ml Puffer 1 mit 10mM Imidazol und 1x mit 4ml Puffer 1 mit 30mM Imidazol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Ni²⁺-Agarose in eine leere Chromatographiesäule (PolyPrep Säulen, Bio-Rad) überführt und das Fusionsprotein mit 2x 500µl Puffer 1 mit 300mM Imidazol eluiert.

Die Fraktionen wurden 2h bei 4°C dialysiert: Das Fusionsprotein für die *in vitro* Kinasereaktionen wurde gegen Dialysepuffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5% (v/v) Glycerin, 0.3mM DTT) dialysiert; das Fusionsprotein für die Immunisierungen wurde gegen PBS dialysiert. Das Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung.

4.7.5 Aufreinigung von rekombinantem GST-Aurora-C-Fusionsprotein

Das rekombinante GST-Aurora-C-Fusionsprotein wurde für *in vitro* Interaktionsstudien eingesetzt. Das Fusionsprotein wurde in dem *Escherichia coli*-Stamm Rosetta (Novagen) produziert und für die Aufreinigung auf die Gluthation-Sepharose (Sigma) gebunden und nicht eluiert. Folgendes Protokoll wurde für die Produktion und Aufreinigung bzw. Bindung des GST-Aurora-C-Fusionsproteins verwendet:

1l LB-Medium wurde mit 100ml Übernachtskultur des Produktionsstammes angeimpft und auf einem Rotationsschüttler bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 wurde die Proteinproduktion mit 0.5mM IPTG (1M) induziert und die Zellen 4h bei 28°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 4h Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (20min, 6000G, 4°C).

Das Bakterienpellet wurde in 15ml eiskaltem PBS (mit 0.2mM PMSF, 10mg/ml PIN, 10mg/ml TPCK, 5mg/ml TLCK, 1mg/ml Aprotinin, 1mM Na-Vanadat, 1mM DTT) aufgenommen und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (4 x 15s, Branson Sonifier W-250, Branson) auf Eis aufgeschlossen. Der Ansatz wurde mit 1.5ml Triton X-100 (100% (v/v)) versetzt und zentrifugiert (30min, 20000G, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und 250µl Gluthation-Sepharose (3x mit PBS gewaschen) zugegeben. Nach 10min Inkubation bei RT auf einem Inkubationsrad wurde der Ansatz 2min mit 4000G zentrifugiert und die Gluthation-Sepharose 3x mit 15ml PBS gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurde die Gluthation-Sepharose mit dem immobilisierten Fusionsprotein in 750µl PBS/Glycerin-Lösung (PBS mit 50% (v/v) Glycerin) aufgenommen. Das immobilisierte Fusionsprotein wurde bei -20°C gelagert. Die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung.

4.7.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Folgender Ansatz wurde verwendet:

790µl Wasser
10µl Probe bzw. BSA-Standard (Bio-Rad)
200µl Bradfordreagenz (Bio-Rad)

Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und nach 5min die Extinktion bei 595nm in 96-Multi-Lochplatten mit einem ELISA-Gerät (Labsystems Multiskan) bestimmt. Aus den gemessenen Extinktionen wurde mit Hilfe einer Eichgeraden die Konzentration der unbekanntenen Proben berechnet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.7.7 Herstellung von [³⁵S]-markierten Proteinen durch *in vitro* Translation

Für *in vitro* Interaktionsstudien wurden [³⁵S]-markierte Proteinfragmente (Tid1, TRF2, RBM21, Calpain-4) durch *in vitro* Translation mit dem TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) produziert. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren. Folgende Plasmide wurden für die *in vitro* Translation eingesetzt: pTriEx-1-Tid1-, -Calpain-4-, -RBM21-, -TRF2-Fragment

4.7.8 *In vitro* Interaktionsstudien zwischen Aurora-C und potentiellen Interaktionspartnern

In vitro Interaktionsstudien wurden durchgeführt, um die Bindung zwischen Aurora-C und anderen Proteinen nachzuweisen, die durch einen Two-Hybrid-Screen in der Bäckerhefe identifiziert wurden. Für die Interaktionsstudien wurden das immobilisierte GST-Aurora-C-Fusionsprotein und [³⁵S]-markierte Proteinfragmente eingesetzt. Die Versuche wurden gemäß den Angaben des MATCHMAKER Co-IP Kit (Clontech, 1999) durchgeführt.

4.7.9 *In vitro* Kinasereaktion mit der Proteinkinase Aurora-C

Für die *in vitro* Kinasereaktionen wurden rekombinantes His₆-Aurora-C-Fusionsprotein oder HA-Aurora-C als Proteinkinase eingesetzt. Als exogenes Substrat für die Reaktionen wurde ein Mix aus verschiedenen Histonen verwendet. Es ist bekannt, dass sowohl Aurora-A, -B und -C Histon H3 phosphorylieren können (Crosio et al., 2002).

Außerdem wurden Phosphorylierungsstudien mit TRF2-Derivaten und Calpain-4 als Substrat der Kinase Aurora-C durchgeführt. Beide Proteine wurden als potentielle Interaktionspartner bzw. Substrate von Aurora-C durch einen Two-Hybrid-Screen identifiziert.

4.7.9.1 *In vitro* Kinasereaktion mit His₆-Aurora-C-Fusionsprotein

Das rekombinante His₆-Aurora-C-Fusionsprotein (WT, K72R) wurde aus Baculovirus-infi-zierten Sf9-Zellen isoliert und lag im Reaktionsansatz in löslicher Form vor. Der Mix aus verschiedenen Histonen wurde als exogenes Substrat (Kontrolle) eingesetzt und lag in gelöster Form im Reaktionsansatz vor.

Die potentiellen Substrate TRF2 (WT, T358A, T358A/S360A, T450A) und Calpain-4 wurden aus den Zellextrakten transfizierter 293T-Zellen immunpräzipitiert und waren während der Reaktion an Protein-G-Sepharose gekoppelt. Nach der Immunpräzipitation wurden die Protein-G-Sepharose mit den gekoppelten Substraten 5x mit Lysepuffer (siehe 4.7.12) und 3x mit Kinasereaktionspuffer gewaschen.

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50-70µl in Kinasereaktionspuffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl₂, 10µM MnCl₂, 1mM DTT, 50µM ATP) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 200ng-5µg His₆-Aurora-C-WT/-K72R, 25µCi γ-[³²P]-ATP und entweder TRF2, Calpain-4 oder 15µg Histon-Mix (Roche).

Die Reaktion wurde in der Regel 30min bei 30°C durchgeführt und durch die Zugabe von 6x Laemmli-Puffer gestoppt. Die Proben wurden 10min bei 95°C aufgekocht und 5min mit 18000G abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie im Gel angefärbt. Der [³²P]-Einbau wurde durch Autoradiographie nachgewiesen.

Die Quantifizierung von Signalen erfolgte durch Szintillations-Messung: Das Signal bzw. die Bande, die quantifiziert werden sollte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit 2ml Szintillations-Flüssigkeit versetzt und mit einem Szintillations-Messgerät (LKB Wallac 1209 Rackbeta, Liquid Scintillation Counter) gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.7.9.2 *In vitro* Kinasereaktion mit immobilisiertem HA-Aurora-C-Protein

Das HA-Aurora-C-Protein (WT, K72R, T191D, T198D, T202D) wurde in der Regel aus den G2/M-Zellextrakten transfizierter HeLa-Zellen immunpräzipitiert, die mit Nocodazol behandelt wurden. Das Protein war während der Reaktion an die Protein-G-Sepharose gekoppelt bzw. immobilisiert. Nach der Immunpräzipitation wurde die Protein-G-Sepharose mit der gekoppelten Kinase 5x mit Lysepuffer (siehe 4.7.12) und 3x mit Kinasereaktionspuffer gewaschen. Als exogenes Substrat für die Reaktionen wurde ein Gemisch aus verschiedenen Histonen eingesetzt.

Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50µl in Kinasereaktionspuffer (20mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl₂, 10µM MnCl₂, 1mM DTT, 50µM ATP) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt immobilisiertes HA-Aurora-C (WT, K72R, T191D, T198D, T202), 15µg Histon-Mix (Roche) und 25µCi γ -[³²P]-ATP.

Die Reaktion wurde in der Regel 30min bei 30°C durchgeführt und durch die Zugabe von 6x Laemmli-Puffer gestoppt. Die Proben wurden 10min bei 95°C aufgekocht und 5min mit 18000G abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie im Gel angefärbt. Der [³²P]-Einbau wurde durch Autoradiographie nachgewiesen.

Die Quantifizierung von Signalen erfolgte durch Szintillations-Messung: Das Signal bzw. die Bande, die quantifiziert werden sollte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit 2ml Szintillations-Flüssigkeit versetzt und mit einem Szintillations-Messgerät (LKB Wallac 1209 Rackbeta, Liquid Scintillation Counter) gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.7.10 Aufreinigung von Antikörpern mit Antigensäulen

Die Aufreinigung von Antikörpern und die Herstellung von Antigensäulen wurden gemäß Harlow et al. (1998) durchgeführt. Als Säulenmaterial für die kovalente Kopplung des Antigens (Peptide, Protein) wurde CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham) gewählt. Die Aufkonzentrierung von Antikörpern nach der Aufreinigung erfolgte mit Centricon-Filterröhrchen von Millipore, entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.7.11 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefen

Für die Herstellung von Proteinextrakten aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden 20ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur durch Zentrifugation (4000G, 5min) geerntet. Die Zellen wurden in 1ml eiskaltem Wasser aufgenommen und in ein 1ml-Reaktionsgefäß überführt, das mit 300µl Glasperlen (Sigma) gefüllt war. Das Reaktionsgefäß wurde kurz zentrifugiert, so dass sich die Zellen auf den Glasperlen absetzen konnten. Anschließend wurde der Überstand über den Glasperlen verworfen und 200µl Lysepuffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 50mM NaF, 5mM EDTA, 0.1 % (v/v) NP-40, 0.2mM PMSF, 10mg/ml PIN, 10mg/ml TPCK, 5mg/ml TLCK, 1mg/ml Aprotinin, 1mM Na-Vanadat, 1mM DTT, 10mM β-Glycerophosphat) auf das Zell/Glasperlen-Gemisch gegeben. Die Zellen wurden mechanisch aufgebrochen (5min ‚vortexen‘ auf höchster Stufe) und der Ansatz zentrifugiert (5min, 18000G, 4°C). Der Proteinextrakt über den Glasperlen wurde abgenommen und entweder durch SDS-PAGE untersucht oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.7.12 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen und Sf9-Zellen

Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen eiskaltem Lysepuffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 250mM NaCl, 50mM NaF, 5mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.2mM PMSF, 10mg/ml PIN, 10mg/ml TPCK, 5mg/ml TLCK, 1mg/ml Aprotinin, 1mM Na-Vanadat, 1mM DTT) aufgenommen und 30min auf Eis unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10min, 18000G, 4°C) und der Überstand bzw. Proteinextrakt abgenommen. Der Proteinextrakt wurde entweder durch SDS-PAGE untersucht oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.0 Ergebnisse

5.1 Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern

Für den Nachweis des endogenen Aurora-C-Proteins auf zellulärer Ebene wurden kommerzielle und nicht-kommerzielle Antikörper getestet. In der Regel wurden für den Nachweis HeLa-Zellextrakte verwendet, die endogenes Aurora-C enthalten sollen (Kimura et al., 1999, Li et al., 2004; Sasai et al., 2004).

Keiner der getesteten Antikörper konnte das endogene Aurora-C im Western-Blot unter Standardbedingungen in einem HeLa-Zellextrakt detektieren. Allerdings konnten fast alle Antikörper das überexprimierte HA-Aurora-C im Zellextrakt transient transfizierter 293T- oder HeLa-Zellen nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um das endogene Aurora-C nachzuweisen, wurden die Bedingungen bzw. einige Parameter verändert. Zum Beispiel wurden für den Nachweis Zellextrakte von HeLa-Zellen verwendet, die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus arretiert waren. Außerdem wurden verschiedene Zelllinien und Zellaufschlussmethoden getestet (van Steensel, 1998, Li et al., 2000; Morrison et al., 2002; Li et al., 2004; Gruneberg et al., 2004). Keine der Veränderungen führte zum erfolgreichen Nachweis des endogenen Aurora-C.

Eine weitere Strategie, die zum Nachweis des endogenen Proteins angewendet wurde, war die Anreicherung des Proteins durch Immunpräzipitation mit anschließender Detektion des angereicherten Proteins im Western-Blot oder durch Massenspektroskopie (MALDI-TOF, Zentrale Proteinanalytik, DKFZ, Heidelberg). Das endogene Protein konnte auch mit diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Der Nachweis des endogenen Aurora-C durch Immunfärbung von HeLa-Zellen war ebenfalls negativ. Es wurden unterschiedliche Fixierungsmethoden (Methanol- und Paraformaldehydfixierung) getestet.

Aufgrund der fehlenden Nachweismöglichkeit war es im Rahmen dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich die Funktion des endogenen Aurora-C auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Der Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern ist ein anerkanntes Problem (Giet et al., 2005; Tang et al., 2006). Die bisher publizierten Daten basieren daher überwiegend auf der Überexpression des Proteins (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005).

5.2 Untersuchung von HeLa-Zellen nach Überexpression von Aurora-C

Untersuchungen, die basierend auf der Überexpression von Aurora-C gemacht wurden, zeigen, dass die Funktionen des überexprimierten Aurora-C und des endogenen Aurora-B bzw. Aurora-A überlappen. Das überexprimierte Aurora-C verhält sich während der Mitose wie das endogene Aurora-B. Während sich das überexprimierte Protein in der Interphase ähnlich dem endogenen Aurora-A verhält und mit schwacher Affinität an das Centrosom bindet (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005).

Die bisher publizierten Daten beziehen sich dabei ausschließlich auf die Überexpression von Aurora-C-WT und der Kinase-inaktiven Mutante Aurora-C-K72R. Für die Überexpressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Es wurde versucht eine hyperaktive Aurora-C-Mutante herzustellen, die eine höhere Kinaseaktivität als Aurora-C-WT *in vitro* aufweist. Die Mutante sollte in HeLa-Zellen überexprimiert werden und die physiologischen Auswirkungen der Überexpression auf die Zellen untersucht werden.

Allgemein werden Serin/Threonin-Proteinkinasen durch die Phosphorylierung einer oder mehrerer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Aminosäuren im Aktivierungsmotif der Kinase angeschaltet (Huse & Kuriyan, 2002; Nolen et al., 2004). Der Aminosäureaustausch von Serin oder Threonin gegen eine saure Aminosäure (Glutaminsäure oder Asparaginsäure) kann in einigen Fällen die Phosphorylierung eines Proteins imitieren. In einigen Fällen war es mit diesem Ansatz möglich, konstitutiv aktive Mutanten von Proteinkinasen herzustellen (Kelm et al., 2002; Katayama et al., 2004).

Das Aktivierungsmotif von Aurora-C ist konserviert und weist hohe Sequenzhomologie zu den Aktivierungsmotifen von Aurora-A und -B auf (Abb.6A; Carmena & Earnshaw, 2003) und enthält mehrere potentielle Aktivierungsstellen (S188, S193, T191, T198, T202, Y205). Die Aminosäure T191 ist Aurora-C-spezifisch; die Aminosäuren S188, S193, T198, T202 und Y205 sind konserviert und finden sich in den entsprechenden Aktivierungsmotifen von Aurora-A und Aurora-B (Abb.6A). Die Autophosphorylierung von Aurora-A-T288 (entspricht Aurora-C-T198) aktiviert Aurora-A und ist essentiell für den Übergang von Säugerzellen aus der G2-Phase in die M-Phase (Hirota et al., 2003). Die Autophosphorylierung von Aurora-B-T232 (entspricht Aurora-C-T198) führt zur Aktivierung von Aurora-B während der Mitose (Yasui et al., 2004). *In vitro* Untersuchungen mit mAurora-C (Aurora-C-Protein in der Maus) haben gezeigt, dass die Mutanten T171A und T175A (würde Aurora-C-T198A bzw. -T202A entsprechen) eine erhöhte Kinaseaktivität im Vergleich zu mAurora-C-WT aufweisen. Die Doppelmutante mAurora-C-T171A/T175A zeigt keine Kinaseaktivität (Chen & Tang, 2002).

Um eine hyperaktive Aurora-C-Mutante herzustellen, wurden drei Mutanten hergestellt und die potentiellen Aktivierungsstellen T191, T198 und T202 gegen Asparaginsäure (D) ausgetauscht. Der entsprechende Expressionsvektor (pcDNA-HA-Aurora-C-WT) mit der Aurora-C-cDNA wurde mutiert und die Konstrukte für die Überexpressionsstudien in HeLa-Zellen nach transienter Transfektion eingesetzt.

5.2.1 Aurora-C-T191D besitzt eine höhere Kinaseaktivität als Aurora-C-WT *in vitro*

Im nachfolgenden Experiment wurde die Kinaseaktivität der potentiellen, hyperaktiven Mutanten durch Kinasereaktionen *in vitro* bestimmt. HeLa-Zellen wurden mit den verschiedenen Aurora-C-Expressionsvektoren transfiziert, mit Nocodazol behandelt und 48h nach der Transfektion geerntet. Die Zellextrakte wurden im Western-Blot untersucht und für die Immunpräzipitation von Aurora-C eingesetzt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden für Kinasereaktionen verwendet. Als Substrat wurde ein Mix aus verschiedenen Histonen benutzt. Die Ergebnisse sind in Abb.6 dargestellt.

Bei der Analyse der Zellextrakte kann HA-Aurora-C-WT, -K72R, -T198D und -T202D nur als einzelne Bande im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb.6B; Spur:1, 2, 4, 5). Im Gegensatz dazu kann HA-Aurora-C-T191D im Western-Blot als Doppelbande detektiert werden. Das Protein kann als schnell und langsam bewegliches Protein nachgewiesen werden (Abb.6B; Spur:3).

Die Untersuchung der Kinaseaktivität zeigt, dass HA-Aurora-C-T198D, -T202D und -K72R (Negativkontrolle) keine Aktivität im Vergleich zu HA-Aurora-C-WT und -T191D aufweisen und inaktiv sind (Abb.6C1; Spur:2, 4, 5).

HA-Aurora-C-T191D ist hyperaktiv im Vergleich zu HA-Aurora-C-WT (Positivkontrolle) (Abb.6C1; Spur:1, 3). Die relative Kinaseaktivität von HA-Aurora-C-T191D ist rund siebenmal höher als die von HA-Aurora-C-WT (Abb.6D).

Die Kontrollen zeigen, dass ähnliche Bedingungen in den verschiedenen Reaktionsansätzen vorlagen. Für die Reaktionen sind vergleichbare Mengen an Substrat (Abb.6C3; Coomassie-Färbung) und Kinase (Abb.6C2; Western-Blot mit Quantifizierung der Signale) eingesetzt worden.

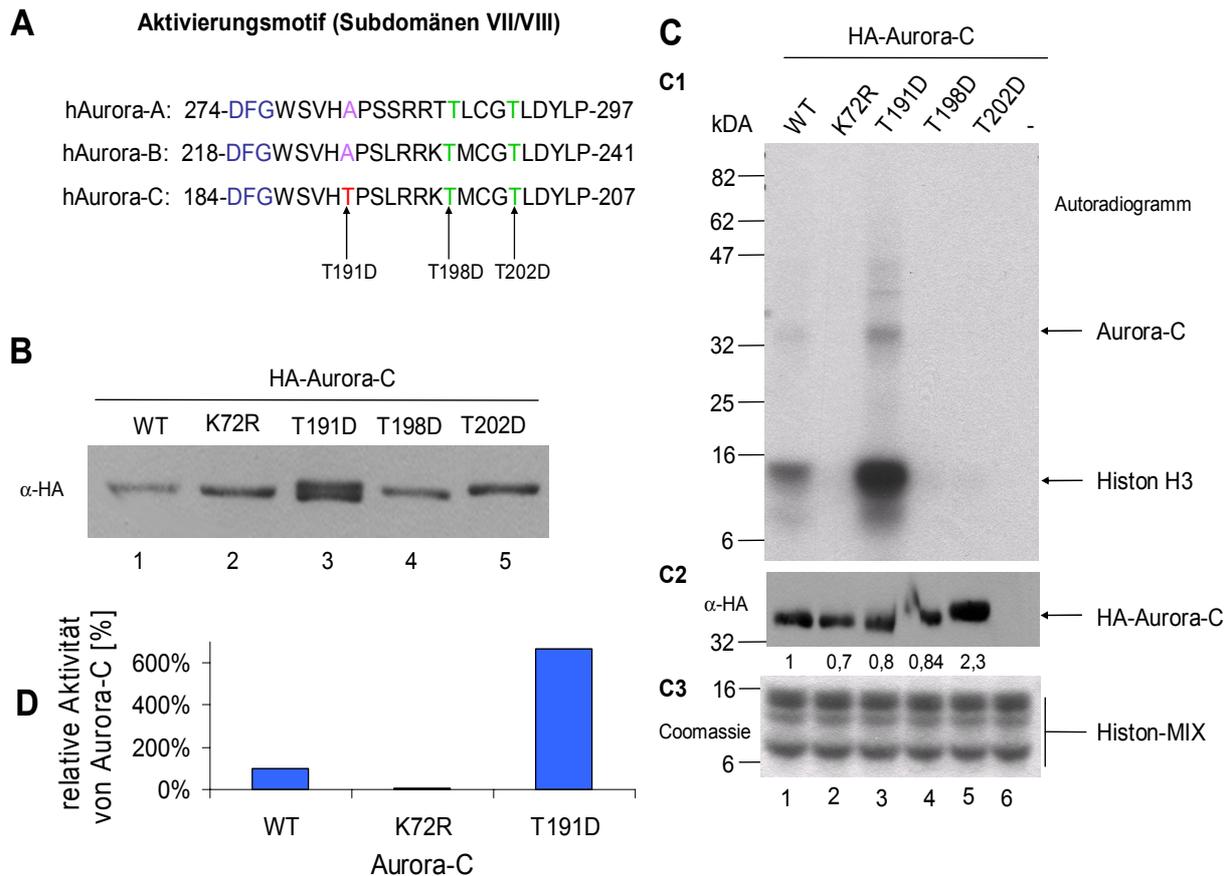


Abb.6: Aurora-C-T191D besitzt eine höhere Kinaseaktivität als Aurora-C-WT *in vitro*.

(A) Sequenzvergleich der Aktivierungsmotive von hAurora-A, -B, und -C: Die Aminosäure T191 (rot) ist Aurora-C-spezifisch; die Aminosäuren T198 und T202 (grün) sind konserviert.

(B) Aurora-C-T191D kann als Doppelbande im Western-Blot nachgewiesen werden: HeLa-Zellen wurden mit pcDNA-Aurora-C-WT, -K72R, -T191D, -T198D oder -T202D transfiziert und nach 36h mit 50ng/ml Nocodazol behandelt. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Zellextrakte mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) im Western-Blot untersucht. (Folgende Proteinmengen wurden auf das Gel geladen: Spur1 40 μ g; Spur2 40 μ g; Spur3 20 μ g; Spur4 25,5 μ g; Spur5 25,5 μ g).

