

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Untersuchungen zur Rolle der ZIPK und der Bedeutung der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von
Anne Conradi aus Berlin

Bonn im November 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann.

Diese Arbeit ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2009

Erstgutachter:	Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Klaus Willecke
Fachnaher Gutachter:	Prof. Dr. Norbert Koch
Fachangrenzender Gutachter:	Prof. Dr. Martin Reuter

Tag der Promotion: 19. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der eukaryotische Zellzyklus	1
1.1.1 Die Kontrollpunkte des Zellzyklus	2
1.1.2 Die M-Phase	3
1.2 Histonmodifikationen	6
1.2.1 Die Phosphorylierung von Histon H3	7
1.3 Die ZIPK	9
1.3.1 Lokalisation der ZIPK	10
1.3.2 Regulation der Aktivität der ZIPK	10
1.3.3 Substrate und Interaktionspartner der ZIPK	11
1.3.4 Funktionen der ZIPK	11
1.4 Der Chromosomal Passenger Komplex, CPC	13
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	16
2.1.2 Bakterienstämme	16
2.1.3 Zelllinien und Zellkultur	16
2.1.4 Inhibitoren	17
2.1.5 Oligonukleotide und siRNA	17
2.1.6 Puffer und Lösungen	18
2.2 Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1 Plasmide	20
2.3 Zellbiologische Methoden	20
2.3.1 Infektion von <i>Sf9</i> -Zellen	20
2.3.2 Transiente Transfektion	21
2.3.3 Stabile Transfektion	21
2.3.4 Immunfluoreszenzanalysen	21
2.3.4.1 <i>Live-Cell-Imaging</i>	22
2.4 Biochemische Methoden	22
2.4.1 Herstellung von Zellextrakten	22
2.4.2 Immunpräzipitation	23
2.4.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>Sf9</i> -Zellen	23
2.4.4 <i>In-vitro</i> -Kinase-Assay	24

2.4.5	SDS-PAGE und Immunblotting	24
2.4.6	Antikörper	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Untersuchung zur Lokalisation der endogenen ZIPK in der Mitose . .	28
3.2	Untersuchungen zur Interaktion zwischen Aurora-Kinasen und ZIPK	29
3.2.1	Die ZIPK kolokalisiert mit Aurora-B in der Mitose	30
3.2.2	Überprüfung einer funktionellen Beziehung zwischen Aurora-Kinasen und ZIPK	31
3.2.2.1	Analyse von rekombinanter ZIPK	31
3.2.2.2	Analyse von rekombinanter Aurora-A	32
3.2.2.3	Analyse von rekombinanter Aurora-B	33
3.2.2.4	Es besteht keine Enzym-Substrat-Beziehung zwischen den Aurora-Kinasen und der ZIPK	34
3.3	Der zeitliche Verlauf der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung im Zellzyklus	35
3.3.1	Histon H3 wird ab der späten G ₂ -Phase am Thr11 phosphoryliert	36
3.3.2	Lokalisation der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose	37
3.3.3	Histon H3 assoziiert nicht mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen	38
3.4	Identifizierung der mitotischen Histon H3-Thr11-Kinase	40
3.4.1	Etablierung eines Systems zur Inhibition der ZIPK mittels RNA-Interferenz	41
3.4.1.1	Untersuchung der Funktionalität verschiedener siRNA-Sequenzen gegen die humane ZIPK	42
3.4.1.2	Herstellung einer stabil shRNA gegen ZIPK exprimierenden Zelllinie	43
3.4.2	Screening verschiedener Kinaseinhibitoren	47
3.4.2.1	Überprüfung der Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Aktivität der ZIPK	48
3.4.2.2	Überprüfung der Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung . .	49
3.4.2.3	Einfluss der Inhibitoren auf die zentromerspezifische Histon H3-Thr11-Phosphorylierung	51
3.4.3	Herunterregulation von PRK1 und PRK2 mittels RNA-Interferenz	55
3.4.3.1	Analyse der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung vor einem PRK1/2 RNAi-Hintergrund	56
3.5	Untersuchungen zur Funktion der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung	58
3.5.1	Die Mutation des Histons H3 am Thr11 führt zu einer Verzögerung in der Mitose	58
3.5.2	Die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung ist an der Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte beteiligt	61

4	Diskussion	64
4.1	Die mitotischen Kinasen	64
4.1.1	Lokalisation der endogenen ZIPK in der Mitose	65
4.1.2	Gibt es eine Beziehung zwischen ZIPK und den Aurora-Kinasen?	68
4.2	Die Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11	69
4.2.1	Die H3-Thr11-Phosphorylierung erfolgt vor der H3-Ser10-Phosphorylierung	69
4.2.2	Am Thr11 phosphoryliertes H3 assoziiert nicht mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen	69
4.3	Identifizierung der mitotischen Histon H3-Thr11-Kinase	71
4.3.1	Die ZIPK wird durch siRNA kaum beeinflusst	71
4.3.2	Screening verschiedener Kinaseinhibitoren	72
4.3.3	PRK2 ist an der zentromerspezifischen Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11 beteiligt	77
4.4	Die Funktion der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung	78
4.4.1	Der Verlust der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung führt zu einer Verzögerung in der Mitose	78
4.4.2	Stabilisiert die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung die Interaktion zwischen dem Kinetochor und den Mikrotubuli?	79
4.5	Ausblick	80
5	Zusammenfassung	82
	Literaturverzeichnis	83
	Anhang	98
	Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestilata</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destilata</i>	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Amp	Ampicillin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
APS	Ammoniumpersulfat	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
AS	Aminosäure	PI	Protease-Inhibitor-Cocktail
ATP	Adenosintriphosphat	PIPES	1,4-Piperazin-bis-ethansulfonsäure
bp	Basenpaare	PLP	Phosphat-Lysispuffer
BSA	Rinderserumalbumin	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
cDNA	reverses Transkript der Boten-Ribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat	rpm	Umdrehungen per Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
DOC	Natrium-Desoxy-cholat	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol	t	Zeit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tab.	Tabelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EGTA	Ethylenglycoll-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat	TE	Tris-EDTA
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
FCS	fötales Kälberserum	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
GST	Glutathion-S-Transferase	Tween20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
IF	Immunfluoreszenzanalyse	U	units
IP	Immunpräzipitation	ÜN	über Nacht
kb	Kilo Basenpaare	Vol	Volumen
kDa	Kilodalton	(v/v)	Volumen pro Volumen
Km	Kanamycin	WB	Western-Blot-Analyse
LB-Medium	Flüssigmedium nach Luria Bertani	WT	Wildtyp
M	Molar	(w/v)	Masse pro Volumen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure		
N	Normal		
NEM	N-Ethylmaleinimid		
NP-40	Nonidet-40		
OD _x	Optische Dichte bei x nm		
PAA	Polyacrylamid		

Alle weiteren Abkürzungen und Zeichen wurden entsprechend dem Duden verwendet.

1 Einleitung

1.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Der eukaryotische Zellzyklus gliedert sich in vier Phasen, die G_1 - (G = von engl. *gap*), die S - (S = Synthese), die G_2 - und die M -Phase (Abb. 1.1). Proliferierende Zellen treten nach der Mitose in eine Wachstums- und Produktionsphase, die G_1 -Phase, ein. In der nachfolgenden S -Phase findet die semikonservative Verdopplung des Genoms und der Zentrosomen statt. Nach Abschluss der DNA-Replikation gehen die Zellen in die G_2 -Phase über, in der die replizierte DNA auf Schäden kontrolliert wird und sich die Zelle auf die Mitose vorbereitet. In der Mitose erfolgt die Aufteilung der Chromosomen, der Zellorganellen und der Zellmasse auf die Tochterzellen, die sich anschließend in der Zellteilung (Zytokinese) physisch trennen. Mitose und Zytokinese werden zusammen als M -Phase (M = Mitose) bezeichnet. Der Zeitraum zwischen zwei M -Phasen wird als Interphase bezeichnet.

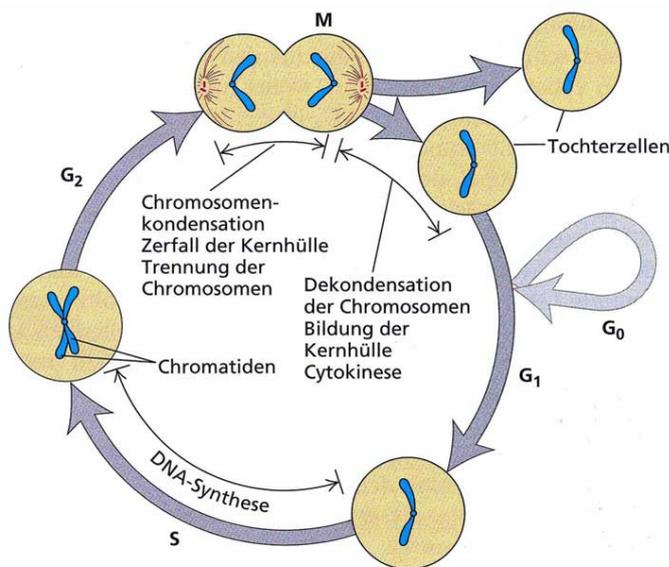


Abbildung 1.1: Zellzyklus bei Eukaryoten.

Die Chromosomen sind auch außerhalb der Mitose in ihrer kondensierten Form dargestellt, um die Anzahl der Chromosomen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus deutlich zu machen. Die Kernhülle ist nicht eingezeichnet. Die G_1 -, S - und G_2 -Phase bilden zusammen die Interphase, also den Zeitraum zwischen zwei Mitosen. Die Zellen besitzen nach der Beendigung der S -Phase, beim Übergang zur G_2 -Phase, verglichen mit der G_1 -Phase die doppelte Anzahl an Chromosomen. Die G_2 -Phase wird durch den Beginn der Mitose beendet, in deren Verlauf zahlreiche Vorgänge zur Zellteilung führen. (Modifiziert nach Lodish et al., 2001).

Zellen durchlaufen diesen Zyklus unterschiedlich schnell, wobei die G_1 -Phase in ihrer Dauer am variabelsten ist. Bei Säugerzellen in Kultur dauert der Zyklus 20-24 Stunden. In einem vielzelligen Organismus befinden sich die meisten Zellen in einem differenzierten Zustand, der irreversibel ist und als G_0 bezeichnet wird. Davon zu unterscheiden sind die Stammzellen, die sich während G_0 im Ruhezustand befinden und wieder in den aktiv proliferierenden Zustand zurückkehren können (für eine Übersicht über den Zellzyklus siehe Lodish et al., 2001).

Die Vorgänge des Zellzyklus werden in erster Linie über Transkription, Proteinphosphorylierungen und Proteinabbau reguliert. Schlüsselenzyme der Regulation sind die cyclinabhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, Cdks). Die regulatorischen Untereinheiten dieser heterodimeren Proteinkinasen bezeichnet man als Cycline, da ihr Gehalt zellzyklusabhängig zu- und abnimmt. Die katalytischen Untereinheiten, die Cdks, sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die durch Bindung an Cycline oder inhibitorische Faktoren, sowie durch Phosphorylierung positiv bzw. negativ reguliert werden (Morgan, 1997) (Abb. 1.2).

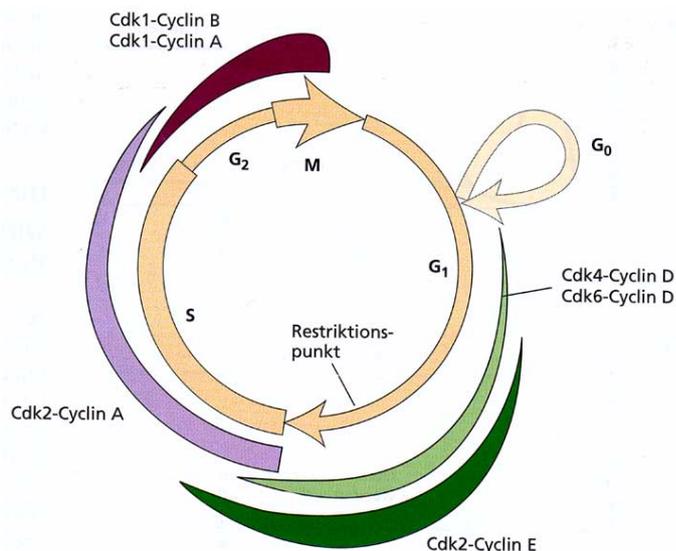


Abbildung 1.2: Aktivität der verschiedenen Cdk-Cyclin-Komplexe während des Zellzyklus.

Die Dicke der farbigen Pfeile entspricht der relativen Proteinkinaseaktivität der dargestellten Komplexe. Die drei Arten von D-Cyclinen sind unter der Bezeichnung Cyclin-D zusammengefasst. (Modifiziert nach Lodish et al., 2001).

1.1.1 Die Kontrollpunkte des Zellzyklus

Die Replikation und Segregation des genetischen Materials erfordert höchste Präzision. Deshalb werden die Übergänge der verschiedenen Zellzyklusphasen durch Kontrollpunkte überwacht. Kommt es zur Aktivierung eines dieser Kontrollpunkte, besteht die Möglichkeit einer Unterbrechung des Zellzyklus und der Korrektur des aufgetretenen Fehlers oder es kommt zur Apoptose, durch die die fehlerhafte Zelle eliminiert wird (Elledge, 1996).

Ein wichtiger Kontrollpunkt, der G₁-Restriktionspunkt, liegt in der späten G₁-Phase, bei dessen Überschreitung Zellen zu einer neuen Replikationsrunde programmiert sind. In diesem Stadium des Zellzyklus führt eine mitogenabhängige Expression und Aktivierung von Cdk4/6-CyclinD1-Komplexen zu einer initialen Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb). Durch die Fähigkeit in seiner un- und hypophosphorylierten Form Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zu binden und zu inhibieren, kann pRb die Transkription zellzyklus-promovierender Gene reprimieren (Harbour & Dean, 2000). Durch zunehmende Phosphorylierung verliert pRb die Fähigkeit, E2F zu binden, und es kommt zu einer Hochregulation von E2F-Zielgenen, die u.a. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Die

Phosphorylierung von pRb ist damit Voraussetzung für ein Fortschreiten im Zellzyklus. Aufgrund der Wirkung von Cdk2- und Cdk1-Cyclin-Komplexen bleibt pRb während der gesamten S- und G₂-, sowie zu Beginn der M-Phase phosphoryliert und funktionell inaktiviert. Mit Eintritt in die M-Phase wird CyclinB herunterreguliert, so dass pRb über die Protein-Phosphatase PP1 dephosphoryliert werden kann und die Tochterzellen in der nachfolgenden G₁-Phase verbleiben, bis der nächste Zellzyklus aktiviert wird.

Vor dem Eintritt der Zelle in die Mitose, liegt der G₂-Kontrollpunkt, der bei DNA-Schäden aktiviert wird. Dieser Zellzyklusstopp wird durch einen p53-unabhängigen Weg initiiert, für das Aufrechterhalten des Arrests wird aber p53 benötigt (Taylor & Stark, 2001).

Der Übergang von Metaphase zu Anaphase wird vom Spindel-Kontrollpunkt überwacht, welcher durch freie, nicht besetzte Kinetochoren aktiviert wird. Solange nicht alle Chromosomen in der Metaphaseplatte ausgerichtet und in der richtigen Weise an die Spindelfasern angeheftet sind, wird die Aktivierung des anaphasefördernden Komplexes/Cyclosom (*anaphase-promoting complex/cyclosome*, APC/C) verhindert. Der aktivierte APC/C ist für die ubiquitinabhängige Proteolyse von Hemmstoffen der Anaphase und dadurch Inaktivierung der Proteinkomplexe, die in der Metaphase die Schwesterchromatiden verbinden, verantwortlich. Der Spindel-Kontrollpunkt verhindert den Übergang in die Anaphase, indem er die Bindung von Cdc20 (*Cell division cycle 20 homolog*) an den APC/C negativ reguliert. Cdc20 ist ein aktivierender Kofaktor des APC/C, welcher Proteine über Ubiquitinierung dem proteasom-abhängigen Abbau zuführt (Peters, 2002). Durch die Inhibition von Cdc20 werden vor allem die zwei Schlüsselsubstrate CyclinB und Securin vor dem Abbau geschützt. Securin ist der stöchiometrische Inhibitor der Protease Separase. Separase wird benötigt, um die Kohäsin-Komplexe, die die Schwesterchromatiden zusammenhalten, abzubauen (Peters, 2002). Die Proteolyse von CyclinB auf der anderen Seite inaktiviert Cdk1, was den Austritt aus der Mitose einleitet (Peters, 2002). Durch den verhinderten Abbau von CyclinB und Securin können diese Prozesse nicht stattfinden, weshalb die Zellen nicht in die Anaphase übergehen, bis der Spindel-Kontrollpunkt durch eine bipolare Bindung der Spindelfasern an den Kinetochoren inaktiviert wurde.

1.1.2 Die M-Phase

Die M-Phase ist die Zellzyklusphase, die mit der größten Umstrukturierung in der Zelle einhergeht. In der Mitose (griechisch *μιτος* = Faden) erfolgt dabei die Zellkernteilung, die der Zellteilung (Zytokinese) voran geht. Es erfolgt die Längsspaltung der Chromosomen in Chromatide und deren gleichmäßige Verteilung auf zwei Tochterkerne. Nach morphologischen Gesichtspunkten lässt sich die M-Phase in diskrete Abschnitte unterteilen: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (Abb. 1.3).

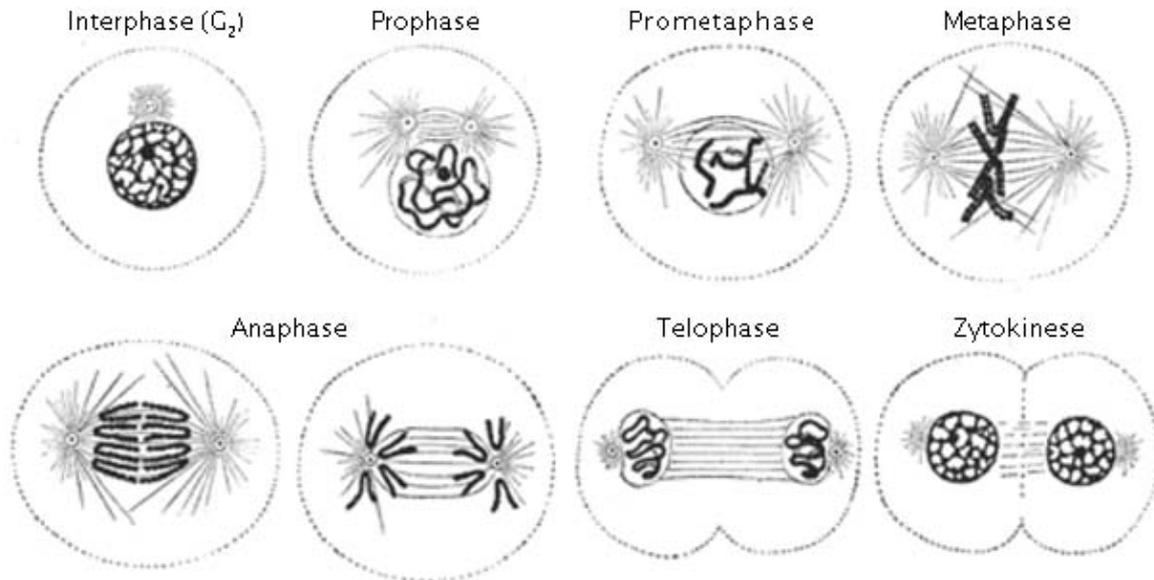


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Mitosestadien und Zellteilung einer eukaryotischen Zelle. (Modifiziert nach Gray, 1918).

Prophase und Prometaphase

In der Prophase kondensiert das Chromatin, so dass die Chromosomen lichtmikroskopisch sichtbar werden. Dabei werden die Chromatide verdichtet und schraubig aufgewunden, um die Chromosomen in eine Transportform zu überführen. Gleichzeitig trennen sich die Zentrosomen und wandern an die entgegengesetzten Pole der Zelle, welche die Spindelpole definieren. Die Spindelpole sind Mikrotubulus-Organisationszentren (*microtubule organising center*, MTOC), verankern die Minusenenden der Mikrotubuli und bilden so den Ausgangspunkt für die Mitosespindel. Die Spindel wird aus depolymerisierenden Mikrotubuli des Zytoskeletts aufgebaut (Compton, 2000) und ordnet sich zunächst sternförmig um die MTOCs an. Außerdem kommt es zur Auflösung der Kernmembran durch Phosphorylierung der Lamina. Durch die fragmentierte Kernmembran dringen Spindelfasern in den Bereich des Kerns ein und nehmen in der Prometaphase Kontakt mit den Kinetochoren auf. Dies ist ein komplexer Vorgang, der unter anderem durch das dynamische Suchen und Festhalten der Mikrotubuli durch die Kinetochore vermittelt wird (McIntosh et al., 2002). Kinetochore sind komplexe trilaminare Proteinstrukturen, welche an den Zentromeren der Chromosomen gebildet werden und die Interaktion der Chromatide mit den Spindelfasern vermitteln (Rieder & Salmon, 1998; Biggins & Walczak, 2003; Maiato & Sunkel, 2004).

Metaphase

Die Chromosomen sind jetzt maximal verkürzt und ordnen sich durch die Dynamik der Mikrotubuli und die Aktion von Motorproteinen im äquidistanten Abstand zwischen den Spindelpolen, in der Metaphaseplatte, an. Erst wenn alle Chromoso-

men korrekt angeordnet und bipolar an die Spindelfasern gebunden sind, erfolgt der Übergang in die Anaphase. Die korrekte, bipolare Interaktion der Spindelfasern mit den Kinetochoren wird u. a. durch physische Spannung an den Kinetochoren detektiert (Shah et al., 2004) und vom Spindel-Kontrollpunkt kontrolliert (siehe 1.1.1). Die Regulation des Spindel-Kontrollpunkts erfolgt über konservierte Komponenten, wie Mad2 (*Mitotic arrest deficient 2*), BubR1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles Related 1*) und Bub3 (*budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog*), dem sogenannten „mitotic checkpoint complex“ (MCC), der an nicht besetzte bzw. monoorientierte Kinetochore bindet (Shah et al., 2004; Musacchio & Salmon, 2007). Für die Korrektur von syntelisch oder merotelisch verbundenen Kinetochoren ist die Funktion des Chromosomal Passenger Komplexes (*chromosomal passenger complex, CPC*) essentiell. Aurora-B, ein Mitglied des CPC, kann nicht-bipolar gebundene Kinetochore lösen, rekrutiert dadurch den MCC und aktiviert den Spindel-Kontrollpunkt (Übersicht bei Vader et al., 2008). Zusätzlich generiert der CPC ein vom Spindel-Kontrollpunkt unabhängiges Signal, um den APC/C zu inhibieren, vermutlich um ein schwaches Signal des Spindel-Kontrollpunktes zu verstärken (Vader et al., 2007).

Anaphase

Durch die Proteolyse von CyclinB und Securin erfolgt die Aktivierung der Separase, die den Abbau der Kohäsine bewirkt. Die nun freien Schwesterchromatiden können über Mikrotubuli-Dynamik und die Aktion von molekularen Motoren an die Spindelpole segregiert werden. Gleichzeitig bildet sich die Zentralspindel aus, welche die Lage und die Ausbildung des kontraktilen Rings in der Telophase determiniert.

Telophase

Nach Erreichen der Spindelpole depolymerisieren die Spindelfasern und die Chromosomen dekondensieren. Die Kernmembranen bilden sich zurück.

Zytokinese

Die physische Trennung der neu entstandenen Zellen erfolgt in der Zytokinese, die bereits in der Anaphase beginnt. Die Teilungsfurche, ein kontraktiler Actomyosin-Ring, beginnt sich zu verengen, bis die Zellen nur noch über eine dünne zytoplasmatische Brücke verbunden sind (Glotzer, 2001). Diese Brücke enthält eine Struktur gebündelter Mikrotubuli und assoziierter Proteine, das sogenannte Mittelkörperchen. Dieses ist entscheidend an der Regulation der Zytokinese beteiligt. Schließlich wird der letzte Kontakt zwischen den Zellen, unter anderem durch Modulation der Zellmembran-Zusammensetzung aufgelöst (Glotzer, 2001).

Um die oben beschriebenen komplexen Vorgänge zu strukturieren, ist neben den Cdks ein Netzwerk weiterer regulatorischer Kinasen, u. a. Mitglieder aus den Familien Polo-, Aurora- und Nek-Kinasen, beteiligt (Nigg, 2001; Salaun et al., 2008). Die Plk1 (*Polo like kinase 1*) übernimmt vielfältige Aufgaben in der M-Phase. Sie wird mit der Aktivierung von Cdk1-CyclinB beim Eintritt in die Mitose, mit der Zentrosomenreifung durch Rekrutierung des γ -Tubulin-Komplexes, dem Spindelaufbau, der Teilung der Schwesterchromatide durch Entfernung des Kohäsins der Chromosomen-

arme, der Förderung des Metaphase-Anaphase-Übergangs durch Phosphorylierung des APC/C sowie mit dem Austritt aus der Mitose und der Zytokinese in Verbindung gebracht (Barr et al., 2004; Petronczki et al., 2008). Die Aurora-Kinasen sind an der Reifung der Zentrosomen und dem Spindelaufbau (Aurora-A), der Regulation des Spindel-Kontrollpunktes und der Zytokinese (Aurora-B, CPC) beteiligt (Ducat & Zheng, 2004; Vader & Lens, 2008). Die Nek-Kinasen sind humane Homologe zu den NIMA (*never in mitosis*)-Kinasen. Die verschiedenen Isotypen sind z. B. in der Zentrosomenreifung und Ausbildung der bipolaren Spindel (Nek2), sowie in der Regulation des Mitoseintritts, dem Spindelaufbau und der Steuerung des Metaphase-Anaphase-Übergangs (Nek9, Nek6 und Nek7) involviert (O'Regan et al., 2007).

1.2 Histonmodifikationen

Die genetische Information eines Organismus ist in der DNA kodiert, jedoch ist sie nicht alleiniger Überträger der Information von Mutter- zu Tochterzelle. Die Epigenetik beschreibt u. a. die Weitergabe von vererbbarer Information auf der Ebene von DNA-Verpackungsproteinen, den Histonen. In eukaryotischen Zellen ist die DNA im Zellkern als Chromatin verpackt, das mit Hilfe von Nukleosomen strukturell organisiert ist. Ein zentrales Heterotetramer der Histone H3 und H4, umgeben von jeweils zwei Heterodimeren der Histone H2A und H2B, bilden dabei einen oktameren Nukleosomenkern, um den 146 bp DNA gewickelt sind (Luger et al., 1997) (Abb. 1.4).

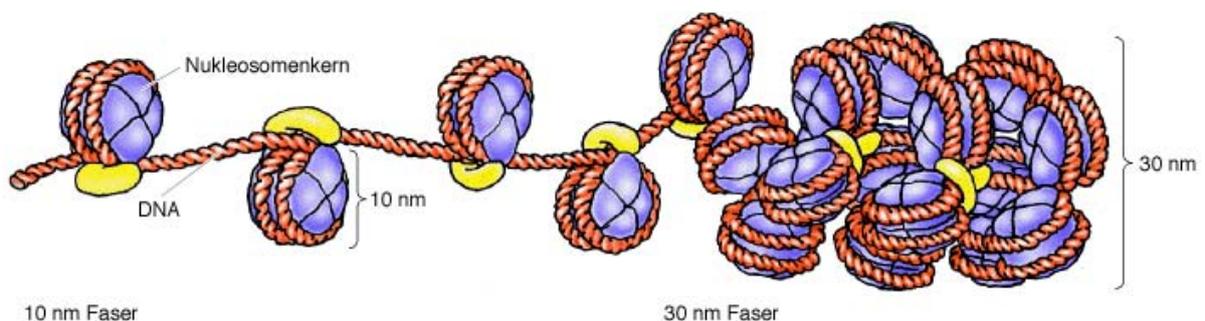


Abbildung 1.4: Solenoidmodell der 30 nm Faser aus kondensiertem Chromatin.

Die DNA (rot) ist um einen oktameren Nukleosomenkern (blau) gewickelt. Beide zusammen bilden ein Nukleosom, das mit einem Histon H1-Molekül (gelb) assoziiert ist. Diese so genannte 10 nm Faser spiralisiert sich zu einer Solenoidstruktur mit einem Durchmesser von 30 nm.

Histone bestehen aus einem hoch konservierten globulären Zentrum und einer, für die Nukleosomenstruktur entbehrlichen, N-terminalen Domäne, die außerhalb des Nukleosoms liegt (Luger et al., 1997). Vor allem der N-Terminus, aber auch das globuläre Zentrum der Histone können durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung posttranslational modifiziert werden (Abb. 1.5). Das resultiert in einer Änderung der Chromatinstruktur

und damit der Genaktivität (Spencer & Davie, 1999). Die Komplexität der posttranslationalen Modifikationen wird zusätzlich erhöht, indem Lysinreste ein, zwei oder drei Methylgruppen akzeptieren und auch Arginin entweder mono- oder di-methyliert vorliegen kann. Betrachtet man die Zahl der möglichen Histonmodifikationen an sämtlichen Nucleosomen und den verschiedenen Histonen einer Zelle, ist das Potenzial der Regulation durch Histonmodifikationen fast unermesslich. Aufgrund dieser

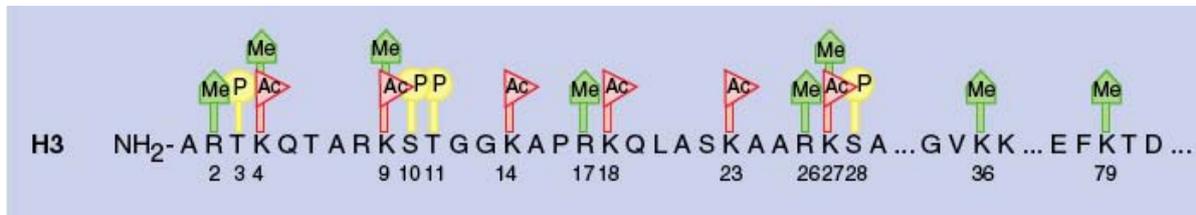


Abbildung 1.5: Bekannte posttranslationale Modifikationen am Beispiel von Histon H3.

Methylierung (Me) kann an Lysin oder Arginin, Phosphorylierung (P) an Serin oder Threonin und Acetylierung (Ac) an Lysinresten des Histon H3 erfolgen. (Modifiziert nach Peterson & Laniel, 2004).

Beobachtung wurde die Histon-Code-Hypothese (Strahl & Allis, 2000) aufgestellt, nach der jede Kombination posttranslationaler Histonmodifikationen eine Art Code darstellt, welcher von chromatin-bindenden Proteinen gelesen werden kann (Jenuwein & Allis, 2001).

1.2.1 Die Phosphorylierung von Histon H3

Die Phosphorylierung von Histonen wurde das erste Mal in den 1960er-Jahren beobachtet (Gutierrez & Hnilica, 1967). Es werden alle Histone phosphoryliert, im Folgenden wird aber ausschließlich die Phosphorylierung von Histon H3 näher betrachtet. Man kennt vier verschiedene Aminosäuren, an denen H3 in der Mitose phosphoryliert wird: Ser10 (Gurley et al., 1978), Ser28 (Goto et al., 1999), Thr3 (Shoemaker & Chalkley, 1980; Polioudaki et al., 2004) und Thr11 (Preuss et al., 2003b).

Die Phosphorylierung von H3 am Ser10 und Ser28 ist vermutlich an der Chromosomenkondensation während der Zellteilung beteiligt (Hendzel et al., 1997; Goto et al., 1999). Zusätzlich korreliert die H3-Ser10-Phosphorylierung mit der Auflockerung des Chromatins während der Transkriptionsaktivierung (Übersicht bei Prigent & Dimitrov (2003)). Daraus kann man schließen, dass die Phosphorylierung nur ein initiales Ereignis darstellt und die jeweils nachfolgenden Prozesse durch andere Proteine vermittelt werden. In der Mitose beginnt die Phosphorylierung am Ser10 und Ser28 während der späten G₂-Phase in der perizentrischen Region des Heterochromatins und breitet sich bis zur Prophase über die gesamte Länge der Chromosomenarme aus (Hendzel et al., 1997). Am stärksten ist die Phosphorylierung während der Prometaphase/Metaphase, wenn die Chromosomen vollständig kondensiert vorliegen, was bis zur Anaphase andauert. Danach verschwindet sie wieder (Hendzel et al., 1997; Van Hooser et al., 1998). In *Tetrahymena* ist am Ser10 phosphoryliertes H3 Voraussetzung für eine regelgerechte Mitose und Chromosomenkondensation (Wei

et al., 1999). Die Mikroinjektion von H3pS10-Peptiden in Säugerzellen und dadurch vermutlich Sättigung der entsprechenden Kinase führte zu einem Stillstand des Zellzyklus in der G₂-Phase und verhinderte die Chromosomenkondensation (Van Hooser et al., 1998). Andere genetische Daten legen jedoch nahe, dass die H3-Ser10-Phosphorylierung nicht für die Chromosomenkondensation erforderlich ist. Hefemutanten, in denen der entsprechende Serinrest mutiert ist (H3S10A), zeigen ein normales Zellzyklusverhalten (Hsu et al., 2000). Auch *in-vivo*-Experimente in *Drosophila* zeigen nur eine schwache Korrelation zwischen dieser Phosphorylierung und der Chromosomenkondensation (Adams et al., 2001). Neuere Studien gehen davon aus, dass die Phosphorylierung von H3 am Ser10 an der Reduzierung der Schwesterchromatidkohäsion beteiligt sein könnte (Gimenez-Abian et al., 2004). Aurora-B ist die für die H3-Ser10- und -Ser28-Phosphorylierung verantwortliche Kinase (Hsu et al., 2000; Adams et al., 2001; Crosio et al., 2002). Die korrespondierende Phosphatase ist die Protein-Phosphatase PP1 (Hsu et al., 2000; Prigent & Dimitrov, 2003).

Der zeitliche Ablauf der Phosphorylierung von H3 am Thr3 (Polioudaki et al., 2004) ist mit der Phosphorylierung am Ser10 vergleichbar. Allerdings finden sich Unterschiede in der Lokalisation der modifizierten Histone. In der späten G₂-Phase erscheint die Thr3-Phosphorylierung in einem punktförmigen Muster verteilt über die Chromosomenarme, wogegen die Ser10-Phosphorylierung diffuser über diese Region verbreitet ist. In der späten Prophase ist die Thr3-Phosphorylierung in der inneren Zentromerregion lokalisiert (Dai et al., 2005). Die Phosphorylierung von Thr3 beeinflusst in der Prometaphase die Kohäsion oder Kondensation der Chromosomenarme und ist ab der Metaphase möglicherweise an der Regulation der Schwesterchromatidkohäsion an den Zentromeren bzw. am Kinetochoraufbau beteiligt und wird durch die Haspin Kinase vermittelt (Dai et al., 2005).

Die Phosphorylierung von H3 am Thr11 tritt ebenfalls in der Mitose auf und zeigt eine ähnliche zeitliche Abfolge wie die bereits beschriebenen mitotischen Phosphorylierungen. Sie erscheint in der Prophase, ist am deutlichsten in der Prometaphase/Metaphase und verschwindet in der frühen Anaphase wieder (Preuss et al., 2003b; Zhou et al., 2007). Die Thr11-Phosphorylierung tritt ausschließlich im Bereich der Zentromere auf und ist eventuell zusammen mit phosphorylierten CENP-A (*centromere protein A*) am Assembly der Kinetochore beteiligt (Zeitlin et al., 2001; Preuss et al., 2003b). Die für diese Phosphorylierung in der Mitose verantwortliche Kinase ist vermutlich die ZIPK, da sie H3 am Thr11 *in vitro* phosphoryliert und zeitgleich mit dem Auftreten der Thr11-Phosphorylierung mit den Zentromeren assoziiert ist (Preuss et al., 2003b). Ähnlich wie die Ser10- spielt auch die Thr11-Phosphorylierung in mehreren zellulären Prozessen eine Rolle. Sie ist an der androgenabhängigen Transkriptionsregulation beteiligt. In diesem Zusammenhang wird H3 durch die PRK1 (*protein kinase C related kinase 1*) am Thr11 phosphoryliert. Das führt zu einer Demethylierung und anschließender Acetylierung von H3 Lys9 und bewirkt eine Aktivierung der Transkription androgen-regulierter Gene (Metzger et al., 2007). Eine weitere H3 Thr11 Kinase ist Chk1 (*checkpoint kinase 1*), die H3 während des Zellzyklus phosphoryliert. Beim Auftreten von DNA-Schäden kommt es zu einer Dissoziation von Chk1 vom Chromatin, dadurch zu einer verminderten H3-Thr11-Phos-

phorylierung und Repression von Genen, wie *cdk1* und *cyclin B1* in Korrelation mit reduzierter H3-Lys9-Acetylierung (Shimada et al., 2008).