(C) Aurora-C-T191D hat eine höhere Kinaseaktivität als Aurora-C-WT: HeLa-Zellen wurden wie in (B) beschrieben behandelt und geerntet. HA-Aurora-C wurde mit α -HA-Antikörper aus den Zellextrakten immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität der Proteine in einer *in vitro* Kinasereaktion bestimmt: Das immunpräzipitierte HA-Aurora-C-WT, -K72R, -T191D, -T198D oder -T202D wurden 30min bei 30°C in Kinasereaktionspuffer mit einem Mix aus verschiedenen Histonen (Substrat) und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert. Der $[\text{P}^{32}]$ -Einbau wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (C1). Die Kontrolle der Immunpräzipitation von HA-Aurora-C erfolgte mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) im Western-Blot. Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch Fluoreszenz-Messung (relative Signalstärke bezogen auf Aurora-C-WT unter der jeweiligen Bande angegeben) (C2). Der Nachweis des Substrats erfolgte durch Coomassie-Färbung (C3).

(D) Die Quantifizierung der radioaktiven Signale aus (C) erfolgte durch Szintillations-Messung. (Angabe der relativen Aktivität bezogen auf HA-Aurora-C-WT in %).

5.2.2 Untersuchung von HeLa-Zellen in der Mitose nach Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate

Die bisher publizierten Daten, die basierend auf der Überexpression von Aurora-C gewonnen wurden, beschreiben überwiegend die Funktion des Proteins in der Mitose. Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass das überexprimierte Aurora-C sich in der Mitose wie ein „Chromosomal-Passenger-Protein“ verhält, und die Funktionen von Aurora-C und Aurora-B während der Mitose redundant sind (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005). Die Überexpression der Kinase-inaktiven Aurora-C-K72R-Mutante in HeLa-Zellen inhibiert die Cytokinese am Ende der Mitose und verursacht eine Akkumulation von polyploiden Zellen mit zwei oder mehr Zellkernen (Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005).

In den folgenden Experimenten wurden die verschiedenen Aurora-C-Proteine in HeLa-Zellen überexprimiert und die Auswirkungen der Überexpression auf die Mitose bzw. Cytokinese untersucht. Für die Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit den verschiedenen HA-Aurora-C-Expressionsvektoren transfiziert und 48h nach der Transfektion fixiert. Die Zellen wurden mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) und α -Tubulin-Antikörper (Marker für die Zellmorphologie) gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Die Zellen wurden auf Cytokinesedefekte untersucht. HeLa-Zellen haben einen defekten postmitotischen G1-Kontrollpunkt (Meraldi et al., 2004; Giet et al., 2005). Cytokinesedefekte äußern sich daher in einer Akkumulation von multiplen Zellkernen in HeLa-Zellen (Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005). Außerdem sind die Zellen nicht in der Lage eine postmitotische Brücke auszubilden. Durch die entsprechenden Negativkontrollen wurde eine Kreuzreaktivität zwischen den verwendeten Antikörpern ausgeschlossen.

In HeLa-Zellen, die HA-Aurora-C-WT, -K72R, -T191D, -T198D oder -T202D überproduzieren, kann HA-Aurora-C während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper (midbody) nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Nur 1 bis 3% der Zellen, die HA-Aurora-C-T198D, -T202D oder -K72R überproduzieren, können eine postmitotische Brücke zwischen den beiden sich teilenden Tochterzellen ausbilden (Abb.7A, 7C). Sehr häufig können Zellen mit abnormen postmitotischen Brücken beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt). Rund 40% der Zellen, die HA-Aurora-C-T198D, -T202D oder -K72R überproduzieren, weisen nach 48h zwei oder mehr Zellkerne auf (Abb.7B; 7D).

13% bzw. 8% der HeLa-Zellen, die HA-Aurora-C-WT oder -T191D überproduzieren, bilden eine postmitotische Brücke aus (Abb.7C). 5% der Zellen, die HA-Aurora-C-WT oder -T191D überproduzieren, haben nach 48h multiple Zellkerne (Abb.7D).

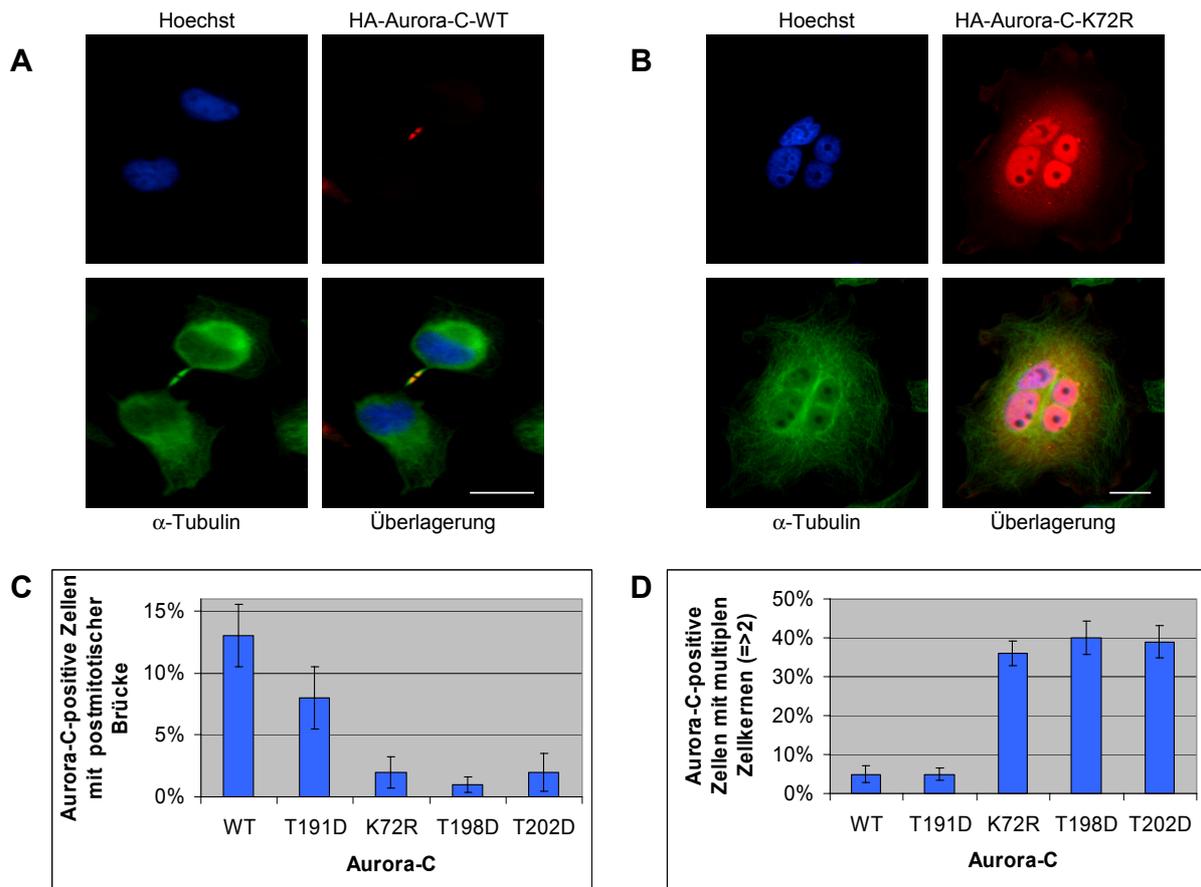


Abb.7: Charakterisierung von Aurora-C in der Mitose bzw. Cytokinese.

HeLa-Zellen wurden entweder mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT, -K72R, -T191D, -T198D oder -T202D transfiziert und 48h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) und α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; rot) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop: (A) Aurora-C-positive Zelle mit einer postmitotischen Brücke (Balken: 20 μ m). (B) Aurora-C-positive Zelle mit multiplen Zellkernen (Balken: 20 μ m). (C;D) In drei unabhängigen Experimenten wurden Aurora-C-positive Zellen mit postmitotischer Brücke (C) und Aurora-C-positive Zellen mit multiplen Kernen (≥ 2 ; D) gezählt. Pro Experiment wurden 200 Aurora-C-positive Zellen gezählt. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Die Überexpression von Aurora-C-T198D, -T202D oder -K72R inhibiert die Cytokinese und induziert die Akkumulation von Zellen mit multiplen Zellkernen. Im Gegensatz dazu, scheint die Überexpression von Aurora-C-WT oder der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D keinen Einfluss auf den Fortgang der Mitose bzw. Cytokinese zu haben. Über die Lokalisation der Proteine während der Prometaphase, Prophase, Metaphase und Anaphase kann keine Aussage gemacht werden.

Da die Mutanten Aurora-C-T198D, -T202D und -K72R sich ähnlich verhalten, wurde entschieden für die weiteren Untersuchungen nur noch Aurora-C-WT, Aurora-C-T191D und Aurora-C-K72R zu berücksichtigen.

5.2.3 Untersuchung von HeLa-Zellen in der Interphase nach Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate

Überexpressionsstudien in HeLa-Zellen haben außerdem gezeigt, dass Aurora-C in der Interphase eine schwache Affinität zum Centrosom aufweist und in einigen, wenigen Zellen während der Interphase an das Centrosom bindet. HeLa-Zellen, die Aurora-C am Centrosom gebunden haben, sind oftmals polyploid und haben eine abnorme Centrosomenzahl (Dutertre et al., 2005). In den Überexpressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Beobachtung ebenfalls gemacht werden (Ergebnis nicht gezeigt). Allerdings wurde die Beobachtung nicht weiter untersucht, weil es nur sehr wenige Zellen betraf und nicht signifikant erschien. In Interphasezellen konnten andere Beobachtungen gemacht werden, die signifikanter sind und bisher noch nicht beschrieben wurden.

Für die Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Aurora-C-Expressionsvektoren transfiziert und 24 bzw. 48h nach der Transfektion fixiert. Die Zellen wurden mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) und α -Tubulin-Antikörper (Marker für die Zellmorphologie) gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Durch die entsprechenden Negativkontrollen wurden Kreuzreaktivitäten zwischen den verwendeten Antikörpern ausgeschlossen.

Bei der mikroskopischen Auswertung stellte sich heraus, dass aufgrund der Filter des Mikroskops das rote (Aurora-C) und grüne Signal (α -Tubulin) interferieren. Bei Betrachtung des grünen Kanals leuchtete das rote Signal in den grünen Kanal (Ergebnis nicht gezeigt). Es entsteht zum Beispiel der Eindruck, dass α -Tubulin und Aurora-C im Zellkern kolokalisieren. Vor allem bei der Untersuchung von Zellen, die überexprimiertes Aurora-C-T191D in großen Mengen im Zellkern akkumulierten, machte sich dies bei der Auswertung negativ bemerkbar (Vergleiche Abb.8Ac und 8Bc).

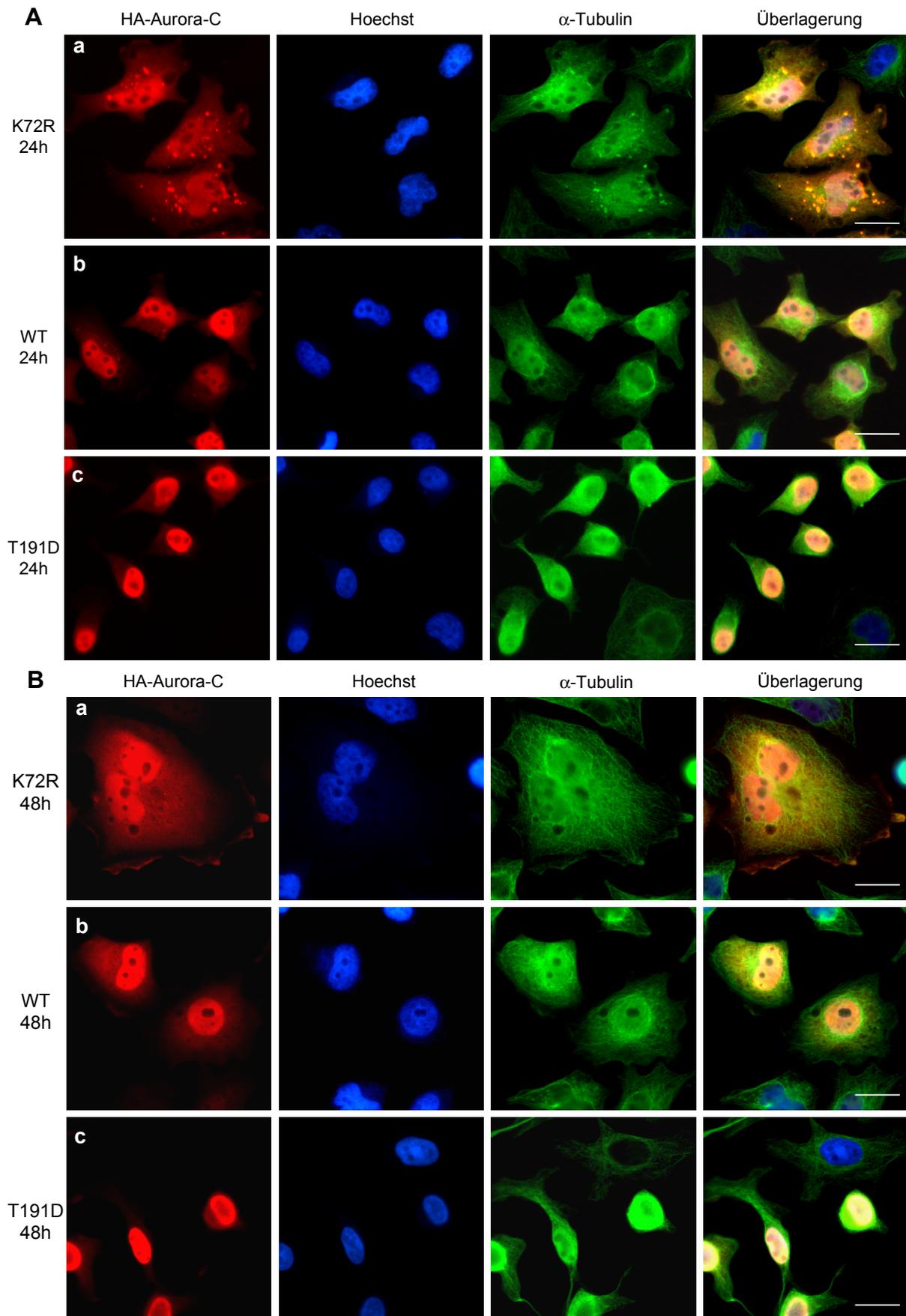


Abb.8: Die Überexpression von Aurora-C-T191D in HeLa-Zellen verursacht die Akkumulation von Aurora-C im Zellkern und den Verlust des cytoplasmatischen Raums.

Abb.8: Die Überexpression von Aurora-C-T191D in HeLa-Zellen verursacht die Akkumulation von Aurora-C im Zellkern und den Verlust des cytoplasmatischen Raums.

HeLa-Zellen wurden entweder mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT, -K72R oder -T191D transfiziert und 24h (A) bzw. 48h (B) nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) und α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; rot) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Balken: 20 μ m).

HeLa-Zellen, die das hyperaktive Aurora-C-T191D überproduzieren, sind 24h nach der Transfektion abgerundet. Die Zellen weisen eine sehr starke Aurora-C-Kernfärbung und eine schwache cytoplasmatische Aurora-C-Färbung auf (Abb.8Ac). Im Vergleich zu Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, haben die Zellen einen reduzierten cytoplasmatischen Raum und zeigen eine stärkere Aurora-C-Kernfärbung. HeLa-Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, weisen eine schwache cytoplasmatische Aurora-C-Färbung und eine starke Aurora-C-Kernfärbung auf (Abb.8Aa; 8Ab).

48h nach der Transfektion zeigen Zellen, die Aurora-C-T191D überproduzieren, eine noch stärkere Aurora-C-Kernfärbung als 24h nach der Transfektion, und der cytoplasmatische Raum ist in der Regel noch stärker reduziert. Im Extremfall sind die Zellen bis auf den Zellkern reduziert und der cytoplasmatische Raum ist fast vollständig verloren (Abb.8Bc; 9B). Oftmals können auch Zellen beobachtet werden, die bis auf den Zellkern reduziert sind und sehr lange cytoplasmatische Ausläufer gebildet haben (Abb.9A). HeLa-Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, zeigen nach 48h eine starke Aurora-C-Kernfärbung und eine schwache cytoplasmatische Aurora-C-Färbung. Aurora-C-WT und -K72R akkumulieren aber nicht wie Aurora-C-T191D im Zellkern und induzieren auch keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Die Überexpression von Aurora-C-K72R verursacht wie beschrieben Cytokinesedefekte, resultierend in der Akkumulation von zwei oder mehr Zellkernen. Ein weiterer Effekt, der sich auf die Cytokinesedefekte zurückführen lässt, ist die Zunahme der Zellgröße bzw. des Volumens (Abb.8Ba).

Im Folgenden wird die Akkumulation von Aurora-C im Zellkern und der Verlust des cytoplasmatischen Raums als T191D-Phänotyp bezeichnet (Abb. 9A; 9B). 90% der HeLa-Zellen, die Aurora-C-T191D überproduzieren, zeigen nach 48h den T191D-Phänotypen in einer der beiden Ausprägungsformen (mit und ohne cytoplasmatische Ausläufer). Im Gegensatz dazu kann in HeLa-Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, der T191D-Phänotyp nicht beobachtet werden (Abb.9C).

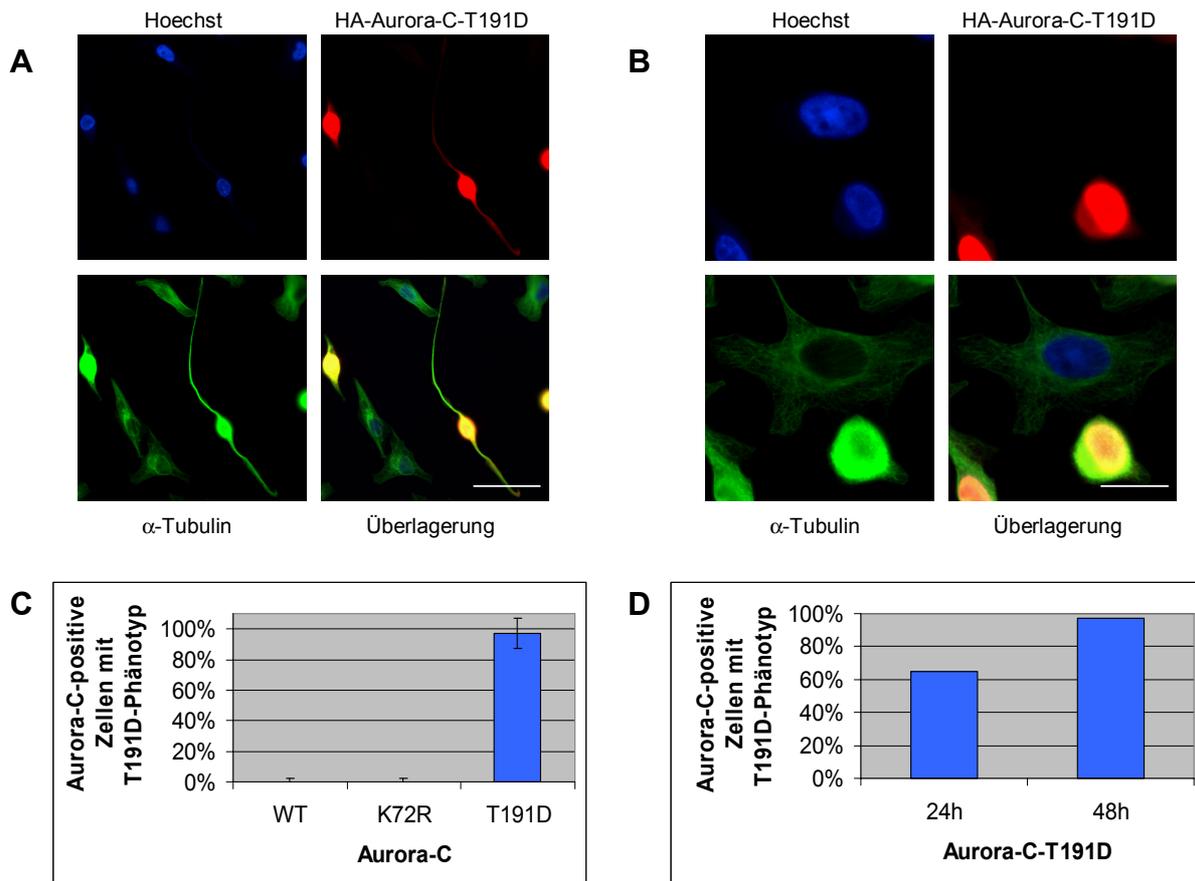


Abb.9: Charakterisierung von HeLa-Zellen mit T191D-Phänotyp.

HeLa-Zellen wurden entweder mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT, -K72R oder -T191D transfiziert und 24h bzw. 48h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) und α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; rot) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop: (A) Aurora-C-positive Zelle mit T191D-Phänotyp (mit cytoplasmatischen Ausläufern) 48h nach der Transfektion (Balken: 50 μ m). (B) Aurora-C-positive Zelle mit T191D-Phänotyp (ohne cytoplasmatische Ausläufer) 48h nach der Transfektion (Balken: 20 μ m). (C) In drei unabhängigen Experimenten wurden Aurora-C-positive Zellen mit T191D-Phänotyp (mit und ohne cytoplasmatische Ausläufer) 48h nach der Transfektion (pcDNA-HA-Aurora-C-WT, -K72R, -T191D) gezählt. Pro Experiment wurden 100 Aurora-C-positive Zellen gezählt. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. (D) Es wurden Aurora-C-positive Zellen mit T191D-Phänotyp (mit und ohne cytoplasmatische Ausläufer) 24h und 48h nach der Transfektion (pcDNA-HA-Aurora-C-T191D) gezählt. Pro Experiment wurden 100 Aurora-C-positive Zellen gezählt. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt (Experiment nur einmal durchgeführt).

Vergleicht man HeLa-Zellen, die Aurora-C-T191D 24h bzw. 48h lang überproduzieren, so zeigen 60% der Zellen nach 24h und 95% der Zellen nach 48h den T191D-Phänotypen (Abb.9D). Nach 48h ist die Ausprägung des T191D-Phänotyps in der Regel stärker als nach 24h. Die Zellen zeigen häufig nur einen schmalen Plasmaraum. Nach 24h weisen die Zellen meistens noch einen kleinen cytoplasmatischen Raum auf, der allerdings im Vergleich zu den Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, rückgebildet ist (Abb.8A; 8B).

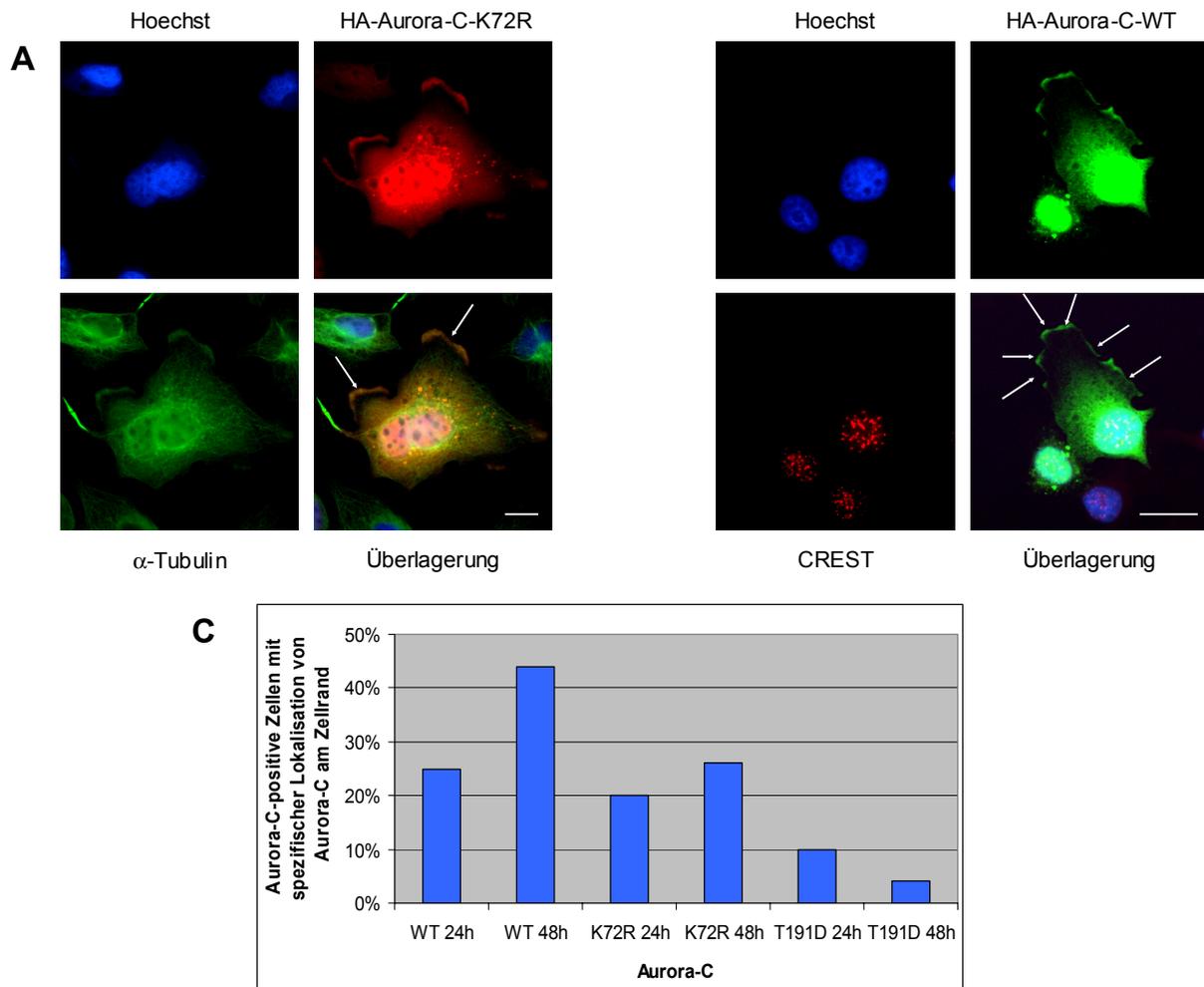


Abb.10: Spezifische Lokalisation von Aurora-C am Zellrand von HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden entweder mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT, -K72R oder -T191D transfiziert und 24h bzw. 48h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; rot) und mit α -Tubulin-Antikörper (grün) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop: (A) Aurora-C-positive Zelle mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C-K72R (rot) am Zellrand (Balken: 20 μ m). (B) Aurora-C-positive Zelle mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C-WT (grün) am Zellrand. Die Färbung der Zellen erfolgte mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; grün) und humanen CREST-Serum (rot; Balken: 20 μ m). (C) Es wurden Aurora-C-positive Zellen mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C am Zellrand 24h und 48h nach der Transfektion gezählt. Pro Experiment wurden 100 Aurora-C-positive Zellen gezählt. Die Ergebnisse wurden in Histogrammen dargestellt (Experiment nur einmal durchgeführt). (Weiße Pfeile zeigen auf Stellen, wo HA-Aurora-C asymmetrisch am Zellrand lokalisiert ist).

Außerdem kann die asymmetrische Lokalisation von überexprimierten Aurora-C am Zellrand bzw. Zellsaum beobachtet werden (Abb.10A; 10B). In 44% bzw. 26% der HeLa-Zellen, die Aurora-C-WT oder -K72R überproduzieren, lokalisiert Aurora-C 48h nach der Transfektion asymmetrisch am Zellrand (Abb.10C).

Nur 4% der HeLa-Zellen, die das hyperaktive Aurora-C-T191D überproduzieren, weisen nach 48h eine asymmetrische Lokalisation von Aurora-C-T191D am Zellrand auf (Abb.10C). In schwach überexprimierenden Zellen kann Aurora-C-T191D allerdings entweder im Zellkern (möglicherweise innere Kernmembran) oder am Zellrand nachgewiesen werden (Abb.11).

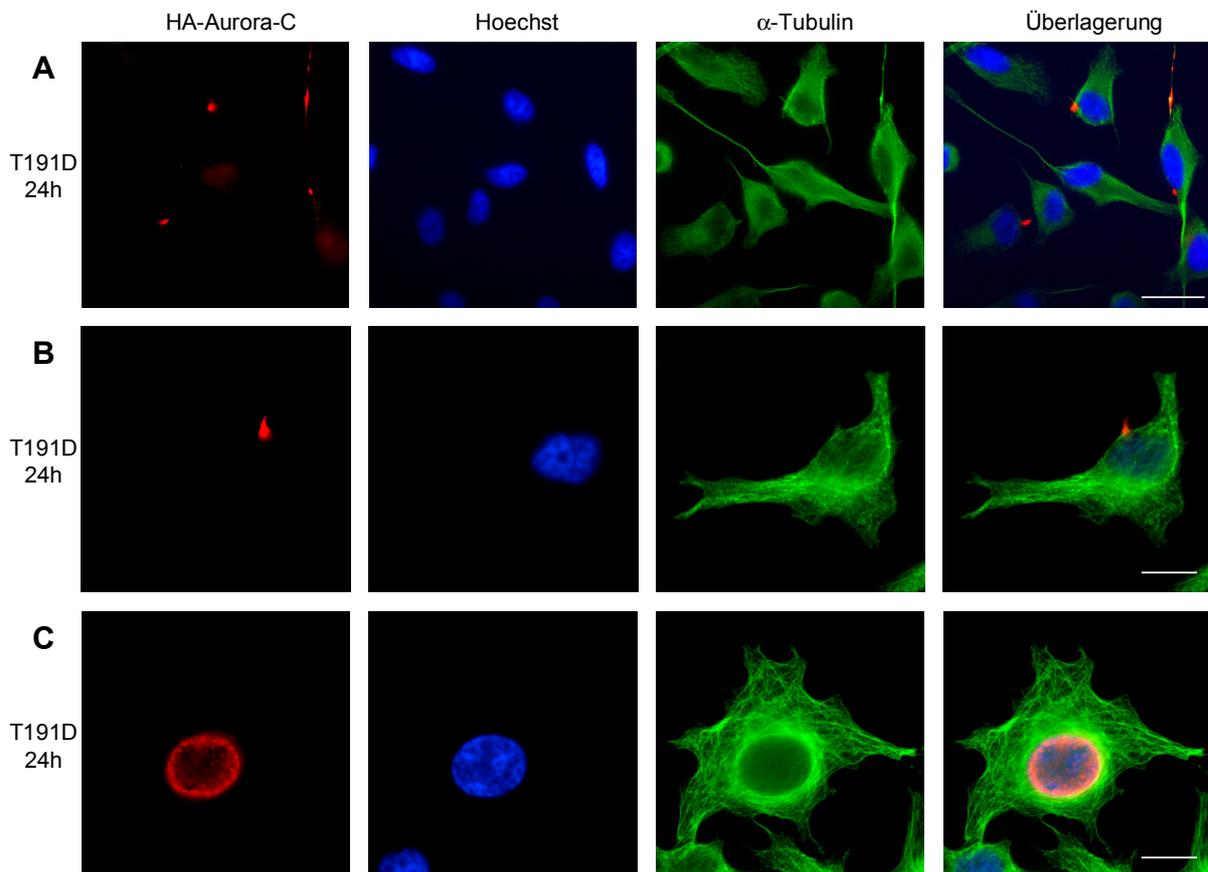


Abb.11: Aurora-C-T191D lokalisiert in schwach überexprimierenden HeLa-Zellen entweder im Zellkern oder am Zellrand.

HeLa-Zellen wurden mit pcDNA-HA-Aurora-C-T191D transfiziert und 24h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) und α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C; rot) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop: (A) Aurora-C-positive Zellen mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C-T191D am Zellrand (Balken: 50 μ m). (B) Aurora-C-positive Zelle mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C-T191D am Zellrand (Balken: 20 μ m). (C) Aurora-C-positive Zelle mit spezifischer Lokalisation von HA-Aurora-C-T191D im Zellkern (Balken: 20 μ m).

Überexpressionsstudien mit Aurora-C-WT, -K72R und -T191D wurden auch in U2OS-Zellen durchgeführt, und die beschriebenen Phänotypen konnten auch in dieser Zelllinie beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt; keine Quantifizierung durchgeführt).

5.3 Funktionelle Analyse von Aurora-C durch RNA-Interferenz

Die bisher publizierten Studien haben gezeigt, dass die Funktionen des überexprimierten Aurora-C und des endogenen Aurora-B bzw. Aurora-A *in vivo* redundant sind (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Giet et al., 2005; Dutertre et al., 2005). Bisher konnte noch keine Funktion von Aurora-C beschrieben werden, die sich alleine auf die spezifische Aktivität von Aurora-C zurückführen lässt. Die besondere Schwierigkeit bei den Überexpressionsstudien mit Aurora-C besteht in der hohen Sequenzhomologie zu Aurora-A und -B. Möglicherweise sind die Effekte, die durch die Überexpression von Aurora-C ausgelöst werden, ausschließlich artifiziell und auf eine Störung der Funktion von Aurora-A und -B zurückzuführen.

Eine Möglichkeit Aurora-C *in vivo* selektiv zu untersuchen ohne die Funktion von Aurora-A und -B zu stören, ist die spezifische Reduktion bzw. Abnahme der natürlichen bzw. endogenen Proteinmenge von Aurora-C durch Behandlung von Zellen mit shRNAs (small hairpin RNA), die gegen das Aurora-C-Gen bzw. die Aurora-C-mRNA gerichtet sind. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der natürlichen mRNA-Menge des Aurora-C-Gens und Aurora-B-Gens Zellen mit multiplen Zellkernen induziert. In Abwesenheit von Aurora-B kann das überexprimierte Aurora-C die Funktion von Aurora-B komplementieren (Li et al., 2004). Eine weitere Studie zeigte, dass die Reduktion der natürlichen Proteinmengen von Aurora-B *in vivo* multiple Defekte in der Mitose auslöst, die zu Cytokinesedefekten führen (Honda et al., 2003). Die Reduktion der endogenen Proteinmenge von Aurora-A in Säugerzellen führt zu einem Zellzyklusarrest in der späten G2-Phase und verhindert den Eintritt der Zellen in die Mitose (Hirota et al., 2003).

5.3.1 Abnahme des HA-Aurora-C-Proteins nach Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das vektorbasierende pSuper-System (Suppression of endogenous RNA) für die *in vivo* Transkription der shRNAs, die gegen das Aurora-C-Gen gerichtet ist, eingesetzt (Brummelkamp et al., 2002). Aufgrund der fehlenden Nachweismöglichkeiten war es nicht möglich die Abnahme des endogenen Aurora-C direkt auf Proteinebene nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde versucht die Abnahme der Aurora-C-mRNA durch quantitative RT-PCR nachzuweisen. Der Nachweis konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass die verwendeten Vektoren die natürliche mRNA-Menge des Aurora-C-Gens in HeLa-Zellen vermutlich effektiv reduzieren können (Ergebnis nicht gezeigt). Um eine verbindliche Aussage machen zu können, müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Die nachfolgend dargestellten Experimente wurden ohne Nachweissystem (Western-Blot; RT-PCR) durchgeführt und sind noch nicht abgeschlossen. Die ersten, vorläufigen Ergebnisse sollen hier vorgestellt werden, da sehr starke Querverbindungen zu anderen, unabhängigen Ergebnissen (Überexpressionsstudien, Two-Hybrid-Screen) bestehen.

Für die Experimente wurden zwei Vektoren verwendet, die shRNAs kodieren, die gegen zwei unterschiedliche Regionen des Aurora-C-Gens bzw. die mRNA gerichtet sind. Der Vektor pSuper-Aurora-C-1 kodiert shRNAs (shRNA-Aurora-C-1), die gegen die Zielsequenz 404bp bis 423bp im Aurora-C-Gen bzw. der mRNA gerichtet ist. Die 19bp-lange Zielsequenz im Aurora-C-Gen unterscheidet sich an 7 Positionen von der homologen Region im Aurora-B-Gen und an 8 Positionen von der homologen Region im Aurora-A-Gen. Der Vektor pSuper-Aurora-C-2 kodiert shRNA-Aurora-C-2 und ist gegen die Zielsequenz 421bp bis 440bp gerichtet. Die Aurora-C-Zielsequenz unterscheidet sich nur an 2 Positionen von der homologen Region im Aurora-B-Gen und an 8 Positionen von der homologen Region im Aurora-A-Gen. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pSuper-Luciferase eingesetzt, das shRNAs gegen das Luciferasegen (GL2) kodiert (Elbashir et al., 2001).

Um die Vektoren (pSuper-Aurora-C-1, pSuper-Aurora-C-2) zu testen, wurde ein Überexpressionssystem verwendet. 293T-Zellen wurden mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT und entweder mit pSuper-Aurora-C-1, pSuper-Aurora-C-2 oder pSuper-Luciferase kotransfiziert. Es wurden Proben nach 24h, 48h und 72h entnommen, und die Zellextrakte wurden mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) und α -Tubulin-Antikörper (Ladekontrolle) im Western-Blot untersucht (Abb.12).

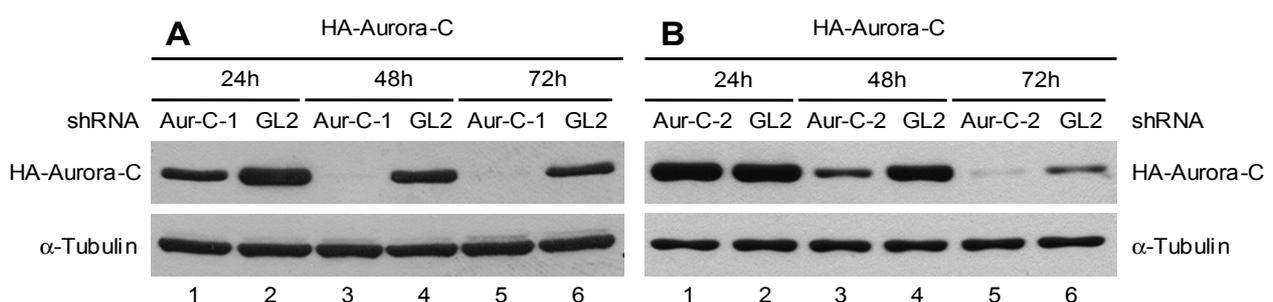


Abb.12: Test von pSuper-Aurora-C-1 und -2 in einem Überexpressionssystem.

(A) 293T-Zellen wurden mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT (HA-Aurora-C) und entweder mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1; Aur-C-1) oder mit pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; GL2) kotransfiziert. Proben wurden 24h, 48h und 72h nach der Transfektion entnommen und die Zellextrakte mit α -HA-Antikörper (HA-Aurora-C) und α -Tubulin-Antikörper (Ladekontrolle) im Western-Blot untersucht.

(B) 293T-Zellen wurden mit pcDNA-HA-Aurora-C-WT (HA-Aurora-C) und entweder mit pSuper-Aurora-C-2 (shRNA-Aurora-C-2; Aur-C-2) oder mit pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; GL2) kotransfiziert. Weitere Vorgehensweise siehe (A).

Die Western-Blot-Analyse der Zellextrakte zeigt, dass Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 und pcDNA-HA-Aurora-C-WT transfiziert wurden, nach 24h eine deutlich reduzierte HA-Aurora-C-Proteinmenge gegenüber den Kontrollzellen aufweisen, die mit pSuper-Luciferase und pcDNA-HA-Aurora-C-WT transfiziert wurden (Abb.12A; Spur:1, 2). Nach 48h kann HA-Aurora-C in Zellen, die mit shRNA-Aurora-C-1 behandelt wurden, nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.12A; Spur:3). Die Ladekontrolle (WB mit α -Tubulin-Antikörper) zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen geladen wurden (Abb.12A; Spur:1-6). Außerdem konnte in einem unabhängigen Experiment mit HeLa-Zellen nachgewiesen werden, dass shRNA-Aurora-C-1 keinen Einfluss auf die endogene Proteinmenge von Aurora-B hat (Ergebnis nicht gezeigt).

Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-2 und pcDNA-HA-Aurora-C-WT transfiziert wurden, weisen nach 24h keine signifikante Reduktion der HA-Aurora-C-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Abb.12B; Spur:1, 2). Nach 48h und 72h kann in Zellen, die mit shRNA-Aurora-C-2 behandelt wurden, eine deutliche Reduktion von HA-Aurora-C im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (Abb.12B; Spur:3, 4, 5, 6). Vermutlich lässt sich in dieser Versuchsreihe auch eine starke Abnahme der Proteinmenge durch Protein-degradation beobachten (Abb.12B, Spur: 2, 4, 6). Die Ladekontrolle (WB mit α -Tubulin-Antikörper) zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen geladen waren (Abb.12B; Spur:1-6).

Für die nachfolgenden Versuche wurde überwiegend der Vektor pSuper-Aurora-C-1 verwendet, der in dem Überexpressionssystem effektiver war als der Vektor pSuper-Aurora-C-2. Andere pSuper-Aurora-C-Konstrukte, die gegen andere Zielregionen des Aurora-C-Gens gerichtet waren, zeigten keinen Effekt bei den Überexpressionsstudien (Ergebnis nicht gezeigt).

5.3.2 Morphologische Veränderungen von HeLa-Zellen nach Behandlung mit shRNAs gegen Aurora-C

Im folgenden Experiment wurden HeLa-Zellen mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder mit pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; Kontrolle) transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion routinemäßig mit einem Umkehrmikroskop im Phasenkontrast beobachtet. 48h nach der Transfektion konnten erste Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen den Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, und den Kontrollzellen, die mit pSuper-Luciferase transfiziert wurden, beobachtet werden. Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, rundeten sich ab und schienen sich vom Boden des Kulturgefäßes abzulösen (Ergebnis nicht gezeigt).

72h, 96h und 120h nach der Transfektion wurden Zellen fixiert und mit α -Tubulin-Antikörper (Marker für die Zellmorphologie) gefärbt. Die Präparate wurden mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

72h nach der Transfektion scheinen die Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, einen reduzierten cytoplasmatischen Raum im Vergleich zu den Kontrollzellen aufzuweisen (Abb.13Aa; 13Ab). Nach 96 und 120h kann eine weitere Reduktion des cytoplasmatischen Raums beobachtet werden (Abb.13Bb; 13Cb). 120h nach der Transfektion sind die meisten Zellen abgerundet und der Kontakt zwischen den Zellen fast vollständig aufgelöst. Der cytoplasmatische Raum ist fast vollständig verloren und die Zellen im Extremfall bis auf den Zellkern reduziert und abgemagert (Abb.13Cb; 14C). Im Gegensatz dazu können bei den Kontrollzellen keine Veränderungen festgestellt werden (Abb.13Ca; 14A).

Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, weisen sehr starke Ähnlichkeit zu den Zellen auf, die das hyperaktive Aurora-C-T191D überproduzieren. Die Zellen haben einen reduzierten cytoplasmatischen Raum und weisen keine Polarität auf.

Es ist auch zu beobachten, dass die Zellkerne der Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, kleiner sind als die Zellkerne der Kontrollzellen. Die Beobachtung wurde nicht weiter verfolgt. Eine Aussage ob die Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, multiple Zellkerne besitzen ist nicht möglich. Die Reduktion des cytoplasmatischen Raums erschwert die Unterscheidung der individuellen Zellen.

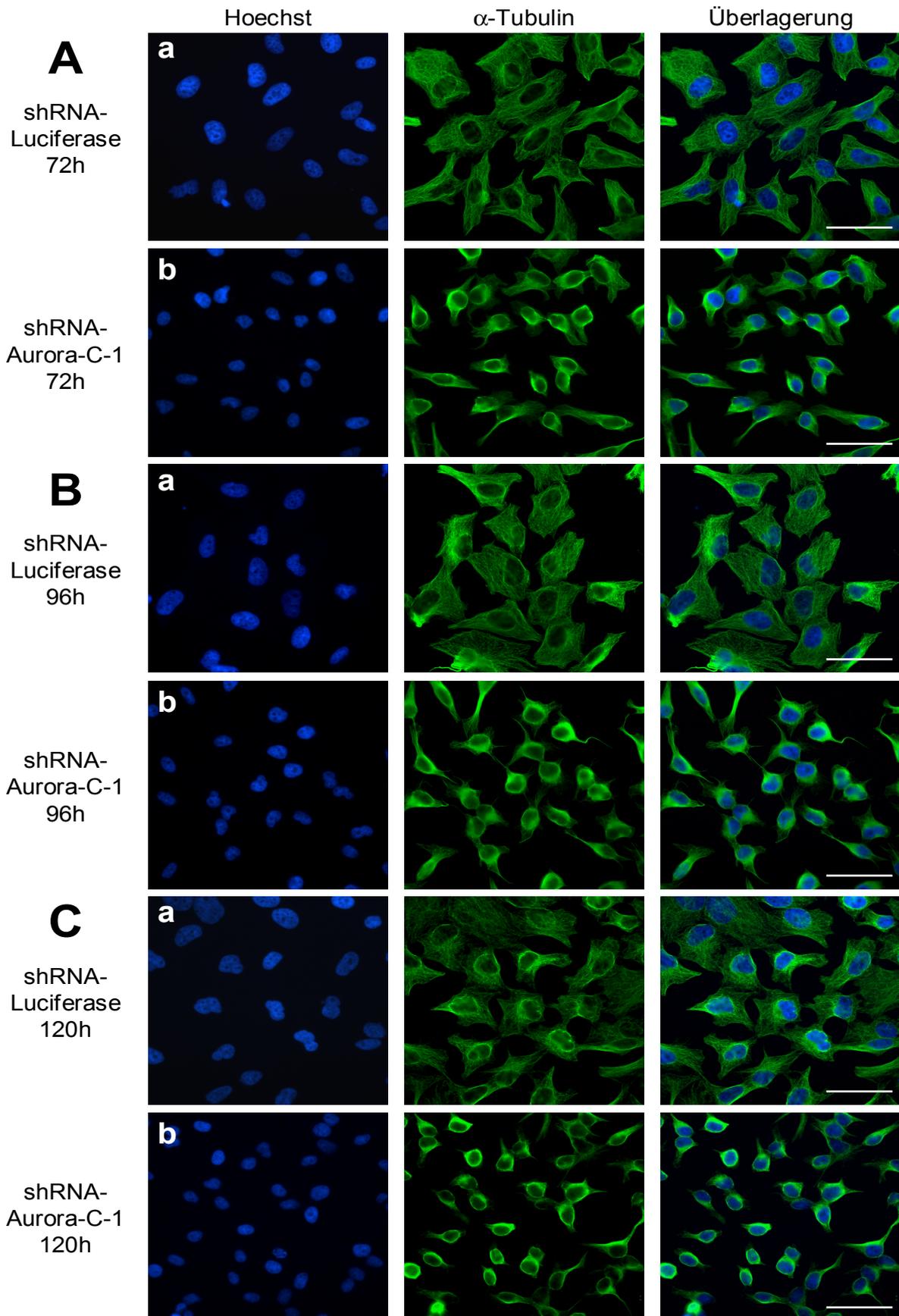


Abb.13: Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C führt zum Verlust des cytoplasmatischen Raums.