1.3 Die ZIPK

Die ZIPK, auch DAPK3 oder Dlk genannt, ist eine Serin/Threonin-Kinase die erstmals 1998 von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde die ZIPK aus der Maus als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor 4*) identifiziert. Da in diesem Versuch das Leucin-Zipper-Motiv von ATF4 als Köder eingesetzt wurde, bezeichnete man die gefischte Kinase als zipper-interagierende Proteinkinase (*zipper interacting protein kinase*, ZIPK) (Kawai et al., 1998). Zeitgleich wurde bei einer Suche nach Proteinkinasen, die an der Wachstumskontrolle beteiligt sind, aus einer Ratten-cDNA-Bank die Dlk (*death-associated protein (DAP) like kinase*) isoliert, die ihren Namen aufgrund der hohen Sequenzidentität zur DAPK (*death-associated protein kinase*) erhielt (Kögel et al., 1998). Ein Sequenzvergleich der beiden Proteine ergab, dass es sich um Orthologe handelt. Spätere Untersuchungen zeigten, dass es ZIPK-spezifische evolutionäre Unterschiede zwischen der murinen und der humanen Form gibt (Shoval et al., 2007).

Die ZIPK gehört mit vier weiteren Mitgliedern zur DAPK-Familie. Die DAPK, das Gründermotiv dieser Familie, ist eine Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-abhängige Kinase, die eine Rolle beim Interferon- γ - und Tumor-Nekrose-Faktor- α -induzierten Zelltod spielt und im Zytoplasma am Aktin-Zytoskelett lokalisiert ist (Cohen et al., 1997). Neben ZIPK und DAPK gehören die DAPK2 (*DAP kinase 2*) oder DRP-1 (*DAP related kinase protein-1*) (Kawai et al., 1999; Inbal et al., 2000), DRAK1 und DRAK2 (*DAP related apoptosis-inducing kinase 1 und 2*) (Sanjo et al., 1998) zur DAPK-Familie, deren Mitglieder sich durch eine hohe Sequenzidentität ihrer N-terminalen katalytischen Domäne auszeichnen. Die C-terminale Region dieser Kinasefamilie ist dagegen sehr verschieden. Die DAPK und DAPK2/DRP-1 enthalten in diesem Bereich eine CaM-Binderegion und die DAPK ferner acht Ankyrin-Wiederholungen, eine Zytoskelett-Binderegion und eine sogenannte Todesdomäne. Die ZIPK besitzt als einzige Kinase dieser Familie ein C-terminales Leucin-Zipper-Motiv, die eine Homo- sowie eine Heterodimerisierung vermitteln kann. DRAK1 und DRAK2 besitzen im C-Terminus keine bekannten Struktur motive.

Die ZIPK ist ein 454 Aminosäuren (human) bzw. 448 Aminosäuren (murin) großes Protein mit einer molekularen Masse von etwa 52 kDa. Neben der N-terminalen Kinasedomäne (AS 13-275) und dem C-terminalen Leucin-Zipper-Motiv (AS 427-441 (human) bzw. AS 411-448 (murin)) wurden insgesamt vier putative Kernlokalisationssequenzen (*nuclear localization signal*, NLS) identifiziert. Für die murine ZIPK konnte gezeigt werden, dass die NLS4 (AS 405-410) notwendig und hinreichend für die Kernlokalisierung ist (Kögel et al., 1999).

1.3.1 Lokalisation der ZIPK

In der Zelle ist die murine ZIPK vor allem im Zellkern lokalisiert und assoziiert dort mit punktförmigen Strukturen, sogenannten „Speckles“. Versuche mit Deletions- und kinaseinaktiven Mutanten zeigten, dass sowohl die Kinaseaktivität, als auch das Leucin-Zipper-Motiv für diese Lokalisation notwendig sind (Kögel et al., 1999). Weiterführende Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass die „Speckles“ partiell mit den PML-NBs (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*) kolokalisieren (Kögel et al., 1998; Kawai et al., 2003). PML-NBs sind subnukleäre Multiproteinkomplexe, die neben einer Vielzahl weiterer Proteine hauptsächlich aus dem Protein PML bestehen und eine wichtige Funktion bei der Transkriptionsregulation, Tumorsuppression, Wachstumskontrolle, zellulärer Seneszenz und Apoptose einnehmen (Salomoni & Pandolfi, 2002). Für die humane ZIPK wurde eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation, mit einem geringen Anteil an Zellen mit diffuser Kernlokalisation, beschrieben (MacDonald et al., 2001b; Komatsu & Ikebe, 2004; Shoval et al., 2007). Die Mutation der Aminosäuren Thr299/300 (T299A/T300A) führt zu einer Relokalisation der humanen Kinase aus dem Zytoplasma in den Kern. Diese Aminosäuren sind in der murinen Kinase nicht konserviert, wo sie durch Alanin repräsentiert werden. Die Vermutung, dass eine Mutation von Ala299/300 (A299T/A300T) zu einer Relokalisation der murinen ZIPK aus dem Kern in das Zytoplasma führt, wurde nicht bestätigt. Allerdings zeigt diese Mutante keine Kolokalisation mit den PML-NBs mehr und ist eher nukleoplasmatisch lokalisiert (Shoval et al., 2007).

1.3.2 Regulation der Aktivität der ZIPK

Während des gesamten Zellzyklus wird die ZIPK konstitutiv exprimiert (Preuss et al. (2003a), Scheidtmann und Landsberg, unveröffentlicht) und zeichnet sich durch eine starke autokatalytische Aktivität aus. Es wurden bisher sechs Autophosphorylierungsstellen beschrieben: Thr180, Thr225, Thr265 liegen in der katalytischen Domäne und Thr299, Thr306 und Ser311 in der extrakatalytischen Domäne. Durch die Autophosphorylierung in der katalytischen Domäne kann die Kinaseaktivität der ZIPK reguliert werden (Graves et al., 2005). Die Phosphorylierung von Thr299 beeinflusst die Lokalisation der ZIPK (siehe 1.3.1) (Shani et al., 2004), wogegen die Funktion der Phosphorylierung am Thr306 und Ser311 noch nicht geklärt werden konnte (Graves et al., 2005). Weitere Studien zeigten, dass die humane ZIPK ein Substrat der Rho-Kinase (ROCK1) ist. Die beiden Autophosphorylierungsstellen Thr265 und Thr299 können auch von ROCK1 phosphoryliert werden, wobei die Phosphorylierung von Thr265 durch ROCK1 notwendig für die Aktivierung der humanen ZIPK ist (Hagerty et al., 2007). Außerdem ist die ZIPK Substrat der DAPK und wird an mindestens sechs Aminosäuren (Thr299, Ser309, Ser311, Ser312, Ser318 und Ser326) durch die DAPK phosphoryliert. Dadurch kann die DAPK die Lokalisation (Thr299) der ZIPK beeinflussen, ein direkter Effekt auf die Aktivität konnte aber nicht gezeigt werden (Shani et al., 2004).

1.3.3 Substrate und Interaktionspartner der ZIPK

Dass die ZIPK eine wichtige Rolle innerhalb des Zellzyklus einnimmt, lässt sich anhand der bisher beschriebenen Substrate und Interaktionspartner erkennen. Durch Sequenzvergleiche der unmittelbaren Umgebung bereits bekannter Phosphorylierungsstellen in diversen Substraten lässt sich folgende Konsensussequenz ableiten: (R/K)XY(S/T)Y, wobei X für eine beliebige Aminosäure, aber bevorzugt Arginin oder Lysin und Y für eine beliebige Aminosäure, aber nicht Prolin oder saure Reste steht (Scheidtmann, 2007). Neben den Sequenzvoraussetzungen scheinen aber auch strukturelle Bedingungen eine Rolle zu spielen. Dass die Sequenz allein nicht hinreichend für die Substratspezifität ist, zeigt das Beispiel STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Die beschriebene Phosphorylierungsstelle Ser727 (₇₂₄LPMpSP₇₂₈) entspricht nicht der Konsensussequenz, wird aber von der humanen ZIPK phosphoryliert (Sato et al., 2005). Ebenso entspricht die Autophosphorylierungsstelle Thr180 (₁₇₇IFGpTP₁₈₁) nicht der Konsensussequenz.

Zu den Substraten der ZIPK zählen die leichte Kette des Myosin II (*myosin light chain*, MLC), die von allen Mitgliedern der DAPK-Familie zumindest *in vitro* phosphoryliert wird (Komatsu & Ikebe, 2004). Weiterhin wurden das Histon H3 (Kögel et al., 1998; Preuss et al., 2003b), α - und/oder β -Tubulin (Preuss et al., 2003a), das pro-apoptische Protein Par-4 (*prostate apoptosis response-4*) (Page et al., 1999a) und der Transkriptionsfaktor STAT3 (Sato et al., 2005), sowie das Myosin-Bindeprotein MYPT1 (*myosin phosphatase targeting protein-1*) (MacDonald et al., 2001a), der Myosin-Phosphataseinhibitor CPI-17 (MacDonald et al., 2001b), Peptide des p53-Regulators Mdm2 (*murine double minute 2*) und der Cdk-Inhibitor p21^{waf} (Burch et al., 2004) als *in-vitro*-Substrate beschrieben. Als Interaktionspartner der murinen ZIPK konnten bisher Daxx (*death-associated protein 6*) (Kawai et al., 2003) und die Transkriptionsfaktoren ATF4 (Kawai et al., 1998; Page et al., 1999a), AATF (*apoptosis antagonizing transcription factor*) (Page et al., 1999b), CDC5 (*cell division cycle 5*) (Engemann et al., 2002) und STAT3 (Sato et al., 2005), sowie der Androgenrezeptor (Leister et al., 2007) und γ -Tubulin (Preuss et al., 2003a) identifiziert werden. Für die humane ZIPK wurden p21^{waf} (Burch et al., 2004) und der Androgenrezeptor (Leister et al., 2007) als Interaktionspartner beschrieben. Darüber hinaus interagiert die humane ZIPK auch mit der DAPK und ROCK1, welche eine regulierende Wirkung auf die ZIPK ausüben (siehe 1.3.2) (Shani et al., 2004; Hagerty et al., 2007). Für Par-4 wurde eine Interaktion mit der murinen ZIPK beschrieben (Page et al., 1999a), was für die humane ZIPK nicht bestätigt werden konnte (Shoval et al., 2007).

1.3.4 Funktionen der ZIPK

Transkriptionsregulation

Die Interaktion der ZIPK mit verschiedenen Transkriptions(ko)faktoren, lässt vermuten, dass sie an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Bisher wurden nur für die Interaktionspartner STAT3 und den Androgenrezeptor ein direkter Einfluss der ZIPK auf die Transkriptionsregulation beschrieben (Sato et al., 2005; Leister et al., 2007).

STAT3 ist Interaktionspartner und Substrat der murinen ZIPK. Die Phosphorylierung durch die ZIPK steigert seine Transaktivierungsaktivität (Sato et al., 2005). In Bezug auf die androgenrezeptor-vermittelte Transkription bindet die ZIPK zusammen mit AATF an Promotoren und bewirkt ebenfalls eine Steigerung der Aktivität. Allerdings sind weder Androgenrezeptor noch AATF Substrate der ZIPK, so dass der Wirkungsmechanismus unklar ist (Leister et al., 2007).

Beteiligung an der Apoptose

Die zelluläre Lokalisation der ZIPK steht in direktem Zusammenhang mit ihrem apoptoseauslösenden Potenzial. Transloziert die murine ZIPK durch die Interaktion mit Par-4 aus dem Kern ins Zytoplasma, führt das zur Apoptose der Zelle. Wird durch eine C-terminale Deletion der letzten 110 Aminosäuren neben dem Leucin-Zipper-Motiv auch die NLS4 entfernt, hat das ebenfalls zur Folge, dass die ZIPK im Zytoplasma verbleibt und dort mit Aktinmyosinfilamenten des Zytoskeletts assoziiert. Es kommt zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, einer starken Kontraktion der Aktinmyosinfilamente und der Induktion der Apoptose. Im murinen System ist die Rekrutierung der ZIPK an das Aktin-Zytoskelett abhängig von Par-4 und dessen Phosphorylierung am Thr155 durch die ZIPK.

Die Überexpression der humanen ZIPK führt, ausgelöst durch die Phosphorylierung von MLC, ebenfalls zum Zelltod (Mills et al., 1998; Murata-Hori et al., 2001). Da die überexprimierte humane ZIPK bereits im Zytoplasma vorliegt, erfolgt dieser Prozess Par-4-unabhängig (Shoval et al., 2007) und wird möglicherweise durch die *trans*-Phosphorylierung der ZIPK durch die DAPK forciert (Shani et al., 2004).

Assoziation mit dem Zytoskelett

Die Phosphorylierung von MLC durch die ZIPK hat nicht nur eine Funktion während der Apoptose, sondern bewirkt auch eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellpolarität, der Zellmotilität und der Zytokinese. Hinweise auf die Beteiligung der humanen ZIPK an diesen Prozessen gaben vor allem siRNA-Experimente, die zu einem Verlust der Zellpolarität und der Migrationseffizienz sowie zu einer verminderten MLC-Phosphorylierung führten (Komatsu & Ikebe, 2004). Der Phosphorylierungsstatus von MLC kann auf direktem oder indirektem Weg von der ZIPK beeinflusst werden. Zusätzlich zur direkten Phosphorylierung, kann die ZIPK die Dephosphorylierung von MLC verhindern. Die ZIPK assoziiert mit MYPT1, einer Untereinheit der PP1c (Protein Phosphatase 1c) (MacDonald et al., 2001a; Endo et al., 2004), und inhibiert MYPT1 durch Phosphorylierung. Gleichzeitig kann die ZIPK durch Phosphorylierung CPI-17, einen Inhibitor der Myosin Phosphatase aktivieren (MacDonald et al., 2001b).

Aufgabe in der Mitose

Experimente mit ektopisch exprimierter GFP-ZIPK zeigten eine Assoziation mit unterschiedlichen mitotischen Strukturen, wie Zentrosomen, Zentromeren, kontraktilem Ring und Mittelkörperchen (Preuss et al., 2003b). Die Assoziation mit den Zentrosomen erfolgt während des gesamten Zellzyklus, mit dem stärksten Signal in der G₂- und M-Phase. Durch Koloalisation und Koimmunopräzipitation der ZIPK mit

γ -Tubulin konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Ebenfalls während der Mitose und zwar ausschließlich von der Prophase bis zur frühen Anaphase assoziiert die murine ZIPK mit den Zentromeren. Diese Assoziation stimmt zeitlich mit dem Auftreten von phosphoryliertem CENP-A und am Thr11 phosphoryliertem Histon H3 überein. Von der Telophase bis zur Zytokinese kolokalisiert die ZIPK mit dem kontraktilen Ring und zwar mit am Ser19 phosphoryliertem MLC. In diesem Zusammenhang führten die Expression von Deletionsmutanten sowie das Herunterregulieren der ZIPK durch siRNA zu mehrkernigen Zellen, was die Vermutung nahelegt, dass die ZIPK in Bezug auf die MLC-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielt (Manderscheid und Scheidtmann, in Vorbereitung).

Während der Mitose zeigt die ZIPK ein ähnliches Lokalisationsmuster wie die mitotische Kinase Aurora-B. Aurora-B ist Mitglied des Chromosomal Passenger Komplexes (*chromosomal passenger complex, CPC*). Der CPC zeichnet sich durch eine charakteristische Lokalisation während der Mitose aus. Die in der G₂-Phase nukleären Proteine assoziieren mit den kondensierenden Chromosomen während der Prophase, akkumulieren dann im inneren Kinetochor in der Prometa- und Metaphase, wandern am Metaphase-Anaphase-Übergang an die Zentralspindel, um schließlich in der Zytokinese im Mittelkörperchen zu lokalisieren. Da die ZIPK mit den Zentromeren, dem kontraktilen Ring und mit dem Mittelkörperchen assoziiert, könnte sie eventuell mit dem CPC an diesen Strukturen interagieren.

1.4 Der Chromosomal Passenger Komplex, CPC

Der CPC beschreibt eine Gruppe von Proteinen, die verschiedene mitotische Prozesse koordinieren. Der Komplex besteht aus Aurora-B (Terada et al., 1998) und den drei nicht-enzymatischen Mitgliedern INCENP (Cooke et al., 1987; Adams et al., 2000), Survivin (Wheatley et al., 2001) und Borealin/DasraB (Gassmann et al., 2004). Letztere drei sind für die enzymatische Aktivität und Stabilität von Aurora-B sowie für die Lokalisation des CPC verantwortlich. Wird mittels siRNA eine dieser Komponenten herunterreguliert, führt das zu einer Fehllokalisierung aller anderen Mitglieder des CPC. Das hat zur Folge, dass mitotische Zellen in der Prometaphase auflaufen und Fehler in der Chromosomenverteilung und der Spindelmorphologie aufweisen. Beenden diese Zellen die Mitose und gehen in die Interphase sind sie meist multinukleär oder besitzen Mikronuklei (Honda et al., 2003).

INCENP

Innerhalb des CPC stellt INCENP (*Inner Centromere Protein*) eine Art Gerüst dar, mit dem die anderen Mitglieder interagieren (Abb. 1.6). Der N-Terminus enthält eine Bindedomäne für Survivin und Borealin (AS 1-58), die die Zentromerlokalisierung vermitteln (Honda et al., 2003; Gassmann et al., 2004; Klein et al., 2006), gefolgt von einer β -Tubulin-Bindedomäne, die für die Lokalisation des CPC an die Zentralspindel benötigt wird (Wheatley et al., 2001; Ainsztein et al., 1998). Direkt daneben liegt eine *in vitro* kartierte Interaktionsdomäne (AS 135 -270) für Heterochromatin-Protein-1 α (HP1 α) (Ainsztein et al., 1998). Über eine hoch konservierte C-terminale Domäne, der

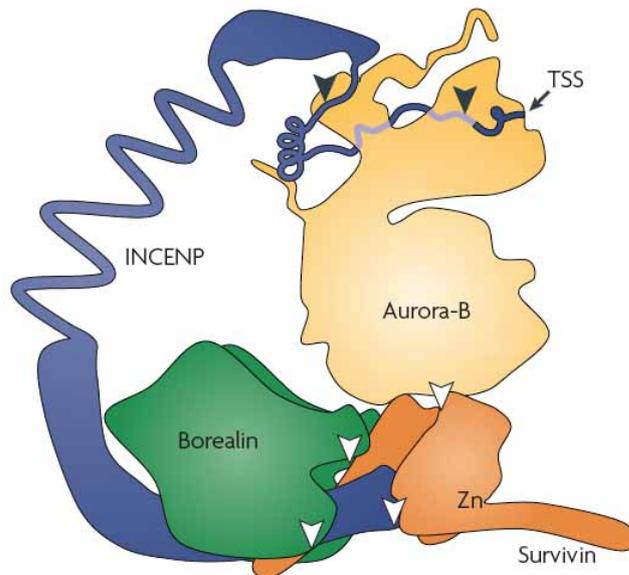


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des CPC.

INCENP ist Bindeglied für die Interaktion mit den übrigen CPC-Mitgliedern. Survivin und Borealin interagieren mit dem N-Terminus von INCENP (AS 1-58 bei humanem INCENP). Der N-Terminus von Aurora-B interagiert mit der IN-Box (zwischen den beiden schwarzen Pfeilspitzen, AS 822-900 bei humanem INCENP) im C-Terminus von INCENP. Interaktionen innerhalb des Komplexes sind durch weiße Pfeilspitzen dargestellt. Die schematische Darstellung von Aurora-B und der assoziierten Region des C-Terminus von INCENP ist aus der Röntgenstrukturanalyse (Sessa et al., 2005) des Komplexes abgeleitet. (Modifiziert nach Ruchaud et al., 2007).

IN-Box, bindet INCENP an Aurora-B (Adams et al., 2000; Kaitna et al., 2000). Außerdem interagiert INCENP noch mit zwei weiteren mitotischen Kinasen, Cdk1 und Plk1, und erfüllt damit, unabhängig von Aurora-B, noch weitere Funktionen in der Mitose (Goto et al., 2006).

Aurora-B

Aurora-B ist eine hoch konservierte Serin/Threonin-Kinase, dessen Expression und Aktivität in proliferierenden Zellen zellzyklusabhängig ist. Die höchste Expression erfolgt am G₂-M-Übergang mit maximaler Kinaseaktivität in der Mitose (Bischoff et al., 1998; Terada et al., 1998). Die Bindung von Aurora-B an INCENP führt über die Phosphorylierung von INCENP und einer positiven Rückkopplung zur vollständigen Aktivierung von Aurora-B (Bishop & Schumacher, 2002; Sessa et al., 2005).

Survivin

Survivin ist Mitglied der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie und trägt eine BIR-Domäne (*baculovirus IAP repeat*), die für die Dimerisierung notwendig ist (Chantalat et al., 2000; Muchmore et al., 2000; Verdecia et al., 2000). Survivin bindet an die anderen drei CPC-Mitglieder, wird von Aurora-B phosphoryliert (Carvalho et al., 2003; Verdecia et al., 2000) und ist für die Lokalisation des CPC an die Zentromere notwendig (Vader et al., 2006). Darüber hinaus gibt es Studien, die belegen, dass Survivin zur Aktivierung von Aurora-B beiträgt (Bolton et al., 2002; Chen et al., 2003) oder nicht (Honda et al., 2003). Die weitere Funktion von Survivin wird kontrovers diskutiert. Es gibt Orthologe von Survivin, vor allem Bir1 aus *C.elegans*, denen eine ausschließliche Funktion im Zellzyklus zugesprochen wird. Aber es fehlen Survivin bestimmte Struktur motive (z. B. XIAP), die in anderen IAP-Mitgliedern die Interaktion mit den Caspasen vermitteln. Die Bildung von funktionellen Survivin-Caspase-Komplexen ist daher stark umstritten, obwohl in einer Vielzahl von Versuchen die

anti-apoptotische Wirkung von Survivin nachgewiesen werden konnte (Übersicht bei Altieri (2006); Knauer et al. (2007)).

Borealin

Borealin ist vermutlich identisch mit CSC-1 (*chromosome segregation and cytokinesis defective-1*) aus *C.elegans* (Romano et al., 2003). Es wird von Aurora-B *in vitro* phosphoryliert (Gassmann et al., 2004); die funktionelle Relevanz ist bisher aber nicht bekannt. In borealin-defizienten Zellen bindet Survivin nicht an INCENP, weshalb Borealin eine Rolle in der Stabilisierung der Survivin-INCENP Interaktion zugesprochen wird (Vader et al., 2006). Außerdem bindet Borealin *in vitro* an DNA und könnte daher auch eine Funktion bei der Lokalisation des CPC an perizentromerisches Heterochromatin ausüben (Klein et al., 2006; Monier et al., 2007).

Die Funktion des CPC

Auf seiner Wanderung während der Mitose interagiert und agiert der CPC mit einer Vielzahl an Substraten. Er ist mit für den Austausch von HP1 α in mitotischen Chromosomen durch die Modifikation von Histon H3 in der Prophase verantwortlich, fördert die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte, indem er Fehlanschlüsse von den Spindelfasern an die Kinetochore korrigiert, beteiligt sich an der Organisation und dem Aufbau der Zentralspindel und ist notwendig für die Zytokinese (Übersicht bei Ruchaud et al., 2007). Dabei wird mit INCENP als Plattform nicht nur der CPC an die unterschiedlichen mitotischen Strukturen geleitet, sondern auch durch Cdk1-Phosphorylierung von INCENP, eine Interaktion mit Plk1 ermöglicht, welche so an die Zentromere rekrutiert wird (Goto et al., 2006).

1.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der ZIPK und der Bedeutung der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose.

Es wurde eine mögliche Beziehung zwischen der ZIPK und dem Chromosomal Passenger Komplex, speziell von Aurora-B, untersucht. Beide Kinasen interagieren mit verschiedenen mitotischen Strukturen und weisen eine ähnliche Lokalisation in der Mitose auf. Aurora-B wandert von den Zentromeren in der Metaphase im Übergang zur Anaphase an die Zentralspindel und lokalisiert in der Zytokinese mit dem Mittelkörperchen. Die ZIPK assoziiert mit den Zentrosomen, den Zentromeren und dem kontraktilen Ring. Die Assoziation der ZIPK mit den Zentromeren korreliert dabei mit der Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11. Um zu klären, ob die ZIPK, die Histon H3 am Thr11 *in vitro* phosphoryliert, auch *in vivo* dafür verantwortlich ist, wurden siRNA-Experimente durchgeführt. Außerdem wurde durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren versucht zu ermitteln, ob eine andere mitotische Kinase für diese Modifikation von H3 verantwortlich sein könnte. Weiterhin wurden stabil transfizierte H3-GFP-Zelllinien verwendet, um Aufschluss über die Funktion der Histon H3 Phosphorylierung zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, Calbiochem, Roth, Invitrogen, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen. Radiochemikalien, [³²P]- γ -ATP, stammten von GE Healthcare und Hartmann. Enzyme wurden von den Firmen NEB, Promega und Roche Molecular Biochemicals bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

Für Klonierungen wurden chemisch kompetente Bakterien (Hanahan, 1983, modifiziert) der unten aufgeführten Stämme verwendet. Die Kultur der Bakterien erfolgte wie in Sambrook & Russel (2001) beschrieben.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>genetischer Marker</i>	<i>Referenz</i>
<i>E.coli</i> DH5 α	F^- , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> TOP10	F^- , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , Φ 80d, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpdL</i> (Str ^R)	Invitrogen

2.1.3 Zelllinien und Zellkultur

Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Spezies</i>	<i>Histologische Herkunft</i>
MCF-7	human	Adenokarzinom, Brust
PC3	human	Prostatakarzinom
Hela	human	Zervixkarzinom
HEK293	human	embryonale Nierenzellen mit Adenovirus-E1-Genen transformiert
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovargewebe des Puppenstadiums

Alle Säugerzellen wurden bei 37 °C in einer 5 % oder 10 % CO₂-Atmosphäre in DMEM (Gibco) bzw. RPMI-1640 supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert.

Sf9-Zellen wurden bei 27 °C in Sf-900 II serumfreiem Medium (Gibco) supplementiert mit 50 µg/ml Gentamycin kultiviert.

2.1.4 Inhibitoren

Die nachfolgend aufgeführten Inhibitoren wurden in der angegebenen Konzentration in der Zellkultur oder im *in-vitro*-Kinase-Assay verwendet:

Tabelle 2.3: Verwendete Inhibitoren

<i>Name</i>	<i>inhibiert</i>	<i>Konzentration</i>
Hesperadin	Aurora-B-Kinase (Hauf et al., 2003)	100 nM
ZM447439	Aurora-B-Kinase (Ditchfield et al., 2003)	2 µM
Ro3306	Cdk1 (Vassilev et al., 2006)	9 µM
Roscovitine	Cdk1/2 (Planchais et al., 1997)	10 µM
LFM-A13	Plk1 (Uckun et al., 2007)	100 µM
TAL	Plk1 (Santamaria et al., 2007)	500 nM
Okadaic Acid	PP1, PP2a (Bialojan & Takai, 1988)	100 nM
Ro318220	PRK1/2 (Metzger et al., 2007)	3 µM
Y-27632	ROCK (Uehata et al., 1997)	50 µM
H7	ZIPK (Sato et al., 2005)	5 µM
Nocodazol	Depolymerisation von Mikrotubuli	41,7 ng/ml
Thymidin	Ribonukleotid-Reduktase	2 mM

2.1.5 Oligonukleotide und siRNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Nachstehend sind die Sequenzen aller verwendeter Oligonukleotide, ihre Position in Bezug zur cDNA und ihre Schmelztemperatur (T_m) angegeben.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>T_m in °C</i>
β-Aktin-USP	5'-CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3'	182-203	60
β-Aktin-DSP	5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'	424-403	60
ZIPK-cDNA-f	5'-GGTGTCATCACCTATATCCTCC-3'	610-631	54
ZIPK-cDNA-r	5'-GGGCAATGGTCATTCTCCGC-3'	802-782	54

Für die Herunterregulation von endogener ZIPK, PRK1 und PRK2 in der Zellkultur wurden verschiedene synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle verwendet. Diese trugen im 3'-Bereich 2 nt lange Uridin-Überhänge und lagen bereits hybridisiert vor. Daher wurden sie nur in *siRNA Universal Buffer* (Dharmacon) oder nuklease-freiem Wasser (Ambion) gelöst. In der Tabelle sind die Sequenzen in Sinnrichtung angegeben. Die verwendeten siRNA-Hybride setzen sich zusätzlich noch aus dem jeweils entsprechenden Strang in Gegensinnrichtung zusammen. Die angegebene Position bezieht sich auf den Bereich der cDNA des Proteins, zu dem die Sequenz der siRNA homolog ist.

Tabelle 2.5: Verwendete siRNA-Moleküle

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Quelle</i>
ZIPK K1	5'-CAUCCUGCGGGAGAUCGGUU-3'	197-218	Kawai et al., 2003
ZIPK-1	5'-GAACAUUCCUGGAUUAAGGUU-3'	810-829	Dharmacon
ZIPK-2	5'-CCACGCGUCUGAAGGAGUAUU-3'	895-914	Dharmacon
ZIPK-3	5'-GAGCCAGGCCCGUAAGUUCUU-3'	3'-UTR	Dharmacon
ZIPK-4	5'-GAGGAGUACUUCAGCAACAUU-3'	711-730	Dharmacon
ZIPK #128	5'-GGAGUACACCAUCAAGUCGUU-3'	909-927	Ambion
ZIPK #129	5'-GGAGUACGCAGCCAAGUUCUU-3'	110-139	Ambion
PRK1-1	5'-CCUCGAAGAUUUCAGUUCUU-3'	1833-1851	Dharmacon
PRK1-2	5'-ACAGUAAGACCAAGAUUGAUU-3'	515-533	Dharmacon
PRK1-3	5'-ACAGCGACGUGUUCUCUGAUU-3'	2123-2141	Dharmacon
PRK1-4	5'-GAGAAGCAGUUGGCCAUUGUU-3'	394-412	Dharmacon
PRK2	5'-GGAUCGAAUUAAGAGAGAAUU-3'	481-499	Ambion

2.1.6 Puffer und Lösungen

<i>PBS⁻ (pH 7,4)</i>	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	2 mM	KH ₂ PO ₄
<i>PBS⁺ (pH 7,4)</i>	wie PBS ⁻ mit 0,5 mM MgCl ₂ und 0,7 mM CaCl ₂	
<i>2 x Probenpuffer</i>	250 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	40 mM	DTT
	6,6 % (w/v)	SDS

<i>NEM</i>	25 mg/ml 33 % (v/v)	<i>NEM</i> Glycerin, gesättigt mit Bromphenolblau (0,1 % w/v)
<i>Trenngelpuffer</i>	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl (pH 8,8) SDS
<i>Sammelgelpuffer</i>	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl (pH 6,8) SDS
<i>10 x SDS-Elektrophoresepuffer</i>	0,25 M 1,92 M 1 % (w/v)	Tris Glycin SDS
<i>10 x Blotpuffer</i>	0,25 M 1,92 M	Tris Glycin

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mittels Alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979, modifiziert) oder über Säulenaffinitätschromatographie mit dem *JETSTAR Plasmid DNA Purification Kit* von Genomed nach Herstellerangaben. Die Isolierung von Fragment-DNA aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des *NucleoSpin®-ExtractII-Kits* von Macherey-Nagel nach Protokoll. Für DNA-Ligationen wurden die T4-DNA-Ligase und der zugehörige Puffer der Firma Roche Molecular Biochemicals nach Angaben des Herstellers verwendet. DNA-Sequenzierungen wurden bei MWG Biotech in Auftrag gegeben.

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden entweder mit dem *Phusion™ High-Fidelity PCR Kit* (Finnzymes) oder mit dem *HotStarTaq DNA Polymerase-Reaktionssatz* (Qiagen) durchgeführt. PCR-Ansätze wurden in einem T-Gradient-Thermocycler der Firma Biometra inkubiert.

Für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde die Phenol-Guanidinium-Thiocyanate-Chloroform-Extraktion angewandt.

Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) zur Expressionsanalyse von Genen im Zellkulturmodell wurde mithilfe der Reversen Transkriptase *Superscript™II* (Invitrogen) durchgeführt.

DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen wurden photometrisch mit einem UV-Spektrophotometer der Firma Beckman Coulter GmbH durchgeführt.

Alle weiteren Handhabungen und Modifikationen von DNA und RNA wurden nach Standardmethoden wie beschrieben durchgeführt (Sambrook & Russel, 2001).

2.2.1 Plasmide

Folgende rekombinanten Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.6: Verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
pVL1392-INCENP	Baculovirus-Transfer-Vektor (pVL1392, Invitrogen) kodierend für humanes INCENP	diese Arbeit
pH3-SNAP	Expressionsvektor (pSNAP-N1) für SNAP-markiertes Histon H3	diese Arbeit
pH3-GFP	Expressionsvektor (pEGFP-N1, Stratagene) für GFP-markiertes H3	Sarah Appel
pH3T11A-GFP	Expressionsvektor (pEGFP-N1, Stratagene) für GFP-markiertes H3 (T11A)	Sarah Appel
pH3T11D-GFP	Expressionsvektor (pEGFP-N1, Stratagene) für GFP-markiertes H3 (T11D)	Sarah Appel
TI378504	shRNA-Expressionsvektor kodierend für sh-1, Position 1235-1264 der ZIPK cDNA (5'-TGAGGTCCTATCTCCAGGCTGCGGTGACT-3')	Origene
TI378505	shRNA-Expressionsvektor kodierend für sh-2, Position in der 5'-UTR der ZIPK cDNA (5'-ACTTCCTGGCGGAGAAAGAGTCGCTGACG-3')	Origene
TI378506	shRNA-Expressionsvektor kodierend für sh-3, Position 307-336 der ZIPK cDNA (5'-ACCAACATCTCAGCCGTGAACTACGACTT-3')	Origene
TI378507	shRNA-Expressionsvektor kodierend für sh-4, Position 678-707 der ZIPK cDNA (5'-CTTCAGCCGCCTGGAGAACCGCTACGAGG-3')	Origene

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren

Rekombinante Baculoviren kodierend für His₆-ZIPK (murin), His₆-Aurora-A oder GST-Aurora-B standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung (Kögel et al., 1998; E.Nigg, Martinsried; Honda et al., 2003). Zur Herstellung von Baculoviren kodierend für INCENP wurde die cDNA des Proteins in den Vektor pVL1392 kloniert und rekombinante Baculoviren mittels des Baculo Gold Kits (Pharmingen Corp.) nach Herstellerangaben erzeugt.

2.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA

Zur Transfektion von Säugerzellen mit DNA wurde das *JetPei*-Transfektionsreagenz (Qbiogene) verwendet. Die Transfektion mit siRNA erfolgte mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen).

Zur Transfektion mit DNA wurde je Vertiefung einer 24-Loch-Kulturschale ein Transfektionsansatz von 25 μl angesetzt. Es wurde eine Lösung von maximal 250 ng DNA in 12,5 μl 150 mM NaCl sowie eine Verdünnung von 0,5 μl *JetPei* in 12,5 μl 150 mM NaCl hergestellt. Beide Lösungen wurden gründlich vermischt, 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zu 225 μl Medium je Vertiefung in die Kulturschale pipettiert. Für Zellkulturschalen von 5 cm \varnothing wurden die Transfektionsansätze entsprechend den obigen Angaben auf 100 μl , für Zellkulturschalen von 10 cm \varnothing auf 250 μl vervielfacht. Nach spätestens 24 Stunden wurde der Transfektionsansatz durch frisches Medium ersetzt. Die Analyse der Zellen erfolgte 24-48 Stunden nach der Transfektion.

Für die Transfektion von Zellen mit siRNA wurden je Vertiefung einer 24-Loch-Kulturschale 20 bis 100 nM siRNA in 50 μl *Optimem* (serumfreies Medium der Firma Gibco) verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 50 μl *Optimem* mit 1 μl *Lipofectamine 2000* verdünnt und 5 Minuten bei RT vorinkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend vermischt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Unterdessen wurde von den zu transfizierenden Zellen das Medium entfernt, die Zellen 1 x gewaschen und 400 μl *Optimem* auf die Zellen je Vertiefung der 24-Loch-Kulturschale gegeben. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubationszeit vorsichtig auf die Zellen gegeben und nach 4 Stunden durch einen Waschschrift mit PBS und anschließendem Mediumwechsel wieder entfernt. Für eine Zellkulturschale von 3,5 cm \varnothing wurde der 5-fache Ansatz verwendet.

2.3.3 Stabile Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA

Zur Herstellung stabil transfizierter MCF-7-Zellen, in denen H3WT-GFP exprimiert wird, wurden die Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben auf 3,5 cm \varnothing Kulturschalen mit dem Plasmid pH3-GFP transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und auf 6 cm \varnothing Kulturschalen passagiert. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Zugabe von 800 ng/ μl Geneticindisulfat (G418). Abgestorbene Zellen wurden alle zwei Tage durch einen Mediumwechsel entfernt und die überlebenden Zellen weiter im Selektionsmedium gehalten. Nachdem einzelne Zellklone mit einem Durchmesser von 1-3 mm Durchmesser auf der Kulturschale hochgewachsen waren, wurden diese mit einer Pipettenspitze unter dem Mikroskop auf eine 48-Loch-Kulturschale überführt und weiter im Selektionsmedium kultiviert.