Abb.13: Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C führt zum Verlust des cytoplasmatischen Raums.

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder mit pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; Kontrolle) transfiziert und 72h (A), 96h (B) und 120h (C) nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Balken: 50 μ m).

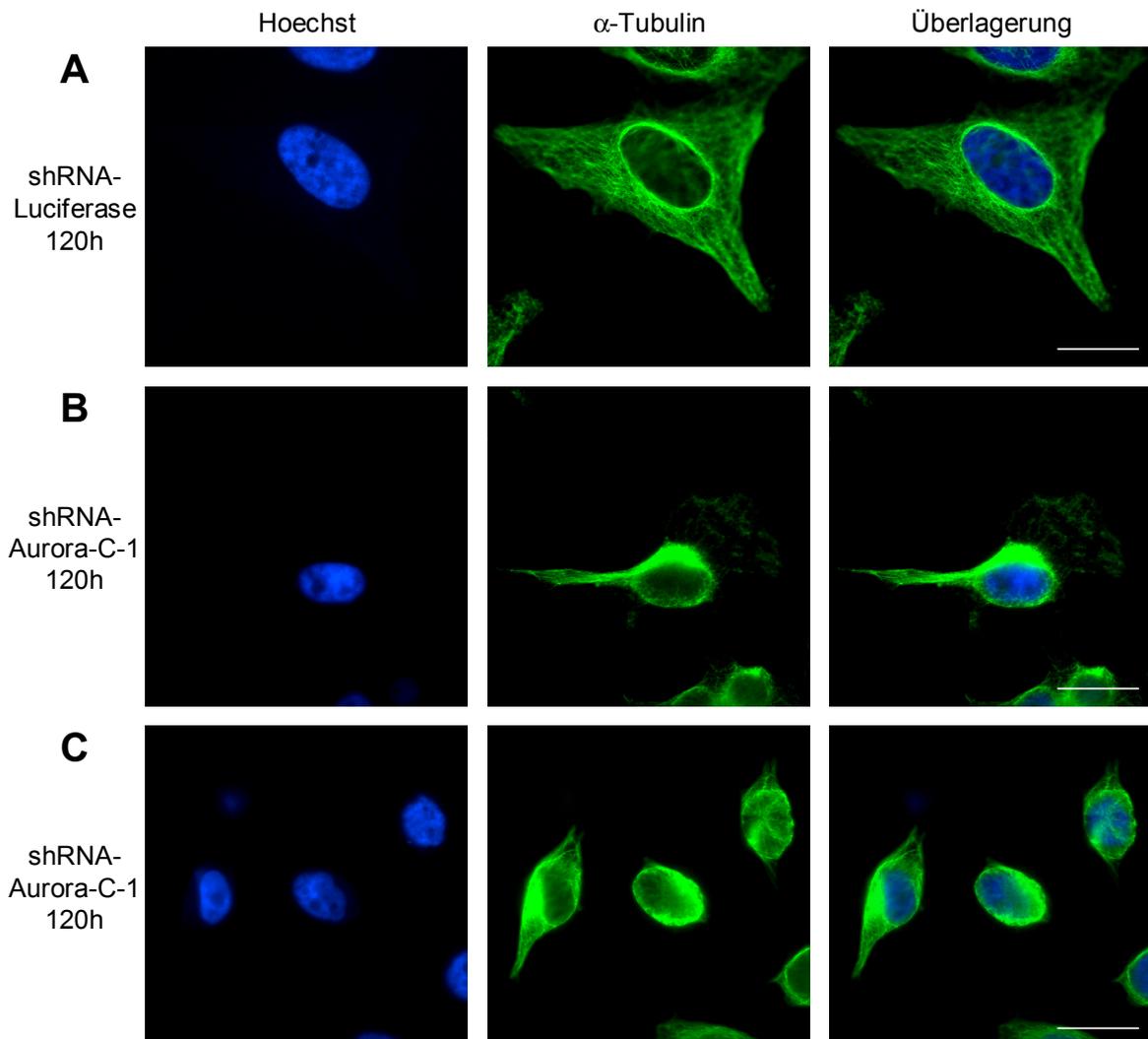


Abb.14: Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C führt zum Verlust des cytoplasmatischen Raums

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder mit pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; Kontrolle) transfiziert und 120h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit α -Tubulin-Antikörper (grün) gefärbt; die DNA (blau) wurde mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Balken: 20 μ m).

5.3.3 Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C hat einen Effekt auf den Zellzyklus

In den folgenden Experimenten wurden synchronisierte HeLa-Zellen mit shRNAs gegen das Aurora-C-Gen behandelt und die Auswirkungen auf den Zellzyklus untersucht.

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase) transfiziert und durch eine zweifache Behandlung mit Thymidin in der späten G1-Phase arretiert. 50h nach der Transfektion wurden die synchronisierten Zellen aus dem Zellzyklusarrest entlassen, und es wurden Proben zu bestimmten Zeitpunkten entnommen. Der DNA-Gehalt der Proben wurde durch eine FACS-Analyse bestimmt und die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Abb.15).

Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, durchlaufen den Zellzyklus schneller als Kontrollzellen, die mit pSuper-Luciferase transfiziert wurden. Überraschenderweise kann die erste Asynchronität der beiden Zellpopulationen in der S-Phase beobachtet werden. 2h nachdem die Zellen aus dem Arrest entlassen wurden, zeigen die beiden Zellpopulationen noch eine identische Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Nach 3 bzw. 4h weisen beide Zellpopulationen erstmals eine unterschiedliche Verteilung der Zellen auf. Nach 4h sind nur 31% der Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, in der S-Phase. Während sich zum selben Zeitpunkt noch 54% der Kontrollzellen in der S-Phase befinden (Abb.15B). Die Differenz von rund 20% lässt sich bis zu den späteren Zeitpunkten weiter verfolgen. Nach 12h sind 64% der Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, und 45% der Kontrollzellen in der G1-Phase (Abb.15A).

Der Versuch wurde mit dem identischen Ergebnis wiederholt. Bei beiden Versuchen waren leider die Proben zu Zeitpunkt 0 nicht auswertbar. Jedoch konnte, bei beiden Versuchen 2h nachdem die Zellen aus dem Arrest entlassen wurden, eine identische Zellverteilung der beiden Zellpopulationen beobachtet werden. Um auszuschließen, dass der Effekt auf den Zellzyklus durch die Arrest-induzierende Substanz Thymidin verursacht wurde, erfolgte eine Wiederholung des Experiments mit Nocodazol als Arrest-induzierender Substanz.

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase) transfiziert und mit Nocodazol in der Mitose arretiert. 48h nach der Transfektion wurden die synchronisierten Zellen aus dem Zellzyklusarrest entlassen, und es wurden Proben zu bestimmten Zeitpunkten entnommen. Die Proben wurden zu späteren Zeitpunkten entnommen, um zu überprüfen, ob die erste Asynchronität der beiden Zellpopulationen wie bei den ersten Experimenten zuerst in der S-Phase auftritt.

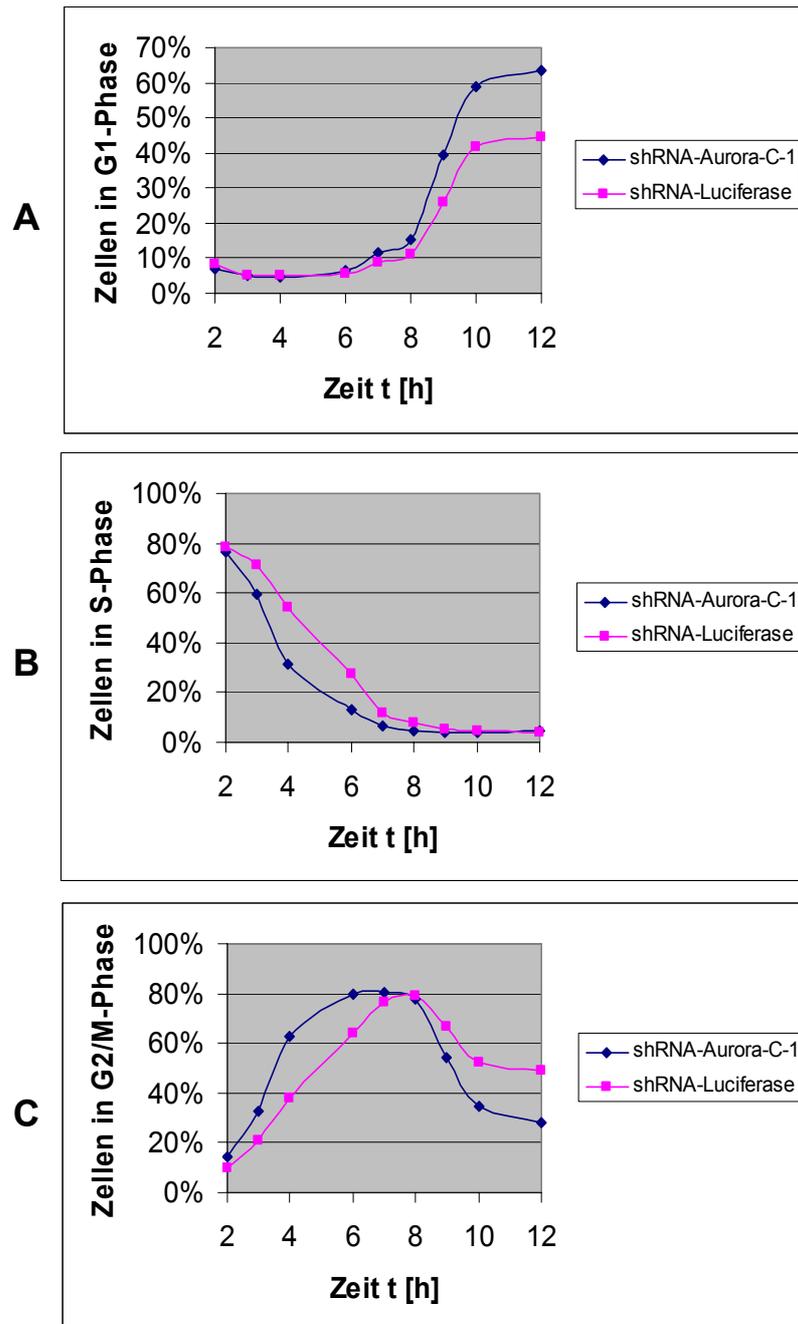


Abb.15: Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C hat einen Effekt auf den Zellzyklus.

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase) transfiziert und 4h nach der Transfektion mit 2mM Thymidin (1. Thymidinzugabe) behandelt. 19h nach Zugabe des Thymidins wurden die Zellen in Thymidin-freies Medium überführt, 10h inkubiert und erneut mit 2mM Thymidin (2. Thymidinzugabe) behandelt. 17h nach der zweiten Thymidinzugabe wurden die Zellen erneut in Thymidin-freies Medium überführt und synchron aus dem Zellzyklusarrest (G1-Phase) entlassen ($t=0$). Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und der DNA-Gehalt der Zellen durch eine FACS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt und die prozentuale Verteilung der Zellen einer Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1-Phase (A), S-Phase (B), G2/M-Phase (C)) in Abhängigkeit der Zeit t [h] dargestellt.

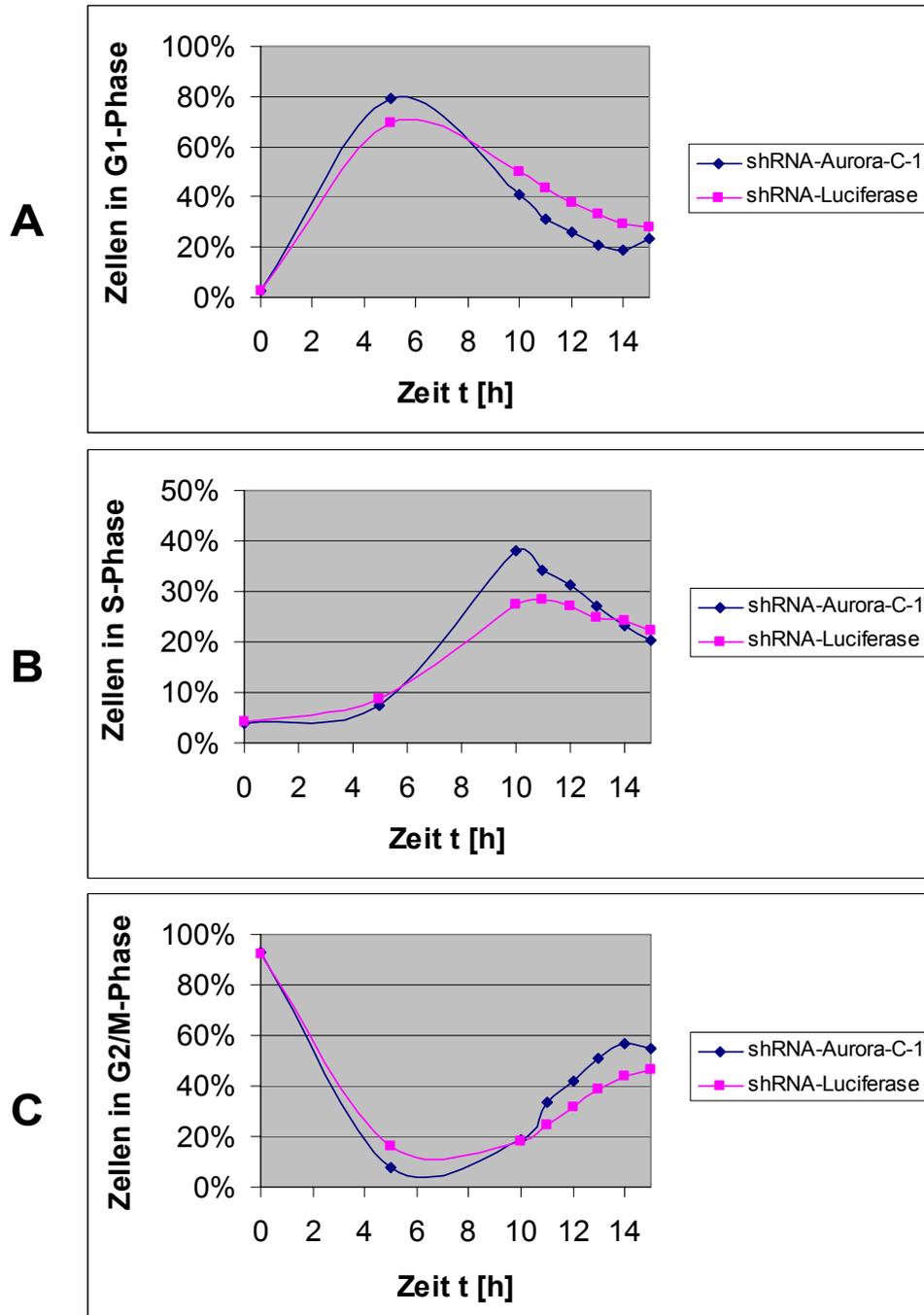


Abb.16: Die Behandlung von HeLa-Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C hat einen Effekt auf den Zellzyklus.

HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Aurora-C-1 (shRNA-Aurora-C-1) oder pSuper-Luciferase (shRNA-Luciferase; Kontrolle) transfiziert und 36h nach der Transfektion mit 50ng/ml Nocodazol behandelt. 12h nach Zugabe des Nocodazols wurden die mitotischen Zellen von den G2-Phase-Zellen getrennt und durch Überführen in Nocodazol-freies Medium synchron aus dem Zellzyklusarrest entlassen ($t=0$). Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und der DNA-Gehalt der Zellen durch eine FACS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt und die prozentuale Verteilung der Zellen einer Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1-Phase (A), S-Phase (B), G2/M-Phase (C)) in Abhängigkeit der Zeit t [h] dargestellt.

Der DNA-Gehalt der Proben wurde durch eine FACS-Analyse bestimmt und die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb.16 dargestellt.

Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, durchliefen den Zellzyklus schneller als Kontrollzellen, die mit pSuper-Luciferase transfiziert wurden. Im Gegensatz zum ersten Experiment wurde die erste Asynchronität der Zellpopulationen nicht in der S-Phase beobachtet, sondern bereits in der M-Phase bzw. G1-Phase.

Zum Zeitpunkt 0 weisen beide Zellpopulationen noch eine identische Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus auf. Nach 5h befinden sich 79% der Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-1 transfiziert wurden, in der G1-Phase. Während zum selben Zeitpunkt nur 69% der Kontrollzellen in der G1-Phase sind (Abb.16A). Die Differenz von rund 10% lässt sich bis zu den späteren Zeitpunkten weiter verfolgen (Abb.16).

Das Experiment wurde mit dem Vektor pSuper-Aurora-C-2 (shRNA-Aurora-C-2) wiederholt. Die Ergebnisse der vorherigen Versuche konnten tendenziell bestätigt werden. Zellen, die mit pSuper-Aurora-C-2 transfiziert wurden, durchlaufen den Zellzyklus schneller als Kontrollzellen, die mit pSuper-Luciferase transfiziert wurden. Es konnte allerdings nur eine Differenz von 5% beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt).

5.4 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern der Kinase Aurora-C

5.4.1 Identifizierung von Interaktionspartnern der Kinase Aurora-C durch einen Two-Hybrid-Screen in der Hefe

Bisher konnten noch keine physiologischen Interaktionspartner bzw. Substrate der Kinase Aurora-C beschrieben werden. Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Aurora-C wurde ein Two-Hybrid-Screen in der Hefe durchgeführt. Die Suche nach Interaktionspartnern erfolgte in einer HeLa-cDNA-Bibliothek.

Um Substrate von Aurora-C zu identifizieren, wurde ein Fragment der Kinase-inaktiven Mutante Aurora-C-K72R als Köder-Protein verwendet. Allgemein ist die Interaktion zwischen Substrat und Proteinkinase transient und schwach. In der Regel werden deshalb Kinase-inaktive Mutanten für den Two-Hybrid-Screen eingesetzt. Kinase-inaktive Mutanten binden das Substrat stärker als aktive Kinasen und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit Substrate zu isolieren (Smith et al., 2001; Levenson et al., 2002).

Da die Überexpression der Mutante Aurora-C-K72R in dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH109 toxisch ist, wurde als Köder-Protein für die Suche ein 210-aminosäurelanges, N-terminales Proteinfragment von Aurora-C-K72R verwendet, dessen Überexpression von den Hefen toleriert wurde. Das Fragment verursachte keine autonome Aktivierung der Reportergene im Hefestamm AH109.

Nach der Kotransformation von pGBKT7-Aurora-C-K72R-N210As und der HeLa-cDNA-Bibliothek in den Hefestamm AH109 wurde die Suche nach Interaktionspartnern unter hoch und niedrig stringenten Bedingungen durchgeführt. Unter hoch stringenten Bedingungen (starke Interaktionen) konnten keine Klone isoliert werden. Unter niedrig stringenten Bedingungen (schwache transiente Interaktionen) wurden 200 Klone isoliert und untersucht. Nach Analyse der isolierten Plasmide wurden 64 Klone sequenziert. Mit den Sequenzen wurde durch Datenbankanalyse mit Blast (NCBI blastx2) die entsprechenden humanen Proteine identifiziert, die in Tab.1 aufgelistet sind.

Es wurde entschieden die interessantesten Klone (Calpain-4, TRF2, Tid1 und RBM21) weiter zu untersuchen. Der Klon Calpain-4 kodiert ein Proteinfragment der kleinen regulatorischen Untereinheit-1 der Calpain-Proteasen und nimmt eine besondere Stellung unter den isolierten Klonen ein (Perrin & Huttenlocher, 2002; Goll et al., 2003). Calpain-4 war der Klon, der am häufigsten isoliert wurde. Außerdem konnte Calpain-4 als einziger Klon die Toxizität von Aurora-C-K72R in Hefen bei einer Kotransformation neutralisieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion zwischen Calpain-4 und Aurora-C eine relativ starke ist, und Cal-

ain-4 möglicherweise ein potientielles regulatorisches Bindeprotein von Aurora-C ist, aber kein Substrat.

Der Klon TRF2 kodiert ein Fragment des Telomerbindeproteins TRF2. TRF2 bindet an den doppelsträngigen Bereich der Telomeren und reguliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie Seneszenz, Telomerlänge, Telomerstabilität und die Antwort auf DNA-Schäden (de Lange, 2005; Blasco, 2005). Das Protein enthält eine potentielle Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle und ist möglicherweise ein Substrat von Aurora-C.

Tab.1: Potentielle Interaktionspartner von Aurora-C (Datenbankanalyse 2.02.2005).

Name	Funktion
TRF2 (<u>T</u> elomeric <u>r</u> epeat binding <u>f</u> actor <u>2</u>)	Telomerbindeprotein
Epiplakin	Cytolinker-Protein
Calpain-4 (Calpain small subunit 1)	kleine regulatorische Untereinheit-1 der Calpain-Proteasen
Tid1 (<u>t</u> umorous <u>i</u> maginal <u>d</u> iscs protein)	Cochaperon (auch als HSP40 bekannt)
RBM21 (<u>R</u> NA <u>b</u> inding <u>m</u> otif protein <u>21</u>)	vermutlich cytoplasmatischer Polyadenylierungs-Faktor
HSP60 (<u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein <u>60</u> kDa)	Chaperon
Interleukin-15	Cytokin
L36	Mitochondriale Ribosomenuntereinheit
BCA3 (<u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>a</u> ssociated protein <u>3</u>)	unbekannt

Der Klon RBM21 kodiert ein Fragment des Proteins RBM21. RBM21 ist ein bisher unbeschriebenes Protein. Das Protein weist Ähnlichkeiten zu cytoplasmatischen Polyadenylierungs-Faktoren auf (Wang et al., 2000; Read & Norbury, 2002).

Der Klon Tid1 kodiert ein Fragment des Cochaperons Tid1. In *Drosophila* konnte nachgewiesen werden, dass das homologe Protein Tid56 ein Tumor-Suppressor-Protein ist (Kurzik-Dumke et al., 1995; Lo et al., 2004).

Auf eine weitere Untersuchung der Klone HSP60, L36, BCA3, Interleukin-15 und Epiplakin wurde verzichtet. Aufgrund eigener Beobachtungen und Ergebnissen, die von Anderen im Verlauf dieser Arbeit über das Protein Epiplakin publiziert wurden, sollte eine Interaktion von Aurora-C und Epiplakin in Zukunft unbedingt überprüft werden. Es konnte gezeigt werden,

dass die Abnahme der endogenen Proteinmenge von Epiplakin in HeLa-Zellen die Zerstörung des Keratin- und Vimentin-Cytoskeletts verursacht (Jang et al., 2005). Möglicherweise ist die Veränderung der Zellmorphologie von HeLa-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-HA-Aurora-C-T191D oder pSuper-Aurora-C-1 auf eine Interaktion zwischen Aurora-C und Epiplakin zurückzuführen.

5.4.2 *In vitro* Interaktionsstudien mit Aurora-C-K72R und potentiellen Interaktionspartnern

Um Bindungen zwischen Aurora-C und den potentiellen Interaktionspartnern nachzuweisen, wurden *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt. Für die Interaktionsstudien wurden immobilisiertes GST-Aurora-C-K72R-Fusionsprotein und [³⁵S]-markierte Proteinfragmente von TRF2, RBM21, Calpain-4 und Tid1 eingesetzt.

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass GST-Aurora-C-K72R mit einem Proteinfragment von RBM21 unter den gewählten Versuchsbedingungen *in vitro* spezifisch interagiert (Ergebnis nicht gezeigt). Das Fragment interagiert aber nicht mit dem GST-Protein (Negativkontrolle).

Eine spezifische Interaktion zwischen GST-Aurora-C-K72R und den Proteinfragmenten von TRF2, Calpain-4 und Tid1 konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Proteinfragmente von TRF2, Calpain-4 und Tid1 interagieren zwar mit GST-Aurora-C-K72R, aber auch unspezifisch mit dem GST-Protein (Negativkontrolle).

Von einer weiteren Untersuchung von RBM21 wurde abgesehen. Die weitere Untersuchung des Proteins hätte den Aufbau einer kompletten Infrastruktur (Antikörper, Klonierung usw.) erfordert, was aus zeitlichen Gründen nicht möglich war. Ebenso wurde von der weiteren Untersuchung von Tid1 abgesehen. Tid1 gehört zu einer Proteinfamilie (Chaperon), deren Mitglieder sehr häufig zu unspezifischen Interaktionen im Two-Hybrid-Screen neigen. Für die weiteren Untersuchungen wurde nur noch Calpain-4 und TRF2 berücksichtigt.

5.4.3 *In vivo* Interaktionsstudien mit Aurora-C-K72R, TRF2 und Calpain-4

Um eine Bindung zwischen Aurora-C und Calpain-4 bzw. TRF2 nachzuweisen, wurden *in vivo* Interaktionsstudien nach Überexpression der Proteine in 293T-Zellen durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und 48h später geerntet. Es wurden Zellextrakte hergestellt und Immunpräzipitationen über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend im Western-Blot untersucht.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte keine Interaktion zwischen Myc-TRF2-WT und HA-Aurora-C-K72R nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Interaktion zwischen Flag-Calpain-4 und HA-Aurora-C-K72R festgestellt werden.

Mittlerweile konnte jedoch die spezifische Interaktion zwischen Flag-Calpain-4 und HA-Aurora-C-WT von einem Kollegen in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung O. Cizmecioglu, DKFZ).

5.4.4 Phosphorylierung von TRF2 durch die Kinase Aurora-C *in vitro*

Durch *in vitro* Kinasereaktionen sollte überprüft werden, ob TRF2 und Calpain-4 potentielle Substrate der Kinase Aurora-C sind. Für die Kinasereaktionen wurden die aktive Kinase His₆-Aurora-C-WT und die inaktive Kinase His₆-Aurora-C-K72R (Negativkontrolle) verwendet. Die potentiellen Substrate Myc-TRF2-WT und Flag-Calpain-4 wurden aus den Zellextrakten transient transfizierter 293T-Zellen immunpräzipitiert. Die Aktivität der Kinasen wurde außerdem in Kinasereaktionen ohne und mit exogenem Substrat (Mix aus Histonen) überprüft (Crosio et al., 2002).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen wird Myc-TRF2-WT von His₆-Aurora-C-WT phosphoryliert, aber nicht von dem Kinase-inaktiven His₆-Aurora-C-K72R (Abb.17A, Spur:1, 2). Die Negativkontrolle ohne Aurora-C zeigt ein schwach phosphoryliertes Myc-TRF2-WT. Vermutlich wurde bei der Immunpräzipitation von Myc-TRF2-WT eine unspezifische Kinaseaktivität kopräzipitiert, die sich für die schwache Phosphorylierung verantwortlich zeigt (Abb.17A, Spur 3). Die Coomassie-Färbung zeigt, dass vergleichbare Mengen an Kinase und Substrat für die Reaktionen eingesetzt wurden (Abb.17B, Spur:1, 2, 3).

His₆-Aurora-C-WT kann Flag-Calpain-4 unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht phosphorylieren (Abb.17A, Spur 4). Die Coomassie-Färbung zeigt, dass Flag-Calpain-4 immunpräzipitiert werden konnte und im Reaktionsansatz vorhanden war (Abb.17B, Spur:4, 5, 6).

Möglicherweise sind dadurch entsprechend mehr Verunreinigungen in die Reaktionsansätze gelangt.

Durch Kinasereaktionen konnte gezeigt werden, dass die Kinase Aurora-C das Substrat TRF2 *in vitro* phosphorylieren kann. Aurora-C kann unter den gewählten Versuchsbedingungen aber nicht Calpain-4 phosphorylieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Kopplung von Flag-Calpain-4 an Protein-G ein sterisches Problem entsteht und dadurch eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Kinase verloren geht.

5.4.5 Die Aminosäure TRF2-T358 ist eine *in vitro* Phosphorylierungsstelle der Kinase Aurora-C

Das folgende Experiment diente der Identifizierung von Aurora-C-Phosphorylierungsstellen in TRF2. Für die Kinasereaktionen wurden die aktive Kinase His₆-Aurora-C-WT und die inaktive Kinase His₆-Aurora-C-K72R (Negativkontrolle) verwendet. Als Substrate wurden Myc-TRF2-Derivate aus den Zellextrakten transient transfizierter 293T-Zellen immunpräzipitiert. Es wurden zwei Substrate getestet, in denen jeweils eine potentielle Phosphorylierungsstelle bzw. Aminosäure (Threonin) gegen eine nicht phosphorylierbare Aminosäure (Alanin) ausgetauscht wurde. Die potentielle Phosphorylierungsstelle T358 liegt in der RAP1-Bindedomäne von TRF2 und entspricht einer Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle. RAP1 ist ein Telomerbindeprotein, das an TRF2 bindet und an der Regulation der Telomerlänge beteiligt ist (Abb.18A, B; Li et al., 2000; Li & de Lange, 2003; O'Connor et al., 2004). Die zweite potentielle Phosphorylierungsstelle T450 liegt in der DNA-Bindedomäne (Myb-Domäne) von TRF2 und entspricht keiner Ipl1/Aurora-B-Konsensusstelle (Abb.18A, B).

Myc-TRF2-WT, -T358A und -T450A werden von His₆-Aurora-C-WT phosphoryliert (Abb. 18C1, Spur: 1, 4, 7). Das Signal von Myc-TRF2-T358A ist schwächer als das Signal von Myc-TRF2-WT bzw. -T450A. Die Quantifizierung der Signale ergab, dass das Signal von Myc-TRF2-T358A 50% schwächer ist als das Signal von Myc-TRF2-WT bzw. -T450A (Abb. 18D). Myc-TRF2-WT, -T358A und -T450A werden nicht von dem inaktiven His₆-Aurora-C-K72R phosphoryliert (Abb.18C1, Spur: 2, 5, 8). Die Coomassie-Färbung zeigt, dass vergleichbare Mengen an Kinase und Substrat für die Reaktionen eingesetzt wurden (Abb.18C2). Negativkontrollen ohne Kinase beweisen, dass keine unspezifische Kinaseaktivität kopräzipitiert wurde (Abb.18C1, Spur: 3, 6, 9).

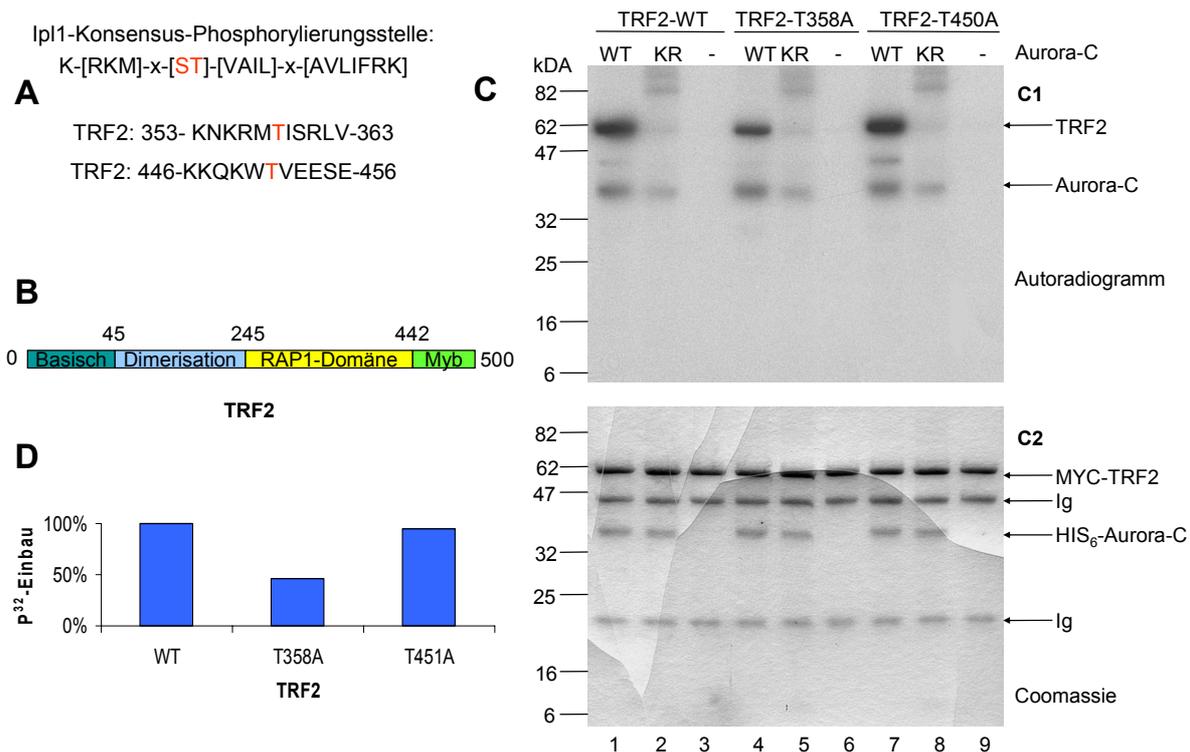


Abb.18: Die Aminosäure TRF2-T358 ist eine *in vitro* Phosphorylierungsstelle der Kinase Aurora-C.

(A) Zwei potentielle Aurora-C-Phosphorylierungsstellen in TRF2 (rot) wurden untersucht: TRF2-T358 ist eine Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle; TRF2-T450 ist keine Ipl1/Aurora-B-Phosphorylierungsstelle.

(B) Struktur des humanen TRF2: basische Domäne (1-45As), Dimerisationsdomäne (45-245As), RAP1-Bindedomäne (245-442As), Myb-Domäne (442-500As).

(C) TRF2-T358 ist eine Phosphorylierungsstelle von Aurora-C: His₆-Aurora-C (WT, KR (K72R), -) wurde 30min bei 30°C im Kinasereaktionspuffer mit dem Substrat (Myc-TRF2-WT, -T358A, -T450A) und [γ -³²P]-ATP inkubiert. Der [³²P]-Einbau wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (C1). Der Nachweis des Substrates und der Kinase erfolgte durch Coomassie-Färbung (C2).

(D) Quantifizierung der radioaktiven Signale aus (C) durch Szintillations-Messung. (Angabe der [³²P]-Einbau bezogen auf TRF2-WT in %).

Bei den Kinasereaktionen mit His₆-Aurora-C-K72R können unspezifische Signale im hoch molekularen Bereich beobachtet werden, die bei den Reaktionen mit His₆-Aurora-C-WT nicht auftreten. Eine mögliche Erklärung ist, dass aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der Kinasen unterschiedliche Volumina verwendet werden mussten. Um vergleichbare Mengen an Kinase in den Reaktionsansätzen zu haben, musste ein achtmal größeres Volumen von Aurora-C-K72R im Vergleich zu Aurora-C-WT eingesetzt werden. Möglicherweise sind dadurch entsprechend mehr Verunreinigungen im Reaktionsansatz gelangt.

Durch Kinasereaktionen konnte nachgewiesen werden, dass TRF2-T358 eine *in vitro* Phosphorylierungsstelle von Aurora-C ist und dass vermutlich noch eine unbekannte zweite

Phosphorylierungsstelle existiert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass TRF2-T450A und TRF2-S360A (Ergebnis nicht gezeigt) vermutlich keine Phosphorylierungsstellen von Aurora-C sind.

5.4.6 TRF2 hat zwei *in vitro* Aurora-C-Phosphorylierungsstellen

Ein Kritikpunkt bei der Durchführung der *in vitro* Kinasereaktionen waren die großen Mengen Kinase, die pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden (5 µg Kinase pro Reaktion in 5.4.4 und 5.4.5). Möglicherweise phosphoryliert His₆-Aurora-C-WT unter diesen Bedingungen TRF2 unspezifisch. Um nachzuweisen, dass TRF2 spezifisch phosphoryliert wird und T358 eine von zwei Aurora-C-Phosphorylierungsstellen in TRF2 ist, wurden Reaktionskinetiken aufgenommen. Es wurde der [³²P]-Einbau in die Substrate Myc-TRF2-WT und -T358A in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen und bei spezifischer Phosphorylierung von TRF2 durch Aurora-C-WT sollte im Idealfall der [³²P]-Einbau in Myc-TRF2-WT (zwei Phosphorylierungsstellen) im linearen Reaktionsbereich doppelt so schnell erfolgen als in Myc-TRF2-T358A (eine Phosphorylierungsstelle). Für die Kinasereaktionen wurde weniger Kinase (His₆-Aurora-C-WT) pro Reaktionsansatz eingesetzt als in früheren Experimenten (0.2 µg).

Das Autoradiogramm zeigt, dass Myc-TRF2-WT zu den entsprechenden Zeitpunkten jeweils stärker phosphoryliert wird als Myc-TRF2-T358A (Abb.19A). Die Quantifizierung der Signale ergab, dass der [³²P]-Einbau in Myc-TRF2-WT rund doppelt so schnell erfolgt als in Myc-TRF2-T358A (Abb.19C).

Die Coomassie-Färbung zeigt, dass vergleichbare Mengen an Substrat für die Reaktionen eingesetzt wurden (Abb.19B). Es kann keine unspezifische Kinaseaktivität durch die Immunpräzipitation von Myc-TRF2-WT festgestellt werden (Abb.19A, Spur11). His₆-Aurora-C-WT wurde durch einen Western-Blot nachgewiesen und lag in vergleichbaren Mengen in den Reaktionsansätzen vor (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Reaktionskinetiken zeigen, dass das Substrat TRF2 *in vitro* spezifisch von der Kinase His₆-Aurora-C-WT phosphoryliert wird und dass neben T358 noch eine zweite unbekannte Phosphorylierungsstelle existiert.

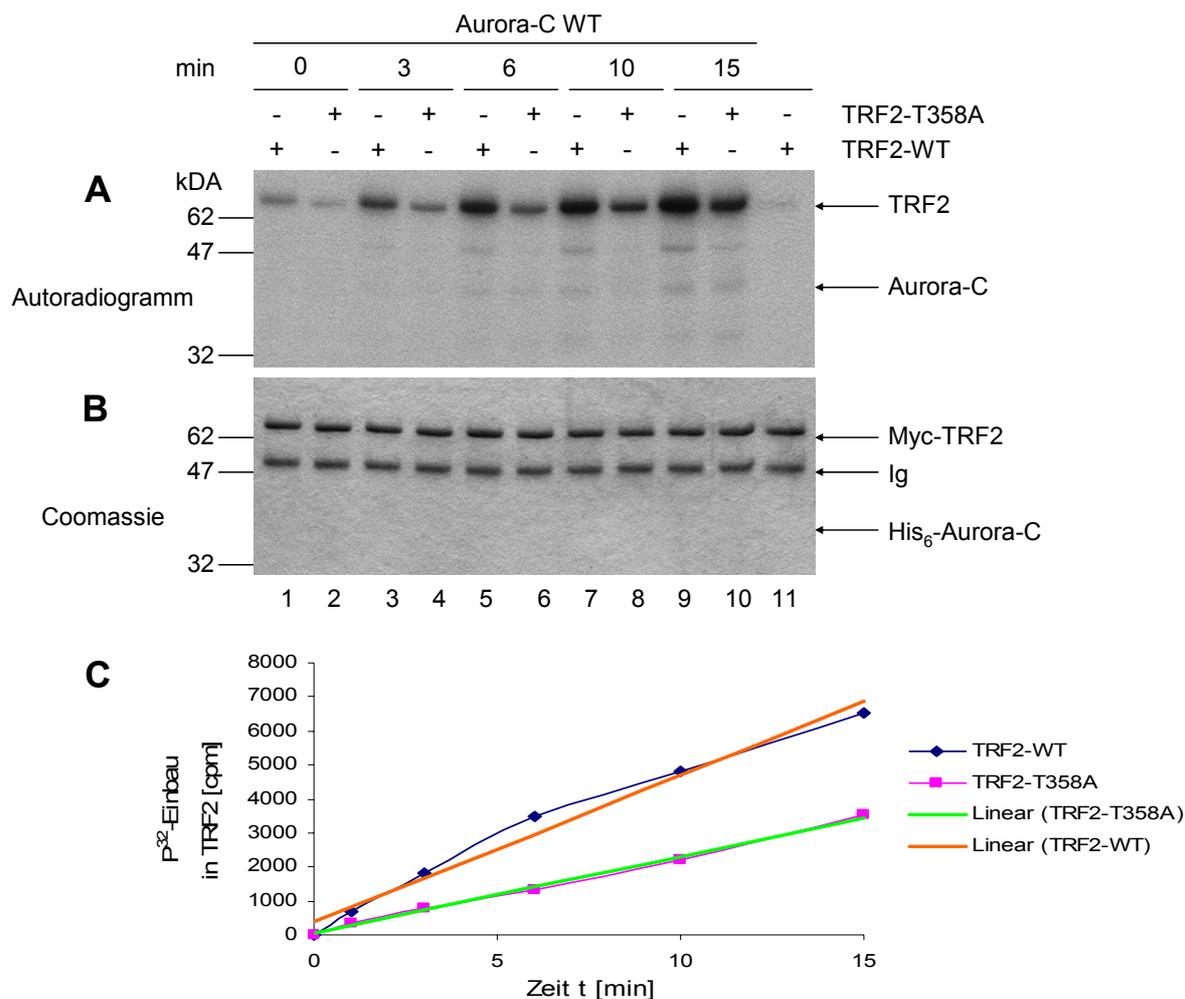


Abb.19: TRF2 hat zwei *in vitro* Aurora-C-Phosphorylierungsstellen.

His₆-Aurora-C (WT; -) wurde 0, 3, 6, 10 oder 15min bei 30°C in Kinasereaktionspuffer mit dem Substrat (Myc-TRF2-WT, -T358A) und [γ -³²P]-ATP inkubiert. Der [³²P]-Einbau wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (A). Der Nachweis des Substrates erfolgte durch Coomassie-Färbung (B). Der Nachweis von His₆-Aurora-C erfolgte im Western-Blot mit α -His₆-Antikörper und α -Aurora-C-Antikörper (Ergebnis nicht gezeigt). Quantifizierung der radioaktiven Signale aus (A) durch Szintillations-Messung (Angabe des [³²P]-Einbaus in counts per minute [cpm]) und graphische Darstellung des [³²P]-Einbaus (C) in Abhängigkeit von der Zeit [t].

5.4.7 Mikroskopische Untersuchung von TRF2 und Aurora-C

Mikroskopisch wurde in den folgenden Experimenten eine mögliche Interaktion von Aurora-C und TRF2 untersucht. In einem Experiment wurde die Telomerlokalisierung des endogenen TRF2 nach Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate mikroskopisch überprüft. In einem weiteren Experiment wurden die Auswirkungen der Überexpression verschiedener TRF2-Derivate auf die Zellen mikroskopisch untersucht. Die Experimente wurden mit U2OS-

Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen lassen sich in U2OS-Zellen die Telomeren relativ gut beobachten. U2OS-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und 24h bzw. 48h nach der Transfektion fixiert. Die Zellen wurden mit α -TRF2-, α -HA- oder α -Myc-Antikörper gefärbt und mikroskopisch analysiert.

Alle getesteten Myc-TRF2-Derivate (WT, T358A, T358D) konnten in schwach überexprimierenden Zellen an den Telomeren nachgewiesen werden. Bei starker Überexpression der Myc-TRF2-Derivate war es nicht mehr möglich die Telomeren zu beobachten. Es kann deshalb keine Aussage über die Lokalisation der Myc-TRF2-Derivate in stark überproduzierenden Zellen gemacht werden. Allerdings konnte in stark überproduzierenden Zellen unabhängig vom Myc-TRF2-Derivat die Ausbildung von Chromatinbrücken zwischen den Zellkernen beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die beobachteten Effekte waren unabhängig vom überexprimierten TRF2-Derivat und lassen sich vermutlich ausschließlich auf die Dosis der überexprimierten Proteine zurückführen.

Chromatinbrücken entstehen durch eine unerwünschte Fusion von zwei Chromosomen an den Enden bzw. Telomeren. Nach der Trennung der Schwesterchromatiden und der Dekondensation der Chromosomen verbinden die Chromatinbrücken die zwei entstandenen Zellkerne. Chromatinbrücken lassen sich charakteristischerweise in Zellen beobachten, die eine TRF2-Mutante ohne basische Domäne produzieren. TRF2-Mutanten ohne basische Domäne können zwar an die Telomeren binden, aber die Telomeren haben die Fähigkeit verloren die T-Loop-Struktur auszubilden. Diese Struktur schützt die Telomeren und ist essentiell für die Stabilität und Integrität von Chromosomen (van Steensel et al., 1998).

Über die Auswirkungen der Überexpression verschiedener HA-Aurora-C-Derivate (WT, K72R, T191D) auf die Lokalisation des endogenen TRF2 an den Telomeren in U2OS-Zellen kann keine Aussage gemacht werden. Aufgrund der starken Überexpression von HA-Aurora-C-WT, -K72R oder T191D konnte das endogene TRF2-Protein nicht beobachtet werden.