2.3.4 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden die verwendeten Deckgläschen gegebenenfalls für 20 Minuten mit Poly-L-Lysin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in *A.bidest.*) beschichtet, anschlie-

ßend 3x mit *A.bidest.* gewaschen und bei RT getrocknet. Die auf den Deckgläschen kultivierten Zellen wurden für 10 Minuten bei RT in 137 mM NaCl, 1,48 % Formalin, 20 mM PIPES (pH 6,8), 0,2 % TritonX-100, 10 mM EGTA und 1 mM MgCl₂ (Honda et al., 2003, modifiziert) fixiert. Dann wurden sie einmal in PBS⁺ gewaschen und für eine Stunde bei RT mit Blocklösung (3 % BSA oder Milchpulver, 0,1 % TritonX-100 und 1 % Ziegenserum in PBS⁺) blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper in PBS⁺ mit 0,1 % TritonX-100 und 1 % Ziegenserum für eine Stunde bei RT bis maximal über Nacht bei 4 °C und nach zwei 5-minütigen Waschschritten mit dem sekundären Antikörper in PBS⁺ für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Propidiumiodid. Dazu wurden die fixierten Zellen mit 0,2 µg/ml Propidiumiodid in PBS⁺ und 100 µg/ml DNase-freier RNaseA für 45 Minuten bei RT inkubiert. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten der Zellen mit PBS⁺ wurden die Deckgläschen in *A.bidest.* gewässert und anschließend auf Objektträger mit *PERMAFLUOR Aqueous Mounting Medium* (Immunotech) eingebettet. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte mit einem konfokalen Axioplan Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) gekoppelt mit einem Zeiss LSM510Meta. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Zeiss LSM Image Browser (Rel. 4.2) und Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems).

2.3.4.1 *Live-Cell-Imaging*

Für *Live-Cell-Imaging*-Aufnahmen wurden die Zellen in einer 6-Loch-Kulturschale ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Um die Zellen in einer beheizten Kammer ohne CO₂-Zufuhr mikroskopieren zu können, wurde CO₂-independent-Medium (Gibco), supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet. Die mikroskopische Analyse der Zellen erfolgte über Nacht mit einem konfokalen Olympus IX81-Mikroskop. Es wurden je Zelllinie vier verschiedene Bereiche der Kulturschale ausgewählt und über einen Zeitraum von 16 Stunden alle drei Minuten Aufnahmen von diesen Bereichen gemacht. Die Auswertung erfolgte mit der cell^R-Software (Olympus) und dem Quicktime-Player (Apple).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurde ein detergentenhaltiger Phosphat-Lysispuffer (PLP) verwendet. Der Puffer enthält eine hohe Konzentration an Phosphat-Ionen, die während der Zelllyse die Phosphatasen hemmen, sodass die Proteine in ihrem ursprünglichen Phosphorylierungszustand gewonnen werden können (Scheidtmann et al., 1982).

Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgeschabt, zweimal mit kaltem PBS⁺ gewaschen und anschließend auf Eis für 10 Minuten in PLP (20 mM NaPO₄ (pH 8,0), 140 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 % DTT und 1-fach PI) lysiert.

Es erfolgte eine Sedimentation der unlöslichen Zellstrukturen bei 4 °C und 1600 rpm für 5 Minuten. Der zytoplasmatische Überstand wurde ab- und das Kernpellet nochmals in PLP aufgenommen und für weitere 15 Minuten bei Anwesenheit von Benzonase® auf Eis inkubiert. Die Dissoziation von Kernstrukturen wie Lamine und der Kernmatrix erfolgte anschließend mit 500 mM NaCl und 10 mM EDTA (zur Inhibition der Benzonase) für weitere 5 Minuten auf Eis. Mit dem folgenden Zentrifugations-schritt für 15 Minuten bei 4 °C und 13200 rpm wurden sowohl der Zytoplasma- als auch der Kernextrakt abzentrifugiert, um die unlöslichen Proteine des Zytoskeletts und des Chromatins zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder für eine SDS-PAGE verwendet (siehe 2.4.5) oder stand für eine Immunpräzipitation zur Verfügung (siehe 2.4.2).

2.4.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde der Zellextrakt mit einer geeigneten Menge des entsprechenden Antikörpers für 60 bis 90 Minuten auf Eis inkubiert. Um die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe an eine Matrix zu binden, wurde Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Agarose zum Zellextrakt gegeben und für weitere 90 Minuten bei 4 °C rotierend inkubiert. Die spezifisch gebundenen Komplexe wurden zusammen mit der Matrix durch Zentrifugation sedimentiert und 1 x mit Buffer J (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 % DOC, 1 % NP-40, 0,1 % SDS, 1 mM DTT und 1-fach PI), 1 x mit Buffer J:PLP 1:2, 1 x mit Buffer J:PLP 1:4, 1 x mit PLP sowie abschließend 1 x mit 10 mM Tris pH 8,0 gewaschen.

2.4.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus *Sf9*-Zellen

Mit rekombinanten Baculoviren, kodierend für His₆-ZIPK (murin) oder His₆-Aurora-A, infizierte *Sf9*-Zellen wurden in PLP (+5 mM β-Mercaptoethanol) mit 5 U Benzonase® für 30 Minuten auf Eis lysiert. Der PLP (siehe 2.4.1) enthält statt DTT β-Mercaptoethanol, um Disulfidbrücken zwischen den Proteinen zu reduzieren, da DTT bereits in geringer Konzentration die Nickel-Ionen der Ni-NTA-Agarose reduziert und so die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix verhindert. Nach der Lyse wurde der Zellextrakt bei 4 °C und 1600 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Buffer J (+5 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und auf 500 mM NaCl eingestellt. Zu diesem Kernextrakt wurde gewaschene Ni-NTA-Agarose (Qiagen) und 10 mM Imidazol, zur Verringerung von unspezifischen Bindungen an die Matrix, gegeben und eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem spezifisch gebundenen His-Fusionsproteinen bei 4 °C und 13200 rpm für 30 Sekunden sedimentiert, 2 x mit PLP (+500 mM NaCl, +5 mM β-Mercaptoethanol) und 2 x mit PBS⁺ (+500 mM NaCl, +5 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Die Elution der His-Fusionsproteine von der Matrix erfolgte mit dem Elutionspuffer IMAC₃₀₀ (20 mM Tris/HCl (pH 7,5/6,5/5,5), 500 mM NaCl, 10 % Glycerin, 50 μM Leupeptin, 5 mM β-Mercaptoethanol und 300 mM Imidazol) 2 x mit pH 7,5, 2 x mit pH 6,5 und 1 x mit pH 5,5 für 5 Minuten auf Eis.

Zur Aufreinigung von GST-Aurora-B aus *Sf9*-Zellen wurde ein verändertes Protokoll nach Honda et al., 2003 verwendet. Die mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen wurden in Lysispuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 mM DOC, 20 mM β -Glycerol-Phosphat, 1 mM NaMoO₄ und 1-fach PI) mit 5 U Benzonase® für 30 Minuten auf Eis lysiert und durch anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 13200 rpm für 15 Minuten von Zelltrümmern gereinigt. Der proteinhaltige Überstand wurde mit Glutathion-Sepharose® 4B (GE Healthcare) versetzt und eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Matrix mit gebundener GST-Aurora-B-Kinase wurde dann bei 4 °C und 2200 rpm für 3 Minuten sedimentiert, 2 x mit dem 10-fachen Volumen an LP und jeweils 1 x mit dem 10-fachen Volumen Waschpuffer 1 (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 0,1 % NP-40 und 1-fach PI) und Waschpuffer 2 (10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1-fach PI) gewaschen. Für eine nachfolgende Kinase-Reaktion erfolgt ein finaler Waschschrift mit 10-fachen Volumen Kinase-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl, 1 mM DTT und 1 mM PMSF).

Die Aufreinigung von INCENP aus *Sf9*-Zellen erfolgte mittels Immunpräzipitation (siehe 2.4.2).

2.4.4 *In-vitro*-Kinase-Assay

Für *in-vitro*-Kinase-Assays wurden aus *Sf9*-Zellen aufgereinigte rekombinante Proteine oder immunpräzipitierte Proteine aus humanen Zellen verwendet. Das entsprechende Protein wurde zusammen mit einem molaren Überschuss an Substrat in einem Ansatz von 10 μ l Kinase-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl, 1 mM DTT und 1 mM PMSF) inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 1 μ Ci [³²P] γ -ATP gestartet und für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Kinasereaktion wurde dann durch Zugabe von 2 x Probenpuffer mit 10 mM EDTA und anschließender Denaturierung der Proteine bei 100 °C für 3 Minuten abgestoppt. Nach Zugabe von $\frac{1}{3}$ NEM und 10-minütiger Inkubation bei RT konnten die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend getrocknet werden. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte über Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (Cronex 5, AGFA).

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteinproben wurden in 2 x Probenpuffer bei 100 °C für 3 Minuten denaturiert. Das DTT im Probenpuffer reduziert die Disulfidbrücken in den Proteinen zu Sulfhydryl-Gruppen. Um eine Reoxidation der Disulfidbrücken zu verhindern, wurde den Proben nach dem Denaturieren $\frac{1}{3}$ Volumen NEM zugesetzt, das zu einer Alkylierung der freien Sulfhydryl-Gruppen führt. Die Inkubation mit NEM erfolgte für 10 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Proben auf 0,75 mm starken Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970)

mit Trenngelen von 7,5 %, 10 % oder 13,5 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1) in SDS-Puffer im elektrischen Feld aufgetrennt (SDS-PAGE).

Proteine wurden durch Inkubation der Gele für eine Stunde in einer warmen Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10 % Essigsäure und 25 % Isopropanol) gefärbt, wobei die Essigsäure der Färbelösung die Proteine im Gel fixiert. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mit Entfärbelösung (10 % Essigsäure und 10 % Isopropanol in *A.bidest.*) aus dem Gel entfernt. Das Entfärben erfolgte solange auf einem Schüttler, bis die Proteinbanden deutlich im Gel zu erkennen waren. Zur Archivierung wurden die Gele auf Filterpapier unter Vakuum für 45 Minuten bei 50-80 °C getrocknet.

Zum Nachweis von Proteinen über eine Western-Blot-Analyse wurden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, wo sie mithilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können (Towbin et al., 1979).

Der Transfer der Proteine aus einem SDS-PAA-Gel auf eine porablot Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel) erfolgte durch Elektrotransfer bei 70 V für 60 bis 120 Minuten in einer Blotting-Kammer der Firma Bio-Rad. Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran wurde diese mit Ponceau-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % Essigsäure) für eine Minute gefärbt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 3 % (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBST (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl und 0,05 % (v/v) Tween20) abgesättigt. Die Inkubation der Membran mit den angegebenen primären Antikörpern (siehe 2.4.6) erfolgte rotierend in TBST für eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4 °C. Nach dem Waschen der Membran für 3 x 10 Minuten in TBST wurde die Membran mit peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschstritten mit TBST wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mithilfe von Chemilumineszenz nachgewiesen. Dafür wurden 1 ml Lösung 1 (0,1 M Tris/HCl (pH 8,6) und 0,25 mg/ml Luminol), 0,3 µl H₂O₂ (30 %) und 200 µl Lösung B (1,1 mg/ml para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) gemischt und auf die Membran gegeben. Die Signale wurden mit einem Röntgenfilm (Cronex 5, AGFA) detektiert.

2.4.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind neben ihrer Bezugsquelle nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF)- und Western-Blot (WB)-Analysen sind angegeben. Für die Immunpräzipitation (IP) ist die pro mg Gesamtprotein eingesetzte Antikörpermenge aufgeführt. Es wurden nicht alle Antikörper für alle Anwendungen getestet (n. g.).

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>IF</i>	<i>WB</i>	<i>IP</i>	<i>Quelle</i>
Aurora-B	Maus monoklonal	1:1000	1:1000	n. g.	BD Bioscience
BubR1	Maus monoklonal	1:1000	n. g.	n. g.	abcam
CENP-A	Maus monoklonal	1:8000	—	—	abcam
CENP-F (Mitosin)	Maus monoklonal	1:500	n. g.	n.g.	GeneTex
Histon H3	Maus monoklonal	1:500 (ÜN)	1:500000	n. g.	abcam
Histon H3	Kaninchen polyklonal	1:500 (ÜN)	1:1000	n. g.	Cell Signaling
Histon H3	Kaninchen polyklonal	—	1:500	n. g.	Santa Cruz
Histon H3pS10	Maus monoklonal	1:8000	1:10000	n. g.	Millipore
Histon H3pT11	Kaninchen polyklonal	1:2000	1:2000	n. g.	Pineda
INCENP	Kaninchen polyklonal	1:5000	1:5000	n. g.	Sigma
Par-4	Kaninchen polyklonal	1:2000	1:2000	n. g.	Santa Cruz
PRK1	Maus polyklonal	1:2000	1:5000	n. g.	BD Bioscience
PRK2	Maus polyklonal	1:2000	1:5000	n. g.	BD Bioscience
α -Tubulin	Maus monoklonal	1:50000	1:50000	n. g.	Sigma-Aldrich
ZIPK	Kaninchen polyklonal	1:1000 (ÜN)	1:2000	0,1 μ g	Calbiochem
Kaninchen IgG Alexa488 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	MoBiTec
Kaninchen IgG Cy3 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	Dianova

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>IF</i>	<i>WB</i>	<i>IP</i>	<i>Quelle</i>
Kaninchen IgG Cy5 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	Dianova
Kaninchen IgG HRP konjugiert	Ziege	—	1:10000	—	Nordic
Maus IgG Alexa488 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	Invitrogen
Maus IgG Alexa647 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	Invitrogen
Maus IgG Cy3 konjugiert	Ziege	1:2000	—	—	Dianova
Maus IgG HRP konjugiert	Ratte	—	1:5000	—	Nordic

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung zur Lokalisation der endogenen ZIPK in der Mitose

Bisherige Erkenntnisse zur Rolle der ZIPK in der Mitose wurden ausschließlich mit ektopisch exprimierter muriner ZIPK gesammelt. Diese Experimente mit GFP-ZIPK haben gezeigt, dass sie an verschiedenen mitotischen Strukturen lokalisiert ist. Sie assoziiert im gesamten Zellzyklus mit den Zentrosomen, während der Pro- und Metaphase mit den Zentromeren und ist in der Telophase am kontraktilen Ring und in der Zytokinese am Mittelkörperchen zu finden (Preuss et al., 2003a).

Es stellte sich daher die Frage, ob die endogene humane ZIPK die gleiche Lokalisation in der Mitose aufweist. Dazu wurden MCF-7-Zellen fixiert und mit einem anti-ZIPK-Antikörper immungefärbt. In Interphasezellen ist eine diffuse Verteilung der Kinase im Zellkern zu beobachten. In der Mitose dagegen assoziiert sie mit spezifischen Strukturen (Abb. 3.1).

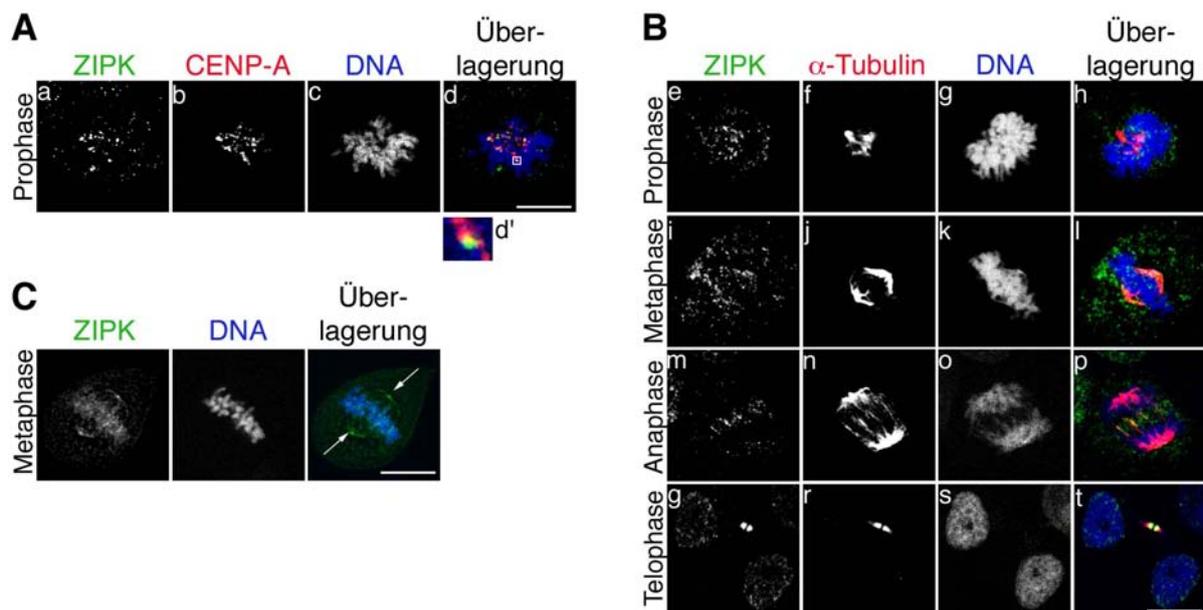


Abbildung 3.1: Subzelluläre Lokalisation der humanen ZIPK in der Mitose.

MCF-7-Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen die ZIPK (A,B,C) sowie gegen CENP-A (A) oder α -Tubulin (B) immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Es wurden Zellen in verschiedenen mitotischen Phasen bezüglich der subzellulären Lokalisation der ZIPK ausgewertet. Balken 10 μ m.

Während der Pro- und der Metaphase ist die ZIPK als punktförmiges Muster auf den Chromosomen verteilt zu sehen. Die Vermutung, dass sie dort mit den Zentromeren assoziiert ist, konnte durch eine Kofärbung mit dem Zentromermarker CENP-A bestätigt werden (Abb. 3.1, A a-d). Betrachtet man die Lokalisation von ZIPK und CENP-A genauer (Abb. 3.1, A d'), erkennt man, dass diese sich nur teilweise überlappen. CENP-A als Bestandteil der Nukleosomen lokalisiert in der zentralen Domäne des Zentromers, auf die unmittelbar das innere Kinetochor folgt. Das Kinetochor selber ist eine trilaminare Struktur die aus dem inneren Kinetochor, der Interzone und dem äußeren Kinetochor besteht (Amor et al., 2004). Da die ZIPK teilweise neben CENP-A lokalisiert, ist sie vermutlich eher ein äußeres Kinetochorprotein. In der Anaphase kann man die ZIPK zwischen den sich trennenden Schwesterchromatiden im Bereich der Zentralspindel beobachten (Abb. 3.1, B m). Eine Assoziation mit den Zentromeren ist jetzt nicht mehr nachzuweisen. In der Telophase und der sich anschließenden Zytokinese assoziiert die ZIPK zunächst mit dem kontraktilen Ring und ist dann am Mittelkörperchen zu beobachten (Abb. 3.1, B g). Kofärbungen mit anti- α -Tubulin-Antikörper belegen die Kolo-kalisierung mit der Zentralspindel (Abb. 3.1, B m-p), dem kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen (Abb. 3.1, B q-t). Außerdem konnte in der Metaphase auch die Assoziation der ZIPK mit den Zentrosomen dargestellt werden (Abb. 3.1, C).

Durch indirekte Immunfluoreszenzstudien konnte also gezeigt werden, dass die endogene humane ZIPK in der Mitose mit den gleichen Strukturen wie die murine ZIPK assoziiert ist. Die genauere Untersuchung der Assoziation der ZIPK mit den Zentromeren ergab, dass sie eventuell ein äußeres Kinetochorprotein ist, da sie nur teilweise mit CENP-A kolo-kalisiert. Im Vergleich zur murinen ZIPK assoziiert die humane ZIPK auch mit der Zentralspindel bevor sie in der Telophase und Zytokinese am kontraktilen Ring und Mittelkörperchen lokalisiert. Die Assoziation mit den Zentrosomen konnte für die Mitose gezeigt werden, erfolgt aber wahrscheinlich im gesamten Zellzyklus.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen Aurora-Kinasen und ZIPK

In der Literatur sind bereits mehrere Proteine oder Proteinkomplexe bekannt, die mit verschiedenen Strukturen in der Mitose assoziieren. Der Chromosomale Passenger Komplex (CPC) z. B. hat eine sehr charakteristische Lokalisation in der Mitose, der er seinen Namen verdankt. Die Proteine des CPC, Aurora-B, INCENP, Survivin und Borealin, assoziieren mit den kondensierenden Chromosomen in der Prophase, akkumulieren im inneren Zentromer in der Prometa- und Metaphase, verlassen am Übergang zur Anaphase die Chromosomen und transferieren an die Zentralspindel, um in der Zytokinese am Mittelkörperchen konzentriert zu werden (Übersicht bei Vagnarelli & Earnshaw, 2004).

Die Abfolge der Assoziationen mit den Zentromeren, der Zentralspindel und dem Mittelkörperchen erfolgt damit sehr ähnlich der Lokalisation der ZIPK. Eine weite-

re Gemeinsamkeit ist die Fähigkeit Histon H3 zu phosphorylieren. Die katalytische Komponente des CPC, Aurora-B, vermittelt in der Mitose die Phosphorylierung von Histon H3 am Ser10, während die ZIPK H3 *in vitro* am Thr11 phosphoryliert. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten sollte untersucht werden, ob es eine funktionelle Beziehung zwischen Aurora-B und der ZIPK gibt, die eventuell Einfluss auf die räumliche und zeitliche Phosphorylierung von H3 in der Mitose nehmen könnte.

3.2.1 Die ZIPK kolokalisiert mit Aurora-B in der Mitose

Als Erstes wurde die Vermutung überprüft, ob die ZIPK und der CPC, respektive Aurora-B, in der Mitose kolokalisieren. Dafür wurde eine Kofärbung mit Aurora-B- und ZIPK-spezifischen Antikörpern durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse in MCF-7-Zellen durchgeführt (Abb. 3.2).

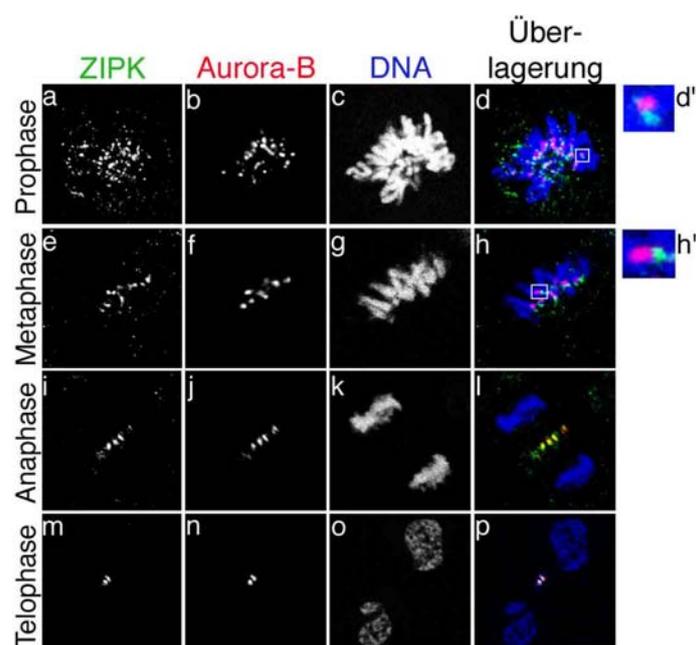


Abbildung 3.2: Kolokalisation von ZIPK und Aurora-B in der Mitose.

MCF-7-Zellen wurden fixiert und mit anti-ZIPK- und anti-Aurora-B-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid detektiert. Die Bilder zeigen in Zellen unterschiedlicher mitotischer Phasen die Kolokalisation der ZIPK und Aurora-B an den Zentromeren in der Pro- und Metaphase (a-h), an der Zentralspindel in der Anaphase (i-l) und am Mittelkörperchen in der Telophase (m-p). Balken 10 µm.

In der Pro- und Metaphase befinden sich beide Kinasen an den Zentromeren (Abb. 3.2, a-h). Ähnlich wie bei der Kofärbung von ZIPK und CENP-A ergab auch hier die nähere Analyse keine direkte Kolokalisation (Abb. 3.2, d', h'), sondern dass beide Proteine nebeneinander liegen. Da der CPC mit Aurora-B im inneren Kinetochor lokalisiert (Übersicht bei Chan et al., 2005), lässt sich auch hier vermuten, dass die ZIPK mit dem äußeren Kinetochor assoziiert ist. Am Metaphase-Anaphase-Übergang transfe-

rieren ZIPK und Aurora-B an die Zentralspindel (Abb. 3.2, i-l) und lokalisieren ab der Telophase zusammen am sich bildenden Mittelkörperchen (Abb. 3.2, m-p).

3.2.2 Überprüfung einer funktionellen Beziehung zwischen Aurora-Kinasen und ZIPK

Ein weiteres Familienmitglied der Aurora-Kinasen, Aurora-A, ist ebenfalls eine effektive H3-Kinase (Crosio et al., 2002). Da sie in der Mitose wie die ZIPK mit den Zentrosomen assoziiert und dort an der Zentrosomenreifung und -teilung sowie am Spindelauf- und -abbau beteiligt ist (Carmena & Earnshaw, 2003; Meraldi et al., 2004), sollte, sowohl für Aurora-B als auch für Aurora-A, die Möglichkeit einer funktionellen Beziehung zur ZIPK geprüft werden.

Für die Untersuchungen wurden jeweils eine katalytisch aktive und inaktive Form der Kinasen als rekombinante Proteine im Baculovirus-Expressions-System exprimiert und aufgereinigt. Baculoviren haben ein doppelsträngiges DNA-Genom von etwa 150 kb, von dem ein relativ großer Abschnitt gegen Fremd-DNA ausgetauscht werden kann. Das Fremdgen wird dabei hinter den Polyhedrin-Promotor kloniert und mittels homologer Rekombination in das Virusgenom eingebracht. Polyhedrin ist das Hüllprotein des Virus, das gegen Ende des Infektionszyklus in sehr großer Menge gebildet wird. Die Vorteile des Baculovirus-Expressions-System liegen u.a. darin, dass die überexprimierten Proteine posttranslational modifiziert werden und verschiedene rekombinante Proteine simultan exprimiert werden können. Es ist z. B. möglich, Cdks mit ihren Cyclinpartnern zu exprimieren und sie anschließend im funktionellen Komplex aufzureinigen (Peeper et al., 1993).

3.2.2.1 Analyse von rekombinanter ZIPK

Für die Expression der ZIPK in *Sf9*-Zellen standen bereits rekombinante Baculoviren zur Verfügung (Kögel et al., 1998). Für die Aufreinigung einer katalytisch aktiven Kinase wurde das WT-Protein und für die Aufreinigung einer katalytisch inaktiven Form eine Mutante (K42A) mit einer Punktmutation in der ATP-Bindungsregion exprimiert. Diese Punktmutation hat zur Folge, dass eine Ionenpaar-Bindung in der Tertiärstruktur unterbleibt, wodurch ATP nicht mehr hydrolysiert werden kann (Johnson et al., 1996). Beide Kinasen wurden als aminoterminaler His₆-Fusionsproteine über eine Ni-NTA-Matrix aufgereinigt und eluiert (Abb. 3.3, A).

Die Überprüfung der Funktionalität der aufgereinigten Proteine erfolgte in einem *in-vitro*-Kinase-Assay mit Histonen als Substrat (Preuss et al., 2003b). Die ZIPK phosphoryliert Histon H3, H2a und vor allem H4 und zeigt eine deutliche Autophosphorylierung auf der Höhe von 52 kDa (Abb. 3.3, B Spur 1). Die Mutante K42A war wie erwartet inaktiv (Abb. 3.3, B Spur 2).

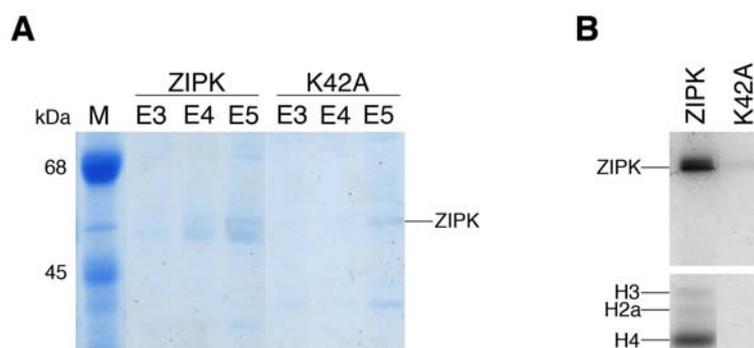


Abbildung 3.3: Aufreinigung und Kinaseaktivität rekombinanter ZIPK aus *Sf9*-Zellen.

Rekombinante ZIPK und kinase-inaktive Mutante ZIPK-K42A wurden aus *Sf9*-Zellen aufgereinigt. **A** Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Dargestellt sind die verschiedenen Elutionsfraktionen der His₆-Fusionsproteine ZIPK und ZIPK-K42A. **B** *In-vitro*-Kinase-Assay mit His₆-ZIPK und His₆-ZIPK-K42A. Die Proteine wurden zusammen mit [³²P]-γ-ATP und einem Histon-Gemisch als Substrat inkubiert.

3.2.2.2 Analyse von rekombinanter Aurora-A

Rekombinante Baculoviren die für Aurora-A sowie eine inaktive Mutante kodieren, wurden von E. Nigg, Martinsried erhalten. Aurora-A und die inaktive Mutante K162M, die ebenfalls eine Punktmutation in der ATP-Bindungsregion trägt, wurden als aminoterminaler His₆-Fusionsproteine exprimiert und durch Affinitätsreinigung über eine Ni-NTA-Matrix isoliert. Die Ausbeute an rekombinantem Protein war im Falle der aktiven Kinase etwas geringer als im Falle der inaktiven Form (Abb. 3.4, A).

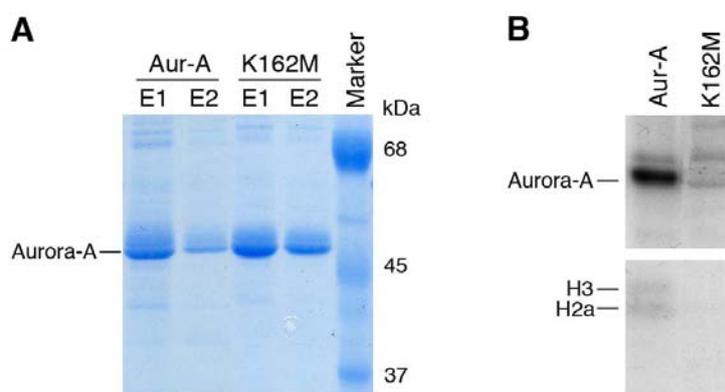


Abbildung 3.4: Aufreinigung und Kinaseaktivität rekombinanter Aurora-A aus *Sf9*-Zellen.

Rekombinante Aurora-A (Aur-A) und kinase-inaktive Mutante K162M wurden überexprimiert in und aufgereinigt aus *Sf9*-Zellen. **A** Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE-Gel mit den verschiedenen Elutionsfraktionen (E1 und E2) der His₆-Fusionsproteine. **B** *In-vitro*-Kinase-Assay mit His₆-Aurora-A und His₆-K162M. Aufgereinigte Proteine wurden in Gegenwart von [³²P]-γ-ATP zusammen mit einem Histon-Gemisch (H2a/b, H3 und H4) inkubiert.

Um die Funktionalität der Enzyme zu testen, wurde ein *in-vitro*-Kinase-Assay mit Histonen als Substrat durchgeführt. Die WT-Form phosphorylierte Histon H3 und H2a

und zeigte eine starke Autophosphorylierung (Abb. 3.4, B Spur 1). Die katalytisch inaktive Mutante K162M phosphorylierte weder Histone noch ist eine Autophosphorylierung zu beobachten (Abb. 3.4, B Spur 2), was bestätigt, dass die Mutation die Kinase inaktivierte und keine verunreinigende Kinaseaktivität mit aufgereinigt wurde.

3.2.2.3 Analyse von rekombinanter Aurora-B

Die rekombinanten Baculoviren, welche für ein GST-Aurora-B-Fusionsprotein kodieren, kamen ebenfalls von E. Nigg, Martinsried (Honda et al., 2003). Um katalytisch aktive Aurora-B zu erhalten, wurde die WT-Kinase zusammen mit INCENP im Komplex exprimiert und aufgereinigt. Die Interaktion von Aurora-B mit INCENP ist essentiell für die Aktivität und führt über die Phosphorylierung von INCENP zu einer weiteren und vollständigen Aktivierung der Kinase (Bishop & Schumacher, 2002; Sessa et al., 2005). Ohne INCENP ist Aurora-B nur sehr schwach aktiv (Crosio et al., 2002). Die WT-Kinase ohne INCENP wurde daher als inaktive Kinase verwendet. Die Herstellung von rekombinanten Baculoviren, die für INCENP kodieren, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit. INCENP wurde dabei ohne Markierung kloniert und daher nicht als Fusionsprotein exprimiert. Die Aufreinigung von Aurora-B oder von beiden Proteinen im Komplex erfolgte über die Kinase als GST-Fusionsprotein gebunden an Glutathion-S-Sepharose.

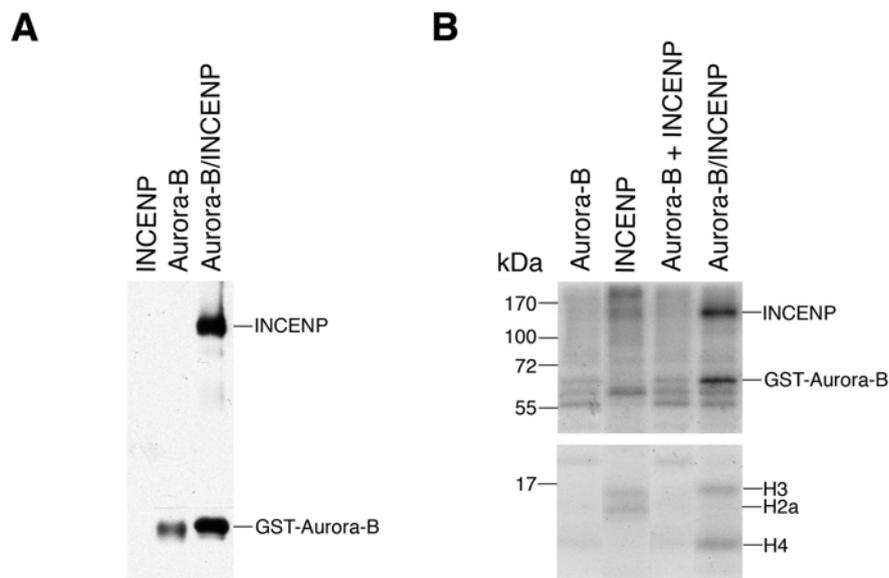


Abbildung 3.5: Aufreinigung und Kinaseaktivität rekombinanter Aurora-B.

Rekombinante Aurora-B und INCENP wurden einzeln oder gemeinsam in *Sf9*-Zellen exprimiert und mittels Glutathion-S-Sepharose aufgereinigt. **A** Western-Blot-Analyse von aufgereinigtem INCENP, Aurora-B und GST-Aurora-B/INCENP im Komplex. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit anti-Aurora-B- und anti-INCENP-Antikörpern. **B** *In-vitro*-Kinase-Assay mit GST-Aurora-B, INCENP und GST-Aurora-B/INCENP-Komplex. Proteine wurden einzeln oder zusammen in Gegenwart von [32 P]- γ ATP zusammen mit einem Histon-Gemisch inkubiert.

In der Western-Blot-Analyse ist dargestellt, dass Aurora-B, aber nicht INCENP mittels Glutathion-S-Sepharose aufgereinigt werden konnte (Abb. 3.5, A Spur 2 und 1). Die gleichzeitige Expression von Aurora-B und INCENP bestätigte die Komplexbildung der beiden Proteine, da INCENP mit Aurora-B kopräzipitiert werden konnte (Abb. 3.5, A Spur 3). Nur diese, im Komplex mit INCENP aufgereinigte Kinase ist im anschließenden *in-vitro*-Kinase-Assay katalytisch aktiv und zeigt Autophosphorylierung, Phosphorylierung des zugesetzten Substrats (H3 und H4) und Phosphorylierung von INCENP (Abb. 3.5, B Spur 4). Aurora-B alleine zeigt nur eine sehr schwache Autophosphorylierung und keine Substratphosphorylierung (Abb. 3.5, B Spur 1). Bei der Aufreinigung von INCENP durch Immunpräzipitation mit anti-INCENP-Antikörper wird zum Teil endogene Baculovirus-Aurora-B mitgereingt, da im *in-vitro*-Kinase-Assay eine schwache Phosphorylierung von INCENP und H3 beobachtet werden kann (Abb. 3.5, B Spur 2). Es ist nicht möglich Aurora-B *in vitro* durch die Zugabe von INCENP vollständig zu aktivieren. Aurora-B zeigt dann zwar eine schwache Autophosphorylierung, aber es erfolgt keine Phosphorylierung von INCENP oder den Histonen (Abb. 3.5, B Spur 3).

3.2.2.4 Es besteht keine Enzym-Substrat-Beziehung zwischen den Aurora-Kinasen und der ZIPK

Aus der Kolo-kalisation von ZIPK und Aurora-B (siehe 3.2.1) und eventuell Aurora-A ergibt sich die Frage nach einer funktionellen Interaktion etwa in Form einer Enzym-Substrat-Beziehung. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die aufgereinigten aktiven Kinasen und die jeweiligen katalytisch inaktiven Kinasen zusammen in einem *in-vitro*-Kinase-Assay inkubiert. Als Kontrollsubstrat wurden Histone zugesetzt (Abb. 3.6). Wie bereits beschrieben, zeigten nur die aktiven Formen von Aurora-A, Aurora-B und ZIPK Auto- und Substratphosphorylierung (Abb. 3.6, A und B jeweils Spur 2 und 4). Im Vergleich dazu ist bei den katalytisch inaktiven Kinasen dagegen weder Auto- noch Substratphosphorylierung detektierbar (Abb. 3.6, A und B jeweils Spur 1 und 3).

Wird Aurora-A mit inaktiver ZIPK oder ZIPK mit inaktiver Aurora-A inkubiert, ergibt sich gegenüber den einzelnen Kinasen keine Änderung (Abb. 3.6, A Spur 5 und 6). Beide Kinasen haben ein ähnliches Molekulargewicht. Aurora-A hat eine theoretische Größe von 48 kDa und die ZIPK von 52 kDa. Daher läuft die zu beobachtende Bande der Autophosphorylierung von beiden Kinasen auf derselben Höhe nach Auftrennung in einer 13,5%igen SDS-PAGE (Abb. 3.6, A Spur 2 und 4). Durch die Phosphorylierung der jeweils inaktiven Kinase hätte man eine Verstärkung des detektierten Signals erwarten können, was aber nicht beobachtet werden konnte.

Auch zwischen Aurora-B und ZIPK besteht keine direkte Enzym-Substrat-Beziehung. Zumindest erfolgt keine deutliche Phosphorylierung der jeweils inaktiven Kinase (Abb. 3.6, B Spur 5). Inkubiert man allerdings inaktive Aurora-B mit aktiver ZIPK hat das einen inhibitorischen Effekt, sowohl auf die Auto- als auch auf die Substratphosphorylierung der ZIPK (Abb. 3.6, B Spur 6). Gleichzeitig kommt es zu einer schwachen Aktivierung von Aurora-B, erkennbar vor allem an der Phosphorylierung von

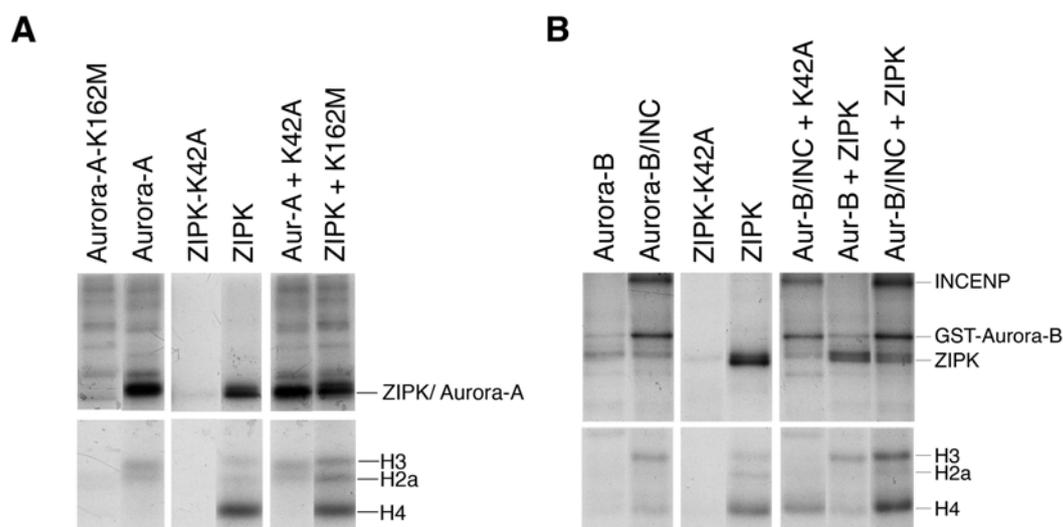


Abbildung 3.6: In-vitro-Kinase Assay von ZIPK, Aurora-A und Aurora-B.

A Dargestellt sind *in-vitro*-Kinase-Assays von Aurora-A, kinase-inaktiver Mutante K162M, ZIPK und inaktiver Mutante ZIPK-K42A sowie die jeweilige Kombination von aktiver und inaktiver Kinase (Aurora-A/ZIPK-K42A und ZIPK/Aurora-A-K162M). Die aus *Sf9*-Zellen aufgereinigten Kinasen wurden zusammen mit einem Histon-Gemisch sowie [32 P]- γ ATP inkubiert. **B** Darstellung der *in-vitro*-Kinase-Assays von Aurora-B und Aurora-B/INCENP; von ZIPK und ZIPK-K42A sowie die jeweiligen Kombination von aktiver und inaktiver Kinase (Aurora-B/INC mit ZIPK-K42A, Aurora-B mit ZIPK und Aurora-B/INC mit ZIPK).

H3 (Abb. 3.6, B Spur 6). Bei der Inkubation aktiver Aurora-B mit aktiver ZIPK ist die Autophosphorylierung der ZIPK ebenfalls vermindert, während die Substratphosphorylierung aber unbeeinflusst bleibt, was vermutlich auf die Aktivität von Aurora-B zurückzuführen ist (Abb. 3.6, B Spur 7). Eine katalytisch inaktive oder aktive Aurora-B scheint damit eine leicht inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der ZIPK zu haben, wobei das gleichzeitig einen aktivierenden Effekt auf Aurora-B hat. Die Relevanz dieser *in vitro* erhobenen Daten für die Kinasen *in vivo* ist aber unklar und muss noch untersucht werden.

3.3 Der zeitliche Verlauf der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung im Zellzyklus

Die bisherigen Untersuchungen zur Histon H3-Thr11-Phosphorylierung postulierten eine Funktion für diese Modifikation in der Mitose, da sie ausschließlich in mitotischen Zellen an zentromerischem Chromatin erfolgt (Preuss et al., 2003b; Zhou et al., 2007). Jüngste Studien dagegen konnten zeigen, dass die Phosphorylierung auch eine Rolle in der Transkription androgenrezeptor-abhängiger Zielgene (Metzger et al., 2007) bzw. in der GCN5 (*general control nonderepressible 5*)-vermittelten Transkriptionsaktivierung (Shimada et al., 2008) spielt. Folglich würde man erwarten, dass eine Phosphorylierung von H3 am Thr11 bereits in der Interphase erfolgt. Zur genaueren

Analyse des zeitlichen Auftretens dieser Phosphorylierung im Zellzyklus wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

3.3.1 Histon H3 wird ab der späten G₂-Phase am Thr11 phosphoryliert

Die mikroskopische Analyse asynchron wachsender MCF-7-Zellen ergab, dass vor allem mitotische Zellen intensiv von einem anti-H3pT11-Antikörper angefärbt werden. Interphasezellen zeigten dagegen lediglich eine schwache diffuse Fluoreszenz. Es fiel allerdings eine kleine Subpopulation von Interphasezellen auf, in denen eine punktartige Färbung ähnlich der von Zentromeren auftrat (Abb. 3.7). Dass die Phosphorylierung von H3 am Thr11 in diesen Interphasezellen an zentromerischem Chromatin erfolgte, konnte durch eine Kofärbung mit anti-CENP-A-Antikörper bestätigt werden (Abb. 3.7).

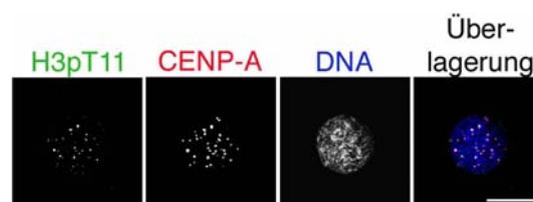


Abbildung 3.7: Die Phosphorylierung von H3 am Thr11 in der Interphase erfolgt zentromerspezifisch. Immunfluoreszenzfärbung von asynchron wachsenden MCF-7-Zellen. Kofärbung der Zellen mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern. Die DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt. Balken 10 µm.

Arretiert man asynchron wachsende MCF-7-Zellen mit einem doppelten Thymidinblock in der S-Phase, entlässt sie dann aus diesem Zellzyklusblock und markiert sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem anti-H3pT11-Antikörper, bekommt man ab 6,5 Stunden eine Anreicherung an Interphasezellen mit H3-Thr11-Phosphorylierung (Abb. 3.8). Etwa 7 Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklusarrest kann man dann die ersten mitotischen Zellen beobachten. Das lässt vermuten, dass diese Modifikation bereits in der G₂-Phase kurz vor dem Eintritt in die Mitose erfolgt.

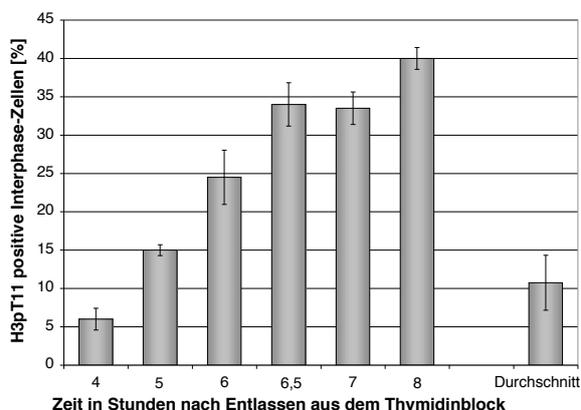


Abbildung 3.8: Anreicherung von Interphasezellen aus einem Zellzyklusarrest mit am Thr11 phosphoryliertem H3.

MCF-7-Zellen wurden mit einem doppelten Thymidinblock in der S-Phase arretiert und nach dem Entlassen aus dem Block zu den Zeitpunkten 4, 5, 6, 6,5, 7 und 8 h fixiert und mit anti-H3pT11-Antikörper angefärbt. Es wurden jeweils 3 x 100 Interphasezellen ausgezählt und der Anteil der Zellen mit Thr11-phosphoryliertem H3 bestimmt.

Die Größe der Zellkerne und eine Kofärbung mit CENP-F-spezifischem Antikörper bestätigten, dass es sich bei dieser Subpopulation um Zellen handelt, die sich in der späten G₂-Phase befinden (Abb. 3.9). Die Expression von CENP-F erfolgt zellzyklusabhängig und ist am Übergang von der G₂-Phase in die Mitose am höchsten (Rattner et al., 1993). Es ist anzunehmen, dass die Thr11-Phosphorylierung in der G₂-Phase mit der Vorbereitung der Zelle auf die Mitose korreliert und unabhängig von Transkriptionsprozessen erfolgt.

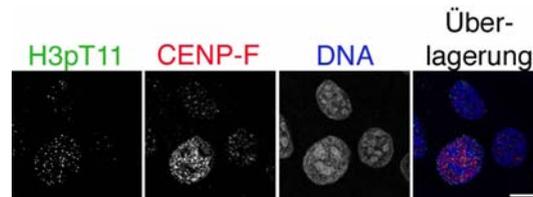


Abbildung 3.9: Die Phosphorylierung von H3 am Thr11 tritt ab der G₂-Phase im Zellzyklus auf. Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7-Zellen mit anti-H3pT11- und anti-CENP-F-Antikörpern zur Bestimmung der Zellzyklusphase. Die DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt. Balken 10 µm.

Da auch die Phosphorylierung des H3 am Ser10 bereits in der späten G₂-Phase auftritt (Hendzel et al., 1997), sollte ermittelt werden, welche der beiden Modifikationen von H3 zuerst erfolgt oder ob eventuell beide zeitgleich auftreten. Eine Kofärbung von asynchron wachsenden MCF-7-Zellen mit anti-H3pT11- und anti-H3pS10-Antikörpern zeigte, dass die Phosphorylierung am Thr11 vor der Phosphorylierung am Ser10 erfolgt (Abb. 3.10).

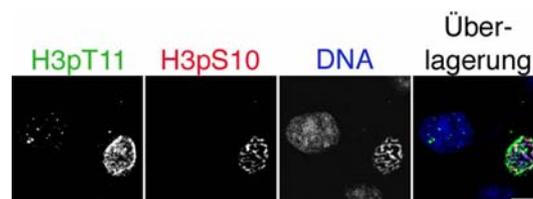


Abbildung 3.10: Die Phosphorylierung von H3 am Thr11 erfolgt zeitlich vor der Phosphorylierung am Ser10.

Immunfluoreszenzfärbung von MCF-7-Zellen. Koimmunfärbung von H3 mit anti-H3pT11- und anti-H3pS10-Antikörpern. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Balken 10 µm.

3.3.2 Lokalisation der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose

In der Mitose treten sowohl die Phosphorylierung von H3 am Ser10 als auch am Thr11 von der Prophase bis zur frühen Anaphase auf (Hendzel et al., 1997; Preuss et al., 2003b; Zhou et al., 2007). Die Phosphorylierung am Ser10 erfolgt ausschließlich an den Chromosomenarmen, während die Phosphorylierung am Thr11 zentromer-spezifisch ist. Zusätzlich zu diesen bekannten Daten konnten mit dem anti-H3pT11-Antikörper weitere mitotische Strukturen, nämlich die Zentrosomen in der Metapha-

se (Abb. 3.11, e-h) sowie das Mittelkörperchen von der Telophase bis zur Zytokinese (Abb. 3.11, m-p) detektiert werden.

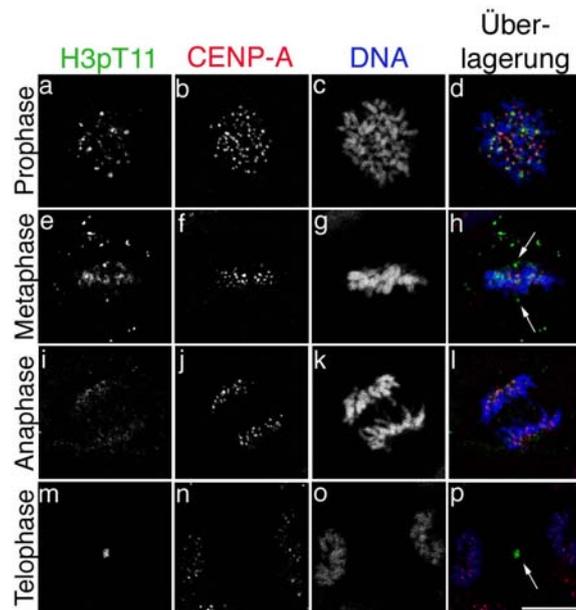


Abbildung 3.11: In der Mitose lokalisiert am Thr11 phosphoryliertes H3 an verschiedene mitotische Strukturen.

Asynchron wachsende MCF-7-Zellen wurden fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid dargestellt. Zellen in verschiedenen mitotischen Phasen wurden bezüglich der Phosphorylierung des Histon H3 am Thr11 ausgewertet. Balken 10 μm .

Histone wurden bisher nur als Bestandteil von Nukleosomen, d.h. als DNA-bindene Proteine, angesehen. Allerdings gibt es einige Veröffentlichungen die beschreiben, dass Histon H3 oder CENP-A am kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen zu beobachten sind. Dieses Phänomen wurde für Ser10- (Li et al., 2005; Song et al., 2007) und kürzlich auch für Thr11-phosphoryliertes H3 (Zhou et al., 2007) sowie für Ser7-phosphoryliertes CENP-A (Li et al., 2007) beschrieben.

3.3.3 Histon H3 assoziiert nicht mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen

Um zu überprüfen, ob der anti-H3pT11-Antikörper an den Zentrosomen und am Mittelkörperchen tatsächlich Histon H3 detektiert oder eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein Ursache für diese Beobachtung ist, sollte eine Gegenfärbung mit generellen anti-H3-Antikörper, welcher modifikations-unabhängig ist, durchgeführt werden. Leider eigneten sich alle getesteten anti-H3-Antikörper nicht, H3 in mitotischen Zellen darzustellen. Die Detektion von H3 in Interphasezellen dagegen gelang problemlos. Da alle verwendeten Antikörper ein Epitop im C-Terminus von H3 erkennen, ist es möglich, dass das Epitop in der Mitose aufgrund des hohen Kon-

densationsgrades der Chromosomen schwerer bis gar nicht zugänglich ist als in Interphasezellen. Da es aus diesen Gründen nicht möglich war, endogenes H3 in der Mitose darzustellen, sollte der Nachweis mit ektoisch exprimiertem H3 als Fusionsprotein erfolgen. Das hat den Vorteil, dass für die Detektion neben H3 auch der Fusionspartner zur Verfügung steht.

Für dieses Experiment wurde eine stabile Zelllinie etabliert, die zusätzlich zum endogenen H3, GFP-markiertes H3 exprimiert. Außerdem wurde ein Expressionsvektor kloniert, mit dessen Hilfe SNAP-markiertes H3 in Zellen exprimiert werden kann.

GFP ist ein gängiges Fusionsprotein zur Markierung von Proteinen. Durch seine Eigenfluoreszenz nach Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht kann die räumliche und zeitliche Verteilung des Fusionspartners, z. B. H3, in der Zelle verfolgt werden. Das SNAP-Protein ist ein Derivat der O-6-Alkylguanin-Alkyltransferase (AGT). Dieses in Säugerzellen ubiquitär exprimierte, nukleäre Protein repariert alkylierte DNA, indem es die Alkylgruppe von der O6-Position des Guanins auf ein Cystein in seinem aktiven Zentrum überträgt. AGT ist kein Enzym, da diese Reaktion nur einmal und irreversibel erfolgt. Das SNAP-Protein ist eine Variante der AGT, die nicht mehr mit DNA-gebundenem Guanosin reagiert und auch nicht mehr im Zellkern lokalisiert ist. Substrate des SNAP-Proteins sind Benzylpurine und -pyrimidine, die in der para-Position z. B. durch einen Farbstoff markiert sein können. Nach Zugabe des SNAP-Substrats erfolgt eine irreversible Reaktion zwischen SNAP-Protein und Substrat, was zur indirekten Markierung des Fusionspartners von SNAP führt. Der Vorteil des Systems gegenüber der GFP-Markierung liegt darin, dass man zu einem bestimmten Zeitpunkt das Fusionsprotein *in vivo* markieren kann und sich anschließend Lokalisation und Lebensdauer der markierten Proteine verfolgen lassen, wobei neusynthetisierte Fusionsproteine aber nicht detektiert werden.

Beide Fusionsproteine, H3-GFP und H3-SNAP, sind in mitotischen und Interphasezellen mit dem Chromatin assoziiert. Eine Kofärbung mit anti-H3pT11-Antikörper zeigt aber, dass weder GFP- noch SNAP-markiertes H3 an den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen lokalisiert ist.

In Abb. 3.12 ist die Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung von anti-H3pT11-Antikörper mit Zellen der H3WT-GFP-Zelllinie (Abb. 3.12, A) oder H3-SNAP (Abb. 3.12, B) transfizierten Zellen dargestellt. In der Metaphase erkennt der phosphospezifische anti-H3pT11-Antikörper neben den Zentromeren auch die Zentrosomen, während das GFP- oder SNAP-markierte H3 nur mit den Chromosomen assoziiert ist (Abb. 3.12, a-d, a'-d'). In der Telophase ist das überexprimierte H3 in beiden Fällen ebenfalls ausschließlich mit den Chromosomen assoziiert, während der phosphospezifische H3pT11-Antikörper zusätzlich das Mittelkörperchen detektiert (Abb. 3.12, e-h, e'-h'). Da beide H3-Fusionproteine weder an die Zentrosomen noch an das Mittelkörperchen lokalisieren, ist es unwahrscheinlich, dass die dort detektierten Proteine H3 repräsentieren. Es ist also zu vermuten, dass das Signal von einem kreuzreagierenden Protein stammt.

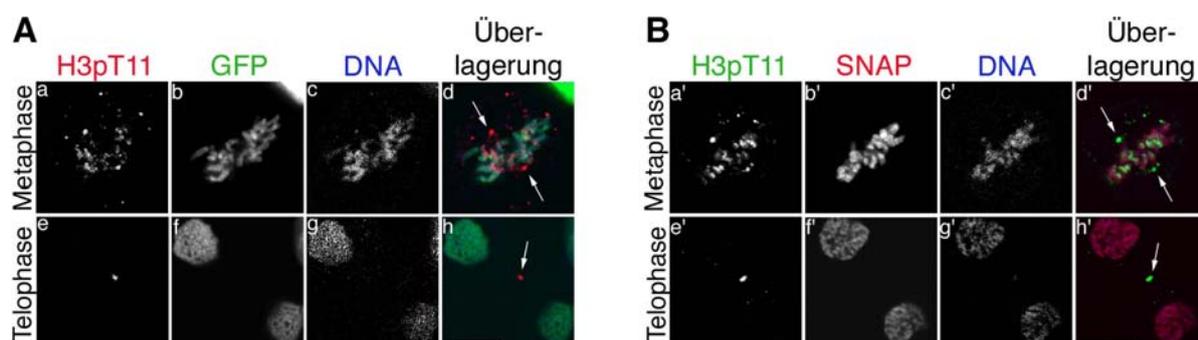


Abbildung 3.12: H3-GFP oder H3-SNAP assoziieren nicht mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen.

A Immunfluoreszenzanalyse der H3WT-GFP-Zelllinie immungefärbt mit anti-H3pT11-Antikörper.

B MCF-7-Zellen wurden transient mit SNAP-markiertem H3 transfiziert, anschließend fixiert und SNAP und endogenes H3pT11 mittels entsprechender Antikörper immunodetektiert. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Balken 10 µm.

3.4 Identifizierung der mitotischen H3-Thr11-Kinase

Um die Funktion der H3-Thr11-Phosphorylierung untersuchen zu können, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese Modifikation während der Mitose zu blockieren. In höheren Organismen gibt es mehrere Histon-Subtypen (von Histon H3 gibt es z. B. vier verschiedene) in einer Zelle, die zum Teil untereinander redundant sind. Eine direkte Deletion von H3 ist damit schwierig zu realisieren und hätte vermutlich auch dramatische Konsequenzen, da die Zelle ohne H3 nicht lebensfähig ist. Außerdem würden durch den Tod der Zellen auch keine Rückschlüsse auf die Funktion der Thr11-Phosphorylierung möglich sein. Sinnvoller wäre es, die korrespondierende Kinase zu identifizieren, um gezielt die Phosphorylierung am Thr11 zu inhibieren. Bisher war bekannt, dass die ZIPK H3 *in vitro* am Thr11 phosphoryliert (Preuss et al., 2003b). Durch eine Inhibition der ZIPK könnte der Nachweis erbracht werden, dass sie auch *in vivo* für diese Modifikation verantwortlich ist. In der Mitose gibt es ein Netzwerk verschiedener Kinasen, die für die Koordination und Regulation der Zellteilung verantwortlich sind. Da die ZIPK eine bisher unbekannt Rolle in der Mitose und der Zytokinese spielt, ist es möglich, dass sie in dieses Netzwerk eingebettet ist und direkt oder indirekt von anderen mitotischen Kinasen, wie Cdk1, Polo und Aurora-Kinasen, reguliert wird. Diese könnten damit auch einen Einfluss auf die Phosphorylierung von H3 am Thr11 haben.

Kürzlich wurden bereits zwei Kinasen beschrieben, die für die Phosphorylierung von H3 am Thr11 in der Interphase verantwortlich sind. In der androgenrezeptor-abhängigen Transkription vermittelt PRK1 diese Modifikation (Metzger et al., 2007). Außerdem phosphoryliert Chk1 H3 am Thr11 und unterstützt so die Rekrutierung der Histonacetyltransferase GCN5, die für die Acetylierung von H3 am Lys9 verantwortlich ist und damit ebenfalls Transkriptionsaktivierung begünstigt (Shimada et al., 2008). Letztere Studie postuliert, dass für die Phosphorylierung des H3 am Thr11 in der Mitose eine weitere Kinase existiert, da eine Herunterregulation von

Chk1 die mitotische Modifikation nicht inhibieren konnte. Um zu überprüfen, ob die ZIPK diese Kinase ist, sollte zunächst ein System zur Herunterregulation der ZIPK mittels RNA-Interferenz etabliert bzw. durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitoren die Aktivität oder Funktion der ZIPK negativ beeinflusst werden.

3.4.1 Etablierung eines Systems zur Inhibition der ZIPK mittels RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet einen regulatorischen Mechanismus eukaryotischer Zellen zur Abwehr gegen Viren, Transposonausbreitung und zur Kontrolle der Genexpression, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) den Abbau von mRNA eines bestimmten Zielgens induziert (Übersicht bei Hannon (2002); Kim & Rossi (2008)). Neben dem Abbau von mRNA kann auch durch eine Translationsblockade (Wightman et al., 1993) oder auf Transkriptionsebene durch die Methylierung von DNA (Wassenegger, 2000; Mette et al., 2000) eine Abschaltung des Zielgens erreicht werden. Die funktionellen Zwischenstufen des RNAi-Mechanismus sind kleine dsRNA-Moleküle, die als siRNA (*small interfering RNA*) bezeichnet werden. Sie sind 21-25 nt lang und besitzen am 3'-Ende Dinukleotid-Überhänge, welche von der RNAi-Maschinerie erkannt werden. Die siRNA-Moleküle entstehen in eukaryotischen Zellen durch die Prozessierung von dsRNA-Vorläufern durch eine Endonuklease der RNaseIII-Familie, dem sogenannten Dicer-Enzym (Carmell & Hannon, 2004). Anschließend werden diese kurzen doppelsträngigen siRNA-Moleküle in den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) geladen und von Ago-2 (*Argonaut-2*), einer Komponente von RISC, weiter prozessiert (Meister et al., 2004). Es entsteht ein aktivierter RISC-Komplex mit einem einzelsträngigen siRNA-Molekül, welches die Spezifität für den Abbau der Ziel-mRNA definiert (Tang, 2005) (Abb. 3.13).

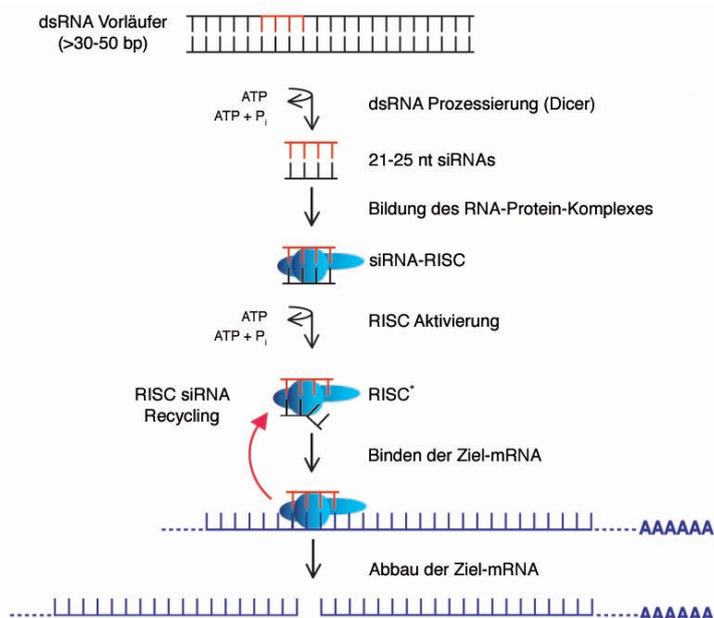


Abbildung 3.13: Der RNA-Interferenz-Mechanismus. RNAi wird ausgelöst durch kurze dsRNA-Moleküle mit homologen Sequenzen für eine Ziel-mRNA. Diese Vorläufer-dsRNA-Moleküle werden von dem Dicer-Enzym zu 21-25 nt langen siRNA-Molekülen prozessiert. Anschließend werden sie in den RISC-Komplex geladen und dort mithilfe von ATP weiter prozessiert (RISC-Aktivierung). Dieser ssRNA-Protein Komplex (RISC*) bindet dann an die Ziel-mRNA und leitet ihren Abbau ein. (Modifiziert nach Dharmacon, 2004).

Um sich diesen Mechanismus nutzbar zu machen, wurden zwei Ansätze entwickelt, um spezifisch Gene durch RNAi zu inhibieren. Zum einen besteht die Möglichkeit, synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle in die Zellen zu bringen, die den spezifischen Abbau von mRNA vermitteln (Elbashir et al., 2001). Zum anderen können Vektoren, die für shRNA (*short hairpin RNA*) kodieren, in die Zellen eingeschleust werden. Diese shRNA kann *in vivo* vom Dicer zu funktioneller siRNA prozessiert werden (Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002).

3.4.1.1 Untersuchung der Funktionalität verschiedener siRNA-Sequenzen gegen die humane ZIPK

Die Effektivität der Herunterregulation des Zielgens hängt bei der RNAi sehr stark von der Sekundärstruktur und Zugänglichkeit der Ziel-mRNA und damit von der Sequenz ab, die die siRNA kodiert (Holen et al., 2002; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003). Vorangegangene Experimente mit siRNA gegen die murine ZIPK führten zu mehrkernigen Zellen mit Zytokinesedefekten oder zur Apoptose der Zellen. Die H3-Thr11-Phosphorylierung war aber nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass eine geringe Restaktivität der ZIPK ausreichend sein könnte, um die Prozesse, an der die Kinase beteiligt ist, aufrechtzuerhalten (Keller, Diplomarbeit 2003). Es wurden daher sieben verschiedene Sequenzen als siRNA getestet, um eine größtmögliche Reduktion des Proteinlevels der humanen ZIPK zu erreichen.

Eine der Sequenzen (K1) wurde bereits veröffentlicht und bindet im Exon 2 der humanen ZIPK (Kawai et al., 2003). Außerdem wurde der SMARTpool® von der Firma Dharmacon eingesetzt. Der SMARTpool® besteht aus vier verschiedenen siRNA-Sequenzen, die jeweils einzeln und zusammen auf ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Herunterregulation der ZIPK getestet wurden. Sequenz 1 bindet im Exon 7, Sequenz 2 im Exon 8, Sequenz 3 in der 3'-UTR und Sequenz 4 im Exon 6. Zwei weitere siRNAs (#128 und #129) wurden von der Firma Ambion bezogen und ebenfalls einzeln und im Gemisch eingesetzt. Die siRNA #128 bindet im Exon 8 und #129 im Exon 2. Die o. a. siRNA-Moleküle wurden in drei verschiedenen Zelllinien (MCF-7-, PC3- und HeLa-Zellen) zu je 100 nM transfiziert und nach 24, 48, 72 und 96 h der Proteinlevel der ZIPK in einer Western-Blot-Analyse überprüft (nicht dargestellt). Im Allgemeinen ist 100 nM eine Konzentration bei der alle siRNAs ihr Stilllegungspotenzial erreichen. Wird die Effektivität der Stilllegung des Zielproteins bestätigt, kann die Mindestkonzentration an siRNA ausgetestet werden (Dharmacon, 2004). Ein typisches Experiment der erhaltenen Ergebnisse ist in Abb. 3.14 dargestellt.

In diesem Experiment wurden MCF-7-Zellen mit jeweils 100 nM siRNA (K1, SMARTpool®, #128 oder #129) transfiziert und 48 h später die Zellen geerntet. Anschließend wurde in der Western-Blot-Analyse die Proteinmenge der ZIPK überprüft und nach einer Immunpräzipitation mit anti-ZIPK-Antikörper die Aktivität der Kinase in einem *in-vitro*-Kinase-Assay analysiert. Als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen sowie Zellen, die ohne siRNA (Mock), mit unspezifischer siRNA (neg. Kontrolle) oder mit siRNA gegen das Par-4-Protein (pos. Kontrolle) transfiziert wurden. Die Western-Blot-Membran wurde mit anti-ZIPK- oder anti-Par-4-Antikörpern sowie mit

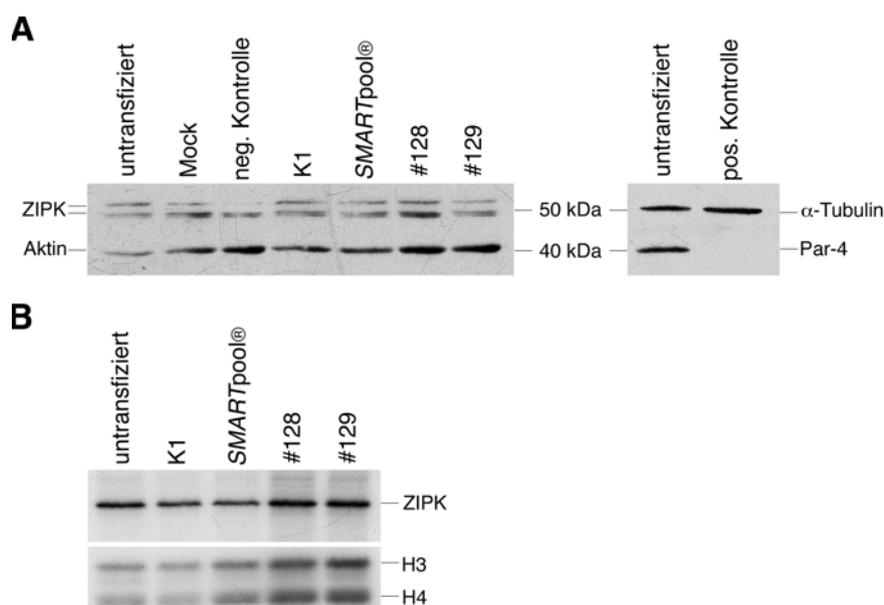


Abbildung 3.14: Synthetische siRNA-Moleküle haben keinen Einfluss auf das Expressionslevel der ZIPK.

A Western-Blot-Analyse von MCF-7-Zellen, die 48 h nach der Transfektion mit 100 nM siRNA gegen ZIPK (K1, SMARTpool®, #128 und #129), mit unspezifischer siRNA (neg. Kontrolle) oder siRNA gegen das Par-4-Protein (pos. Kontrolle) sowie untransfizierten Zellen und transfizierte Zellen ohne siRNA (Mock) geerntet wurden. Auf einer 10%igen SDS-PAGE wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und mit Antikörpern gegen ZIPK, Par-4, Aktin oder α -Tubulin immungefärbt. **B** *In-vitro*-Kinase-Assay mit siRNA (K1, SMARTpool®, #128 und #129) behandelten MCF-7-Zellen oder unbehandelten Zellen 48 h nach der Transfektion. Zellextrakte wurden mit anti-ZIPK-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend zusammen mit einem Histon-Gemisch (H3, H2a/b und H4) als Substrat sowie [32 P]- γ ATP analysiert.

anti-Aktin- oder anti- α -Tubulin-Antikörpern als Abgleich für die aufgetragene Gesamtproteinmenge von 10 µg immungefärbt (Abb. 3.14, A). Man erkennt, dass, obwohl in der positiven Kontrolle eine fast vollständige Reduktion von Par-4 erreicht wurde (Abb. 3.14, A rechts), weder die Proteinmenge der ZIPK (Abb. 3.14, A links) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen, noch die Kinaseaktivität (Abb. 3.14, B) im Vergleich zur Kontrolle durch die Transfektion der siRNA reduziert wurde.

3.4.1.2 Herstellung einer stabil shRNA gegen ZIPK exprimierenden Zelllinie

Da durch die direkte Transfektion synthetisch hergestellter siRNA-Moleküle keine Stilllegung der ZIPK erreicht werden konnte, sollte ein Ansatz zur Ausschaltung der ZIPK über plasmidbasierte shRNA etabliert werden. Während synthetisch hergestellte siRNAs ungeschützt in der Zelle vorliegen und relativ zügig abgebaut werden, kann durch die Transfektion plasmidbasierter shRNA-Sequenzen eine kontinuierliche Expression der dsRNA erfolgen und die Stilllegung des Zielgens über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden (Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002). Diese Expressionsplasmide enthalten die gewünschte siRNA-Sequenz, gefolgt

von einem 7-9 nt großen Platzhalter (*loop*), der siRNA-Sequenz in Gegensinnorientierung und einem Terminationssignal (Abb. 3.15).