5.4.8 Mikroskopische Untersuchung von Calpain-4 und Aurora-C

In dem folgenden Experiment wurde die Kollokalisation von Calpain-4 und Aurora-C nach Überexpression beider Proteine mikroskopisch untersucht. HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und 24h bzw. 48h nach der Transfektion fixiert. Die Zellen wurde mit α -Flag- und α -HA-Antikörper gefärbt und die Präparate mit einem Konfokalmikroskop und Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

Die Kolokalisation von Flag-Calpain-4 und HA-Aurora-C konnte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Calpain-4 und Aurora-C kolokalisierten im Cytoplasma, an der postmitotischen Brücke bzw. am Mittelkörper und am Zellrand (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Lokalisation von Calpain-Proteasen bzw. Calpain-4 in den Fokal-Komplexen an der Zellmembran ist gut beschrieben (Rosenberger et al., 2005; Wells et al., 2005; Franco & Huttenlocher, 2005). Die Beteiligung von Calpain-Proteasen an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -mobilität in Epithelzellen ist seit Jahren etabliert (Glading et al., 2002; Carragher & Frame, 2002; Carragher & Frame, 2004; Wells et al., 2005; Franco & Huttenlocher, 2005; McLean et al., 2005).

6.0 Diskussion

6.1 Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern

Für den Nachweis des endogenen Proteins Aurora-C auf zellulärer Ebene wurden kommerzielle und nicht-kommerzielle Antikörper getestet. Mit keinem der getesteten Antikörper konnte das endogene Aurora-C in der Immunfärbung und im Western-Blot unter Standardbedingungen in HeLa-Zellen bzw. einem HeLa-Zellextrakt nachgewiesen werden. Allerdings konnte das überexprimierte HA-Aurora-C mit fast allen getesteten Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen werden.

Aufgrund der fehlenden Nachweismöglichkeiten war es im Rahmen dieser Arbeit kaum möglich die Funktion des endogenen Aurora-C auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Die Schwierigkeiten beim Nachweis von endogenem Aurora-C mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern ist ein bekanntes Problem (Giet et al., 2005; Tang et al., 2006). Die bisher publizierten Daten basieren daher überwiegend auf der Überexpression des Proteins (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005).

Ein Grund für die Schwierigkeiten beim Nachweis des Proteins ist vermutlich dessen geringe intrazelluläre Konzentration, die sich möglicherweise an der Nachweisgrenze bewegt. Der problemlose Nachweis des überexprimierten Proteins im Western-Blot ist allerdings Beleg dafür, dass die Qualität der eingesetzten Antikörper ausreichend gut ist.

Im Gegensatz zum Nachweis von Aurora-C im Western-Blot wurde der Nachweis des Proteins in der Immunfluoreszenz nicht so intensiv untersucht. Die verwendeten Antikörper sollten daher in einer weiteren Studie nochmals intensiv dahingehend getestet werden.

Aufgrund der Nachweisproblematik auf Proteinebene wurde versucht Aurora-C auf mRNA-Ebene durch quantitative RT-PCR nachzuweisen. Hierzu finden sich einige Hinweise in verschiedenen Publikationen (Sasai et al., 2004; Yan et al., 2005a; Ulisse et al., 2006). Der Nachweis konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden.

6.2 Untersuchung verschiedener Aurora-C-Derivate nach transienter Überexpression

6.2.1 Proteinchemische Untersuchung der Aurora-C-Derivate

Die proteinchemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Mutanten Aurora-C-K72R, -T198D und -T202D keine Kinaseaktivität *in vitro* aufweisen. Die Aurora-C-Derivate Aurora-C-WT und -T191D weisen hingegen Kinaseaktivität auf. Die Mutante Aurora-C-T191D ist im Vergleich zu Aurora-C-WT hyperaktiv (Abb.6C).

Weiter konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte Protein Aurora-C-T191D als Doppelbande im Western-Blot nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu Aurora-C-T191D können die überexprimierten Proteine Aurora-C-WT, -K72R, -T198D und -T202D nur als Einzelbande im Western-Blot detektiert werden (Abb.6B). Aurora-C-T191D kann in stöchiometrischen Mengen in zwei Formen unterschiedlichen Molekulargewichts nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich bei dem höher molekularen Typen um eine modifizierte Form von Aurora-C-T191D, die gegenüber der niedermolekularen Form eine zusätzliche posttranslationale Modifikation aufweist. Die modifizierte Form von Aurora-C-T191D kann in Nocodazol-behandelten und -unbehandelten Zellen beobachtet werden. Vermutlich handelt es sich bei der Modifikation um eine Phosphorylierung. Der letztlich erforderliche Nachweis einer Phosphorylierung durch eine Phosphatase-Behandlung wurde hier nicht geführt. Zudem sind die physiologischen Auswirkungen der Modifikation unbekannt.

Die Ergebnisse der proteinchemischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Aminosäure Aurora-C-T191 *in vivo* vermutlich an der Aktivierung und Regulation von Aurora-C entscheidend beteiligt ist. Der Aminosäureaustausch von Threonin (T) gegen Asparaginsäure (D) an der potentiellen Aktivierungsstelle Aurora-C-T191 verursacht vermutlich eine Pseudophosphorylierung des Proteins und stimuliert die Kinaseaktivität der Mutante Aurora-C-T191D positiv. Die Aminosäure Asparaginsäure imitiert so wahrscheinlich eine phosphorylierte Threonin-Aminosäure. Die Pseudophosphorylierung stimuliert aber nicht nur die Kinaseaktivität von Aurora-C-T191D, sondern verursacht auch eine posttranslationale Modifikation des Proteins, deren Auswirkungen unbekannt sind.

Aurora-C-T191 ist eine Aurora-C-spezifische Aminosäure. Trotz der hohen Sequenzhomologie der humanen Aurora-Kinasen unterscheidet sich Aurora-C von Aurora-A und -B an der entsprechenden Position im Aktivierungsmotif. Anstelle der phosphorylierbaren Aminosäure Threonin befindet sich an den entsprechenden Positionen im Aktivierungsmotif von Aurora-A und -B die nicht-phosphorylierbare Aminosäure Alanin. Diese neutralen Aminosäuren sind vermutlich bedeutungslos für die Regulation von Aurora-A bzw. -B.

Mit den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Aurora-C-T198 und -T202 die Kinaseaktivität von Aurora-C negativ beeinflussen. Die Pseudophosphorylierung der Aminosäuren Aurora-C-T198 oder -T202 durch den Aminosäureaustausch von Threonin (T) gegen Asparaginsäure (D) inhibiert die Kinaseaktivität von Aurora-C-T198D bzw. -T202D. Die Aminosäuren Aurora-C-T198 und -T202 sind konservierte Aminosäuren und finden sich in den Aktivierungsmotifen von Aurora-A und -B wieder. Die Aminosäure Aurora-C-T198 entspricht den Aminosäuren Aurora-A-T288 und Aurora-B-T232. Die Phosphorylierung der Aminosäuren Aurora-A-T288 und Aurora-B-T232 sind essentiell für die Auto-Aktivierung von Aurora-A und -B (Hirota et al., 2003; Yasui et al., 2004). Im Gegensatz zu der Kinase-inaktiven Mutante Aurora-C-T198D ist die entsprechende Mutante Aurora-A-T288D konstitutiv aktiv (Kelm et al., 2002; Katayama et al., 2004).

Über die Funktion der konservierten Aminosäure Aurora-A-T292 und -B-T236, die der Aminosäure Aurora-C-T202 entsprechen, ist nichts bekannt. Untersuchungen mit mAurora-C (Aurora-C-Protein in der Maus) haben gezeigt, dass die Mutanten T171A und T175A (würde Aurora-C-T198A bzw. -T202A entsprechen) eine erhöhte Kinaseaktivität *in vitro* im Vergleich zu mAurora-C-WT aufweisen. Die Doppelmutante mAurora-C-T171A/T175A zeigt keine Kinaseaktivität (Chen & Tang, 2002). Diese Ergebnisse deuten ebenso darauf hin, dass die Phosphorylierung der konservierten Aminosäuren Aurora-C-T198 und -T202 negative Auswirkungen auf die Kinaseaktivität von Aurora-C haben.

Ein Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit publizierten Daten lässt darauf schließen, dass sich die humanen Aurora-Kinasen in ihrer Aktivierung unterscheiden. Die Kinasen Aurora-A und -B werden durch Auto-Phosphorylierung einer konservierten Threonin-Aminosäure im Aktivierungsmotif angeschaltet (Hirota et al., 2003; Yasui et al., 2004). Die Phosphorylierung der entsprechenden Aminosäure im Aktivierungsmotif von Aurora-C scheint hingegen die Kinase zu inhibieren. Für die Aktivierung von Aurora-C scheint die Phosphorylierung einer nicht-konservierten Threonin-Aminosäure (Aurora-C-T191) essentiell zu sein. Möglicherweise ist Aurora-C unter physiologischen Bedingungen aktiv, unter denen Aurora-A und -B inaktiv sind und umgekehrt.

Die Pseudophosphorylierung von Proteinen durch einen Aminosäureaustausch von Threonin gegen eine saure Aminosäure (z.B. Asparaginsäure) ist ein Ansatz, der nicht sehr häufig für Untersuchungen gewählt wird. Es ist nicht möglich vorherzusehen, wie sich ein Aminosäureaustausch von Threonin gegen Asparaginsäure auf die Konformation eines Proteins auswirkt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Aurora-C-Derivate scheinen jedoch eine Pseudophosphorylierung aufzuweisen. Die Beobachtungen und Ergebnisse sind im Einklang mit

den bereits publizierten Daten (Chen & Tang, 2002; Kelm et al., 2002; Hirota et al., 2003; Katayama et al., 2004; Yasui et al., 2004).

6.2.2 Untersuchung der Aurora-C-Derivate in der Mitose bzw. Cytokinese

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Überexpression von Kinase-inaktiven Aurora-C-Derivaten (K72R, T198D, T202D) Cytokinesedefekte in HeLa-Zellen verursacht, die sich in einer Akkumulation von multiplen Zellkernen äußert. Im Gegensatz zur Überexpression der Kinase-inaktiven Aurora-C-Derivate konnten bei der Überexpression von Kinase-aktiven Aurora-C-Derivaten (WT, T191D) keine Auswirkungen auf die Mitose bzw. Cytokinese festgestellt werden (Abb.7).

Cytokinesedefekte sind bereits für die Überexpression von Kinase-inaktiven Aurora-C- und Aurora-B-Derivaten beschrieben worden (Honda et al., 2003; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005; Giet et al., 2005). Diese Defekte verhindern die cytoplasmatische Teilung bzw. Trennung von Zellen. Als Folge verlassen ungeteilte tetraploide Zellen die Mitose und treten in die nachfolgende G1-Phase ein. Normalerweise aktivieren tetraploide Zellen den postmitotischen G1-Kontrollpunkt in Abhängigkeit des Tumor-Suppressor-Proteins p53. Die Aktivierung des Kontrollpunkts führt zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und dem Zelltod. In HeLa-Zellen, die kein funktionsfähiges p53-Protein exprimieren, wird der Zellzyklusarrest und der Zelltod nicht aktiviert. Die tetraploiden HeLa-Zellen entkommen dem Zellzyklusarrest, setzen ihren Zellzyklus fort und akkumulieren auf diese Art multiple Zellkerne (Margolis et al., 2003; Andreassen et al., 2003; Storchova & Pellman, 2004; Giet et al., 2005).

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Aurora-C-Derivate konnten während der Cytokinese an der postmitotischen Brücke nachgewiesen werden. Eine Aussage über das Lokalisationsprofil der Aurora-C-Derivate in der Mitose kann nicht gemacht werden. Mitotische Zellen, die Aurora-C überexprimierten, waren bei den mikroskopischen Untersuchungen unterrepräsentiert. In einer ganzen Reihe von Studien wurde gezeigt, dass das überexprimierte Aurora-C in der Mitose dasselbe Lokalisationsprofil aufweist wie ein „Chromosomal-Passenger-Protein“ bzw. das endogene Aurora-B (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Yan et al., 2005a; Dutertre et al., 2005).

6.2.3 Untersuchung der Aurora-C-Derivate in der Interphase

Ein wesentliches Teilergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass eine Überexpression von Aurora-C-T191D, nicht aber die von Aurora-C-WT und -K72R, Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen hat (Abb.8; 9). HeLa-Zellen, die Aurora-C-T191D überexprimieren, verlieren den cytoplasmatischen Raum und reichern das überexprimierte Protein in großen Mengen im Zellkern an (T191D-Phänotyp). Im Extremfall sind die Zellen bis auf den Zellkern reduziert und haben den cytoplasmatischen Raum fast vollständig verloren. Der T191D-Phänotyp kann in zwei Ausprägungen beobachtet werden. Einmal haben die Zellen, ausgehend von dem verbleibenden, schmalen cytoplasmatischen Raum, lange cytoplasmatische Ausläufer gebildet, die bei dem zweiten Typen vollständig fehlen (Abb.9).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Zellbewegungen untersucht wurden. Zellbewegungen sind in der Regel durch dynamische Veränderungen der Zellmorphologie und -adhäsion gekennzeichnet (Glading et al., 2002; Carragher & Frame, 2004; McLean et al., 2005; Franco & Huttenlocher, 2005). Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit müssen daher die beobachteten morphologischen Veränderungen dynamischen Vorgängen zugeordnet werden.

Die Überexpression von Aurora-C-T191D hat keine Auswirkungen auf die Mitose bzw. Cytokinese (6.2.2). Der Einfluss der Überexpression auf den Zellzyklus wurde hier nicht untersucht. Jedoch zeigen rund 90% der transfizierten Zellen 48h nach Beginn der Überexpression den T191D-Phänotyp in einer der beiden Ausprägungsformen (mit und ohne cytoplasmatische Ausläufer) (Abb.9C). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen aufgrund ihrer geringen Größe nicht in der Lage sind sich zu teilen. In der Regel sind die Zellteilung und das Wachstum gekoppelt, wobei die Zellen eine kritische Größe bzw. Masse aufweisen müssen, um den Restriktionspunkt in der G1-Phase zu überschreiten (Malumbres & Barbacid, 2001).

Im Rahmen dieser hier vorgestellten Untersuchungen fanden sich noch weitere Beobachtungen, die auf eine Beteiligung von Aurora-C an dynamischen Veränderungen der Zellmorphologie hindeuten. Unabhängig von der Kinaseaktivität kann das überexprimierte Aurora-C-WT und -K72R spezifisch an der Zellmembran lokalisieren (Abb.10). In Zellen, die Aurora-C-T191D schwach überexprimieren und deshalb noch keine morphologischen Veränderungen aufweisen, lokalisiert das Protein entweder spezifisch an der Zellmembran oder im Zellkern (vermutlich innere Kernmembran) (Abb.11). In Zellen, die bereits morphologische Veränderungen aufweisen, kann aufgrund der starken Überexpression keine Aussage über die Lokalisation des Proteins gemacht werden

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Kollokalisierung von Aurora-C und Calpain-4 an der Zellmembran nachgewiesen werden. Calpain-Proteasen bzw. Calpain-4 sind Komponenten der so genannten Fokal-Komplexe (focal adhesion; focal complex), die an der Zellmembran lokalisiert sind (Rosenberger et al., 2005; Franco & Huttenlocher, 2005). Veränderung der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit sind gekennzeichnet durch den koordinierten Abbau bzw. der Bildung dieser Protein-Komplexe (Glading et al., 2002; Carragher & Frame, 2004; McLean et al., 2005; Franco & Huttenlocher, 2005). Die proteolytische Aktivität der Calpain-Proteasen ist entscheidend an der Regulation dieser Prozesse beteiligt. Aufgrund der beobachteten Kollokalisierung mit Calpain-4 wurde überprüft, ob Aurora-C möglicherweise ein Baustein der Fokal-Komplexe ist. Um eine Lokalisation von Aurora-C in den Komplexen nachzuweisen, wurden Koimmunfärbungen mit dem überexprimierten Aurora-C-WT und dem Marker Zyxin durchgeführt (Bhatt et al., 2002). Die Immunfärbungen blieben aufgrund von Problemen mit dem Zyxin-Antikörper ergebnislos.

Die Beteiligung von Aurora-C an der Regulation der Zellmorphologie wird durch eine Reihe weiterer unabhängiger Ergebnisse gestützt, die an anderen Stellen in der Diskussion aufgegriffen werden (RNAi-Experimente; Two-Hybrid-Screen). In der Vielzahl der Studien zu den Aurora-Kinasen ist mit Ausnahme einer einzigen Publikation kein Zusammenhang zwischen der Regulation der Zellmorphologie und den Kinasen beschrieben worden. In MDCK-Zellen (Madin-Derby canine kidney cells) konnte gezeigt werden, dass humanes Aurora-A an der Regulation von Zellbewegungen beteiligt ist (Wu et al., 2005). Diese Funktion von Aurora-A ist allerdings Aurora-A-spezifisch und scheint unabhängig von den Kinasen Aurora-B und -C zu sein. Zudem ist in den unterschiedlichen Studien keine Lokalisation der Aurora-Kinasen an der Zellmembran beschrieben worden (Giet et al., 2005).

Die bisher publizierten Untersuchungen zu Aurora-C haben gezeigt, dass das überexprimierte Protein in der Interphase eine schwache Affinität zum Centrosom aufweist und in einigen, wenigen Zellen während der Interphase an das Centrosom bindet. HeLa-Zellen, die Aurora-C am Centrosom gebunden haben, sind oftmals polyploid und haben eine abnorme Centrosomenzahl (Dutertre et al., 2005). In den Überexpressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Beobachtung ebenfalls gemacht werden. Allerdings wurde der Beobachtung nicht viel Beachtung geschenkt, weil es nur sehr wenige Zellen betraf und im Vergleich zu den anderen Beobachtungen nicht signifikant erschien.

Die bisher publizierten Untersuchungen, die basierend auf der Überexpression von Aurora-C gemacht wurden, zeigen, dass die Funktionen des überexprimierten Aurora-C und des endogenen Aurora-B bzw. Aurora-A überlappend sind. Das überexprimierte Aurora-C verhält sich

während der Mitose wie das endogene Aurora-B. Während sich das überexprimierte Protein in der Interphase ähnlich dem endogenen Aurora-A verhält und mit schwacher Affinität an das Centrosom bindet (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004; Dutertre et al., 2005). Die bisher publizierten Daten beziehen sich dabei ausschließlich auf die Überexpression von Aurora-C-WT und dem Kinase-inaktiven Aurora-C-K72R. Mit der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D wurde im Rahmen dieser Arbeit ein nützliches Werkzeug für die Untersuchung des Proteins geschaffen. Die Ergebnisse, die basierend auf der Überexpression der Mutante gewonnen wurden, deuten an, dass Aurora-C mehr ist als ein weiteres „Chromosomal-Passenger-Protein“ und sich vermutlich sehr wohl von Aurora-A und insbesondere Aurora-B in der Funktion und in der Art der Aktivierung unterscheidet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Überexpression der hyperaktiven Mutante ähnlich der Überexpression von Kinasen-inaktiven Aurora-C-Derivaten Auswirkungen auf die Funktion des endogenen Aurora-A bzw. -B hat. Allerdings weisen die vorläufigen RNAi-Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, darauf hin, dass die morphologischen Veränderungen der Zellen, verursacht durch die Überexpression des hyperaktiven Aurora-C-T191D, höchst wahrscheinlich ein Aurora-C-spezifischer Effekt ist.

6.3 RNAi-Experimente

Ein großes Problem bei den Überexpressionsstudien mit Aurora-C ist die hohe Sequenzhomologie von Aurora-C zu Aurora-A und -B. Möglicherweise sind die Effekte, die durch die Überexpression von Aurora-C hervorgerufen werden, ausschließlich artifiziell und auf eine Störung der Funktion von Aurora-A und -B zurückzuführen. RNAi-Experimente mit shRNAs gegen Aurora-C bieten eine Möglichkeit Aurora-C *in vivo* selektiv zu untersuchen, ohne die Funktion von Aurora-A und -B zu beeinträchtigen.

Wie bereits beschrieben, gelang es nicht die Abnahme des endogenen Aurora-C direkt auf Proteinebene im Western-Blot mit Aurora-C-spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde versucht eine Abnahme der Aurora-C-mRNA durch quantitative RT-PCR nachzuweisen. Allerdings konnten diese Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten shRNAs gegen Aurora-C, die endogene mRNA-Menge von Aurora-C effektiv reduzieren können und keinen Einfluss auf die endogene mRNA-Menge von Aurora-B nehmen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die verwendeten shRNAs gegen Aurora-C die Proteinmenge des überexprimierten Aurora-C effektiv reduzieren können (Abb.12).

Wenn auch nur vorläufige Ergebnisse erzielt wurden, so scheinen die RNAi-Experimente eine Beteiligung von Aurora-C an der Regulation der Zellmorphologie zu belegen. HeLa-Zellen, die mit shRNAs gegen Aurora-C behandelt wurden, durchlaufen morphologische Veränderungen und verlieren den cytoplasmatischen Raum (Abb.13; 14). 80 - 90% der Zellen weisen 120h nach Beginn der Behandlung mit shRNAs nur noch einem kleinen cytoplasmatischen Raum auf. Die Zellen sind bis auf den Zellkern reduziert, und die Zell-Zelladhäsion ist fast vollständig aufgelöst. Im Gegensatz dazu weisen zu diesem Zeitpunkt nur 10 - 15% der Kontrollzellen, die mit unspezifischen shRNAs behandelt wurden, ähnliche morphologische Veränderungen auf.

Die morphologischen Veränderungen, die durch die Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C hervorgerufen werden, weisen Ähnlichkeiten zu den morphologischen Veränderungen auf, die durch die Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D verursacht werden. Wie kann die Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D und der Verlust des endogenen Proteins ähnliche morphologische Veränderungen verursachen? Eine wichtige Beobachtung, die bei der Untersuchung der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D gemacht wurde, ist die Anreicherung des überexprimierten Proteins im Zellkern, die gleichzeitig von einer Abnahme der Proteinmenge im Cytoplasma gekennzeichnet ist (Abb.8). Im Vergleich zur Überexpression von Aurora-C-T191D ist bei der Überexpression von Aurora-C-WT und -K72R keine Anreicherung der Proteine im Zellkern zu beobachten (Abb.8).

Möglicherweise verursacht die Abnahme von Aurora-C-T191D im Cytoplasma bzw. die Anreicherung von Aurora-C-T191D im Zellkern diese morphologischen Veränderungen. Die Behandlung der Zellen mit shRNAs gegen Aurora-C sollte eine Abnahme der Proteinmenge in der gesamten Zelle bewirken. In beiden Fällen kommt es zu einer Abnahme der Proteinmenge im Cytoplasma. Das Protein ist vermutlich nicht in ausreichender Menge im Cytoplasma vorhanden und kann deshalb seine regulatorischen Aufgaben dort auch nur eingeschränkt ausüben. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Anreicherung von Aurora-C-T191D im Zellkern und der posttranslationalen Modifikation von Aurora-C-T191D.