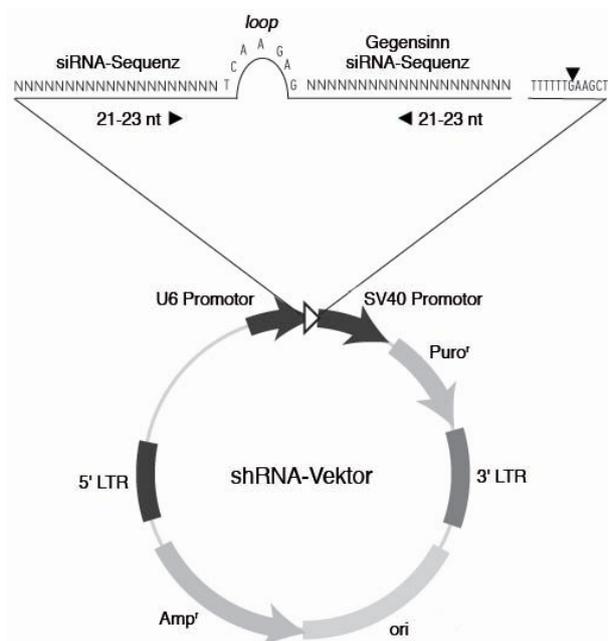


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung eines shRNA-Expressionsplasmids.

Die shRNA-Expressionskassette besteht aus der 21-23 nt langen siRNA-Sequenz, einem 7-9 nt großen Platzhalter (*loop*) und der siRNA-Sequenz in umgekehrter und komplementärer Orientierung unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors. Direkt stromabwärts von der zweiten siRNA-Sequenz liegt ein Terminationssignal (TTTTT), um die Transkription der Polymerase III zu beenden. Die weiteren eingezeichneten Eigenschaften definieren die Antibiotikaresistenzen (Amp^r , Ampicillinresistenz und $Puro^r$, Puromycinresistenz), Verpackungssignale für die Transfektion mit Retroviren (3'- und 5' LTR) sowie den Replikationsstartpunkt für die Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli* (*ori*). (Modifiziert aus *HuSH Application Guide*, Origene.)

Nach der Transfektion eines shRNA-Expressionsplasmids in eukaryotische Zellen synthetisiert die endogene RNA-Polymerase III die hinter dem U6-Promotor liegende Sequenz bis zum Terminationssignal. Der so gebildete RNA-Strang faltet sich zu einer shRNA zusammen und wird anschließend durch zelleigene Enzyme zu siRNA-Molekülen prozessiert.

Es wurden Plasmide mit vier verschiedenen shRNA-Sequenzen gegen die ZIPK von der Firma Origene bezogen. Sie kodieren für shRNA, welche homolog zu Bereichen im Exon 8 (sh-1), in der 5'-UTR (sh-2), im Exon 2 (sh-3) und im Exon 7 (sh-4) sind. Diese Sequenzen sind nicht identisch oder überlappend mit den bereits getesteten siRNA-Sequenzen aus 3.4.1.1. Zunächst wurden die shRNA-Plasmide auf ihr Potenzial, die ZIPK herunterzuregulieren, überprüft. Dafür wurden HEK293-Zellen mit einem Plasmid kodierend für Flag-markierte ZIPK und unterschiedliche Kombinationen von shRNA-Vektoren im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Die Überexpression Flag-markierter ZIPK erfolgte als Transfektionskontrolle und zur besseren Überprüfung der Stilllegung der ZIPK. Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt. Mittels Western-Blot-Analyse erfolgte dann eine Immunfärbung gegen ZIPK oder gegen das Flag-Epitop der ektopisch exprimierten ZIPK sowie gegen Aktin als Abgleich der aufgetragenen Gesamtproteinmenge (10 μ g) (Abb. 3.16).

Nach der Transfektion von sh-3 und der Kombination von sh-3 und sh-4 ist eine Verringerung in der ZIPK-Expression zu beobachten (Abb. 3.16, Spur 6 und 9). Alle anderen getesteten Plasmide oder Plasmidkombinationen brachten keine Verminderung im Expressionslevel der ektopisch exprimierten Flag-ZIPK oder der endogenen ZIPK (Abb. 3.16, Spur 4, 5, 7, 8 und 10). Das Plasmid sh-3 reduzierte die Expression

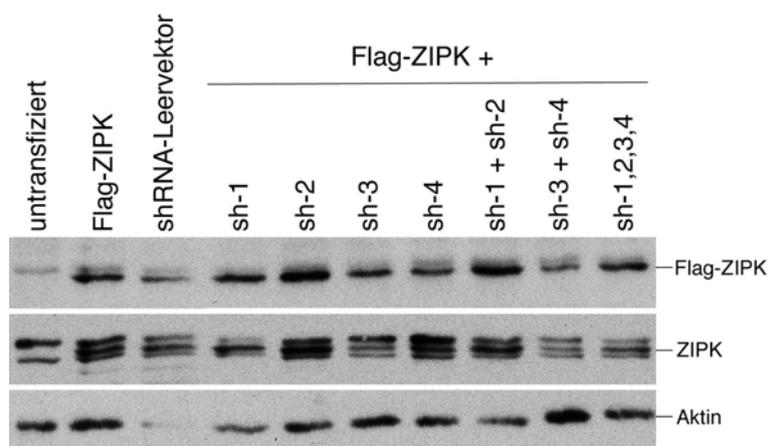


Abbildung 3.16: Überprüfung der Funktionalität der shRNA-Expressionsplasmide.

HEK293-Zellen wurden mit Flag-ZIPK und unterschiedlichen Kombinationen der shRNA-Expressionsplasmide kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt und 10 µg Gesamtprotein-Zellextrakt auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. In der anschließenden Western-Blot-Analyse wurden mit anti-ZIPK-, anti-Flag- und anti-Aktin-Antikörpern die jeweiligen Proteine immungefärbt.

der endogenen ZIPK auf 50% und sh-3 und sh-4 zusammen konnten die Expression der ektopisch exprimierten und der endogenen ZIPK auf etwa 20% verringern. Die Transfektion von sh-2 oder sh-1/sh-2 schien dagegen zu einer Erhöhung der Expression der ZIPK auf 115% bzw. 120% im Vergleich zu untransfizierten Zellen zu führen.

Trotz der nicht vollständigen Ausschaltung der ZIPK nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid sh-3 und der Kombination von sh3/sh-4 stabil transfizierte MCF-7-Zelllinien hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und nach 72 h die positiven Klone mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Insgesamt konnten 21 stabil sh-3-transfizierte Zellklone (Klone 1-21) und 13 stabil sh-3/sh-4-transfizierte Zellklone (Klone A-M) isoliert und für weitere Analysen in Kultur genommen werden. Aufgrund der Vielzahl der Klone wurden diese nach ausreichender Vermehrung auf ihr Expressionslevel der ZIPK getestet und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Ergebnisse des primären Screenings der gewonnenen Zellklone sind auszugsweise in Abb. 3.17 dargestellt.

Fast alle etablierten Zellklone zeigten eine deutliche Reduktion im Expressionslevel der ZIPK. Es wurden zwei Zellklone, MCF-7 shZIPK-4, und -9, die eine Expression von weniger als 10% der ZIPK im Vergleich zu untransfizierten Zellen zeigten, ausgewählt. Diese wurden wieder in Kultur genommen und erneut auf die Expressionsstärke der endogenen ZIPK auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Protein-Ebene in einer Western-Blot-Analyse untersucht.

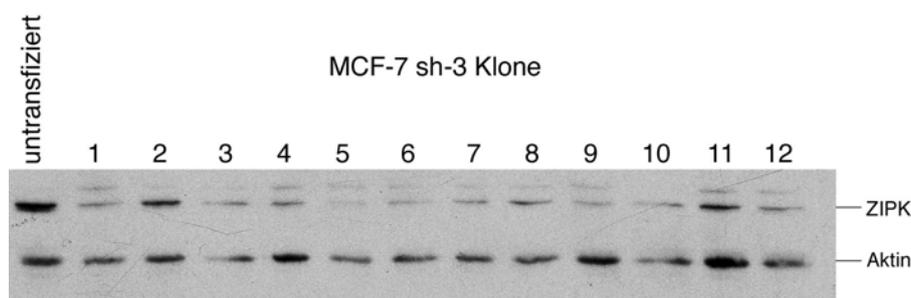


Abbildung 3.17: Screening von stabil siRNA gegen ZIPK exprimierenden MCF-7-Zelllinien.

Die Gesamtprotein-Zellextrakte von den stabil sh-3- oder sh3/sh-4-exprimierenden Zelllinien wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western-Blot-Membran transferiert. Der Nachweis der endogenen ZIPK erfolgte mit einem anti-ZIPK-Antikörper, Aktin wurde mit einem anti-Aktin-Antikörper detektiert und diente zum Abgleich der aufgetragenen Gesamtproteinmenge (10 µg).

In den aufgetauten Zellklonen war sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 3.18, A) als auch auf Proteinebene (Abb. 3.18, B) keine Herunterregulation der endogenen ZIPK mehr zu beobachten. Stattdessen war in allen getesteten Zellklonen die Expression der ZIPK wieder auf 100 % im Vergleich zu untransfizierten Zellen gestiegen. Daher konnten mit diesen, zunächst so vielversprechenden Zellklonen keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Funktion der ZIPK im Zellzyklus oder der H3-Thr11-Phosphorylierung gemacht werden.

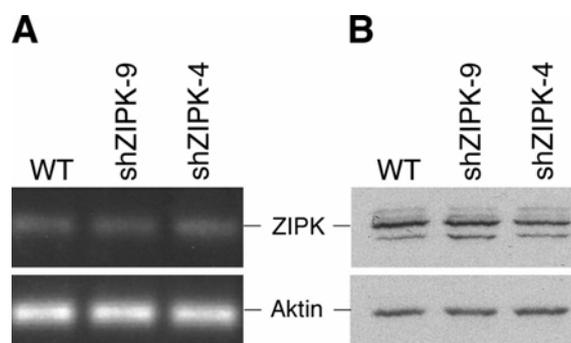


Abbildung 3.18: Überprüfung der Expressionsstärke in stabil siRNA-ZIPK exprimierenden Zellklonen

A Western-Blot-Analyse von MCF-7-Zellen und zwei stabil siRNA-ZIPK exprimierender Zelllinien. Die Gesamtprotein-Zellextrakte wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die ZIPK und Aktin als Abgleich wurden mit entsprechenden Antikörpern immundetektiert. **B** RT-PCR der drei Zelllinien. Nach Isolation der mRNA aus den drei Zelllinien erfolgte die Umschreibung in cDNA mittels RT-PCR. Die erhaltene cDNA wurde anschließend als Matrize mit Primern gegen ZIPK und Aktin als Abgleich in einer PCR eingesetzt.

3.4.2 Screening verschiedener Kinaseinhibitoren

Es konnte bisher nicht eindeutig bewiesen werden, dass die humane ZIPK für die Phosphorylierung von H3 am Thr11 in der Mitose verantwortlich ist. Somit bestand auch die Möglichkeit, dass eine andere Kinase diese Aufgabe übernimmt. Daher sollte die Wirkung von verschiedenen, u. a. mitose-relevanten, Kinaseinhibitoren getestet werden (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Verwendete Inhibitoren

<i>Inhibitor</i> (Referenz)	<i>inhibierte Kinase</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>
Hesperadin (Hauf et al., 2003)	Aurora-B	100 nM
ZM447439 (Ditchfield et al., 2003)	Aurora-B	2 μ M
Ro3306 (Vassilev et al., 2006)	Cdk1	9 μ M
Roscovitine (Planchais et al., 1997)	Cdk1/2	10 μ M
H7 (Hidaka et al., 1984) (Sato et al., 2005)	PKC, ZIPK	5 μ M
Ro318220 (Davis et al., 1989)	PKC, PKC-verwandte Kinasen	3 μ M
LFM-A13 (Uckun et al., 2007)	Plk1	100 μ M
TAL (Santamaria et al., 2007)	Plk1	500 nM
Y-27632 (Uehata et al., 1997)	ROCK1/2	50 μ M

Welche Wirkung ein Inhibitor erzielt, ist oftmals stark abhängig von der eingesetzten Konzentration. Die Anwesenheit einer hohen Konzentration kann die Inhibition einer Vielzahl von ähnlichen Kinasen bewirken. Deswegen wurde mit der möglichst niedrigsten Konzentration gearbeitet, um die zu untersuchende Kinase zu inhibieren. Die angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren wurden sowohl in *in-vitro*- als auch in *in-vivo*-Experimenten eingesetzt. Für Y-27632 wurde diese Konzentration in Immunfluoreszenzanalysen anhand der MLC-Phosphorylierung am Ser19 ermittelt, für alle anderen Inhibitoren wurden die Konzentrationen aus der jeweils angegebenen Quelle entnommen.

Neben Inhibitoren gegen die mitotischen Kinasen Aurora-B, Cdk1/2 und Plk1, wurden auch Inhibitoren gegen PKC, PKC-verwandte Kinasen und ROCK1 eingesetzt. Der Inhibitor H7 gegen PKC (Hidaka et al., 1984) wurde auch als Inhibitor der murinen ZIPK beschrieben (Sato et al., 2005). Zu den PKC-verwandten Kinasen zählt u. a. die PRK1, die bereits als H3-Thr11-Kinase beschrieben worden ist und von Ro318220 inhibiert wird (Metzger et al., 2007). ROCK1 wiederum kann in glatten Muskelzellen durch Phosphorylierung die ZIPK aktivieren (Hagerty et al., 2007).

Als Erstes wurde überprüft, ob die Inhibitoren einen direkten Effekt auf die Aktivität der ZIPK haben. Anschließend wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Ser10- und Thr11-Phosphorylierung von H3 in einer Western-Blot-Analyse und speziell die Wirkung auf die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung in der Immunfluoreszenz untersucht.

3.4.2.1 Überprüfung der Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Aktivität der ZIPK

Für die Analyse der direkten Wirkung der Inhibitoren auf die ZIPK wurde die Kinase aus PC3-Zellen immunpräzipitiert und zusammen mit oder ohne Inhibitor sowie Histonen (H2a/b, H3 und H4) als Substrat eingesetzt. H7 zeigt in diesem Experiment

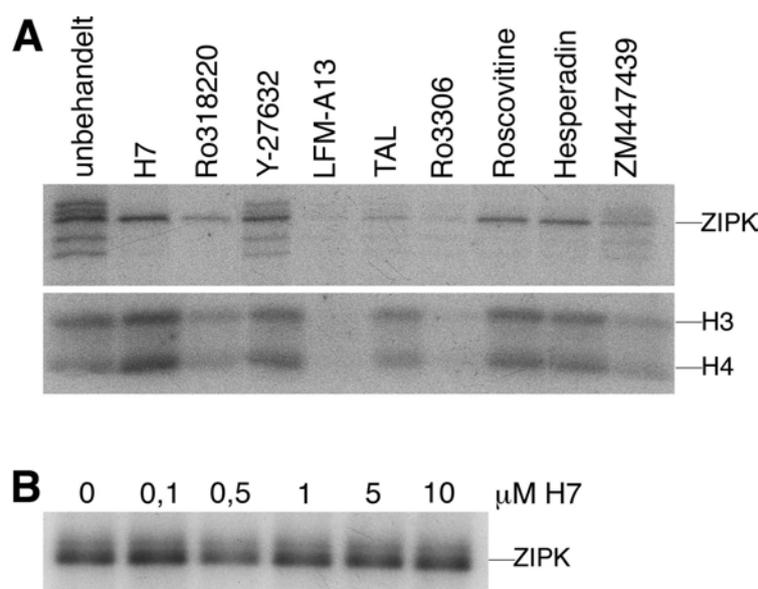


Abbildung 3.19: Die Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Aktivität der ZIPK.

Humane ZIPK wurde aus PC-3-Zellen mit anti-ZIPK-Antikörper immunpräzipitiert und in einem *in-vitro*-Kinase-Assay ohne oder mit einem der o. a. Inhibitoren, Histonen als Substrat und [³²P]-γATP inkubiert. Dargestellt ist die Autophosphorylierung der ZIPK sowie die Substratphosphorylierung.

keinen Einfluss auf die Aktivität der ZIPK (Abb.3.19, A Spur 2). Sowohl die Auto- als auch die Substratphosphorylierung sind sogar stärker als in der unbehandelten Probe. Um zu überprüfen, ob H7 eventuell nur die murine ZIPK inhibiert, wurde das Experiment wiederholt. Dabei wurde aus Insektenzellen aufgereinigte murine ZIPK

(vgl. 3.2.2.1) zusammen mit H7 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Aber auch diesmal war keine Inhibition der Kinaseaktivität zu detektieren (Abb. 3.19, B). Der Inhibitor Ro318220 gegen PKC-verwandte Kinasen, reduzierte die Kinaseaktivität der ZIPK um etwa die Hälfte (Abb. 3.19, A Spur 3). Der Inhibitor gegen ROCK1, hatte dagegen keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität der ZIPK (Y-27632, Abb. 3.19, A Spur 4). Von den beiden Plk1-Inhibitoren inhibierte LFM-A13 die ZIPK vollständig, während TAL nur partiell die Aktivität der ZIPK reduzierte, und zwar die Autophosphorylierung stärker als die Substratphosphorylierung (Abb. 3.19, A Spur 5 und 6). Ähnliches war bei den beiden Cdk-Inhibitoren Ro3306 und Roscovitine zu beobachten. Ro3306 inhibierte die ZIPK vollständig, Roscovitine dagegen hatte keinen Effekt (Abb. 3.19, A Spur 7 und 8). Auch bei den eingesetzten Aurora-B-Inhibitoren bewirkte ZM447439 eine partielle Inhibition der ZIPK, während Hesperadin keinen Effekt zeigte (Abb. 3.19, A Spur 10 und 9).

Zwei der verwendeten Inhibitoren (LFM-A13 und Ro3306) konnten die ZIPK vollständig inhibieren und zwei weitere Inhibitoren (TAL und ZM447439) hatten zumindest partiell einen negativen Einfluss auf die Aktivität der ZIPK. Ob die Inhibitoren auch einen Effekt auf die H3-Thr11-Phosphorylierung haben, sollte im Folgenden untersucht werden.

3.4.2.2 Überprüfung der Wirkung verschiedener Kinaseinhibitoren auf die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung

Für dieses Experiment wurden PC3-Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % angezogen und dann für 16 h mit Nocodazol behandelt. Nocodazol ist ein Spindelgift und löst eine Depolymerisation der Mikrotubuli aus. Dadurch arretieren die Zellen in der Prometaphase und mitotische Zellen werden angereichert. Anschließend wurden die Zellen für 3 h bei Anwesenheit von Nocodazol mit den verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Für die Ernte wurden die mitotischen Zellen von den Interphasezellen durch Abschütteln getrennt und Kernextrakte, die vor allem die dissoziierte Proteine der Kernstrukturen enthalten, hergestellt. Jeweils 3 µg der Gesamtproteinmenge wurde auf einer 13,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit anti-H3pT11-, anti-H3pS10- oder generellem anti-H3-Antikörper immungefärbt.

Die Phosphorylierung von H3 am Ser10 und am Thr11 ist wie erwartet in den mitotischen Zellen stärker als in den Interphasezellen (Abb. 3.20). Die Verwendung fast aller Inhibitoren führte zum Verlust der Thr11-Phosphorylierung in mitotischen Zellen (Abb. 3.20, B links). Nur H7 und TAL hatten keinen Effekt (Abb. 3.20, B links Spur 2 und 8). Ro3306 inhibiert Cdk1, die Kinase, die für den Eintritt in die Mitose und deren Inaktivierung für den Austritt aus der Mitose essentiell ist (Übersicht bei O'Farrell, 2001). Werden die Zellen durch Inhibition von Cdk1 daran gehindert, in die Mitose zu gehen, oder durch Inaktivierung von Cdk1 vorzeitig aus der Mitose entlassen, kann keine mitose-spezifische Thr11-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Damit bleiben sechs Inhibitoren, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Thr11-Phosphorylierung in der Mitose haben: der Inhibitor gegen PKC und

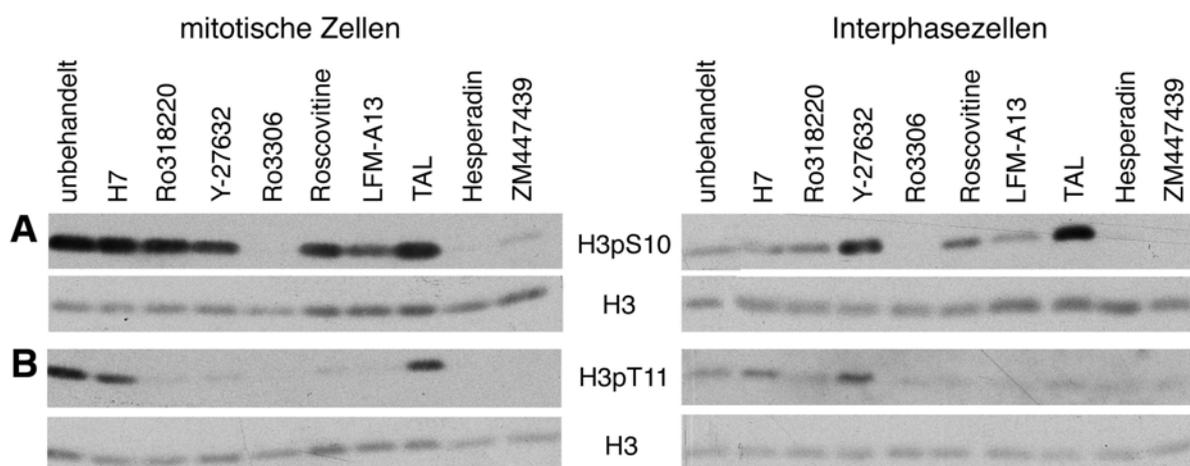


Abbildung 3.20: Die Wirkung der Inhibitoren auf die H3-Ser10- und -Thr11-Phosphorylierung.

Über Nacht mit Nocodazol arretierte PC3-Zellen wurden für 3 h mit den o.a. Inhibitoren behandelt. Mitotische Zellen wurden von den Interphasezellen durch Abschütteln getrennt und Kernextrakte hergestellt. Für die Western-Blot-Analyse wurden 3 μ g Gesamtproteinmenge auf einer 13,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran gebロットet und mit **A** anti-H3pS10- oder anti-H3-Antikörpern bzw. **B** anti-Thr11- oder anti-H3-Antikörpern immunodetektiert.

PKC-verwandte Kinasen Ro318220, der ROCK1-Inhibitor Y-27632, der Cdk-Inhibitor Roscovitine, der Plk1-Inhibitor LFM-A13, und die Aurora-B-Inhibitoren Hesperadin und ZM447439.

Drei Inhibitoren, nämlich die Aurora-B-Inhibitoren Hesperadin und ZM447439 sowie Ro3306 zeigten einen negativen Effekt auf die H3-Ser10-Phosphorylierung (Abb. 3.20, A links Spur 5, 9 und 10). Da H3 am Ser10 durch Aurora-B phosphoryliert wird (Hsu et al., 2000; Giet & Glover, 2001), entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen und stimmt mit den Befunden von Hauf et al. (2003) und Ditchfield et al. (2003) überein. Die Inhibition der Ser10-Phosphorylierung durch Ro3306 (Abb. 3.20, A links Spur 5) ist wahrscheinlich wie die ausbleibende Thr11-Phosphorylierung auf das Fehlen mitotischer Zellen zurückzuführen. Alle anderen Inhibitoren blieben ohne Einfluss auf die Ser10-Phosphorylierung (Abb. 3.20, A links).

In den Interphasezellen ist die Phosphorylierung von H3 am Thr11 und am Ser10 sehr schwach im Vergleich zu mitotischen Zellen (Abb. 3.20, A und B rechts). Die abgebildeten Autoradiogramme der Interphasezellen benötigten eine 10fach längere Expositionszeit bis zur Entwicklung des Röntgenfilmes, stellen also nur $1/10$ der Menge in mitotischen Zellen dar.

Der Effekt der Inhibitoren auf die H3-Thr11-Phosphorylierung in Interphasezellen war relativ schwach. Bis auf die Behandlung mit Y-27632, hatten alle anderen Inhibitoren keinen Effekt. Durch die Zugabe von Y-27632 wurde dagegen der Anteil an Thr11-phosphoryliertem H3 mindestens verdoppelt (Abb. 3.20, B rechts Spur 4). Einige Inhibitoren zeigten dagegen einen deutlichen Effekt auf die Phosphorylierung am Ser10. Nach Zugabe von Hesperadin, ZM447439 sowie Ro3306 war, wie in den mitotischen Zellen, keine Phosphorylierung mehr zu beobachten (Abb. 3.20, A rechts).

Spur 5, 9 und 10) wogegen nach Zugabe von Y-27632 und TAL diese Modifikation sogar verstärkt war (Abb. 3.20, A rechts Spur 4 und 8).

Die Inhibition der Phosphorylierung am Thr11 durch Ro318220, Y27632, Roscovitine, LFM-A13, Hesperadin und ZM447439 in der Mitose lässt keinen direkten Rückschluss auf die korrespondierende Kinase zu. Um die H3-Thr11-Kinase weiter einzugrenzen und speziell die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

3.4.2.3 Einfluss der Inhibitoren auf die zentromerspezifische Histon H3-Thr11-Phosphorylierung

Der Vorteil der indirekten Immunfluoreszenzanalyse gegenüber der Western-Blot-Analyse ist, dass die Zellen und Zellstrukturen erhalten bleiben und eindeutig bestimmbare Mitosestadien ausgewertet werden können. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden MCF-7-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen, da in Präparaten von MCF-7-Zellen ab einer Konfluenz von 80 % eine Vielzahl von mitotischen Zellen in unterschiedlichen Stadien enthalten sind. Die Zellen wurden für 3 h mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt, anschließend fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern immungefärbt.

Thr11-phosphoryliertes H3 lokalisiert in unbehandelten Zellen von der Pro- bis zur frühen Anaphase an die Zentromere (Abb. 3.21 und 3.23, links). Ab der Telophase detektiert der Antikörper eine Struktur am sich bildenden Mittelkörperchen, wobei es sich dabei vermutlich um eine Kreuzreaktion mit einem nicht identifizierten Protein handelt (vgl. 3.3.3). Die Behandlung mit H7 und Y-27632 Inhibitoren zeigte keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen (nicht dargestellt). Es ergab sich bei Y-27632 also eine Diskrepanz zu der Western-Blot-Analyse, wo die Thr11-Phosphorylierung vermindert war.

Die Inkubation mit Ro318220 gegen PKC und PKC-verwandte Kinasen führte zu einem Verlust der H3-Thr11-Phosphorylierung an den Zentromeren (Abb. 3.21, rechts). Das Signal am Mittelkörperchen in der Telophase blieb jedoch erhalten, was die Vermutung bestätigte, dass es sich dabei nicht um H3 handelt. Neben dem Verlust der Thr11-Phosphorylierung wurden in der Prometa- und Metaphase vermehrt Zellen mit freien, ungebundenen Chromosomen beobachtet (siehe Pfeil in der Metaphase in Abb. 3.21, rechts).

Die Verwendung der Aurora-B-Inhibitoren Hesperadin und ZM447439 lieferte gegensätzliche Ergebnisse zur Western-Blot-Analyse. In der Western-Blot-Analyse bewirkten beide Inhibitoren einen Verlust der Phosphorylierung, wogegen in der Immunfluoreszenzanalyse die Phosphorylierung von H3 am Thr11 unverändert im Vergleich zu unbehandelten Zellen war, während die Ser10-Phosphorylierung ausblieb (Abb. 3.22). Die Auswertung der Wirkung in der Immunfluoreszenz beschränkte sich auf Zellen in der Prometaphase, da durch die Inhibition von Aurora-B die Zellen in diesem Stadium der Mitose arretieren (Hauf et al., 2003; Ditchfield et al., 2003). Die Zellen für die Western-Blot-Analyse waren durch die Behandlung mit Nocodazol aber ebenfalls Prometaphasezellen. Trotzdem ist die Interpretation der Ergebnis-

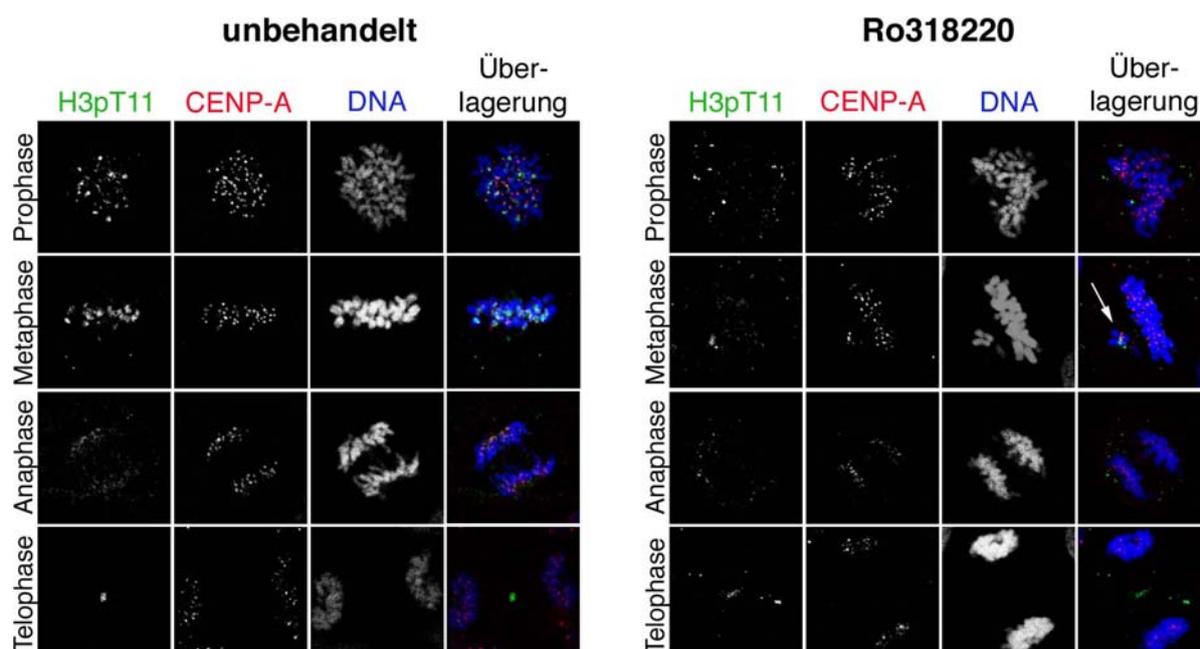


Abbildung 3.21: Immunfluoreszenzanalyse in unbehandelten Zellen und nach Behandlung mit Ro318220.

MCF-7-Zellen wurden 3 h mit oder ohne Ro318220 behandelt, anschließend fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Balken 10 μm .

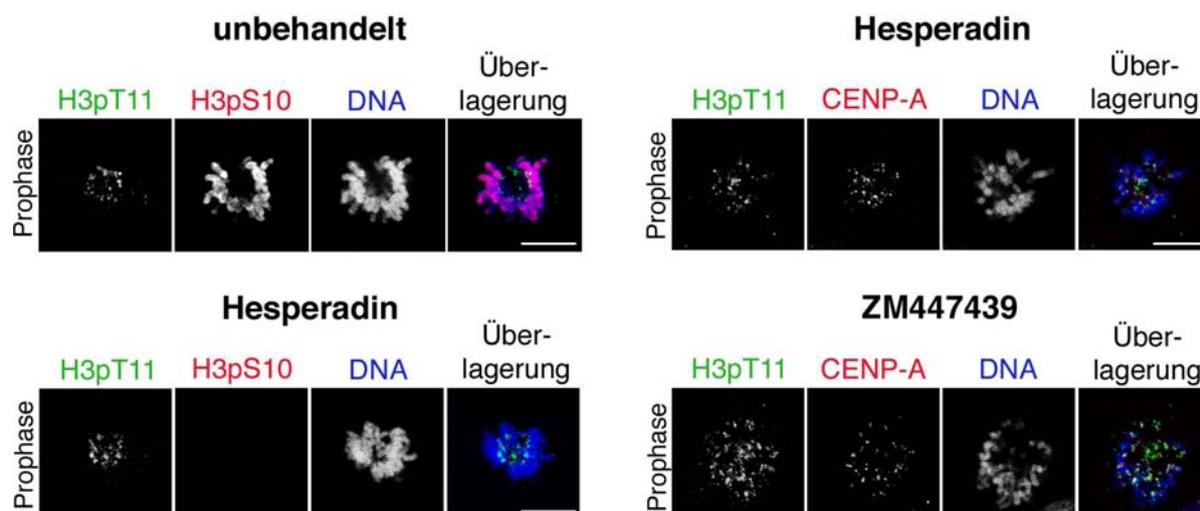


Abbildung 3.22: Immunfluoreszenzanalyse nach Behandlung mit Aurora-B-Inhibitoren.

MCF-7-Zellen wurden 3 h mit Hesperadin oder ZM447439 behandelt oder unbehandelt gelassen, anschließend fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern oder anti-H3pT11- und anti-H3pS10-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenzanalyse von ZM447439-behandelten Zellen mit anti-H3pS10-Antikörpern ist nicht gezeigt, da sie der Darstellung von Hesperadin-behandelten Zellen entspricht. Balken 10 μm .

se bezüglich des Einflusses von Aurora-B auf die Thr11-Phosphorylierung schwierig (siehe Diskussion 4.3.2).

Inhibiert man Cdk1 durch Ro3306, bestätigte sich in der Immunfluoreszenzanalyse, was sich in der Western-Blot-Analyse angedeutet hatte. Es waren keine mitotischen Zellen im Präparat mehr vorhanden, da die Zellen durch die Inaktivierung von Cdk1 entweder in der G₂-Phase arretiert wurden oder vorzeitig aus der Mitose entlassen worden sind (Vassilev et al., 2006). Eine Auswertung der Wirkung dieses Inhibitors auf die Thr11-Phosphorylierung ist aus diesem Grund nicht möglich und erklärt auch, warum sowohl die Thr11- als auch die Ser10-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse nicht detektierbar waren. Der zweite verwendete Cdk1-Inhibitor, Roscovitine, zeigte eine deutlich reduzierte Anzahl an Mitosen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es war aber möglich, Zellen in jedem Stadium der Mitose zu untersuchen. Das Ergebnis war, ähnlich wie bei dem Experiment mit den Aurora-B-Inhibitoren, gegensätzlich zum Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Während dort keine Phosphorylierung am Thr11 zu beobachten war, zeigten die Zellen in der Immunfluoreszenz keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.23).

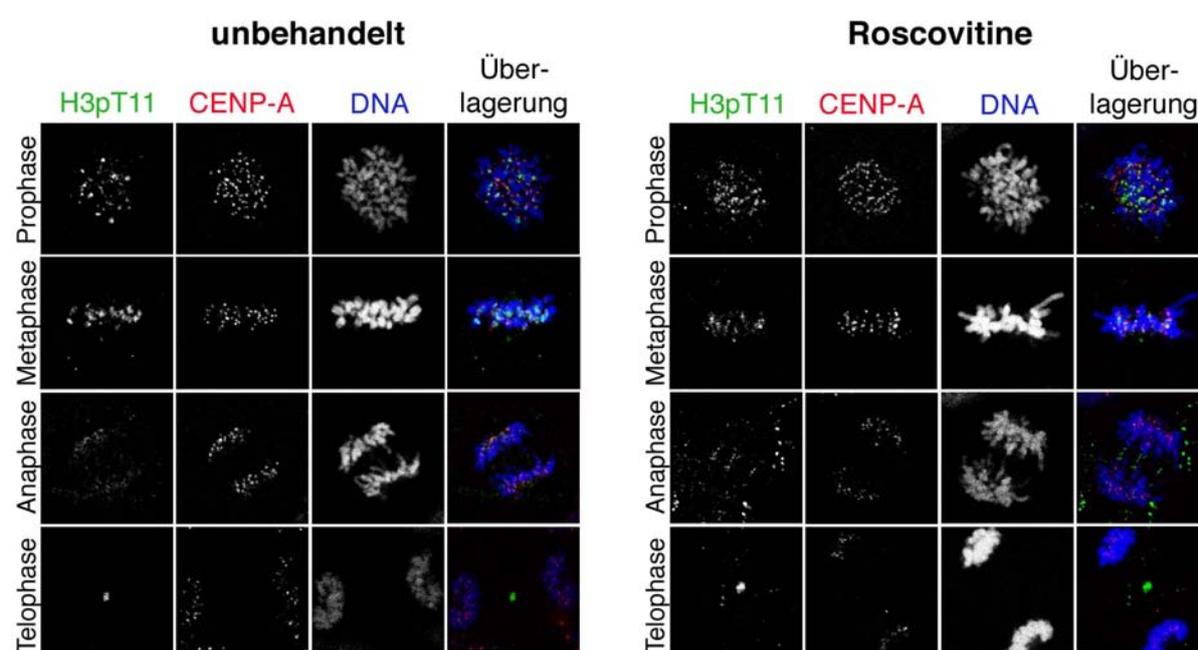


Abbildung 3.23: Immunfluoreszenzanalyse von Zellen ohne und mit Roscovitine-Behandlung.

MCF-7-Zellen wurden 3 h mit Roscovitine behandelt oder unbehandelt gelassen, anschließend fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Balken 10 µm.

Interessanterweise führte die Inhibition von Plk1 durch LFM-A13 oder TAL zu einer Verstärkung der Phosphorylierung (Abb. 3.24). Während nach der Behandlung mit LFM-A13 noch Zellen in allen mitotischen Stadien zu beobachten waren, bewirkte TAL einen Arrest der Zellen in der Metaphase (Abb. 3.24, links unten). Das Ergebnis bezogen auf Zellen in der Pro- und Metaphase war in der Immunfluoreszenz für

beide Inhibitoren gleich. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde das Signal des anti-H3pT11-Antikörpers wesentlich intensiver an den Zentromeren detektiert. Die Behandlung mit TAL führte in der Western-Blot-Analyse ebenfalls zur Verstärkung der Thr11-Phosphorylierung, wogegen LFM-A13 diese Modifikation in den Zellextrakten inhibierte.

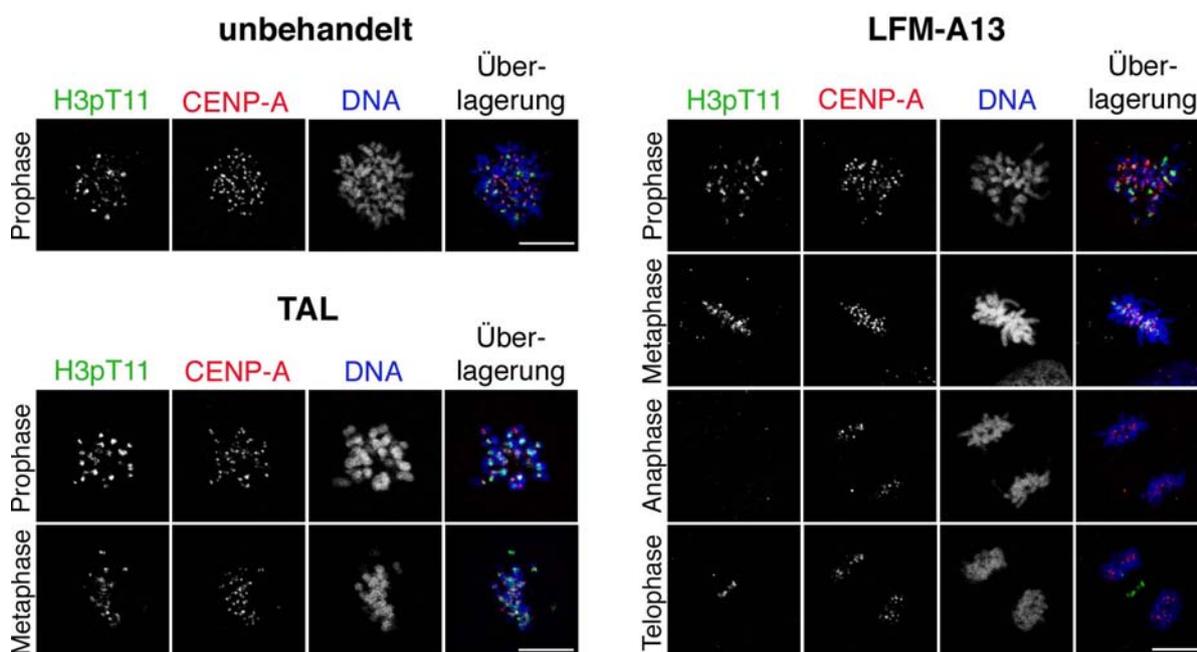


Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzanalyse nach Behandlung mit Plk1-Inhibitoren.

MCF-7-Zellen wurden 3 h mit LFM-A13 oder TAL behandelt, anschließend fixiert und mit anti-H3pT11- und anti-CENP-A-Antikörpern immungefärbt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid sichtbar gemacht. Balken 10 µm.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Inhibitoren gegen PKC/ZIPK, ROCK1, Cdk1 und Aurora-B keinen Einfluss auf die zentromerspezifische Thr11-Phosphorylierung hatten. Die Inhibition von Plk1 dagegen führte sogar zu einer Verstärkung des Signals. Plk1 ist damit wahrscheinlich indirekt an der Regulation dieser Modifikation beteiligt. Der Befund, dass zumindest LFM-A13 die ZIPK vollständig inhibierte, macht es eher unwahrscheinlich, dass sie für die zentromerspezifische Phosphorylierung verantwortlich ist. Die Inhibition von PKC-verwandten Kinasen durch Ro318220 führte sowohl in der Western-Blot-Analyse, als auch in der Immunfluoreszenzanalyse zu einem Verlust der Thr11-Phosphorylierung, während die Ser10-Phosphorylierung erhalten blieb. Dabei waren alle Mitosestadien detektierbar, so dass der Verlust der Thr11-Phosphorylierung nicht indirekt, wie bei Ro3306 verursacht wurde. Zu der Gruppe von PKC-verwandten Kinasen, die von Ro318220 inhibiert werden können, gehören auch PRK1 und PRK2. Von diesen ist PRK1 bereits als H3-Thr11-Kinase beschrieben worden und vermittelt diese Modifikation im Zusammenhang mit Transkriptionsregulation (Metzger et al., 2007). Eine Rolle für PRK1 in der Mitose ist bisher nicht bekannt. PRK2 wird dagegen als Regulator beim Eintritt in und Austritt

aus der Mitose benötigt und ist u.a. für die Phosphorylierung und Aktivierung der Phosphatase Cdc25B verantwortlich (Schmidt et al., 2007).

3.4.3 Herunterregulation von PRK1 und PRK2 mittels RNA-Interferenz

Um zu untersuchen, ob eine der beiden PRK-Isoformen, PRK1 oder PRK2, die Kinase ist, welche H3 am Thr11 in der Mitose phosphoryliert, wurde ein RNAi-Ansatz gewählt. Für die Sequenzen der siRNA-Moleküle wurden zwei bereits veröffentlichte Sequenzen eingesetzt (Metzger et al., 2007; Schmidt et al., 2007) und zunächst auf ihre Wirksamkeit überprüft. Dafür wurden MCF-7-Zellen jeweils mit 20, 50 oder 100 nM siRNA gegen PRK1 oder PRK2 transfiziert und nach 48 h geerntet. Als Kontrollen dienten untransfizierte, mit unspezifischer siRNA (negative Kontrolle) oder mit siRNA gegen das Par-4-Protein (positive Kontrolle) transfizierte Zellen. Es wurden Kernextrakte hergestellt, 10 µg Gesamtprotein der Zellextrakte in einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde mit anti-PRK1- oder anti-PRK2-Antikörper sowie anti- α -Tubulin-Antikörper als Abgleich immungefärbt.

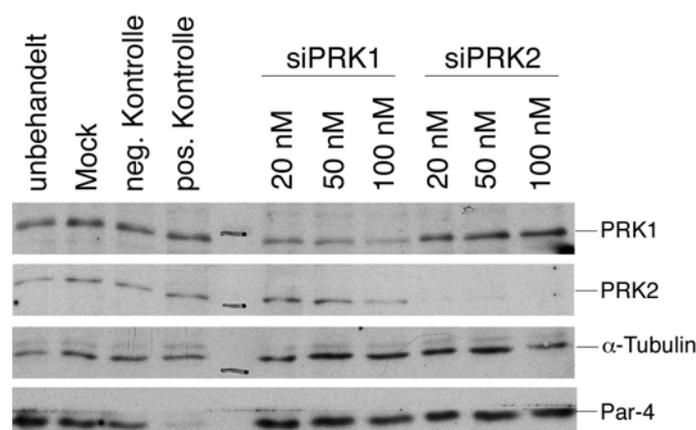


Abbildung 3.25: Reduktion des Proteinlevels von PRK1 oder PRK2 nach der Transfektion spezifischer siRNA.

MCF-7-Zellen wurden entweder nicht, ohne siRNA (Mock), mit unspezifischer siRNA (neg. Kontrolle), siRNA gegen Par-4 (pos. Kontrolle) oder den angegebenen Konzentrationen von siRNA gegen PRK1 oder PRK2 transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und Kernextrakte hergestellt. Die Funktionalität der entsprechenden siRNAs wurde in einer Western-Blot-Analyse mit anti-PRK1-, anti-PRK2-, anti- α -Tubulin-Antikörper als Abgleich oder anti-Par-4-Antikörpern untersucht.

Die getesteten siRNA-Sequenzen waren funktionell und reprimierten die Expression des jeweiligen Proteins. Während die Transfektion von 20 oder 50 nM siRNA gegen PRK1 das Proteinlevel von PRK1 auf etwa 20 % verringerte, erfolgte durch die Transfektion von 100 nM eine Reduktion auf 5 % (Abb. 3.25). Die gewählte siRNA-Sequenz gegen PRK2 war effektiver. Bereits 20 nM reichten aus, um die Expression von PRK2 vollständig zu eliminieren (Abb. 3.25). Die siRNA-Sequenzen waren außerdem spe-

zifisch, inhibierten also nur das gewünschte Protein und hatten keinen Effekt auf die Expression der jeweils anderen Isoform.

3.4.3.1 Analyse der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung vor einem PRK1/2 RNAi Hintergrund

Nachdem die Funktionalität der beiden siRNA-Sequenzen gegen PRK1 und PRK2 bestätigt worden war, sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation einer der beiden Kinasen einen Effekt auf die H3-Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot- und/oder Immunfluoreszenzanalyse hat.

Für die Western-Blot-Analyse wurden PC3-Zellen mit 100 nM siRNA gegen PRK1 oder 20 nM siRNA gegen PRK2 sowie ohne siRNA (Mock) transfiziert oder untransfiziert gelassen. 56 h nach der Transfektion wurden die Zellen zur Anreicherung mitotischer Zellen mit Nocodazol versetzt und 16 h später geerntet. Als zusätzliche Kontrolle wurden untransfizierte, aber mit Nocodazol behandelte Zellen 3 h vor der Ernte mit dem Inhibitor Ro318220 versetzt. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt. Zur Überprüfung, ob die Herunterregulation der Kinasen erfolgreich war, wurden 10 µg Gesamtprotein des Zellextraktes in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-PRK1-, anti-PRK2- oder anti- α -Tubulin-Antikörpern immungefärbt. Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus von H3 wurden 3 µg Gesamtprotein auf einer 13,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-H3pT11- oder anti-H3pS10-Antikörpern immungefärbt.

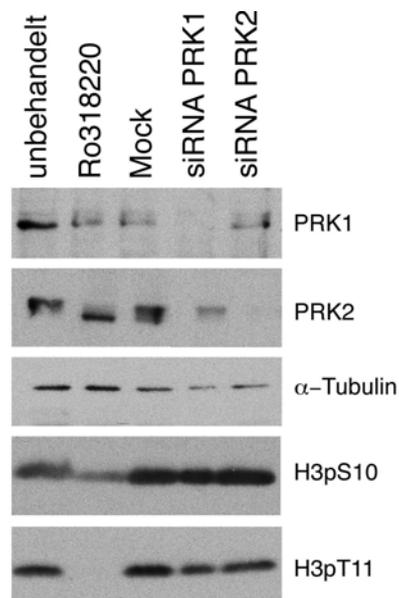


Abbildung 3.26: Phosphorylierungsstatus von H3 nach Herunterregulation von PRK1 oder PRK2.

PC-3 Zellen wurden entweder nicht, ohne siRNA (Mock) oder mit 100 nM PRK1-siRNA bzw. 20 nM PRK2-siRNA transfiziert. 56 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Nocodazol versetzt und weitere 16 h später geerntet. Zur Kontrolle wurden mit Nocodazol behandelte, aber untransfizierte Zellen 3 h vor der Ernte mit Ro318220 versetzt. Die Mitosen wurden durch Abschütteln von den Interphasezellen getrennt und es wurden Kernextrakte hergestellt. In einer Western-Blot-Analyse wurde die Expression der angegebenen Proteine immundetektiert und der Phosphorylierungsstatus von H3 analysiert.

Die Proteinmenge von PRK1 und PRK2 ist nach Behandlung mit der jeweiligen siRNA stark herunterreguliert worden (Abb. 3.26). Allerdings erfolgte keine Veränderung der Thr11- oder Ser10-Phosphorylierung. Nur die Behandlung mit Ro318220 führte erwartungsgemäß zu einem Verlust der Thr11-Phosphorylierung, während die Phosphorylierung von H3 am Ser10 erhalten blieb (siehe auch 3.4.2.2).

Es kann daher nur geschlussfolgert werden, dass eine von Ro318220-sensitive Kinase an der H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose beteiligt ist. Da aber schon in den vorangegangenen Experimenten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Western-Blot- und Immunfluoreszenzanalyse aufgetreten sind, wurde anschließend auch in der Immunfluoreszenzanalyse überprüft, ob die Herunterregulation von PRK1 oder PRK2 einen Einfluss auf die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose hat.

Dafür wurden MCF-7-Zellen bis zu einer Konfluenz von 50 % angezogen, mit 100 nM PRK1- oder 20 nM PRK2-siRNA transfiziert, 72 h später fixiert und mit anti-H3pS10- und anti-H3pT11-Antikörpern immungefärbt.

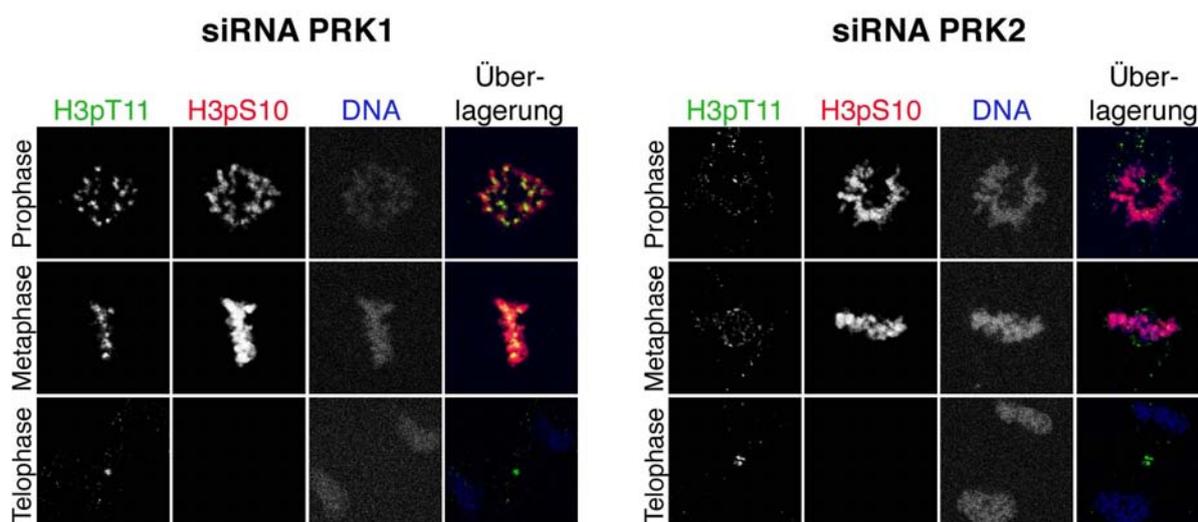


Abbildung 3.27: Phosphorylierungsstatus von H3 in der Mitose nach PRK1- oder PRK2-siRNA-Behandlung.

MCF-7-Zellen wurden mit siRNA gegen PRK1 oder PRK2 transfiziert, 72 h später fixiert und mit anti-H3pS10- und anti-H3pT11-Antikörpern immungefärbt. Es wurden Zellen aus allen mitotischen Phasen bezüglich der Phosphorylierung des H3 ausgewertet und Zellen aus der Pro-, Meta- und Telophase dargestellt. Die Detektion der DNA erfolgte mit Propidiumiodid. Balken 10 µm.

Nach der Transfektion mit PRK1-siRNA konnte kein Unterschied des Phosphorylierungsstatus von H3 am Thr11 oder Ser10 im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.27, links). Die Behandlung mit PRK2-siRNA dagegen bewirkte eine starke Verminderung der Thr11-Phosphorylierung, hatte aber keinen Effekt auf die Ser10-Phosphorylierung (Abb. 3.27, rechts). PRK2 scheint damit an der zentromerspezifischen Thr11-Phosphorylierung in der Mitose beteiligt zu sein. Aufgrund der Diskrepanz zu den Ergebnissen in der Western-Blot-Analyse ist es wahrscheinlich, dass neben PRK2 noch mindestens eine weitere Ro318220-sensitive Kinase existiert, die H3 am Thr11 in der Mitose phosphoryliert und deshalb nach der Herunterregulation von PRK2 in der Western-Blot-Analyse noch Thr11-phosphoryliertes H3 detektiert werden konnte.

3.5 Untersuchungen zur Funktion der H3-Thr11-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von H3 in der Mitose an verschiedenen Aminosäuren (Thr3, Thr11, Ser10, Ser28) erfolgt nach dem gleichen zeitlichen Muster. Sie erscheint in der späten G₂-Phase (Ser10, Thr11) oder Prophase (Thr3, Ser28) und verschwindet in der frühen Anaphase wieder. Für die H3-Thr3- und -Ser10-Phosphorylierung wurde bereits eine Beteiligung an der Chromosomenkondensation und/oder Regulation der Schwesterchromatidkohäsion postuliert (Dai et al., 2005; Wei et al., 1998). Außerdem wurde die sogenannte „ready production label“-Hypothese postuliert, nach der die H3-Ser10-Phosphorylierung als Markierung benötigt wird, um der Zelle zu signalisieren, dass sie sich in der Mitose befindet (Hans & Dimitrov, 2001). Da die H3-Thr11-Phosphorylierung zentromerspezifisch erfolgt, wurde für diese Modifikation eine Funktion als Marker für zentromerisches Chromatin vorgeschlagen, die eventuell an der Regulation des Aufbaus der Kinetochore involviert ist (Preuss et al., 2003b).

3.5.1 Die Mutation des H3 am Thr11 führt zu einer Verzögerung in der Mitose

Um die Funktion der H3-Thr11-Modifikation genauer zu untersuchen, wurden stabile Zelllinien verwendet, die zusätzlich zum endogenen H3, mutiertes, GFP-markiertes H3 exprimieren (Weinl, Diplomarbeit 2003). Die Mutation des H3 erfolgte dabei von Thr11 nach Ala (T11A) oder Asp (T11D). Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Zelllinie etabliert die GFP-markiertes WT-H3 exprimiert, um den Einfluss des GFP bestimmen zu können. Alle drei Zelllinien zeigten eine heterogene Expression von H3-GFP. Das GFP-markierte WT- und mutierte H3 wird wie endogenes H3 in die Chromosomen integriert. Das ist für Zellen in der Pro- und Metaphase für alle drei Zelllinien dargestellt (Abb. 3.28).

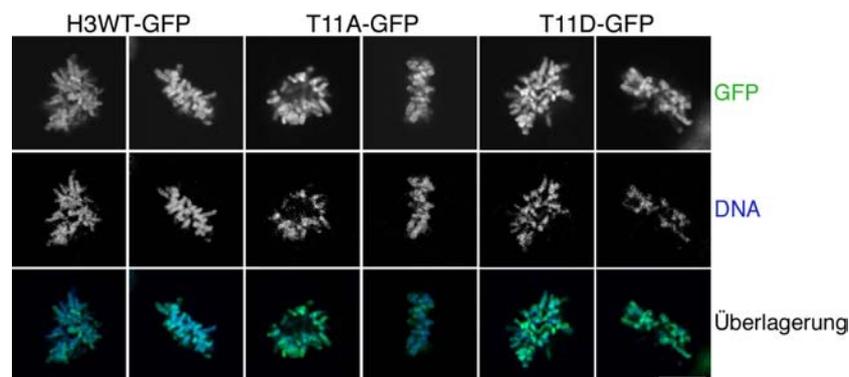


Abbildung 3.28: GFP-markiertes H3 integriert in die Nukleosomen entlang der gesamten Chromosomen.

Asynchron wachsende Zellen der Zelllinien H3WT-GFP, T11A-GFP und T11D-GFP wurden fixiert und die DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Es wurden Zellen in allen Zellzyklusphasen ausgewertet und Zellen in der Pro- und Metaphase dargestellt. Balken 10 μm .

Während der Kultivierung dieser Zelllinien fiel auf, dass T11A-GFP und T11D-GFP ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu MCF-7-Zellen oder H3WT-GFP haben

(Weinl, Diplomarbeit 2003). Ansonsten zeigten sich zunächst keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten.

Zur Analyse der Mitose in diesen Zellen wurden mikroskopische Zeitrafferaufnahmen (*Live-Cell-Imaging*) in Kooperation mit der AG Knolle (IMMEI, Bonn) durchgeführt (Abb. 3.29). Das GFP hat eine Eigenfluoreszenz mit der durch das fusionierte

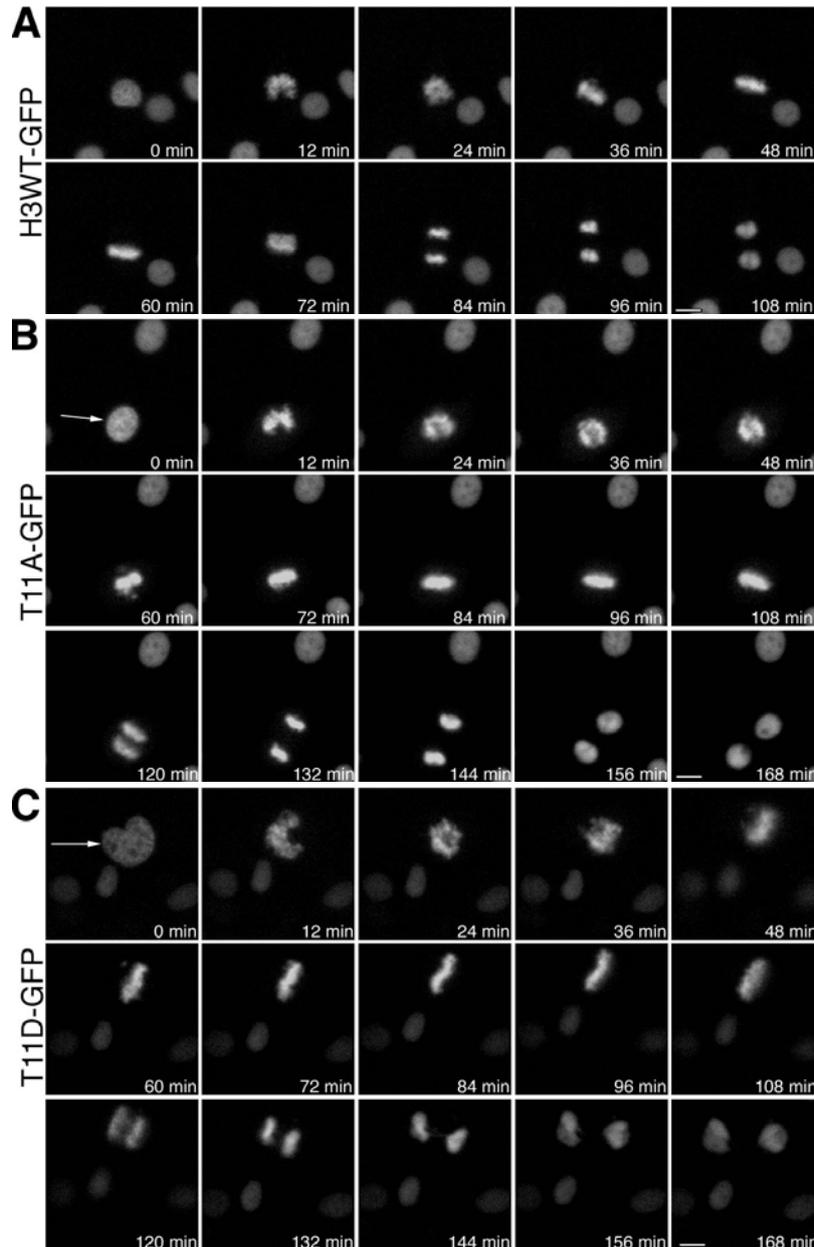


Abbildung 3.29: Live-Cell-Imaging mitotischer Zellen von H3WT-GFP, T11A-GFP und T11D-GFP. Mikroskopische Zeitrafferaufnahmen von drei stabil transfizierten Zelllinien, die, zusätzlich zum endogenen H3, GFP-markiertes WT-H3 (H3WT-GFP) oder mutiertes H3 (T11A-GFP und T11D-GFP) exprimieren. Aufgenommen wurde das GFP-Signal, angeregt mit einem 488 nm Laser eines Olympus IX81 Mikroskop in Drei-Minuten-Abständen über einen Zeitraum von 16 h. Balken 10 μm .

H3 das Chromatin in den Zellen sichtbar gemacht und so die einzelnen mitotischen Phasen verfolgt werden konnten. Als Referenz für die Mitosedauer wurden MCF-7-Zellen verwendet bei denen die Zellen im Phasenkontrastkanal des Mikroskops aufgenommen wurden (nicht dargestellt). Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von etwa 80 % angezogen und anschließend über einen Zeitraum von 16 h alle drei Minuten Aufnahmen von den Zellen gemacht. Bei der Auswertung der Zeitrafferfilme wurden die Zellen der stabilen Zelllinien nach der Expressionsstärke des GFP-Signals unterschieden. Die Einteilung erfolgte dabei nach schwach oder stark H3-GFP exprimierenden Zellen, wobei von beiden Zelltypen die gleiche Anzahl berücksichtigt wurde. Insgesamt wurden je Zelllinie mindestens 100 Zellen analysiert und die Dauer der einzelnen mitotischen Phasen bestimmt. Die Prophase wurde dabei als Zeitraum vom Auflösen der Kernmembran bzw. Kondensation der Chromosomen, je nachdem was zuerst sichtbar war, bis zur vollständigen Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte definiert. Die Metaphase schließt sich daran an und dauert bis zur sichtbaren Trennung der beiden Schwesterchromatiden an. Anaphase und Telophase wurden zusammengefasst und als Zeitraum von der Trennung der Schwesterchromatiden bis zur vollständigen Ausbildung der Kernmembran definiert.

Die Zeitrafferaufnahmen ergaben, dass in allen drei GFP-Zelllinien Zellen mit verlängerter Mitose abhängig von der Expressionsstärke des H3-GFP vorkommen. Von den schwach GFP-positiven Zellen waren es 24-34 % und von den stark GFP-positiven Zellen 42-51 % die eine Verlängerung um 33 % (H3WT-GFP), 43 % (T11A-GFP) oder 64 % (T11D-GFP) zeigten. Die Verzögerung in den einzelnen Mitosephasen war jedoch sehr unterschiedlich (Abb. 3.30).

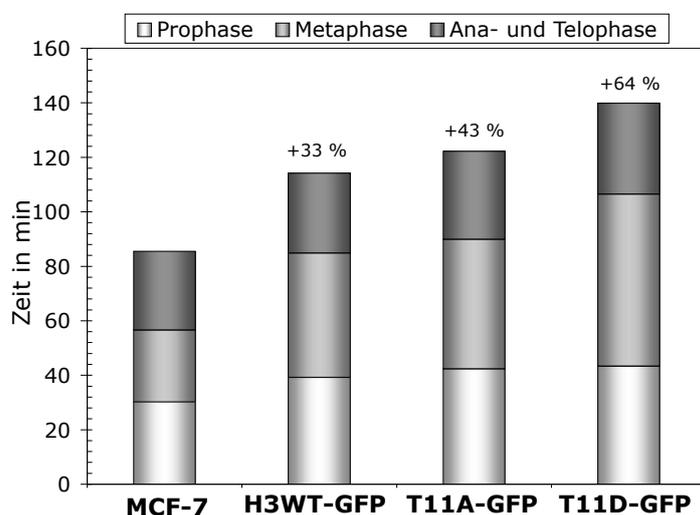


Abbildung 3.30: Die Mutation von H3 am Thr11 führt zu einer Verzögerung der Mitose. Mikroskopische Zeitrafferaufnahmen der drei H3-GFP-exprimierenden Zelllinien H3WT-GFP, T11A-GFP und T11D-GFP sowie von MCF-7-Zellen wurden bezüglich der Dauer der einzelnen mitotischen Phasen ausgewertet. Es wurden mindestens 100 Zellen analysiert und die Dauer der verlängerten Mitosen in den GFP-Zelllinien im Vergleich zur Mitosedauer in MCF-7-Zellen dargestellt.

Die Expression von T11A-GFP führte in 34 % der schwach und 45 % der stark GFP-positiven Zellen zu einer Ausdehnung der Prophase von 54 %, der Metaphase von 99 % und der Ana- und Telophase von 23 %. Für T11D-GFP betraf es 24 % der schwach

und 42 % der stark GFP-positiven Zellen. Dort war die Prophase um 38 %, die Metaphase um 120 % und die Ana- und Telophase um 12 % verlängert. In der Zelllinie H3WT-GFP kam es in 24 % der schwach bzw. 51 % der stark GFP-positiven Zellen zu einer Verlängerung der Prophase um 31 %, der Metaphase um 70 % und der Ana- und Telophase um 4 %.

Zusammengefasst wird deutlich, dass die Verzögerung in der Mitose in den beiden Mutanten-Zelllinien stärker ausgeprägt ist als in der Kontrollzelllinie H3WT-GFP im Vergleich zu MCF-7-Zellen. Die Mutation von Thr11 nach Asp (T11D) hat dabei einen größeren Effekt, vor allem auf die Dauer der Metaphase als die Mutation von Thr11 nach Ala (T11A). Die Beobachtung, dass auch in H3WT-GFP eine Verzögerung der Mitose auftrat, ist auf die GFP-Markierung von H3 zurückzuführen, die damit ebenfalls einen Einfluss auf die Mitose hat, der allerdings schwächer ist als in den Mutantenzelllinien.

3.5.2 Die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung ist an der Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte beteiligt

Die Verlängerung der Metaphase lässt vermuten, dass der Aufbau oder die Funktion der Kinetochore in diesen Zellen beeinträchtigt ist. Die nähere Analyse von MCF-7-Zellen und den GFP-Zelllinien in der Metaphase zeigte überraschenderweise eine erhöhte Anzahl an nicht vollständig ausgerichtetem Chromosomen (ungebundene Chromosomen) in den beiden Mutantenzelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. In MCF-7-Zellen und in der H3WT-GFP-Zelllinie lag der Anteil an diesen Zellen bei 8 %. In den beiden Zelllinien mit mutierten, GFP-markierten H3 oder in mit Ro318220 behandelten MCF-7-Zellen war der Anteil an Zellen mit diesem Phänotyp dagegen auf 27 % (T11A-GFP), 32 % (T11D-GFP) bzw. 40 % (Ro318220) erhöht.

Tabelle 3.2: Prozentualer Anteil der Zellen mit ungebundenen Chromosomen.

<i>Zelllinie</i>	<i>Anzahl der Zellen mit freien Chromosomen</i>
MCF-7	8 %
H3WT-GFP	8 %
T11A-GFP	27 %
T11D-GFP	32 %
MCF-7 + Ro318220	40 %

Die Mutation von H3 am Thr11 bzw. die Inhibition der H3-Thr11-Phosphorylierung durch Ro318220 führte damit zu einer 3-4-fach erhöhten Anzahl an Zellen mit ungebundenen Chromosomen in der Metaphase. Eine solche Situation bewirkt in der Zelle normalerweise die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes. Solange ungebundene oder merotelisch bzw. syntelisch gebundene Kinetochore in der Metaphase vorliegen, wird durch die Rekrutierung des Proteinkomplexes aus BubR1, Bub3 und Mad2

(MCC) an die Kinetochore dieser Chromosomen und der Aktion des Chromosomalen Passenger Komplexes (CPC) der Übergang in die Anaphase verhindert. Erst wenn alle Chromosomen in der Metaphaseplatte ausgerichtet und korrekt an die Spindelfasern angeheftet sind, wird der Spindelkontrollpunkt inaktiviert und die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase kann erfolgen (Übersicht bei Musacchio & Salmon, 2007).

Es stellte sich also die Frage, ob die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes Ursache für die beobachtete Verzögerung in der Mitose ist. Als Indiz für einen aktivierten Spindelkontrollpunkt wurde dabei die Assoziation von BubR1 am Kinetochor festgelegt. BubR1 wird nur solange an die Kinetochore rekrutiert, wie diese nicht mit den Mikrotubuli verbunden sind (Hoyt, 2001). Es wurden Zellen der drei stabilen Zelllinien ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 90 % angezogen. Dann wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-BubR1-Antikörper immungefärbt. Wie in Abbildung 3.31 dargestellt, war in den beiden Mutantenzelllinien T11A-GFP und T11D-GFP mit nicht ausgerichteten Chromosomen BubR1 detektierbar und bestätigt die Vermutung, dass der Spindelkontrollpunkt in diesen Zellen aktiviert wurde.

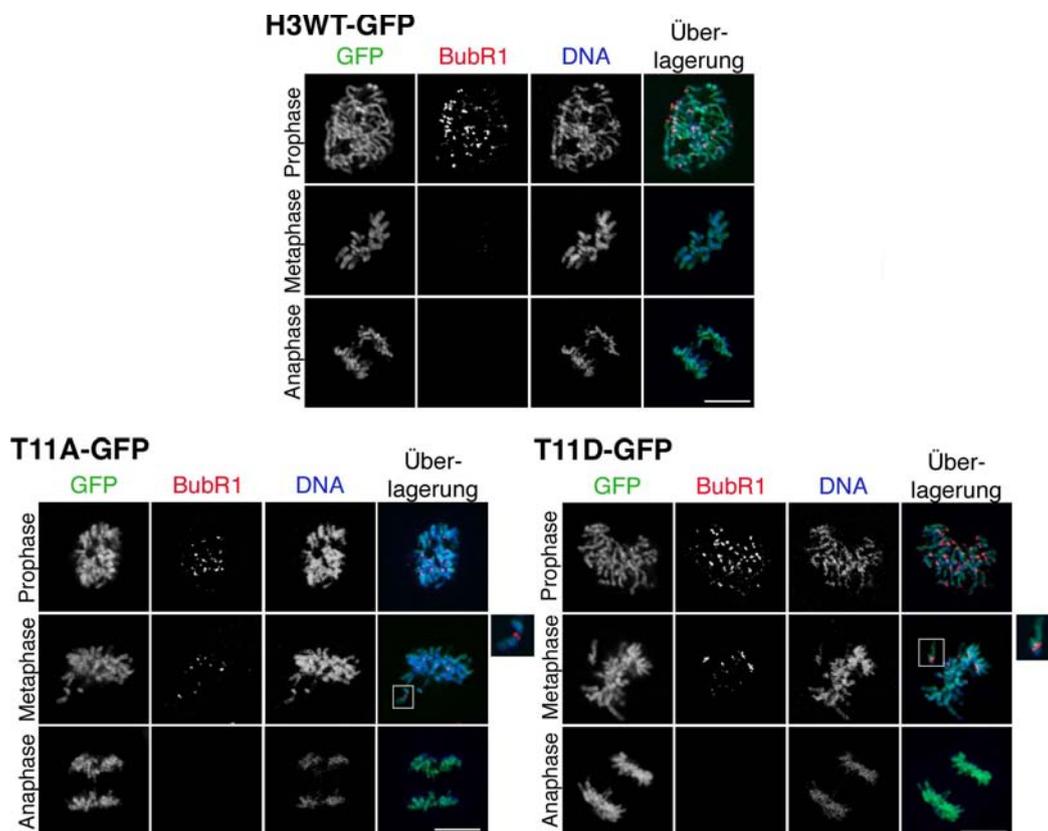


Abbildung 3.31: Die Mutation von H3 am Thr11 führt zu einer Aktivierung des Spindelkontrollpunktes durch ungebundene Chromosomen.

Indirekte Immunfluoreszenzstudien von drei stabil transfizierten Zelllinien H3WT-GFP, T11A-GFP und T11D-GFP mit anti-BubR1-Antikörper zur Überprüfung der Aktivität des Spindelkontrollpunktes. Die DNA wurde mit Propidiumiodid detektiert. Balken 10 μm .

Die Mutation der H3-Thr11-Phosphorylierung oder die Eliminierung der Thr11-Phosphorylierung durch Behandlung mit Ro318220 führte durch eine erhöhte Anzahl ungebundener Chromosomen in der Metaphase zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes und dadurch zu einer Verzögerung in der Mitose. Dieser Befund bestätigt die Vermutung, dass die Phosphorylierung von H3 am Thr11 am Aufbau oder/und der Funktion der Kinetochore beteiligt ist. Da in den untersuchten Zelllinien alle Zellen trotz der Verzögerung die Mitose beendeten, d. h. die Mutation von Thr11 keinen Arrest in der Metaphase bewirkte oder sogar Apoptose auslöste, kann man schlussfolgern, dass die Phosphorylierung von H3 am Thr11 wichtig aber nicht essentiell für die Interaktion der Mikrotubuli an die Kinetochore ist und die Abwesenheit dieser Modifikation die Interaktion nur erschwert.

4 Diskussion

Für die ZIPK wurden bereits Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen beschrieben. Ursprünglich identifiziert als Kinase die an der Apoptose beteiligt ist (Kawai et al., 1998), zeigte sich auch eine Beziehung zu Transkriptionsprozessen (Kögel et al., 1998), zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Murata-Hori et al., 1999) sowie zur Mitose und Zytokinese (Preuss et al., 2003a). Über die Funktion in der Mitose war bisher nur bekannt, dass die ZIPK mit den Zentrosomen, den Zentromeren, dem kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen assoziiert ist und dass sie Histon H3 *in vitro* am Thr11 phosphorylieren kann (Preuss et al., 2003a, 2003b). In dieser Arbeit konnten die bekannten Daten der murinen ZIPK weitgehend für die humane ZIPK bestätigt werden. Aufgrund der Assoziation mit den verschiedenen mitotischen Strukturen schien eine Verbindung zu den Aurora-Kinasen wahrscheinlich. Allerdings konnte eine solche Beziehung nicht bestätigt werden.