Die Untersuchung der Aurora-C-Derivate deutet außerdem darauf hin, dass die morphologischen Veränderungen möglicherweise unabhängig von der Aktivität der Kinase induziert werden. Weder die Überexpression der inaktiven Kinase Aurora-C-K72R, noch die Überexpression der aktiven Kinase Aurora-C-WT verursachen morphologische Veränderungen. Beide Proteine lokalisieren aber spezifisch an der Zellmembran, möglicherweise in den

Fokal-Komplexen. Die morphologischen Veränderungen, die durch die Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D verursacht werden, sind daher möglicherweise nicht auf die erhöhte Kinaseaktivität zurückzuführen, sondern auf andere Eigenschaften der Mutante (z.B. Lokalisation, Proteinstabilität). Es ist nicht ungewöhnlich, dass Kinasen bestimmte Funktionen unabhängig von der Kinaseaktivität vermitteln. Beispielsweise reguliert die „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) Zellbewegungen in Abhängigkeit der Kinaseaktivität. Das Protein ist aber auch in der Lage Zellbewegungen unabhängig von der enzymatischen Aktivität zu regulieren (McLean et al., 2005).

Die RNAi-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben außerdem gezeigt, dass Zellen, die mit shRNAs gegen Aurora-C behandelt wurden, den Zellzyklus innerhalb eines Zeitraums von 48 bis 62h nach Beginn der Behandlung schneller durchlaufen als die Kontrollzellen, die mit shRNAs gegen Luciferase behandelt wurden (Abb.15; 16). Über die Auswirkungen auf den Zellzyklus zu späteren Zeitpunkten kann keine Aussage gemacht werden. Allerdings konnte 120h nach Beginn der Behandlung mit shRNAs bei einigen wenigen Zellen Anzeichen von Apoptose (Fragmentierung der Zellkerne) beobachtet werden. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Zellen aufgrund ihrer geringen Größe 120h nach Beginn der Behandlung mit shRNAs nicht weiter teilen können.

In den bisher in der Literatur vorgestellten Untersuchungen zu den Aurora-Kinasen, die basierend auf der RNA-Interferenz durchgeführt wurden, sind keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie beschrieben worden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der endogenen mRNA-Menge des Aurora-C-Gens bzw. Aurora-B-Gens, verursacht durch RNA-Interferenz, eine Anreicherung von multiplen Zellkernen in den Zellen bewirkt (Li et al., 2004). Dieser Effekt ist allerdings nicht sehr ausgeprägt. Nur 13% der W138-Zellen (normal diploid lung fibroblast cells) weisen 48h nach Beginn der Behandlung mit siRNAs (small interfering RNA) gegen Aurora-C multiple Zellkerne auf. 5% der Kontrollzellen, die mit unspezifischen siRNAs behandelt wurden, weisen ebenfalls multiple Zellkerne zu diesem Zeitpunkt auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnten 48h nach Beginn der Behandlung mit shRNAs keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer Anreicherung von multiplen Zellkernen zwischen den Zellen, die mit shRNAs gegen Aurora-C behandelt wurden, und den Kontrollzellen, die mit unspezifischen shRNAs behandelt wurden, beobachtet werden. Aufgrund der morphologischen Veränderungen war es zu späteren Zeitpunkten nicht mehr möglich festzustellen, ob eine Zelle multiple Zellkerne aufweist. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass die Zellen, die mit shRNAs gegen Aurora-C behandelt wurden, in der Regel kleinere Zellkerne aufwiesen als die Kontrollzellen, die mit shRNAs gegen Luciferase

behandelt wurden. Diese Beobachtung wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die RNAi-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deuten auf eine spezifische Funktion von Aurora-C an der Regulation der Zellmorphologie hin, die unabhängig von den Kinasen Aurora-A und -B ist. Diese These wird durch weitere unabhängige Ergebnisse gestützt, die an anderer Stelle in der Diskussion aufgegriffen werden.

6.4 Two-Hybrid-Screen in der Hefe mit Aurora-C als Köder-Protein

Folgende Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit im Two-Hybrid-Screen als potentielle Interaktionspartner der Kinase Aurora-C identifiziert: TRF2, Epiplakin, Calpain-4, Tid1, RBM21, HSP60, Interleukin-15, L36 und BCA3.

Alle Klone wurden unter niedrig stringenten Bedingungen isoliert, was darauf hindeutet, dass die Interaktionen zwischen der Kinase Aurora-C und den identifizierten Proteinen in der Regel transient und schwach sind. Transiente, schwache Interaktionen sind charakteristisch für Proteinkinasen und deren Substrate. Insbesondere die Interaktionen zwischen den katalytischen Domänen von Proteinkinasen und den Substraten sind sehr schwach (Smith et al., 2001; Leveson et al., 2002). Da sich die Überexpression des Aurora-C-Proteins toxisch auf die Hefen auswirkt, wurde für den Two-Hybrid-Screen ein verkürztes Proteinfsegment von Aurora-C verwendet, das zu 80% aus einem Sequenzabschnitt der katalytischen Domäne bestand. Es ist daher keine Überraschung, dass die Interaktionen zwischen Aurora-C und den potentiellen Interaktionspartnern, bei denen es sich wohl überwiegend um potentielle Substrate handelt, relativ schwach sind.

Im Gegensatz zu Aurora-A und -B sind für Aurora-C noch keine physiologischen Interaktionspartner bzw. Substrate beschrieben worden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der humanen Aurora-Kinasen kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der identifizierten Proteine physiologische Interaktionspartner von Aurora-A oder -B sind. Allerdings ist bisher keines der identifizierten Proteine als physiologischer Interaktionspartner von Aurora-A oder -B beschrieben worden. Basierend auf den bisher publizierten Daten ist kein funktioneller Zusammenhang zwischen einer der Aurora-Kinasen und einem der isolierten Proteine ersichtlich (Giet et al., 2005).

Die Proteine Calpain-4, Epiplakin und Interleukin-15 weisen allerdings Eigenschaften auf, die hinsichtlich der morphologischen Veränderungen, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, von Bedeutung sein könnten. Alle drei Proteine sind an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit beteiligt (Jang et al., 2005; Rosenberger et al., 2005; Bulfone-Paus et al., 2006). Möglicherweise sind die morphologischen Veränderungen der

Zellen, die durch Aurora-C verursacht werden, auf eine Interaktion von Aurora-C mit einem oder mehreren dieser Proteine zurückzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von den drei genannten Proteinen allerdings nur das Protein Calpain-4 näher untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

Das Protein Epiplakin wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Nach der Identifikation des Proteins konnte zunächst kein Zusammenhang zwischen den Proteinen Aurora-C und Epiplakin erkannt werden. Mittlerweile jedoch wurde das Protein Epiplakin in einer Reihe von Publikationen näher charakterisiert (Jang et al., 2005; Spazierer et al., 2006; Goto et al., 2006). Die Ergebnisse zeigen, dass Epiplakin das Intermediär-Cytoskelett und die Zellbeweglichkeit von Epithelzellen reguliert (Jang et al., 2005; Spazierer et al., 2006; Goto et al., 2006).

Das Protein Epiplakin ist ein so genanntes Cytolinker-Protein und gehört zur Proteinfamilie der Plakine. Cytolinker-Proteine verankern das Cytoskelett-Netzwerk an der Zellmembran (Leung et al., 2001; Leung et al., 2002). Epiplakin lokalisiert in einfachen Epithelzellen mit hoher Affinität an das Keratin- und mit schwacher Affinität an das Vimentin-Cytoskelett (Jang et al., 2005). Keratin und Vimentin sind Bausteine des Intermediär-Cytoskeletts bzw. der Intermediär-Filamente (Helfand et al., 2004). RNAi-Experimente haben gezeigt, dass der Verlust des Epiplakin-Proteins in Epithelzellen die Zerstörung des Keratin- und Vimentin-Cytoskeletts verursacht (Jang et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das überexprimierte Aurora-C-WT ebenfalls an das Vimentin-Cytoskelett lokalisiert (Ergebnis nicht gezeigt). Die Lokalisation von Aurora-C an das Keratin-Cytoskelett wurde allerdings nicht untersucht. Möglicherweise sind die morphologischen Veränderungen, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, auf eine Veränderung des Intermediär-Cytoskeletts zurückzuführen.

Eine weitere interessante Eigenschaft des Proteins Epiplakin ist die Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR). Epiplakin bindet spezifisch an den aktivierten EGF-Rezeptor (Blagoev et al., 2003). Die Stimulation des EGF-Rezeptors führt unter anderem auch zur Aktivierung der Calpain-Proteasen. Diese wiederum regulieren die Beweglichkeit von Epithelzellen durch spezifische proteolytische Spaltung von Proteinen (Jost et al., 2000; Carragher & Frame, 2002; Frame et al., 2002; McLean et al., 2005). Möglicherweise sind Aurora-C, Epiplakin und Calpain-4 gemeinsam an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit von Epithelzellen beteiligt.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der für eine Untersuchung der potentiellen Interaktion spricht, ist die Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle, die sich in der Proteinsequenz von Epiplakin finden lässt (Cheeseman et al., 2002; Meraldi et al., 2004). Epiplakin ist möglicherweise ein physiologisches Substrat der Kinase Aurora-C.

Das Cytokin Interleukin-15 ist ein weiteres Protein, das im Rahmen dieser Arbeit im Two-Hybrid-Screen isoliert wurde und an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt ist (Bulfone-Paus et al., 2006). Von der weiteren Untersuchung des Proteins Interleukin-15 im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings abgesehen. Interleukin-15 bindet als Ligand an den Interleukin-15-Rezeptor und reguliert unter anderem die Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit. Die Stimulation des Interleukin-15-Rezeptors durch den Liganden Interleukin-15 führt zur Aktivierung der Calpain-Proteasen. Der Interleukin-15-Rezeptor nutzt dabei dieselben Signalwege (MAP-Kinasesignalweg) für die Signal-Transduktion wie der EGF-Rezeptor (Bulfone-Paus et al., 2006).

Außer Calpain-4 wurde im Rahmen dieser Arbeit noch das Telomerbindeprotein TRF2 näher untersucht, das aufgrund seiner wichtigen physiologischen Funktionen das Auffälligste der isolierten Proteine ist (de Lange, 2005; Blasco, 2005). Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in Kapitel 6.3.2 diskutiert.

6.4.1 Untersuchung der Interaktion zwischen Aurora-C und Calpain-4

Calpain-Proteasen sind eine Familie Calcium-abhängiger Cystein-Proteasen, die an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse (Apoptose, Zellteilung, Zellbeweglichkeit) beteiligt sind. Eine der wichtigsten Aufgaben der Calpain-Proteasen ist die Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit. Die proteolytische Spaltung von Proteinen durch Calpain-Proteasen stellt eine posttranslationale Modifikation dar. Calpain-Proteasen spalten Proteine spezifisch in stabile Fragmente und aktivieren bzw. inaktivieren Proteine dadurch (Perrin & Huttenlocher, 2002; Goll et al., 2003; Glading et al., 2003, Franco & Huttenlocher, 2005).

Das Protein Calpain-4, das im Rahmen dieser Arbeit als potentieller Interaktionspartner der Kinase Aurora-C identifiziert wurde, ist die kleine regulatorische Untereinheit-1 der Calpain-Proteasen bzw. katalytischen Untereinheiten Calpain-1 und -2. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Calpain-Familie werden die katalytischen Untereinheiten Calpain-1, Calpain-2 und deren gemeinsame regulatorische Untereinheit Calpain-4 in allen Säugerzellen exprimiert. Calpain-4 interagiert *in vivo* mit den beiden katalytischen Untereinheiten Calpain-1 (m-calpain) und Calpain-2 (μ -calpain) und bildet jeweils einen heterodimeren Proteinkomplex.

Der molekulare Mechanismus der Regulation der katalytischen Untereinheiten durch die regulatorische Untereinheit Calpain-4 ist unbekannt (Perrin & Huttenlocher, 2002; Goll et al., 2003; Glading et al., 2003, Franco & Huttenlocher, 2005).

Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass die Deletion beider Calpain-4-Allele embryonal letal ist. Die Embryonen sterben am 10. Tage der Embryonalentwicklung aufgrund von Defekten im Blutgefäßsystem, die vermutlich durch die eingeschränkte Beweglichkeit von Endothelzellen verursacht wird (Dourdin et al., 2001). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Calpain-4 eine Komponente der Fokal-Komplexe ist und an der Regulation dieser beteiligt ist (Rosenberger, 2005).

Im Gegensatz zu der regulatorischen Untereinheit Calpain-4 sind die katalytischen Untereinheiten sehr gut charakterisiert. Insbesondere die Regulation von Zellbewegungen durch die Proteasen Calpain-1 und -2 ist sehr gut dokumentiert. Beide Proteasen werden durch den EGF-Rezeptor oder Integrine aktiviert. Die aktivierten Proteasen Calpain-1 und -2 spalten eine Vielzahl von Proteinen, die an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit beteiligt sind, so z.B. den EGF-Rezeptor, Talin, Ezrin, Paxillin, Vinculin, Spectrin, Filamin, verschiedenen Integrine, FAK usw. (Perrin & Huttenlocher, 2002; Goll et al., 2003; Glading et al., 2003; Franco & Huttenlocher, 2005).

Der Klon Calpain-4, der im Rahmen dieser Arbeit im Two-Hybrid-Screen isoliert wurde, kodiert ein Proteinfsegment der kleinen regulatorischen Untereinheit-1 der Calpain-Proteasen und nimmt eine Ausnahmestellung unter den isolierten Klonen ein (Perrin & Huttenlocher, 2002; Goll et al., 2003; Glading et al., 2003, Franco & Huttenlocher, 2005). Calpain-4 war der Klon, der am häufigsten im Two-Hybrid-Screen isoliert wurde. Calpain-4 konnte als einziger Klon die Toxizität von Aurora-C-K72R in Hefen bei einer Kointransformation neutralisieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion zwischen Calpain-4 und Aurora-C eine relativ starke ist, und Calpain-4 möglicherweise ein potentiell regulatorisches Bindeprotein von Aurora-C ist, aber kein Substrat.

Die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die beiden überexprimierten Proteine spezifisch kolokalisieren. Calpain-4 und Aurora-C-WT kolokalisieren im Cytoplasma, an der postmitotischen Brücke und am Zellrand, vermutlich in den Fokal-Komplexen.

Eine Interaktion der beiden Proteine konnte weder *in vivo* noch *in vitro* festgestellt werden. Mittlerweile konnte eine spezifische Interaktion zwischen den beiden überexprimierten Proteinen durch Immunpräzipitationen von einem Kollegen in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung O. Cizmecioglu, DKFZ). Kinasereaktionen mit

Calpain-4 als potentielltem Substrat und Aurora-C als Proteinkinase haben gezeigt, dass Calpain-4 unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Substrat von Aurora-C ist und auch keine Auswirkungen auf die Kinaseaktivität von Aurora-C hat (Abb.17).

Vermutlich ist Calpain-4 ein regulatorisches Bindeprotein, das sich für die korrekte subzelluläre Lokalisation von Aurora-C verantwortlich zeichnet. Die richtige Lokalisation der Kinase ist möglicherweise wie bei den Kinasen Aurora-A und -B die Grundvoraussetzung für den Kontakt mit den physiologischen Substraten (Carmena & Earnshaw, 2003; Giet et al., 2005).

Ein Zusammenhang zwischen der Interaktion der beiden Proteine und den morphologischen Veränderungen der Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Die Kolo-kalisation der beiden Proteine an der Zellmembran, vermutlich in den Fokal-Komplexen, ist allerdings nicht der einzige Hinweis, der darauf hindeutet, dass die Interaktion der beiden Proteine Auswirkungen auf die Zellmorphologie hat.

Weitere Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, deuten an, dass die Interaktion zwischen Aurora-C und Calpain-4 möglicherweise Auswirkungen auf die Proteasen Calpain-1 bzw. -2 hat. Die morphologischen Veränderungen von Zellen, die durch die Behandlung mit shRNAs gegen Aurora-C oder durch die Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D hervorgerufen werden, weisen Ähnlichkeiten mit den morphologischen Veränderungen auf, die durch die Inhibition von Calpain-1 und -2 durch niedermolekulare Calpain-Inhibitoren verursacht werden.

Die Behandlung von adhären-ten Zellen mit niedermolekularen Calpain-Inhibitoren verursacht morphologische Veränderungen, die gekennzeichnet sind durch den Verlust der Fokal-Komplexe und der Adhäsion. Die Zellen runden sich ab und verlieren die Zellpolarität (Glading et al., 2002). Die Überexpression von dominant negativen Calpain-2-Mutanten hat denselben Effekt (Kulkarni et al., 1999). Die spezifische Inhibition von Calpain-1 führt ebenfalls zu Veränderung der Zellmorphologie. Die Zellen bilden lange cytoplasmatische Ausläufer aus und weisen Ähnlichkeit mit Zellen auf, welche die hyperaktive Mutante Aurora-C-T191D überexprimieren (Shiraha et al., 2000).

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Calpain-4 ein regulatorisches Bindeprotein von Aurora-C ist, aber kein Substrat. Die Interaktion der beiden Proteine zeichnet sich sehr wahrscheinlich für die morphologischen Veränderungen mitverantwortlich, die im Rahmen dieser Arbeit bei den RNAi-Experimenten und der Überexpression der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D beobachtet wurden. Die Interaktion zwischen

Aurora-C und Calpain-4 hat vermutlich Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Calpain-4 und Calpain-1 bzw. -2.

6.4.2 Untersuchung der Interaktion zwischen Aurora-C und TRF2

Das Protein TRF2 wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentieller Interaktionspartner der Kinase Aurora-C im Two-Hybrid-Screen identifiziert. Aufgrund seiner wichtigen physiologischen Funktionen ist TRF2 das Auffälligste der identifizierten Proteine. Das Protein TRF2 ist ein Telomerbindeprotein, das in allen höheren eukaryotischen Organismen (Pflanzen; Tiere) exprimiert wird. TRF2 bindet an den doppelsträngigen Bereich der Telomeren und reguliert verschiedene zelluläre Prozesse, wie Seneszenz, Telomerlänge, Telomerstabilität und die Antwort auf DNA-Schäden (de Lange, 2005; Blasco, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Protein TRF2 *in vitro* ein Substrat der Kinase Aurora-C ist (Abb.17; 18; 19). Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass das Protein TRF2 zwei Aurora-C-Phosphorylierungsstellen enthält. Eine der Phosphorylierungsstellen ist die Aminosäure T358, eine Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle (Abb.18; 19). Die zweite Phosphorylierungsstelle konnte nicht identifiziert werden. Ebenso unbeantwortet bleibt die Frage, ob TRF2 ein physiologisches Substrat von Aurora-C oder -B ist. Es wird angenommen, dass die Kinasen Aurora-C und -B dieselbe Substratspezifität *in vitro* aufweisen (Bayliss et al., 2004; Evers et al., 2005; Ferrari et al., 2005; Giet et al., 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Aurora-B TRF2 *in vitro* ebenfalls phosphorylieren kann.

Weder *in vitro* noch *in vivo* konnte eine direkte physische Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Nachweis einer Bindung zwischen der Kinase Aurora-C und einem physiologischen Substrat nicht möglich. Beispielsweise ist es im Fall der Kinase Aurora-B in höheren eukaryotischen Organismen in der Regel nicht möglich eine physische Interaktion zwischen der Kinase und einem Substrat (z.B. MKAK, CENP-A) nachzuweisen (Zeitlin et al., 2001; Kunitoku et al., 2003; Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004; Ohi et al., 2004). Dies trifft möglicherweise auch auf die Kinase Aurora-C zu. Interaktionen zwischen Proteinkinasen und Substrat sind im Allgemeinen sehr schwach, was den Nachweis einer physischen Interaktion schon allein sehr schwierig gestaltet. Im Fall der Kinase Aurora-C kommt möglicherweise noch erschwerend hinzu, dass für einen erfolgreichen Nachweis weitere Hilfsfaktoren benötigt werden, die die schwache Interaktion zwischen der Proteinkinase Aurora-C und dem Substrat stabilisieren. Es ist allerdings auch nicht

ausgeschlossen, dass unter optimierten Versuchsbedingungen der direkte Nachweis einer Interaktion ohne diese Hilfsfaktoren doch möglich ist.

Die Untersuchungen hinsichtlich der physiologischen Auswirkungen einer Phosphorylierung von TRF2 durch Aurora-C blieben ergebnislos. Da die identifizierte Phosphorylierungsstelle T358 in der RAP1-Bindeproteine des Proteins liegt, hat die Phosphorylierung von TRF2 durch Aurora-C möglicherweise Auswirkungen auf die Interaktionen von RAP1 und TRF2. Die Interaktionen der beiden Proteine ist kritisch für die Regulation der Telomerlänge (Li et al., 2000; Li & de Lange, 2003; O'Connor et al., 2004). Die durchgeführten Experimente basierten dabei auf der transienten Überexpression von TRF2-Derivaten oder Aurora-C-Derivaten und waren daher ungeeignet um Veränderungen der Telomerlänge zu untersuchen. Die Veränderung der Telomerlänge ist ein Prozess, der sich über Wochen erstreckt.

6.5 Ausblick

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deuten an, dass die Kinase Aurora-C an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit beteiligt ist. Möglicherweise kommt Aurora-C eine Funktion bei der Metastasierung von Krebszellen zu. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, zeichnen allerdings noch ein ungenaues Bild.

Der Hauptgrund hierfür sind die fehlenden Nachweismöglichkeiten, die es erlauben, dass endogene Protein ohne Einschränkungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Um das Protein uneingeschränkt zu untersuchen, ist es daher notwendig ein Nachweissystem zu etablieren. Wie zwei kürzlich publizierte Studien zeigen, scheint der Nachweis von Aurora-C auf Proteinebene im Western-Blot und der Immunfärbung durchaus möglich zu sein (Tang et al., 2006; Ulisse et al., 2006). Es sollte daher weiter an der Etablierung eines Nachweissystems mit den bereits vorhandenen Aurora-C-spezifischen Antikörpern gearbeitet werden.

Wegen der fehlenden Nachweismöglichkeiten konnten die RNAi-Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Da in diesem Fall der Nachweis auf mRNA-Ebene eine Alternative zum Nachweis auf Proteinebene darstellt, wurde versucht die Abnahme der endogenen Aurora-C-mRNA durch RT-PCR nachzuweisen. Der Nachweis konnte allerdings bis zum Ende der Arbeit nicht in der gewünschten Qualität etabliert werden. Die hierzu begonnenen Experimente waren jedoch sehr viel versprechend und haben gezeigt, dass der Nachweis nur noch weiterer Optimierung bedarf. Um die RNAi-Experimente abzuschließen und um weitere Experimente basierend auf der RNAi-Technologie durchführen zu können, sollte der Nachweis von Aurora-C auf mRNA-Ebene unabhängig von den Bemühungen eines Nachweises auf Proteinebene etabliert werden.

Trotz dieser ungelösten Probleme ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ein System zu etablieren, das es erlaubt Aurora-C basierend auf der Überexpression verschiedener Aurora-C-Derivate zu untersuchen. Vor allem die Untersuchung der hyperaktiven Mutante Aurora-C-T191D hat eine ganze Reihe von Fragen aufgeworfen. Im Rahmen dieser Arbeit blieb die Frage nach der Art der posttranslationalen Modifikation von Aurora-C-T191D und deren physiologischen Auswirkungen unbeantwortet. Ebenso ungeklärt ist, wie die Mutante Aurora-C-T191D die morphologischen Veränderungen induziert. Sind die Veränderungen abhängig von der Kinaseaktivität oder wie vermutet unabhängig von der Kinaseaktivität?

Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen lieferte die Identifizierung der Proteine Calpain-4, Epiplakin und Interleukin-15 im Two-Hybrid-Screen. Alle drei Proteine sind wie Aurora-C an der Regulation der Zellmorphologie, -adhäsion und -beweglichkeit beteiligt (Jang et al., 2005; Rosenberger et al., 2005; Bulfone-Paus et al., 2006).

Die Untersuchung der Interaktion zwischen Aurora-C und Calpain-4 wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits begonnen. Ein funktioneller Zusammenhang konnte allerdings noch nicht gezeigt werden. Die Proteine Epiplakin und Interleukin-15 wurden im Rahmen dieser Arbeit gar nicht untersucht. Vor allem die Untersuchung von Epiplakin erscheint sehr interessant, da das Protein eine Ipl1/Aurora-B-Konsensus-Phosphorylierungsstelle enthält. Möglicherweise hat eine Interaktion zwischen Aurora-C und Epiplakin Auswirkungen auf das Intermediär-Cytoskelett, insbesondere das Keratin-Cytoskelett.

Ein weiterer Ansatzpunkt für Untersuchungen lieferte auch die Identifizierung des Telemorbindeproteins TRF2 im Two-Hybrid-Screen. TRF2 nimmt aufgrund seiner wichtigen physiologischen Funktionen eine Ausnahmestellung unter den isolierten Proteinen ein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRF2 durch die Kinase Aurora-C *in vitro* spezifisch phosphoryliert wird. Die physiologischen Auswirkungen einer Phosphorylierung von TRF2 durch die Kinase Aurora-C sind allerdings unbekannt. Ebenso offen ist die Frage, ob TRF2 ein Substrat der Kinase Aurora-C oder Aurora-B ist.

7.0 Literaturverzeichnis

Andreassen PR, Lohez OD, Margolis RL. (2003) G2 and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutat Res.* 2003 Nov 27;532(1-2):245-53.

Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR. (2003) Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec;15(6):672-83.

Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JR. (2004) Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell.* 2004 Feb;6(2):253-68.

Andrews PD. Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene.* 2005 Jul 28;24(32):5005-15.

Ausubel FH., Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing and Wiley-Interscience.

Badano JL, Teslovich TM, Katsanis N. (2005) The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Mar;6(3):194-205.

Baltimore D. (2001) Our genome unveiled. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):814-6.

Bayliss R, Sardon T, Ebert J, Lindner D, Vernos I, Conti E. (2004) Determinants for Aurora-A activation and Aurora-B discrimination by TPX2. *Cell Cycle.* 2004 Apr;3(4):404-7.

Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. (2003) Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell.* 2003 Oct;12(4):851-62.

Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. (1998) Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics.* 1998 Nov 1;53(3):406-9.

Bharadwaj R, Yu H. (2004) The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene.* 2004 Mar 15;23(11):2016-27.

Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A. (2002) Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci.* 2002 Sep 1;115 (Pt 17):3415-25.

Blagden SP, Glover DM. (2003) Polar expeditions-provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol.* 2003 Jun;5(6):505-11.

Blagoev B, Kratchmarova I, Ong SE, Nielsen M, Foster LJ, Mann M. (2003) A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol.* 2003 Mar;21(3):315-8.

Blasco MA. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):611-22.

- Blow JJ, Tanaka TU. (2005) The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series. *EMBO Rep.* 2005 Nov;6(11):1028-34.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. (2004) Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol.* 2004 Oct 12;4(1):39.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):550-3.
- Bulfone-Paus S, Bulanova E, Budagian V, Paus R. (2006) The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *Bioessays.* 2006 Apr;28(4):362-77.
- Cardozo T, Pagano M. (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Sep;5(9):739-51.
- Carmena M, Earnshaw WC. (2003) The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Nov;4(11):842-54.
- Carragher NO, Frame MC. (2002) Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec;34(12):1539-43.
- Carragher NO, Frame MC. (2004) Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 2004 May;14(5):241-9.
- Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T. (2005) The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene.* 2005 Jan 13;24(3):314-25.
- Cheeseman IM, Anderson S, Jwa M, Green EM, Kang J, Yates JR 3rd, Chan CS, Drubin DG, Barnes G. (2002) Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):163-72.
- Chen SH, Tang TK. (2002) Mutational analysis of the phosphorylation sites of the Aie1 (Aurora-C) kinase in vitro. *DNA Cell Biol.* 2002 Jan;21(1):41-6.
- Crane R, Gadea B, Littlepage L, Wu H, Ruderman JV. (2004a) Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell.* 2004 Apr;96(3):215-29.
- Crane R, Kloepfer A, Ruderman JV. (2004b) Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci.* 2004 Dec 1;117(Pt 25):5975-83.
- Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P. (2002) Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):874-85.
- de Lange T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005 Sep 15;19(18):2100-10.

- Demidov D, Van Damme D, Geelen D, Blattner FR, Houben A. (2005) Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell*. 2005 Mar;17(3):836-48.
- Devoy A, Soane T, Welchman R, Mayer RJ. (2005) The ubiquitin-proteasome system and cancer. *Essays Biochem*. 2005;41:187-203.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS. (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*. 2003 Apr 28;161(2):267-80.
- Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A. (2001) Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):48382-8.
- Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. (2005) Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol*. 2005 Jun;15(6):303-11.
- Ducat D, Zheng Y. (2004) Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*. 2004 Nov 15;301(1):60-7.
- Dutertre S, Hamard-Peron E, Cremet JY, Thomas Y, Prigent C. (2005) The absence of p53 aggravates polyploidy and centrosome number abnormality induced by Aurora-C overexpression. *Cell Cycle*. 2005 Dec;4(12):1783-7.
- Ehara H, Yokoi S, Tamaki M, Nishino Y, Takahashi Y, Deguchi T, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y. (2003) Expression of mitotic Aurora/Ipl1p-related kinases in renal cell carcinomas: an immunohistochemical study. *Urol Res*. 2003 Dec;31(6):382-6. Epub 2003 Sep 13.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8.
- Elledge SJ. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1664-72.
- Eyers PA, Churchill ME, Maller JL. (2005) The Aurora A and Aurora B protein kinases: a single amino acid difference controls intrinsic activity and activation by TPX2. *Cell Cycle*. 2005 Jun;4(6):784-9.
- Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. (2003) A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*. 2003 Apr 15;13(8):691-7.
- Eyers PA, Maller JL. (2004) Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):9008-15.
- Ferrari S, Marin O, Pagano MA, Meggio F, Hess D, El-Shemerly M, Krystyniak A, Pinna LA. (2005) Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. *Biochem J*. 2005 Aug 15;390(Pt 1):293-302.
- Fisher RP. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci*. 2005 Nov 15;118(Pt 22):5171-80.

- Frame MC, Fincham VJ, Carragher NO, Wyke JA. (2002) v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Apr;3(4):233-45.
- Franco SJ, Huttenlocher A. (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci.* 2005 Sep 1;118(Pt 17):3829-38.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. (2005) Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature.* 2005 Oct 13;437(7061):1043-7.
- Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, Nigg EA, Gerloff DL, Earnshaw WC. (2004) Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol.* 2004 Jul 19;166(2):179-91.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P. (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell.* 2003 Aug 22;114(4):431-43.
- Giet R, Petretti C, Prigent C. (2005) Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.* 2005 May;15(5):241-50.
- Gietz DR, Sugino A. (1988): New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* 1988 Dec 30;74(2):527-34.
- Gladden AB, Diehl JA. (2003) Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: breaking down the walls of dogma. *Cancer Cell.* 2003 Sep;4(3):160-2.
- Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 2002 Jan;12(1):46-54.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.
- Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M. (2003) Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8526-30.
- Goto M, Sumiyoshi H, Sakai T, Fassler R, Ohashi S, Adachi E, Yoshioka H, Fujiwara S. (2006) Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(2):548-58.
- Gruneberg U, Neef R, Honda R, Nigg EA, Barr FA. (2004) Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol.* 2004 Jul 19;166(2):167-72.
- Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, Guarguaglini G, Kast J, Wilm M, Le Bot N, Vernos I, Karsenti E, Mattaj IW. (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell.* 2001 Jan 12;104(1):83-93.

- Gruss OJ, Wittmann M, Yokoyama H, Pepperkok R, Kufer T, Sillje H, Karsenti E, Mattaj IW, Vernos I. (2002) Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol.* 2002 Nov;4(11):871-9.
- Hahn WC, Weinberg RA. (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):331-41.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Harlow E, Lane D. (1998) *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* 1998 Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM. (2004) VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med.* 2004 Mar;10(3):262-7.
- Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM. (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 2003 Apr 28;161(2):281-94.
- Helfand BT, Chang L, Goldman RD. (2004) Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci.* 2004 Jan 15;117(Pt 2):133-41.
- Hershko A. (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.* 2005 Sep;12(9):1191-7.
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. (2003) Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell.* 2003 Sep 5;114(5):585-98.
- Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature.* 2005 Dec 22;438(7071):1176-80.
- Hochstrasser M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol.* 2000 Aug;2(8):E153-7.
- Hochstrasser M. (2006) Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):27-34.
- Honda R, Korner R, Nigg EA. (2003) Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003 Aug;14(8):3325-41.
- Hsu JY, Reimann JD, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK. (2002) E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):358-66.
- Hu HM, Chuang CK, Lee MJ, Tseng TC, Tang TK. (2000) Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1. *DNA Cell Biol.* 2000 Nov;19(11):679-88.

- Humphrey T, Pearce A. (2005) Cell cycle molecules and mechanisms of the budding and fission yeasts. *Methods Mol Biol.* 2005;296:3-29.
- Huse M, Kuriyan J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 2002 May 3;109(3):275-82
- Jallepalli PV, Lengauer C. (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1(2):109-17.
- Jang SI, Kalinin A, Takahashi K, Marekov LN, Steinert PM. (2005) Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks. *J Cell Sci.* 2005 Feb 15;118(Pt 4):781-93.
- Jost M, Kari C, Rodeck U. (2000) The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol.* 2000 Oct-Nov;10(7):505-10.
- Karsenti E. (2005) TPX or not TPX? *Mol Cell.* 2005 Aug 19;19(4):431-2.
- Kastan MB, Bartek J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):316-23.
- Katayama H, Brinkley WR, Sen S. (2003) The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Dec;22(4):451-64.
- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. (2004a) Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):55-62.
- Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M, Sen S. (2001) Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem.* 2001 Dec 7;276(49):46219-24.
- Kawabe A, Matsunaga S, Nakagawa K, Kurihara D, Yoneda A, Hasezawa S, Uchiyama S, Fukui K. (2005) Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol Biol.* 2005 May;58(1):1-13.
- Keen N, Taylor S. (2004) Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):927-36.
- Kelm O, Wind M, Lehmann WD, Nigg EA. (2002) Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J Biol Chem.* 2002 Jul 12;277(28):25247-56.
- Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. (1999) Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):7334-40.
- Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ. (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science.* 2001 Oct 5;294(5540):173-7.
- Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer.* 2005 Oct;5(10):773-85.

- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*. 2004 Aug 20;118(4):477-91.
- Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. (2002) Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*. 2002 Aug 19;158(4):617-23.
- Kulkarni S, Saido TC, Suzuki K, Fox JE. (1999) Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23;274(30):21265-75.
- Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T. (2003) CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell*. 2003 Dec;5(6):853-64.
- Kurzik-Dumke U, Gundacker D, Renthrop M, Gateff E. (1995) Tumor suppression in *Drosophila* is causally related to the function of the lethal(2) tumorous imaginal discs gene, a dnaJ homolog. *Dev Genet*. 1995;16(1):64-76.
- Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT. (2004) Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*. 2004 Feb 17;14(4):273-86.
- Leung CL, Green KJ, Liem RK. (2002) Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol*. 2002 Jan;12(1):37-45.
- Leung CL, Liem RK, Parry DA, Green KJ. (2001) The plakin family. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 19):3409-10.
- Levenson JD, Huang HK, Forsburg SL, Hunter T. (2002) The *Schizosaccharomyces pombe* aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 2002 Apr;13(4):1132-43.
- Li B, de Lange T. (2003) Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec;14(12):5060-8.
- Li B, Oestreich S, de Lange T. (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell*. 2000 May 26;101(5):471-83.
- Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, Taniguchi H, Furukawa K, Urano T. (2004) Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):47201-11.
- Lindl T. (2000) Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Littlepage LE, Ruderman JV (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*. 2002 Sep 1;16(17):2274-85.

- Liu Q, Kaneko S, Yang L, Feldman RI, Nicosia SV, Chen J, Cheng JQ. (2004) Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52175-82.
- Lo JF, Hayashi M, Woo-Kim S, Tian B, Huang JF, Fearn C, Takayama S, Zapata JM, Yang Y, Lee JD. (2004) Tid1, a cochaperone of the heat shock 70 protein and the mammalian counterpart of the *Drosophila* tumor suppressor l(2)tid, is critical for early embryonic development and cell survival. *Mol Cell Biol.* 2004 Mar;24(6):2226-36.
- Maison C, Almouzni G. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Apr;5(4):296-304.
- Malumbres M, Barbacid M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Dec;1(3):222-31.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 2004 Aug 20;118(4):493-504.
- Margolis RL, Lohez OD, Andreassen PR. (2003) G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2003 Mar 1;88(4):673-83.
- Marumoto T, Zhang D, Saya H. (2005) Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jan;5(1):42-50.
- Massague J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):298-306.
- Matthews N, Visintin C, Hartzoulakis B, Jarvis A, Selwood DL. (2006) Aurora A and B kinases as targets for cancer: will they be selective for tumors? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Jan;6(1):109-20.
- McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. (2005) The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jul;5(7):505-15.
- Meraldi P, Honda R, Nigg EA. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* 2002 Feb 15;21(4):483-92.
- Meraldi P, Honda R, Nigg EA. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb;14(1):29-36.
- Miller ME, Cross FR. (2001) Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J Cell Sci.* 2001 May;114(Pt 10):1811-20.
- Mitchison TJ, Salmon ED. (2001) Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol.* 2001 Jan;3(1):E17-21.
- Morgan DO. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):131-4.
- Morgan DO. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:261-91.

- Morrison C, Henzing AJ, Jensen ON, Osheroff N, Dodson H, Kandels-Lewis SE, Adams RR, Earnshaw WC. (2002) Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate. *Nucleic Acids Res.* 2002 Dec 1;30(23):5318-27.
- Mortlock AA, Keen NJ, Jung FH, Heron NM, Foote KM, Wilkinson RW, Green S. (2005) Progress in the development of selective inhibitors of aurora kinases. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(8):807-21.
- Nasmyth K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 1996 Oct;12(10):405-12.
- Nasmyth K. (2005) How do so few control so many? *Cell.* 2005 Mar 25;120(6):739-46.
- Nigg EA. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 1995 Jun;17(6):471-80.
- Nigg EA. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):21-32.
- Nigg EA. (2002) Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer.* 2002 Nov;2(11):815-25.
- Nilsson I, Hoffmann I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res.* 2000;4:107-14.
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell.* 2004 Sep 10;15(5):661-75
- Nurse P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):71-8.
- Nurse P. (2002) Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem.* 2002 Jul 2;3(7):596-603.
- O'Reilly DR, Luchow V, Miller LK. (1994): *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.* 1994 Edition. Oxford University Press.
- O'Connor MS, Safari A, Liu D, Qin J, Songyang Z. (2004) The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28585-91.
- Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. (2004) Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2004 Jun;15(6):2895-906.
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):73-87.
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):25-31.

- Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B. (2003) Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* 2003 Sep 15;22(18):4794-803.
- Pascreau G, Arlot-Bonnemains Y, Prigent C. (2003) Phosphorylation of histone and histone-like proteins by aurora kinases during mitosis. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:369-74.
- Passmore LA, Barford D, Harper JW. (2005) Purification and assay of the budding yeast anaphase-promoting complex. *Methods Enzymol.* 2005;398:195-219.
- Perrin BJ, Huttenlocher A. (2002) Calpain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jul;34(7):722-5.
- Peters JM. (1999) Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res.* 1999 May 1;248(2):339-49.
- Peters JM. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 2002 May;9(5):931-43.
- Prigent C, Dimitrov S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci.* 2003 Sep 15;116(Pt 18):3677-85.
- Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. (2004) Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature.* 2004 Mar 4;428(6978):77-81.
- Read RL, Norbury CJ. (2002) Roles for cytoplasmic polyadenylation in cell cycle regulation. *J Cell Biochem.* 2002;87(3):258-65.
- Reed SI. (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Nov;4(11):855-64.
- Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK. (2001) Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell.* 2001 Jun 1;105(5):645-55.
- Ren S, Rollins BJ. (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.* 2004 Apr 16;117(2):239-51.
- Rieder CL, Faruki S, Khodjakov A. (2001) The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 2001 Oct;11(10):413-9.
- Roberts JM, Sherr CJ. (2003) Bared essentials of CDK2 and cyclin E. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):9-10.
- Roberts JM. (1999) Evolving ideas about cyclins. *Cell.* 1999 Jul 23;98(2):129-32.
- Rosenberger G, Gal A, Kutsche K. (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25;280(8):6879-89.

- Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. (2004) The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):187-202.
- Sasai K, Katayama H, Stenoien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S. (2004) Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004 Dec;59(4):249-63.
- Scholey JM, Brust-Mascher I, Mogilner A. (2003) Cell division. *Nature*. 2003 Apr 17;422(6933):746-52.
- Sherr CJ, Roberts JM. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12.
- Shi Q, King RW. (2005) Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1038-42.
- Shiraha H, Gupta K, Drabik K, Wells A. (2000) Aging fibroblasts present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):19343-51.
- Smith DP, Rayter SI, Niederlander C, Spicer C, Jones CM and Ashword A (2001) Lip, a cytoplasmatic protein functionally linked to the Peutz-Jegger syndrome kinase LKB1. *Human Mol Gen* 10(25): 2869-2877.
- Spazierer D, Fuchs P, Proll V, Janda L, Oehler S, Fischer I, Hauptmann R, Wiche G. (2003) Epiplakin gene analysis in mouse reveals a single exon encoding a 725-kDa protein with expression restricted to epithelial tissues. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31657-66.
- Spazierer D, Fuchs P, Reipert S, Fischer I, Schmuth M, Lassmann H, Wiche G. (2006) Epiplakin is dispensable for skin barrier function and for integrity of keratin network cytoarchitecture in simple and stratified epithelia. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(2):559-68.
- Stark GR, Taylor WR. (2004) Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol*. 2004; 280:51-82.
- Stewart S, Fang G. (2005) Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19): 8730-5.
- Storchova Z, Pellman D. (2004) From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jan;5(1):45-54.
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI. (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*. 2001 Sep 20;413(6853):316-22.
- Superti-Furga G, Bergers G, Picard D, Busslinger M. (1991): Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 15;88(12):5114-8.

- Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N, Sano J, Katada M, Takagi Y, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y, Saji S. (2000) Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Oct;91(10):1007-14.
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. (2003) Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci.* 2003 Feb;94(2):148-52.
- Takeda DY, Dutta A. (2005) DNA replication and progression through S phase. *Oncogene.* 2005 Apr 18;24(17):2827-43.
- Tang CJ, Lin CY, Tang TK. (2006) Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol.* 2006 Feb 15;290(2):398-410.
- Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y. (2003) A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 2003 Mar;5(3):242-8.
- Tseng TC, Chen SH, Hsu YP, Tang TK. (1998) Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol.* 1998 Oct;17(10):823-33.
- Ulisse S, Delcros JG, Baldini E, Toller M, Curcio F, Giacomelli L, Prigent C, Ambesi-Impiombato FS, D'Armiento M, Arlot-Bonnemains Y. (2006) Expression of Aurora kinases in human thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer.* 2006 Feb 13.
- Vagnarelli P, Earnshaw WC. (2004) Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma.* 2004 Nov;113(5):211-22.
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998 Feb 6;92(3):401-13.
- Vodermaier HC. (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol.* 2004 Sep 21;14(18):R787-96.
- Wang SW, Toda T, MacCallum R, Harris AL, Norbury C. (2000) Cid1, a fission yeast protein required for S-M checkpoint control when DNA polymerase delta or epsilon is inactivated. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3234-44.
- Wasch R, Engelbert D. (2005) Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene.* 2005 Jan 6;24(1):1-10.
- Wells A, Huttenlocher A, Lauffenburger DA. (2005) Calpain proteases in cell adhesion and motility. *Int Rev Cytol.* 2005;245:1-16.
- Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC. (2004) Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5655-60.

- Wu JC, Chen TY, Yu CT, Tsai SJ, Hsu JM, Tang MJ, Chou CK, Lin WJ, Yuan CJ, Huang CY. (2005) Identification of V23R_A-Ser194 as a critical mediator for Aurora-A-induced cellular motility and transformation by small pool expression screening. *J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9013-22.
- Yan X, Cao L, Li Q, Wu Y, Zhang H, Saiyin H, Liu X, Zhang X, Shi Q, Yu L. (2005a) Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes Cells.* 2005 Jun;10(6):617-26.
- Yan X, Wu Y, Li Q, Cao L, Liu X, Saiyin H, Yu L. (2005b) Cloning and characterization of a novel human Aurora C splicing variant. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 4;328(1):353-61.
- Yasui Y, Urano T, Kawajiri A, Nagata K, Tatsuka M, Saya H, Furukawa K, Takahashi T, Izawa I, Inagaki M. (2004) Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12997-3003.
- Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF. (2001) CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol.* 2001 Dec 24;155(7):1147-57.
- Zhou BB, Elledge SJ. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000 Nov 23;408(6811):433-9.
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):189-93.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für Ihre Unterstützung in all den Jahren.
- Priv.-Doz. Dr. Ingrid Hoffmann danke ich für die wissenschaftliche Anleitung, Diskussion sowie großzügige Unterstützung und Förderung.
- Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf und der Arbeitsgruppe Zentgraf danke ich für Ihre großzügige Unterstützung und Hilfe sowie dem Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit. Bei Prof. Zentgraf, C. Böhm und C. Uhl möchte ich mich für die Herstellung und Bereitstellung von monoklonalen Aurora-C-Antikörpern bedanken.
- Dr. Oliver Gruss danke ich für seine Unterstützung und Bereitschaft als 2. Gutachter meine Doktorarbeit zu betreuen.
- Bei meinen ehemaligen Arbeitskollegen Onur Cizmecioglu, Ingo Hassepaß, Stefan Kemmler, Irina Kotova, Alexander Mion, Renate Öttl, Andrea Perlewitz, Oleg Timofeev, Melanie Volkening, Silke Warnke und Sascha Wey möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb des Labors bedanken.
- Bei Prof. Dr. H. Zentgraf und Dr. M. Volkening möchte ich mich auch für das schnelle Korrekturlesen meiner Doktorarbeit bedanken.
- Priv.-Doz. Dr. Renate Voit und Urs Hoffmann-Rohrer danke ich für die Unterstützung bei der Lösung von so manchem labortechnischen Problems.
- Allen Mitarbeitern und Kollegen in der ATV danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.