Die Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11 ist eine neuartige Modifikation, die vor allem in mitotischen Zellen erfolgt und der ZIPK zugeschrieben wurde (Preuss et al., 2003b). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass diese Histonmodifikation auch eine Funktion in der Transkriptionsaktivierung verschiedener Gene hat (Metzger et al., 2007; Shimada et al., 2008). Es existieren daher wahrscheinlich mehrere Kinasen, die H3 am Thr11 in unterschiedlichen Prozessen phosphorylieren können. Ein Screening mit verschiedenen Inhibitoren zur Identifizierung der korrespondierenden mitotischen Kinase ergab, dass mindestens zwei Kinasen direkt oder indirekt an der H3-Phosphorylierung am Thr11 beteiligt sind. Während die Inhibition von PRK2 den Verlust dieser Phosphorylierung bewirkte, führte die Inhibition von Plk1 zu einer Verstärkung der Modifikation. Eine Beteiligung der ZIPK dagegen konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Die H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose erfolgt zentromerspezifisch und wurde daher mit dem Aufbau oder der Funktion des Kinetochors in Beziehung gebracht (Preuss et al., 2003b). Detailliertere Untersuchungen zur Funktion dieser Modifikation deuten darauf hin, dass sie eine Rolle bei der Regulation der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion spielt.

4.1 Die mitotischen Kinasen

Der Ablauf der Mitose wird von einer Reihe sogenannter mitotischer Kinasen kontrolliert (Übersicht bei Nigg, 2001). Als Hauptregulator tritt dabei der Komplex aus Cdk1-CyclinB auf, dessen Aktivität den Eintritt in die Mitose bis zum Beginn der Anaphase kontrolliert (O'Farrell, 2001). Daneben nehmen die Mitglieder aus den Familien der Polo-, Aurora- und Nek-Kinasen Einfluss auf eine Vielzahl von mitotischen Prozessen. Der Eintritt in die Mitose, Zentrosomenreifung und Aufbau der

bipolaren Spindel, der Übergang von der Metaphase in die Anaphase, sowie der Austritt aus der Mitose und die Zytokinese werden von den mitotischen Kinasen reguliert. Sie assoziieren dabei mit verschiedenen mitotischen Strukturen, wie den Zentrosomen, den Zentromeren, der Zentralspindel, dem kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen, um „vor Ort“ ihre jeweiligen Aufgaben zu erfüllen (Übersicht bei Nigg, 2001).

4.1.1 Lokalisation der endogenen ZIPK in der Mitose

Die ZIPK ist hoch konserviert und wird in einer Vielzahl von Vertebraten exprimiert. Bisherige Befunde zur Rolle der ZIPK in der Mitose beschränkten sich aber auf Analysen an einer ektopisch exprimierten GFP-markierten murinen ZIPK (Preuss et al., 2003a). In phylogenetischen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die murine Form stärker als erwartet evolutionär abweicht und Unterschiede in Bezug auf subzelluläre Lokalisation, Substratphosphorylierung und Interaktionspartner im Vergleich zur humanen Form bestehen (Shoval et al., 2007). Während die murine ZIPK im Zellkern lokalisiert ist, wurde für die humane ZIPK eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation, mit einem geringen Anteil an Zellen mit diffuser Kernlokalisation, beschrieben (MacDonald et al., 2001b; Komatsu & Ikebe, 2004; Shoval et al., 2007).

Aufgrund dieser Unterschiede erhob sich die Frage, ob die humane ZIPK ebenfalls an den entsprechenden mitotischen Strukturen anzutreffen ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sie, wie die murine ZIPK, mit den Zentrosomen, den Zentromeren, dem kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen assoziiert. Jedoch ergaben sich einige Besonderheiten: Die humane ZIPK assoziiert nicht nur mit den Zentrosomen, sondern auch mit den Mikrotubuli zunächst an der Spindelansatzstelle und später an der Zentralspindel. An den Zentromeren ließ sich durch eine Gegenfärbung mit CENP-A oder Aurora-B zeigen, dass diese nicht exakt mit der ZIPK kolokalisieren. Da CENP-A bzw. Aurora-B im Zentromer bzw. im inneren Kinetochor lokalisieren (Übersicht bei Chan et al., 2005), ist die ZIPK vermutlich ein äußeres Kinetochorprotein.

Die Assoziation an den verschiedenen Strukturen hat die ZIPK mit den mitotischen Kinasen gemeinsam. Mit dem Chromosomal Passenger Komplex (CPC) und Plk1 gibt es zwei wichtige Regulatoren in der Mitose, die eine nahezu identische Lokalisation aufweisen (Übersicht bei Ruchaud et al., 2007; Petronczki et al., 2008). Die Vermutung, dass die ZIPK an ähnlichen Prozessen wie die mitotischen Kinasen beteiligt ist, liegt daher nahe.

Eine mögliche Beziehung der ZIPK zum CPC wurde in dieser Arbeit untersucht und wird anschließend diskutiert, aber auch Plk1 könnte in Wechselwirkung mit der ZIPK stehen. Eine direkte Phosphorylierung der ZIPK durch Plk1 findet nicht statt (Scheidtmann, unveröffentlicht), aber es könnte eine indirekte Beziehung der beiden Kinasen über MYPT1, einer Untereinheit der Protein-Phosphatase 1c, bestehen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass MYPT1 ein Antagonist von Plk1 ist (Yamashiro et al., 2008). In der Mitose phosphoryliert Cdk1 MYPT1 und ermöglicht so eine phos-

phorylierungsabhängige Interaktion von MYPT1 mit Plk1 (Yamashiro et al., 2008). Aufgrund dieser Interaktion konnte auch eine Kollokalisierung von Plk1 und phosphoryliertem MYPT1 an den Zentrosomen, den Zentromeren und der Zentralspindel beobachtet werden (Yamashiro et al., 2008). Die genaue Funktion dieser Interaktion ist noch nicht geklärt, aber MYPT1 kann durch direkte Dephosphorylierung von Plk1 oder durch die Dephosphorylierung gemeinsamer Substrate eine antagonistische Wirkung auf Plk1 ausüben (Yamashiro et al., 2008). Die ZIPK kann mit MYPT1 interagieren und durch Phosphorylierung inhibieren (MacDonald et al., 2001a; Endo et al., 2004). Es wäre daher möglich, dass eine Aufgabe der ZIPK darin besteht, durch die Inhibition von MYPT1, Plk1-vermittelte Funktionen zu begünstigen. Plk1 ist u. a. an der Zentrosomenreifung, dem Aufbau der bipolaren Spindel, der Interaktion der Mikrotubuli mit den Kinetochoren und der Zytokinese beteiligt. Für alle diese Funktionen gibt es Hinweise, dass auch die ZIPK involviert sein könnte.

Funktion am Zentrosom

Die Lokalisation der ZIPK an den Zentrosomen könnte in Beziehung mit der Zentrosomenreifung und dem Spindelaufbau stehen, indem sie an der Rekrutierung von γ -Tubulin beteiligt ist. Jedenfalls wird die ZIPK zeitgleich mit γ -Tubulin an die Zentrosomen rekrutiert und kann in einem gemeinsamen Komplex präzipitiert werden (Preuss et al., 2003a). Ausgehend von den Zentrosomen bildet sich ab der Prophase die mitotische Spindel aus sich depolymerisierenden Mikrotubuli des Zytoskeletts aus (Compton, 2000; Schiebel, 2000). Das ist ein Prozess, der durch die Phosphorylierung von mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) durch Cdk1 unterstützt wird (Cassimeris & Spittle, 2001) und mit einer massiven Rekrutierung von γ -Tubulin an die Zentrosomen einhergeht (Khodjakov & Rieder, 1999). Die Mikrotubuli sind Polymere aus Heterodimeren von α - und β -Tubulin, deren Enden sich bezüglich der Wachstumsrate unterscheiden. Das schneller wachsende Plusende ist dabei in Richtung der Chromosomen orientiert, während das stabilere Minusende an den Zentrosomen lokalisiert (Übersicht bei Wittmann et al., 2001).

Für eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation des Spindelaufbaus spricht neben der Fähigkeit der ZIPK *in vitro* α - und β -Tubulin zu phosphorylieren (Preuss et al., 2003a), die Assoziation der ZIPK an den Mikrotubuli des Spindelansatzes. Weiterhin ist bekannt, dass die Expression einer Mutante der murinen ZIPK mit einer Deletion der C-terminalen 111 Aminosäuren (ZIPK Δ C2NLS) nach der Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol einen beschleunigten Spindelaufbau bewirkt, allerdings mit einer erhöhten Anzahl an defekten und/oder mehrpoligen Spindeln (Manderscheid, Dissertation 2007).

Funktion am Kinetochor

Die Assoziation der ZIPK mit den Kinetochoren in der Pro- und Metaphase wurde bisher mit der Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11 in Verbindung gebracht (Preuss et al., 2003b). Es besteht aber auch die Möglichkeit einer Beteiligung der ZIPK an anderen zentromerspezifischen Prozessen. Da die humane ZIPK eher mit dem äußeren Kinetochor assoziiert ist, könnte sie direkt oder indirekt an der Inter-

aktion des Kinetochors mit den Mikrotubuli beteiligt sein und so auch Einfluss auf den Spindelkontrollpunkt nehmen. Bisher sind keine Interaktionspartner oder Substrate der ZIPK bekannt, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Natürlich könnte eine indirekte Beziehung über MYPT1 zu Plk1 bestehen, die die Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion stabilisiert (Sumara et al., 2004). Andererseits ist auch eine direkte Beteiligung der ZIPK an der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion vorstellbar, da sie *in vitro* α - und β -Tubulin phosphorylieren kann (Preuss et al., 2003a).

Relokalisation an die Zentralspindel

Am Metaphase-Anaphase-Übergang relokalisiert die humane ZIPK von den Kinetochoren an die Zentralspindel, welche im weiteren Verlauf der Mitose den Ort des kontraktiven Ringes und damit den Ort der späteren Teilungsfurche determiniert (Barr & Gruneberg, 2007). Wie die Mikrotubuli dabei die Positionierung der Teilungsfurche kontrollieren, ist nicht ganz geklärt. Zusammen mit anderen für die Zytokinese wichtigen Proteinen lokalisiert ein konservierter Komplex aus Mklp1 (*mitotic kinesin like protein 1*) und MgcRacGAP, als sogenanntes Centralspindlin an die Zentralspindel (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007) und ist an der Bildung dieser Struktur beteiligt (Mishima et al., 2002). Die Lokalisation von Centralspindlin ist abhängig vom CPC, respektive Aurora-B (Kaitna et al., 2000), dessen Lokalisation an die Zentralspindel wiederum von Mklp2 abhängig ist (Gruneberg et al., 2004). Auch Plk1 wird neben anderen Prozessen durch Mklp2 an die Zentralspindel rekrutiert (Neef et al., 2003, 2007). Die Kinesine oder kinesin-ähnlichen Proteine (Klps) sind eine Superfamilie von Motorproteinen, die den Transport entlang der Mikrotubuli ermöglichen (Miki et al., 2005). Einige dieser Motorproteine sind als mitotische Kinesine (Mklps) bekannt und transportieren unterschiedliche zelluläre Komponenten, wie Chromosomen oder Transkriptionskomplexe (Vernos & Karsenti, 1996). Auch die ZIPK könnte durch ein Kinesin an die Zentralspindel rekrutiert werden, da sie neben dem kontraktiven Ring in der Telophase auch mit dem Mittelkörperchen in der Zytokinese assoziiert ist und wie Aurora-B und Plk1 eine Funktion in der Zellteilung ausübt (s. u.). Eine Interaktion der ZIPK mit Mklp2 oder einem anderen Kinesin ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

Funktion in der Zytokinese

Der kontraktile Ring besteht aus einem Netzwerk von Aktinmyosinfilamenten, dessen Entstehung eines komplexen Zusammenspiels von verschiedenen Kinasen, Kinesinen und weiteren Proteine bedarf (Wu et al., 2003, 2006). Einer der Hauptregulatoren der Positionierung und des Aufbaus des kontraktiven Rings ist die GTPase RhoA. Ein Gradient von aktiver RhoA definiert den Ort des Zusammenbaus des kontraktiven Rings und ist u. a. für die Rekrutierung von Myosin II verantwortlich (Piekny et al., 2005). Die Phosphorylierung von MLC am Ser19 bewirkt die Aktivierung von Myosin II und ermöglicht die Interaktion von Myosin mit Aktin zu Aktinmyosinfilamenten, welche Voraussetzung für die Kontraktion und damit essentiell für die Teilung der Zellen ist (Matsumura et al., 2001).

Interessanterweise gibt es eine Reihe von Kinasen, die in der Zytokinese in der Teilungsfurche lokalisieren und MLC am Ser19 phosphorylieren können. Darunter ist neben der MLC-Kinase, der Citron-Kinase und ROCK1 auch die ZIPK (Matsumura, 2005). Zusätzlich zu einer direkten Phosphorylierung von MLC durch die ZIPK ist aber auch eine indirekte Beteiligung der ZIPK an der Zytokinese denkbar. Neben der Inhibition von MYPT1 (MacDonald et al., 2001a; Endo et al., 2004) kann die ZIPK auch den Inhibitor der Myosin-Phosphatase, CPI-17, durch Phosphorylierung aktivieren (MacDonald et al., 2001b) und so ebenfalls die Phosphorylierung von MLC positiv regulieren. Wird u. a. durch fehlende MLC-Phosphorylierung die Ausbildung und Kontraktion der Teilungsfurche verhindert, kommt es zu einer Anreicherung von mehrkernigen Zellen (Yokoyama et al., 2005). Diesen Phänotyp von Zellkernen mit einem anormalen DNA-Gehalt erhält man auch bei der Expression der ZIPK-Mutante $\Delta C2NLS$, die wahrscheinlich durch unkontrollierte MLC-Phosphorylierung zu einer verfrühten Teilung der Zellen führt, zu einem Zeitpunkt an dem die Teilung der Chromosomen noch nicht vollständig abgeschlossen ist (Manderscheid, Dissertation 2007). Die kausalen Zusammenhänge sind allerdings nicht geklärt.

4.1.2 Gibt es eine Beziehung zwischen ZIPK und den Aurora-Kinasen?

Die Aurora-Kinasen sind neben Cdk1, Plk1 und den Nek-Kinasen, eine Kinasefamilie mit sehr vielfältigen Aufgaben in der Mitose (Übersicht bei Carmena & Earnshaw, 2003; Vader & Lens, 2008). Aurora-A ist mit den Zentrosomen assoziiert und an der Zentrosomenreifung und dem Spindelaufbau beteiligt (Marumoto et al., 2005). Aurora-B ist Mitglied des Chromosomal Passenger Komplexes (CPC), der die Rekrutierung von Aurora-B an die unterschiedlichen mitotischen Strukturen gewährleistet (Ruchaud et al., 2007). Die Tatsache, dass die ZIPK wie der CPC mit den Zentromeren, der Zentralspindel und dem Mittelkörperchen assoziiert ist, könnte bedeuten, dass sie ebenfalls von INCENP an diese Strukturen geleitet wird. INCENP ist ein Gerüstprotein, an das die anderen Mitglieder des CPCs binden (Bolton et al., 2002; Gassmann et al., 2004; Honda et al., 2003). Außerdem ist INCENP auch essentiell um Plk1 an die Zentromere und die Zentralspindel zu rekrutieren (Goto et al., 2006). INCENP ist damit eine Plattform für verschiedene Kinasen, die teilweise gegensätzliche Prozesse vermitteln. Während Aurora-B an der Aktivierung des Spindelkontrollpunktes durch das Lösen nicht-bipolar gebundener Kinetochore beteiligt ist (Biggins & Murray, 2001; Pinsky et al., 2006), begünstigt Plk1 die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore durch die Phosphorylierung des Ndc80/Nuf2-Komplexes (Wong & Fang, 2005). Es stellte sich also die Frage, ob auch die ZIPK mit INCENP interagiert und/oder eventuell eine Beziehung zu Aurora-B oder Aurora-A besteht. Die ZIPK und die Aurora-Kinasen sind Histon H3-Kinasen (Preuss et al., 2003b; Crosio et al., 2002) und eine Interaktion könnte Auswirkungen auf die räumliche und zeitliche Phosphorylierung von Histon H3 in der Mitose haben, wodurch z. B. die H3-S10-Phosphorylierung an zentromerischem Chromatin verhindert wird.

Die Überprüfung einer möglichen Enzym-Substrat-Beziehung zwischen der ZIPK und den Aurora-Kinasen konnte allerdings keine direkte Verbindung nachweisen. Es

konnte bisher auch keine Interaktion zwischen ZIPK und INCENP festgestellt werden. Ebenso ist eine Phosphorylierung von INCENP durch die ZIPK unwahrscheinlich (Scheidtmann, unveröffentlicht). Allerdings legen *in-vitro*-Daten im Rahmen dieser Arbeit nahe, dass Aurora-B einen negativen Einfluss auf die Aktivität der ZIPK hat. Inwieweit diese Beobachtung *in vivo* von Bedeutung ist und ob einen Einfluss auf die Phosphorylierung von H3 am Ser10 und/oder Thr11 besteht, muss noch untersucht werden.

4.2 Die Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11

Die H3-Thr11-Phosphorylierung wurde zunächst als Modifikation beschrieben, die ausschließlich in mitotischen Zellen zentromerspezifisch auftritt (Preuss et al., 2003b). Als korrespondierende Kinase wurde die ZIPK postuliert, die diese Phosphorylierung *in vitro* vermitteln kann und in dem Zeitraum, in dem die Phosphorylierung auftritt mit den Zentromeren assoziiert ist (Preuss et al., 2003b). Vor kurzem wurde die H3-Thr11-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der androgen-vermittelten Transkription (Metzger et al., 2007) bzw. mit der Transkriptionsaktivierung von GCN5-abhängigen Genen beschrieben (Shimada et al., 2008). In beiden Fällen scheint die Phosphorylierung von H3 am Thr11 dabei auch Einfluss auf die Modifikation von H3 am Lys9 zu haben und im Speziellen die Acetylierung von H3 am Lys9 zu begünstigen (Metzger et al., 2007; Shimada et al., 2008).

4.2.1 Die H3-Thr11-Phosphorylierung erfolgt vor der H3-Ser10-Phosphorylierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von H3 am Thr11 bereits in der späten G₂-Phase erfolgt. Die Phosphorylierung von H3 am Ser10 erfolgt ebenfalls vor der sichtbaren Kondensation des Chromatins (Hendzel et al., 1997), aber erst nach der H3-Thr11-Phosphorylierung. Die gleichzeitige Phosphorylierung von H3 am Ser10 und Thr11 schließt sich aus (Scheidtmann, persönliche Mitteilung). Es wäre daher möglich, dass die H3-Thr11-Phosphorylierung als Art Identifikationsmarker des Zentromers dient und vor der H3-Ser10-Phosphorylierung erfolgt, um die Phosphorylierung von zentromerischen H3 am Ser10 zu verhindern. Falls eine solche Regulation bestehen sollte, wäre sie z. B. auf Ebene der korrespondierenden Kinasen möglich.

4.2.2 Am Thr11 phosphoryliertes H3 assoziiert nicht mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen

Zusätzlich zu den Zentromeren konnten mit einem phosphospezifischen anti-H3pT11-Antikörper die Zentrosomen in der Metaphase und das Mittelkörperchen in der Zytokinese detektiert werden. Auch die Verwendung eines polyklonalen anti-H3pS10-Antikörpers detektierte zu Beginn der Untersuchungen Ser10-phosphoryliertes H3 am Mittelkörperchen. Um zu bestätigen, dass H3 an diesen Strukturen lokalisiert,

wurden generelle anti-H3-Antikörper eingesetzt. Diese Antikörper detektierten aber kein H3 am Zentrosom oder dem Mittelkörperchen. Das Ergebnis war allerdings nicht schlüssig, da sämtliche getesteten anti-H3-Antikörper auch nicht mit mitotischem H3 am Chromatin interagierten. Der Nachweis von H3 in Interphasezellen oder in der Western-Blot-Analyse mit diesen Antikörpern gelang dagegen problemlos. Da diese Antikörper gegen Epitope des C-Terminus von H3 etabliert worden sind, kann es sein, dass aufgrund des hohen Kondensationsgrades des Chromatins in der Mitose der C-terminale Bereich von H3 für die Antikörper nicht zugänglich ist. Dies könnte auch für H3 am Zentrosom oder am Mittelkörperchen zutreffen.

Deshalb wurde zusätzlich untersucht, ob GFP- oder SNAP-markiertes H3 in diesen Strukturen erscheint. Die C-terminale Markierung von H3 mit einem Fusionsprotein hat keinen Einfluss auf die Inkorporation von H3 in die Nukleosomen bzw. auf die nukleosomen-basierte Funktion von H3 (Ahmad & Henikoff, 2001). Natürlich ist aber trotzdem nicht auszuschließen, dass eine Markierung mit GFP oder SNAP mit der Assoziation von H3 mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen interferiert. Außerdem ist es auch möglich, dass die Modifikation von H3 Voraussetzung für diese Assoziation ist. Da das ektopisch exprimierte GFP- oder SNAP-markierte H3 aber auch phosphoryliert werden kann, ist zu erwarten, dass es die gleiche Lokalisation aufweist wie das endogene H3. Es wurde aber keine Assoziation dieser Proteine mit den Zentrosomen oder dem Mittelkörperchen beobachtet. Daher ist es wahrscheinlich, dass dieses Signal auf eine Kreuzreaktion mit einem anderen Phospho-Epitop zurückzuführen ist. Vor allem auch, weil die Detektion des Mittelkörperchen mit monoklonalen anti-H3pS10-Antikörpern nicht mehr möglich ist.

Vor kurzem wurde die Assoziation mit dem Mittelkörperchen für Ser10- und Thr11-phosphoryliertes H3 sowie Ser7-phosphoryliertes CENP-A in der Literatur beschrieben (Li et al., 2005; Zhou et al., 2007; Li et al., 2007). Obwohl zumindest für Ser10-phosphoryliertes H3 auch Koimmunpräzipitations-Experimente mit Aurora-B durchgeführt wurden (Song et al., 2007), beruhen die Schlussfolgerungen vor allem auf Immunfluoreszenzanalysen. Weiterhin wurde auch nicht gezeigt, dass die Assoziation von modifiziertem H3 mit dem Mittelkörperchen auch mit modifikations-unabhängigen Antikörpern gegen H3 nachweisbar ist.

Sowohl die Zentrosomen als auch das Mittelkörperchen sind hochkomplexe Strukturen, die eine Vielzahl an Proteinen vereinen (McCollum, 2005; Kramer et al., 2004). Eine *in-silico*-Analyse identifizierte mehrere hundert Proteine mit dem H3-Epitop (${}_{6}$ TARKSpTG ${}_{12}$) oder Teilen davon. Darunter befand sich z. B. Cep170 (*centrosomal protein 170 kDa*), das mit den Zentrosomen und den Spindelmikrotubuli assoziiert und durch Plk1 phosphoryliert wird (Guarguaglini et al., 2005). Weiterhin wurde Dynactin 1 identifiziert, die größte Untereinheit des makromolekularen Dynactin-Komplexes, einem Kofaktor von Dynein. Dynactin bindet über seinen N-Terminus ebenfalls an Mikrotubuli und ist u. a. an der Wanderung der Chromosomen und der Ausbildung der mitotischen Spindel beteiligt (Übersicht bei Schroer, 2004). Es ist daher möglich, dass sich ein oder sogar mehrere Proteine mit einem ähnlichen Epitop am Zentrosom und Mittelkörperchen befinden, die ebenfalls von dem Antikörper erkannt werden können.

4.3 Identifizierung der mitotischen Histon H3-Thr11-Kinase

Um die Funktion der H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose untersuchen zu können, ist es wichtig die korrespondierende Kinase zu kennen, um die Modifikation gezielt blockieren zu können, ohne die anderen Funktionen von H3 zu beeinflussen. Da die ZIPK bereits mit dieser Phosphorylierung in Verbindung gebracht worden war (Preuss et al., 2003b), sollten zunächst die *in vitro* erhaltenen Befunde auch unter *in vivo*-Bedingungen verifiziert werden. Ziel war es, ein System zu etablieren, indem entweder die Expression oder die Aktivität der ZIPK inhibiert wird.

4.3.1 Die ZIPK wird durch siRNA kaum beeinflusst

Die Herunterregulation von Proteinen durch artifizielle siRNA-Moleküle ist eine inzwischen weit verbreitete Methode um die Funktion von Proteinen zu untersuchen. In vorangegangenen Studien mit siRNA gegen die murine ZIPK führte die Herunterregulation der Kinase um 90 % zu mehrkernigen Zellen infolge von Zytokinesedefekten und zur Apoptose der Zellen (Keller, Diplomarbeit 2003). Die H3-Thr11-Phosphorylierung blieb dabei aber unverändert, was nahe legt, dass entweder eine geringe Restaktivität der Kinase ausreichend ist, um die H3-Phosphorylierung aufrecht zu erhalten oder, dass eine andere Kinase diese Modifikation vermittelt.

Um die erste Möglichkeit auszuschließen wurden verschiedene siRNA-Sequenzen getestet, um eine größtmögliche Reduktion der ZIPK zu erreichen. Die Transfektion von synthetisch hergestellten siRNA-Molekülen führte aber in keinem Fall zu einer signifikanten Reduktion des Proteinlevels der ZIPK obwohl in der Positivkontrolle die Proteinmenge von Par-4 auf weniger als 1 % vermindert wurde. Es gibt etliche Beispiele in der Literatur in denen RNAi auch für Kinasen erfolgreich angewendet wurde (Chan et al., 2007; Evangelista et al., 2008). Und auch für die ZIPK gibt es darüber schon Veröffentlichungen (Kawai et al., 2003; Komatsu & Ikebe, 2004; Sato et al., 2005).

Warum diese Methode nicht funktionierte, kann vielfältige Ursachen haben. Ein Grund könnten Polymorphismen innerhalb der ZIPK sein (Brinckmann, Diplomarbeit 2007), die eventuell zu einer Situation führen in der die gewählte siRNA nicht mehr 100 % homolog zu ihrer Ziel-mRNA ist. Der Austausch einer einzigen Base in der cDNA-Sequenz eines Proteins kann zum rapiden Abfall der Funktionalität bis zu einem kompletten Funktionsverlust der vorher spezifischen siRNA führen (Holen et al., 2002). Da sieben verschiedene siRNA-Sequenzen getestet wurden, ist das aber eher unwahrscheinlich und wurde über Sequenzvergleiche auch ausgeschlossen.

Erst die plasmidbasierte Expression von shRNA-Sequenzen und die daraus resultierende Herstellung der siRNA-Moleküle durch zelleigene Proteine führte zu einer deutlichen Reduktion des Proteinlevels der ZIPK. Auch die Ergebnisse der siRNA-Experimente mit der murinen ZIPK basierten auf der Expression von shRNA-Vektoren bzw. auf der Transfektion eines siRNA-Gemisches von *in vitro* transkribierter, sogenannter esiRNA. Die transiente Transfektion der shRNA-ZIPK-Vektoren führte zu einer Reduktion der ZIPK um maximal 80 %. Das ist ein Level, bei dem eventuell noch

zuviel Protein vorhanden ist, um alle Funktionen der ZIPK einschließlich der möglichen H3-Thr11-Phosphorylierung zu inhibieren (Keller, Diplomarbeit 2003). Es wurden daraufhin stabil transfizierte shRNA-exprimierende Zelllinien hergestellt, die anfänglich eine Reduktion der ZIPK auf unter 5 % ergaben. Dieses Ergebnis wurde nur in dem primären Screening nach positiven Klonen erhalten. Eine längere Kultivierung dieser Zellen führte zu einer Wiederherstellung der WT-Situation bezüglich der Expression der ZIPK.

Als Erklärung für diese „Resistenz“ der Zellen gegen die Herunterregulation der ZIPK könnte man sich eine essentielle Funktion der Kinase vorstellen, die es für die Zelle unmöglich macht, ohne sie zu überleben. Das würde im Umkehrschluss bedeuten, dass alle Zellen in denen die ZIPK erfolgreich herunterreguliert worden ist, durch Apoptose zugrunde gingen und deshalb nicht bzw. nur am Rand erfasst wurden. Es gibt Veröffentlichungen in denen die Herunterregulation von Proteinen gelang, die essentiell für das Überleben der Zelle sind (MacKeigan et al., 2005). Auf der anderen Seite gibt es aber auch Beispiele in denen RNAi zur Apoptose führte (Reagan-Shaw & Ahmad, 2005). Ob die ZIPK in die letztere Gruppe gehört oder es andere Ursachen für die erhaltenen Befunde gibt, muss noch untersucht werden.

4.3.2 Screening verschiedener Kinaseinhibitoren

Mit dem Ziel die korrespondierende Kinase für die mitotische H3-Thr11-Phosphorylierung zu identifizieren, wurden verschiedene Kinaseinhibitoren getestet. Dabei wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die H3-Thr11-Phosphorylierung sowohl mittels Western-Blot-Analyse als auch durch Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivität der ZIPK bei Anwesenheit der Inhibitoren im *in-vitro*-Kinase-Assay bestimmt.

Die Vorteile bei der Verwendung von Inhibitoren sind ihre einfache Handhabung und ihre direkte Wirkung, sodass man relativ schnell Informationen über die physiologische Funktion der betreffenden Kinase erhalten kann. Der Nachteil der Verwendung von Inhibitoren ist, dass man nie sicher sein kann, dass die gewählte Substanz nur die betrachtete Kinase inhibiert. Selbst wenn die Wirkung auf verschiedene Kinasen bekannt ist, könnten immer noch Proteine beeinflusst werden, die man bisher nicht untersucht hat. Bei der Verwendung von Inhibitoren sollte man daher folgendes beachten (Davies et al., 2000):

1. Der beobachtete Effekt sollte bei einer Konzentration des Inhibitors erfolgen, bei der bekannte physiologische Substrate ebenfalls inhibiert werden. Außerdem sollte der Effekt mit mindestens zwei, strukturell nicht verwandten Inhibitoren zu detektieren sein, deren Wirkung auf eine Vielzahl von Kinasen *in vitro* getestet wurde.
2. Die Ergebnisse sollten durch andere Experimente, z. B. RNAi oder einen dominant-negativen Ansatz bestätigt werden können. Im Idealfall kann man eine inhibitor-resistente Mutante der Kinase verwenden, um die beobachteten Ergebnisse zu revertieren.

3. Die meisten Inhibitoren konkurrieren mit ATP. Deshalb wird häufig eine wesentlich höhere Konzentration des Inhibitors *in vivo* als *in vitro* für die gleiche Wirkung benötigt.

Bei dem Screening der verschiedenen Kinaseinhibitoren wurden u. a. auch mitotische Kinasen inhibiert, die vielfältige Funktionen in der Mitose erfüllen. Ein beobachteter Effekt auf die H3-Thr11-Phosphorylierung kann daher auch indirekt durch den Ausfall eines vorangegangenen Ereignisses bewirkt worden sein und nicht im direkten Zusammenhang mit der inhibierten Kinase stehen. Aus diesem Grund wurde, wenn möglich, die Wirkung von zwei verschiedenen Inhibitoren gegen die gleiche Kinase ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Die aufgeführten Inhibitoren bzw. siRNA wurden bezüglich ihrer Wirkung auf die H3-Thr11-Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analyse (WB) bzw. Immunfluoreszenzanalyse (IF) oder auf die Aktivität der ZIPK im *in-vitro*-Kinase-Assay untersucht. Die Wirkung von siRNA gegen PRK1 oder PRK2 auf die Aktivität der ZIPK wurde nicht getestet (n.g.).

<i>Inhibitor</i> (Referenz)	<i>Kinase</i>	WB H3pT11	IF H3pT11	<i>In-vitro</i> -Aktivität der ZIPK
ohne	—	+++	+++	+++
H7 (Sato et al., 2005)	PKC, ZIPK	+++/-	+++	+++
Y-27632 (Uehata et al., 1997)	ROCK1/2	+/-	+++	+++
Ro3306 (Vassilev et al., 2006)	Cdk1	keine Mitosen	keine Mitosen	—
Roscovitine (Planchais et al., 1997)	Cdk1/2	+/-	+++	+++
Hesperadin (Hauf et al., 2003)	Aurora-B	—	+++	+++
ZM447439 (Ditchfield et al., 2003)	Aurora-B	—	+++	+
LFM-A13 (Uckun et al., 2007)	Plk1	—	++++	—
TAL (Santamaria et al., 2007)	Plk1	+++	++++	++/-
Ro318220 (Davis et al., 1989)	PKC, PRK1/2	+/-	+/-	++/-
siPRK1	PRK1	+++	+++	n.g.
siPRK2	PRK2	+++	+/-	n.g.

Überraschenderweise trat bei der Verwendung verschiedener Inhibitoren der Effekt auf, dass in der Western-Blot-Analyse ein Verlust der Thr11-Phosphorylierung beobachtet wurde und in der Immunfluoreszenzanalyse nicht. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell dadurch erklären, dass es zwei verschiedene Bereiche und möglicherweise auch Funktionen der H3-Thr11-Phosphorylierung gibt. Es ist möglich, dass die Thr11-Phosphorylierung zwar bevorzugt an den Zentromeren erfolgt, wo sie als distinktes Signal erscheint (Preuss et al., 2003b), aber ebenso über die Chromosomenarme verteilt auftritt. Ähnliches ist von der H3-Thr3-Phosphorylierung bekannt, die zunächst an den Chromosomenarmen und mit Beginn der Metaphase präferenziell an zentromerischem H3 erfolgt (Dai et al., 2005). Eine Phosphorylierung von H3 am Thr11 an den Chromosomenarmen würde in ihrer Gesamtheit den Hauptteil des am Thr11 phosphorylierten H3 ausmachen, obwohl sie in der Immunfluoreszenz gegenüber dem punktförmigen Signal an den Zentromeren nicht oder nur kaum sichtbar wird. Man müsste weiter fordern, dass die Thr11-Phosphorylierung am Zentromer und die an den Chromosomenarmen von verschiedenen Kinasen vermittelt wird und dass der Anteil der zentromerspezifischen Thr11-Phosphorylierung so gering ist, dass er in der Western-Blot-Analyse nicht mehr detektierbar ist. Da in dieser Arbeit das Hauptinteresse der zentromerspezifischen Phosphorylierung von H3 am Thr11 galt, wurde das jeweilige Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse stärker gewichtet als das Ergebnis der Western-Blot-Analyse.

H7

H7 ist ein PKC-Inhibitor (Hidaka et al., 1984) der auch auf PKA und PKG wirkt (Engh et al., 1996). Er kann u. a. apoptotische DNA-Fragmentierung induzieren und zum Zelltod führen (Rajotte et al., 1992). Außerdem wurde er auch als ZIPK-Inhibitor beschrieben (Sato et al., 2005). Die Behandlung der Zellen mit H7 führte in vereinzelten Zellen zur Fragmentierung der DNA, die als Mikronuklei in der Immunfluoreszenzanalyse sichtbar wurden. Allerdings konnte weder in der Western-Blot- noch in der Immunfluoreszenzanalyse eine Veränderung der H3-Thr11-Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Ebenso konnte keine Aktivitätsänderung der ZIPK im *in-vitro*-Kinase-Assay festgestellt werden. PKC ist damit nicht die gesuchte Kinase. Ob die ZIPK die Thr11-Phosphorylierung vermittelt, lässt sich nicht feststellen, da sie nicht von H7 inhibiert wurde.

Y-27632

Y-27632 wurde als Inhibitor der Rho-abhängigen Kinasen ROCK1 und ROCK2 beschrieben und hemmt die Kontraktion glatter Muskelzellen u. a. durch verminderte MLC-Phosphorylierung am Ser19 (Uehata et al., 1997). Ferner kann Y-27632 auch PRK2 inhibieren (Davies et al., 2000). Die Wirkung des Inhibitors auf die H3-Thr11-Phosphorylierung war nicht konsistent. Während die H3-Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse nicht mehr detektiert wurde, war sie in der Immunfluoreszenzanalyse unbeeinflusst. Die ZIPK wurde nicht von Y-27632 inhibiert, wobei unter *in-vivo*-Bedingungen eventuell ein Effekt zu beobachten wäre, da ROCK1 die ZIPK aktivieren kann (Hagerty et al., 2007). Das würde in jedem Fall bedeuten, dass we-

der ROCK1 noch die ZIPK für die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung verantwortlich sind.

Ro3306 und Roscovitine

Der Cdk1-Inhibitor Ro3306 führte zum Verlust sämtlicher mitotischer Zellen, da diese durch die Inaktivierung von Cdk1 entweder daran gehindert wurden in die Mitose zu gehen bzw. vorzeitig aus der Mitose entlassen wurden (Vassilev et al., 2006). Eine Aussage bezüglich der mitotischen H3-Phosphorylierung ist daher nicht möglich. Allerdings inhibiert Ro3306 die ZIPK *in vitro*. Ob das einen Einfluss auf die Thr11-Phosphorylierung hat, lässt sich nicht sagen, da durch die Inhibition von Cdk1 jede Untersuchung von mitose-spezifischen Prozessen unmöglich ist. Das zeigt, dass eine klare Trennung von direktem und indirektem Effekt des Inhibitors auf die Phosphorylierung nicht immer möglich ist. Von Cdk1 ist bekannt, dass sie als Histonkinase hauptsächlich Histon H1 phosphoryliert (Langan et al., 1989). Eine Phosphorylierung von H3 am Thr11 (oder auch Ser10) ist aber unwahrscheinlich, da Cdk1 zu den sogenannten Prolin-gerichteten Kinasen (*proline-directed kinases*) gehört und die erste vom Serin oder Threonin stromabwärts gelegene Aminosäure zwingend ein Prolin sein muss (Moreno & Nurse, 1990). Diese Situation ist bei H3 nicht gegeben (${}^8\text{RKpSpTGG}_{13}$).

Der zweite Cdk-Inhibitor Roscovitine ist nicht so spezifisch wie Ro3306 und inhibiert neben Cdk1 auch Cdk2 (Planchais et al., 1997). Die Verwendung von Roscovitine führte zu einer stark reduzierten Anzahl an mitotischen Zellen. Während die H3-Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse nur noch schwach detektiert werden konnte, hatte Roscovitine keinen Einfluss auf die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung oder die Aktivität der ZIPK. Ob eine Beeinflussung der Aktivität der ZIPK durch eine direkte Cdk1-Phosphorylierung *in vivo* erfolgt und deshalb indirekt eine mögliche Thr11-Phosphorylierung an den Chromosomenarmen reduziert wurde, bleibt noch zu untersuchen. Jedenfalls ist die ZIPK *in vitro* ein Substrat von Cdk1 (Scheidtmann, persönliche Mitteilung).

Cdk1 ist nicht für die zentromerspezifische Thr11-Phosphorylierung verantwortlich. In Bezug auf die in der Western-Blot-Analyse detektierten Thr11-Phosphorylierung kann man vermuten, dass Cdk1 vielleicht indirekt beteiligt ist, eventuell auch über Phosphorylierung der ZIPK.

Hesperadin und ZM447439

Hesperadin und ZM447439 sind Aurora-B-Inhibitoren und führen in der Mitose zum Verlust der H3-Ser10-Phosphorylierung, sowie zu einem Arrest der Zellen in der Prometaphase bzw. zu mehrkernigen Zellen (Hauf et al., 2003; Ditchfield et al., 2003). Erwartungsgemäß konnte der Verlust der Ser10-Phosphorylierung sowie eine Akkumulation von Prometaphasezellen beobachtet werden. In Bezug auf die Thr11-Phosphorylierung führte die Inhibition von Aurora-B zu einem verminderten Signal in der Western-Blot-Analyse. Die zentromerspezifische Phosphorylierung dagegen blieb durch beide Inhibitoren unbeeinflusst. Die Wirkung auf die Aktivität der ZIPK

in vitro war unterschiedlich. Während Hesperadin keinen Effekt hatte, reduzierte ZM447439 die Aktivität der ZIPK um etwas mehr als die Hälfte.

Nimmt man an, dass H3 auch an den Chromosomenarmen am Thr11 phosphoryliert und diese Phosphorylierung überwiegend in der Western-Blot-Analyse detektiert wird, könnte man daraus schließen, dass Aurora-B, ähnlich wie Cdk1, entweder direkt oder indirekt an dieser Modifikation beteiligt ist, aber nicht die zentromerspezifische Thr11-Phosphorylierung vermittelt. Aurora-B assoziiert wie die ZIPK in der Pro- und Metaphase an den Zentromeren und phosphoryliert dort CENP-A (Zeitlin et al., 2001), vermittelt aber auch die Phosphorylierung von H3 am Ser10 an den Chromosomenarmen (Hendzel et al., 1997). Die Inhibition von ZIPK durch ZM447439 könnte eine Beteiligung der ZIPK an einer Thr11-Phosphorylierung an den Chromosomenarmen bedeuten. Dagegen ist eine indirekte Regulation über Aurora-B eher unwahrscheinlich, da zwischen beiden Kinasen keine direkte Enzym-Substratbeziehung besteht. Aurora-B übt *in vitro* sogar einen inhibierenden Effekt auf die ZIPK aus, weshalb die Inhibition von Aurora-B eher zu einer Aktivierung von ZIPK führen sollte. Da die Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse aber reduziert war, ist es eher unwahrscheinlich, dass sie von der ZIPK vermittelt wird.

LFM-A13 und TAL

LFM-A13 ist ein Inhibitor der Bruton's Tyrosinkinase (BTK) (Mahajan et al., 1999) und der Plk1, weshalb bei Verwendung von LFM-A13 der Aufbau der bipolaren Spindel verhindert wird und die Zellen in der Mitose arretieren (Uckun et al., 2007). Nach der Behandlung der Zellen mit LFM-A13 konnte in der Western-Blot-Analyse keine Thr11-Phosphorylierung mehr detektiert werden. Dieses Ergebnis könnte auf die Inhibition von Plk1 oder aber der ZIPK beruhen, da die ZIPK vollständig von LFM-A13 gehemmt wird. Dass nach der Behandlung mit TAL, einem Plk1-Inhibitor (Santamaria et al., 2007), der die ZIPK *in vitro* nur partiell inhibiert, die Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse unverändert blieb, spricht allerdings eher für die ZIPK als für Plk1, wogegen die Ergebnisse nach Behandlung mit den Aurora-B-Inhibitoren die ZIPK eher ausschließen. Die Beteiligung von Plk1 an einer Thr11-Phosphorylierung an den Chromosomenarmen wäre aber ebenso möglich. Plk1 ist in der Prophase am Abbau der Kohäsine beteiligt, die die Chromosomenarme zusammenhalten, indem sie durch Phosphorylierung die Dissoziation der Kohäsinkomplexe bewirkt (Sumara et al., 2002). Das ist ein Prozess, in den auch Aurora-B involviert ist (Gimenez-Abian et al., 2004) und für den auch eine Beteiligung von H3, phosphoryliert am Thr11, vorstellbar wäre.

In der Immunfluoreszenzanalyse bewirkten sowohl LFM-A13 als auch TAL eine Verstärkung der zentromerspezifischen Thr11-Phosphorylierung. Plk1 vermittelt deshalb zwar nicht direkt diese Modifikation, hat vermutlich aber einen negativen Einfluss auf die korrespondierende Kinase. Eine Beteiligung der ZIPK an der zentromerspezifischen Modifikation scheint dagegen erneut ausgeschlossen, da trotz Inhibition der ZIPK durch LFM-A13 die Thr11-Phosphorylierung verstärkt war.

Ro318220

Ro318220 wurde ursprünglich als PKC-Inhibitor entwickelt (Davis et al., 1989), inhibiert aber auch andere Kinasen, darunter die PKC-verwandten Kinasen PRK1 und PRK2 (Metzger et al., 2007). Interessanterweise führte die Verwendung von Ro318220 zu einem Verlust der Thr11-Phosphorylierung sowohl in der Western-Blot- als auch in der Immunfluoreszenzanalyse. Darüberhinaus kann Ro318220 die Kinaseaktivität der ZIPK *in vitro* um etwa 50 % reduzieren. Es scheinen damit eine oder mehrere Ro318220-sensitive Kinasen an der mitotischen H3-Thr11-Phosphorylierung beteiligt zu sein. Gute Kandidaten dafür sind PRK1 und PRK2. PRK1 wurde bereits als H3-Thr11-Kinase in der androgen-vermittelten Transkription beschrieben (Metzger et al., 2007) und für PRK2 ist eine Funktion in der Mitose postuliert worden (Schmidt et al., 2007). Dafür, dass beide oder eine von beiden Kinasen an einer möglichen Thr11-Phosphorylierung der Chromosomenarmen beteiligt sein könnte, spricht auch, dass nach Behandlung der Zellen mit Y-27632, ebenfalls ein PRK2-Inhibitor, die Thr11-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse reduziert war. Um zu überprüfen, ob PRK1 oder PRK2 an der Phosphorylierung von H3 am Thr11 beteiligt sind, wurden die beiden Kinasen mithilfe von RNAi spezifisch herunterreguliert und der Effekt auf die Phosphorylierung untersucht.

4.3.3 PRK2 ist an der zentromerspezifischen Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11 beteiligt

Durch die Transfektion von siRNA-Molekülen konnte PRK1 auf knapp 5 % und PRK2 auf weniger als 1 % herunterreguliert werden. Ferner erfolgte die Herunterregulation spezifisch für die jeweilige Isoform und hatte keinen Einfluss auf die jeweils andere Kinase. Das Ergebnis in Bezug auf die H3-Thr11-Phosphorylierung war differenzierend zwischen der Western-Blot- und der Immunfluoreszenzanalyse. In der Western-Blot-Analyse war nach Herunterregulation von PRK1 oder PRK2 die Thr11-Phosphorylierung unverändert, obwohl die Behandlung der Zellen mit Ro318220 diese Modifikation vollständig verhinderte. Die zentromerspezifische Thr11-Phosphorylierung blieb nach dem Ausschalten von PRK1 ebenfalls unverändert, während die Herunterregulation von PRK2 zu einem Verlust dieser Modifikation führte. PRK2 ist damit in der Mitose zwar an der zentromerspezifischen Thr11-Phosphorylierung beteiligt, an einer möglichen Phosphorylierung der Chromosomenarme aber nicht. Eine Beteiligung von PRK1 an der mitotischen H3-Thr11-Phosphorylierung wurde nicht beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich postulieren, dass es vermutlich mehrere Kinasen gibt, die die H3-Thr11-Phosphorylierung in der Mitose vermitteln. Überdies erfolgt die Modifikation zwar bevorzugt an den Zentromeren, eine Phosphorylierung von H3 am Thr11 an den Chromosomenarmen ist aber nicht auszuschließen. Es gibt mehrere Möglichkeiten für ein Zusammenspiel verschiedener Kinasen. Die initiale Phosphorylierung könnte von einer Kinase, z. B. PRK2 vermittelt und die Aufrechterhaltung der Modifikation durch eine andere Kinase gewährleistet werden. Ähnliches ist für

die CENP-A-Ser7-Phosphorylierung in Bezug auf die Aurora-Kinasen bekannt. Während die initiale Phosphorylierung von CENP-A in der Prophase durch Aurora-A erfolgt und u. a. notwendig für die Zentromerlokalisierung von Aurora-B ist, wird diese Phosphorylierung nach der Rekrutierung von Aurora-B an die Zentromere von Aurora-B aufrecht erhalten (Kunitoku et al., 2003).

Die zweite Möglichkeit, für die die Ergebnisse eher sprechen, ist, dass eine oder mehrere Kinasen für die Phosphorylierung am Zentromer und eine weitere oder mehrere Kinasen für eine mögliche Phosphorylierung an den Chromosomenarmen verantwortlich sind. Für die zentromerspezifische H3-Thr11-Phosphorylierung konnte eine Beteiligung von PRK2 identifiziert werden, die möglicherweise negativ von Plk1 reguliert wird, da die Inhibition von Plk1 zu einer Verstärkung dieser Modifikation am Zentromer führte. Die für eine mögliche Phosphorylierung an den Chromosomenarmen korrespondierende Kinase ist wenigstens Ro318220-, LFM-A13- und Y-27632-sensitiv. Um welche Kinase es sich dabei handelt, ist aber nicht eindeutig ableitbar. Falls die H3-Thr11-Phosphorylierung tatsächlich in zwei Bereichen der Chromosomen auftritt, stellt sich die Frage, welche Funktion die Modifikation hat und ob sie mehrere unterschiedliche Aufgaben erfüllt.

4.4 Die Funktion der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung

Neben dem Ausschalten der korrespondierenden Kinase kann die Überexpression mutierter Proteine Aufschluss über die Funktion einer Modifikation eines Proteins geben. Im idealen Fall reguliert man zunächst das WT-Protein herunter und exprimiert anschließend die Mutante des zu untersuchenden Proteins. Da Histon H3 essentiell für das Überleben der Zellen ist und mehrere untereinander redundante H3-Isoformen existieren, ist die Herunterregulation von H3 schwer bis gar nicht zu realisieren. Daher erfolgte die Expression von GFP-markierten mutierten H3 zusätzlich zum endogenen H3. Die Mutation von Thr11 nach Ala (T11A) bewirkt eine Situation, in der H3 nicht mehr an der elften Aminosäure phosphoryliert werden kann. Die Mutation von Thr11 nach Asp (T11D) sollte dagegen ständig phosphoryliertes H3 vortäuschen (Phosphomimese). Als Kontrolle diente GFP-markiertes WT-H3. Das GFP-markierte mutierte und WT-H3 wurden entlang der gesamten Chromosomen in die Nukleosomen integriert.

4.4.1 Der Verlust der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung führt zu einer Verzögerung in der Mitose

Es wurden stabile Zelllinien verwendet, um den Effekt der jeweiligen Mutation über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können. Bei der Kultivierung der Zellen fiel zunächst auf, dass sowohl die T11A-GFP-Zelllinie als auch T11D-GFP ein leicht verlangsamtes Wachstum gegenüber H3WT-GFP oder MCF-7-Zellen haben (Weinl, Diplomarbeit 2003). In *Live-Cell-Imaging*-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass diese Wachstumsverzögerung auf eine verlängerte Mitose zurückzuführen ist, die aber

in jedem Fall vollständig durchlaufen wird. Dass dieser Phänotyp nur auf maximal 50% der Zellen und am stärksten in Zellen mit hoher Expression von H3-GFP auftritt, ist auf die Anwesenheit des endogenen H3 zurückzuführen, das mit dem überexprimierten H3 konkurriert. Eine höhere Menge an H3-GFP verursacht daher einen stärker ausgeprägten Phänotyp als eine geringere Menge an H3-GFP.

Die Überexpression von T11A-GFP bewirkte den gleichen Phänotyp wie die Überexpression der Phosphomimese-Mutante T11D-GFP. Wenn die Phosphorylierung von H3 am Thr11 eine Funktion in der Mitose hat, würde man vermuten, dass eine regulierte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung wichtig ist. Das Nachahmen einer ständigen Phosphorylierung sollte daher einen anderen Phänotyp als das Ausbleiben der Modifikation verursachen. Die Mutation von Thr11 zu Asp führte daher in diesem Fall vermutlich nicht zu einem funktionellen Ersatz für die Phosphorylierung. Immerhin führt der Austausch einer Aminosäure zu einer irreversiblen Modifikation und eine COO^- -Gruppe entspricht von der Ladung auch nicht vollständig einer PO_4^{2-} -Gruppe. Angenommen die H3-Thr11-Phosphorylierung würde als Art Identifikationsmarker für Zentromere benötigt, könnte man spekulieren, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt der Einbau von Thr11-phosphoryliertem H3 in den Chromosomenarmen zur Bildung von Neozentromeren führt und die mitotische Spindel daher an mehreren Stellen eines Chromosoms anknüpft. Ein solcher Phänotyp wurde in diesem Fall nicht beobachtet, ist aber z. B. für überexprimiertes CENP-A beschrieben (Yoda et al., 2000; Lo et al., 2001). Die Mutation von Thr11 nach Glu wäre eine weitere Möglichkeit die Thr11-Phosphorylierung vorzutauschen und würde eventuell zu einem neuen Phänotyp führen.

4.4.2 Stabilisiert die Histon H3-Thr11-Phosphorylierung die Interaktion zwischen dem Kinetochor und den Mikrotubuli?

Der Verlust der Phosphorylierung von Thr11 in der Mitose führt zu einer Verzögerung in der Pro- und vor allem in der Metaphase. Sowohl die Mutation von H3 am Thr11 als auch die Behandlung der Zellen mit Ro318220 bewirkten eine 3-4-fach erhöhte Anzahl an Zellen mit ungebundenen Chromosomen, die nicht vollständig in der Metaphaseplatte ausgerichtet waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser sogenannten freien Chromosomen zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes führte, der solange den Übergang in die Anaphase verhindert, bis alle Chromosomen bipolar von den Mikrotubuli gebunden sind (Übersicht bei Musacchio & Salmon, 2007). Es besteht daher eine direkte Korrelation zwischen der erhöhten Anzahl der Zellen mit freien Chromosomen nach Eliminierung der Thr11-Phosphorylierung und der Verzögerung in der Mitose.

Für die Funktion der H3-Thr11-Phosphorylierung bestehen nun mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann die Modifikation für den Aufbau der Kinetochore wichtig sein und so indirekt die Interaktion der Kinetochore mit den Mikrotubuli erschweren. Alternativ könnte sie direkt an der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion beteiligt sein. Das Kinetochor ist eine trilaminare Struktur, bestehend aus innerem Kinetochor, Interzone und äußerem Kinetochor. Der Aufbau erfolgt hierarchisch, d.h. depletiert

man Proteine der inneren Kinetochorplatte unterbleibt die Rekrutierung aller nachfolgenden Proteine des inneren und äußeren Kinetochors (Oegema et al., 2001; Desai et al., 2003). Ganz weit oben in dieser Rangfolge steht CENP-A, das ab der Telophase bis zur frühen G₁-Phase in die Zentromere eingebaut wird und über den gesamten Zellzyklus dort verbleibt (Jansen et al., 2007). Alle anderen Kinetochorproteine, inklusive des NAC (*nucleosom-associated complex*) und des CAD (*nucleosome-distal complex*) werden erst danach aufbauend auf CENP-A rekrutiert (Foltz et al., 2006). Das äußere Kinetochor beinhaltet u. a. Motorproteine wie CENP-E (Cooke et al., 1997) und stellt die Verbindung des Zentromers zu den Plusenden der Mikrotubuli der mitotischen Spindel her (DeLuca et al., 2005).

Das Fehlen der H3-Thr11-Phosphorylierung könnte daher die Rekrutierung eines für die Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion wichtigen Proteins erschweren oder verhindern. Das führt zu einer erschwerten Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte und dadurch zu einer erhöhten Anzahl an freien Chromosomen, was wiederum durch die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes eine Verzögerung in der Mitose, dem beobachteten Phänotyp, zur Folge hat.

4.5 Ausblick

Die Assoziation der ZIPK mit den unterschiedlichen mitotischen Strukturen lässt auf verschiedene Funktionen der ZIPK während der Mitose schließen. Um die Funktionen genauer zu identifizieren, müsste es gelingen die ZIPK herunterzuregulieren, zu inhibieren oder dominant-negative Mutanten zu exprimieren. Der Versuch, mittels shRNA-Vektoren die ZIPK auszuschalten zeigte, dass die Kinase wahrscheinlich eine essentielle Funktion in der Zelle übernimmt. Um die ZIPK herunterzuregulieren sollte daher ein induzierbares System verwendet werden. Etabliert man eine stabil transfizierte Zelllinie in der die Expression von shRNA gegen ZIPK durch die Zugabe eines Induktors erfolgt, könnte man die Zellen z. B. in ihrem Wachstum synchronisieren und so die Funktion in bestimmten Abschnitten des Zellzyklusses gezielt untersuchen. Außerdem könnte man auch verschiedene Deletions- oder Punktmutanten der ZIPK vor einem ZIPK-RNAi Hintergrund exprimieren und dadurch genau die Bereiche oder Aminosäuren bestimmen, die für bestimmte Funktionen und/oder Interaktionen essentiell sind. Natürlich ließe sich mit einer solchen Zelllinie auch endgültig abklären, ob die ZIPK an der Phosphorylierung von H3 am Thr11 beteiligt ist oder nicht.

Für die mitotische Funktion der ZIPK müsste zunächst untersucht werden, wie die ZIPK in das Netzwerk der mitotischen Kinasen eingebettet ist. Es gibt z. B. mehrere potenzielle Cdk1-Phosphorylierungsstellen in der Sequenz der ZIPK und die ZIPK wird *in vitro* von Cdk1 phosphoryliert. Die Identifikation und Mutation dieser Phosphorylierungsstelle(n) würde die Möglichkeit eröffnen die Beziehung zwischen ZIPK und den anderen Kinasen genauer zu untersuchen. Zwischen Plk1 und Cdk1 gibt es z. B. eine eher indirekte Beziehung, indem Cdk1 eine Reihe von Interaktionspartnern und/oder Substraten von Plk1 phosphoryliert und so die Plk1 an diese Proteine re-

krutiert (Goto et al., 2006; Elowe et al., 2007). Um die Beziehung zwischen den mitotischen Kinasen und ZIPK zu untersuchen, wäre die Verwendung einer induzierbaren shRNA-Zelllinie ebenfalls eine große Hilfe. Sollte die ZIPK tatsächlich *in vivo* von Cdk1 phosphoryliert werden, könnte man durch Expression einer entsprechenden ZIPK-Mutante untersuchen, ob die Phosphorylierung Voraussetzung für die Assoziation mit den verschiedenen mitotischen Strukturen ist.

Daneben wäre es interessant zu wissen, von welchen Faktoren die Interaktion der ZIPK mit den Zentromeren abhängt. Da der Aufbau des Kinetochors hierarchisch erfolgt, könnte man mit der Depletion verschiedener äußerer Kinetochorproteine einen Einblick in die Position der Rangfolge der ZIPK beim Kinetochoraufbau erhalten. Außerdem ließe sich eventuell eine Beteiligung der ZIPK an der Regulation des Spindelkontrollpunktes feststellen, indem man die Beziehung zwischen der ZIPK und den Mitgliedern des MCC (*mitotic checkpoint complex*) untersucht, die ebenfalls an das äußere Kinetochor rekrutiert werden (DeLuca et al., 2003). Das könnte durch Interaktionsstudien, wie Koimmunpräzipitationen oder mithilfe eines *in-vitro*-Kinase-Assays erfolgen. Anschließend könnte man untersuchen, wie der Transfer der ZIPK von den Zentromeren an die Zentralspindel am Metaphase-Anaphase-Übergang reguliert wird. Für den CPC und Plk1 ist dafür z. B. das Kinesin Mklp2 essentiell (Gruneberg et al., 2004; Neef et al., 2003). Auch hier ließe sich durch Koimmunpräzipitationsexperimente überprüfen, ob die ZIPK z. B. mit Mklp2 oder einem anderen Kinesin interagiert.

Ganz allgemein könnte man mithilfe eines *Pull-down*-Assays versuchen, neue (mitotische) Interaktionspartner zu identifizieren. Nach der Aufreinigung einer GST- oder SNAP-markierten ZIPK und anschließender Immobilisierung der Kinase an einer geeigneten Matrix könnte man unter Verwendung mitotischer Zellextrakte potenzielle Interaktionspartner fischen, die ebenfalls Hinweise auf die Funktion der ZIPK in der Mitose liefern könnten.

Für die H3-Thr11-Phosphorylierung steht die endgültige Identifikation der korrespondierenden Kinase(n) im Vordergrund. Durch die verwendeten Inhibitoren bzw. die RNAi-Experimente kennt man zwei potenzielle Kinasen die an der Regulation der Modifikation beteiligt sind. Ob PRK2 alleine oder zusammen mit der ZIPK bzw. in Kooperation mit weiteren Kinasen für die Phosphorylierung von H3 am Thr11 verantwortlich ist, muss noch weiter untersucht werden. Die Verwendung von siRNA gegen unterschiedliche Kinasen bzw. die Kombination von siRNA mit verschiedenen Inhibitoren könnte Aufschluss über die Beteiligung weiterer Kinasen geben. Außerdem gilt es zu überprüfen, ob die antagonistische Wirkung von Plk1 durch eine direkte Interaktion mit der korrespondierenden Kinase oder durch einen indirekten Effekt verursacht wird. In diesem Zusammenhang müsste auch geklärt werden, ob die H3-Thr11-Phosphorylierung ausschließlich an den Zentromeren oder auch an den Chromosomenarmen auftritt. Durch die Färbung von Metaphasechromosomen oder von langezogenen Chromosomenfasern (*chromosomal fibers*) könnte man genau bestimmen, wo die H3-Thr11-Phosphorylierung auf den Chromosomen erfolgt.

5 Zusammenfassung

Die ZIPK ist eine Serin/Threonin-Kinase die in verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Regulation der Transkription, Zellmotilität, Apoptose und Mitose involviert ist. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit zwei Aspekten. Zum einen wurde die Lokalisation der ZIPK in der Mitose und zum anderen die Bedeutung der Histon H3-Thr11-Phosphorylierung untersucht.

Es konnte bestätigt werden, dass die humane ZIPK wie die murine ZIPK mit den Zentrosomen, den Zentromeren, dem kontraktilen Ring und dem Mittelkörperchen assoziiert ist. Die Assoziation der humanen ZIPK an den Zentromeren konnte auf das äußere Kinetochor begrenzt sowie eine Lokalisation mit der Zentralspindel am Metaphase-Anaphase-Übergang beobachtet werden. Damit ähnelt die Lokalisation der ZIPK in der Mitose der Wanderung des Chromosomal Passenger Komplexes (CPC). Eine direkte Beziehung zwischen Aurora-B oder INCENP, beides Komponenten des CPCs, konnten jedoch nicht festgestellt werden.

Um die mitotische Funktion der ZIPK genauer untersuchen zu können, sollte ein System zur Herunterregulation der ZIPK mithilfe von RNAi etabliert werden. Jedoch konnte weder durch die Transfektion von siRNA, noch über die plasmidbasierte Expression von shRNA das Expressionslevel der ZIPK ausreichend reduziert werden.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der mitotischen Phosphorylierung von Histon H3 am Thr11. Detailliertere Untersuchungen ergaben, dass diese zentromerspezifische H3-Modifikation in der späten G₂-Phase kurz vor dem Eintreten der Zelle in die Mitose und zwar bereits vor der Phosphorylierung von H3 am Ser10 erfolgt. Mithilfe eines Screenings verschiedener Kinaseinhibitoren konnten zwei potenzielle Kinasen identifiziert werden, die an der Thr11-Phosphorylierung beteiligt sind. Während die Inhibition von PRK2 eine verminderte Thr11-Phosphorylierung zur Folge hatte, führte die Inhibition von Plk1 zu einer Verstärkung der zentromerspezifischen Thr11-Phosphorylierung. Ob die ZIPK *in vivo* an der Phosphorylierung von H3 am Thr11 beteiligt ist, konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Um die Funktion dieser Modifikation zu ermitteln wurden stabil transfizierte Zelllinien verwendet, die eine Mutante (T11A oder T11D) bzw. das WT-Protein von H3 als GFP-Fusionsprotein exprimieren. Bei beiden Mutantenzelllinien (T11A-GFP und T11D-GFP) wurde ein verlangsamtes Wachstum beobachtet. Durch *Live-Cell-Imaging*-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das auf eine Verzögerung in der Pro- und Metaphase zurückzuführen ist, was auf eine Aktivierung des Spindelkontrollpunktes hindeutet. Außerdem wurde in diesen Zelllinien eine um das 3-4-fach erhöhte Anzahl an Zellen mit freien Chromosomen in der Metaphase beobachtet, ein Pänotyp der auch auftritt wenn die Thr11-Phosphorylierung durch Inhibition von PRK2 ausfällt. Die Phosphorylierung von H3 am Thr11 könnte deshalb - entweder direkt oder indirekt - an der Regulation der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion beteiligt sein.

Literaturverzeichnis

- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C., & Carmena, M. (2001). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol*, 153(4), 865–880.
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, 10(17), 1075–1078.
- Ahmad, K. & Henikoff, S. (2001). Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol*, 153(1), 101–110.
- Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M., & Earnshaw, W. C. (1998). Incenp centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein hp1. *J Cell Biol*, 143(7), 1763–1774.
- Altieri, D. C. (2006). The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*, 18(6), 609–615.
- Amor, D. J., Kalitsis, P., Sumer, H., & Choo, K. H. A. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol*, 14(7), 359–368.
- Barr, F. A. & Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell*, 131(5), 847–860.
- Barr, F. A., Sillje, H. H. W., & Nigg, E. A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6), 429–440.
- Bialojan, C. & Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*, 256(1), 283–290.
- Biggins, S. & Murray, A. W. (2001). The budding yeast protein kinase ip11/aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, 15(23), 3118–3129.
- Biggins, S. & Walczak, C. E. (2003). Captivating capture: How microtubules attach to kinetochores. *Curr Biol*, 13(11), R449–60.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513–1523.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S., Novotny, M., Slamon, D. J., & Plowman, G. D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*, 17(11), 3052–3065.

- Bishop, J. D. & Schumacher, J. M. (2002). Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem*, 277(31), 27577–27580.
- Bolton, M. A., Lan, W., Powers, S. E., McClelland, M. L., Kuang, J., & Stukenberg, P. T. (2002). Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 13(9), 3064–3077.
- Brinckmann, D. (2007). *Subzelluläre Lokalisation und INteraktion der ZIP-Kinase und der MYosin-Phosphatase-Untereinheit MYPT1*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., & Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567), 550–553.
- Burch, L. R., Scott, M., Pohler, E., Meek, D., & Hupp, T. (2004). Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J Mol Biol*, 337(1), 115–128.
- Carmell, M. A. & Hannon, G. J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 11(3), 214–218.
- Carmena, M. & Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(11), 842–854.
- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C., & Wheatley, S. P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated hela cells. *J Cell Sci*, 116(Pt 14), 2987–2998.
- Cassimeris, L. & Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol*, 210, 163–226.
- Chan, E. Y. W., Kir, S., & Tooze, S. A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, 282(35), 25464–25474.
- Chan, G. K., Liu, S.-T., & Yen, T. J. (2005). Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol*, 15(11), 589–598.
- Chantalat, L., Skoufias, D. A., Kleman, J. P., Jung, B., Dideberg, O., & Margolis, R. L. (2000). Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell*, 6(1), 183–189.
- Chen, J., Jin, S., Tahir, S. K., Zhang, H., Liu, X., Sarthy, A. V., McGonigal, T. P., Liu, Z., Rosenberg, S. H., & Ng, S.-C. (2003). Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem*, 278(1), 486–490.
- Cohen, O., Feinstein, E., & Kimchi, A. (1997). DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J*, 16(5), 998–1008.
- Compton, D. A. (2000). Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem*, 69, 95–114.

- Cooke, C. A., Heck, M. M., & Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (incenp) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol*, 105(5), 2053–2067.
- Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J., & Earnshaw, W. C. (1997). Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma*, 106(7), 446–455.
- Crosio, C., Fimia, G. M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C. D., & Sassone-Corsi, P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*, 22(3), 874–885.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., & Higgins, J. M. G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev*, 19(4), 472–488.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351(Pt 1), 95–105.
- Davis, P. D., Hill, C. H., Keech, E., Lawton, G., Nixon, J. S., Sedgwick, A. D., Wadsworth, J., Westmacott, D., & Wilkinson, S. E. (1989). Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Lett*, 259(1), 61–63.
- DeLuca, J. G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J. M., Salmon, E. D., & McEwen, B. F. (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol Cell*, 16(2), 519–531.
- DeLuca, J. G., Howell, B. J., Canman, J. C., Hickey, J. M., Fang, G., & Salmon, E. D. (2003). Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Curr Biol*, 13(23), 2103–2109.
- Desai, A., Rybina, S., Muller-Reichert, T., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Hyman, A., & Oegema, K. (2003). KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev*, 17(19), 2421–2435.
- Dharmacon (2004). *RNA Interference: Technical Reference and Application Guide*.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., & Taylor, S. S. (2003). Aurora b couples chromosome alignment with anaphase by targeting bubr1, mad2, and cenp-e to kinetochores. *J Cell Biol*, 161(2), 267–280.
- Ducat, D. & Zheng, Y. (2004). Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*, 301(1), 60–67.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188–200.
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274(5293), 1664–1672.

- Elowe, S., Hummer, S., Uldschmid, A., Li, X., & Nigg, E. A. (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev*, 21(17), 2205–2219.
- Endo, A., Surks, H. K., Mochizuki, S., Mochizuki, N., & Mendelsohn, M. E. (2004). Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J Biol Chem*, 279(40), 42055–42061.
- Engemann, H., Heinzl, V., Page, G., Preuss, U., & Scheidtmann, K. H. (2002). DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition. *Nucleic Acids Res*, 30(6), 1408–1417.
- Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., & Bossemeyer, D. (1996). Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J Biol Chem*, 271(42), 26157–26164.
- Evangelista, M., Lim, T. Y., Lee, J., Parker, L., Ashique, A., Peterson, A. S., Ye, W., Davis, D. P., & de Sauvage, F. J. (2008). Kinome siRNA screen identifies regulators of ciliogenesis and hedgehog signal transduction. *Sci Signal*, 1(39), ra7.
- Foltz, D. R., Jansen, L. E. T., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R. r., & Cleveland, D. W. (2006). The human cenp-a centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol*, 8(5), 458–469.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol*, 166(2), 179–191.
- Giet, R. & Glover, D. M. (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*, 152(4), 669–682.
- Jimenez-Abian, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., & Peters, J.-M. (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol*, 14(13), 1187–1193.
- Glotzer, M. (2001). Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 351–386.
- Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E. A., & Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol*, 8(2), 180–187.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., & Inagaki, M. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*, 274(36), 25543–25549.
- Graves, P. R., Winkfield, K. M., & Haystead, T. A. J. (2005). Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation. *J Biol Chem*, 280(10), 9363–9374.

- Gray, H. (1918). *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea and Febinger, 20th edition.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E. A., & Barr, F. A. (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol*, 166(2), 167–172.
- Guarguaglini, G., Duncan, P. I., Stierhof, Y. D., Holmstrom, T., Duensing, S., & Nigg, E. A. (2005). The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell*, 16(3), 1095–1107.
- Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L., & Tobey, R. A. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*, 84(1), 1–15.
- Gutierrez, R. M. & Hnilica, L. S. (1967). Tissue specificity of histone phosphorylation. *Science*, 157(794), 1324–1325.
- Hagerty, L., Weitzel, D. H., Chambers, J., Fortner, C. N., Brush, M. H., Loiselle, D., Hosoya, H., & Haystead, T. A. J. (2007). ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J Biol Chem*, 282(7), 4884–4893.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557–580.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244–251.
- Hans, F. & Dimitrov, S. (2001). Histone h3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20(24), 3021–3027.
- Harbour, J. W. & Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14(19), 2393–2409.
- Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., & Peters, J.-M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, 161(2), 281–294.
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., & Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., & Sasaki, Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, 23(21), 5036–5041.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., & Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, 30(8), 1757–1766.

- Honda, R., Korner, R., & Nigg, E. A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell*, 14(8), 3325–3341.
- Hoyt, M. A. (2001). A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol*, 154(5), 909–911.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M., & Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102(3), 279–291.
- Inbal, B., Shani, G., Cohen, O., Kissil, J. L., & Kimchi, A. (2000). Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol*, 20(3), 1044–1054.
- Jansen, L. E. T., Black, B. E., Foltz, D. R., & Cleveland, D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol*, 176(6), 795–805.
- Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149–158.
- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V., & Glotzer, M. (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol*, 10(19), 1172–1181.
- Kawai, T., Akira, S., & Reed, J. C. (2003). ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol Cell Biol*, 23(17), 6174–6186.
- Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H., & Akira, S. (1998). ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol*, 18(3), 1642–1651.
- Kawai, T., Nomura, F., Hoshino, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Akira, S. (1999). Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene*, 18(23), 3471–3480.
- Keller, C. L. A. (2003). *Ausschalten der Dlk mittels siRNA Technik und Analyse des daraus resultierenden Phänotyps*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Khodjakov, A. & Rieder, C. L. (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol*, 146(3), 585–596.
- Kim, D. & Rossi, J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 44(5), 613–616.
- Klein, U. R., Nigg, E. A., & Gruneberg, U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell*, 17(6), 2547–2558.
- Knauer, S. K., Mann, W., & Stauber, R. H. (2007). Survivin's dual role: an export's view. *Cell Cycle*, 6(5), 518–521.

- Kögel, D., Bierbaum, H., Preuss, U., & Scheidtmann, K. H. (1999). C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene*, 18(51), 7212–7218.
- Kögel, D., Plottner, O., Landsberg, G., Christian, S., & Scheidtmann, K. H. (1998). Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene*, 17(20), 2645–2654.
- Komatsu, S. & Ikebe, M. (2004). ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol*, 165(2), 243–254.
- Kramer, A., Lukas, J., & Bartek, J. (2004). Checking out the centrosome. *Cell Cycle*, 3(11), 1390–1393.
- Kretschmer-Kazemi Far, R. & Sczakiel, G. (2003). The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 31(15), 4417–4424.
- 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*, 5(6), 853–864.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Langan, T. A., Gautier, J., Lohka, M., Hollingsworth, R., Moreno, S., Nurse, P., Maller, J., & Sclafani, R. A. (1989). Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol*, 9(9), 3860–3868.
- Leister, P., Felten, A., Chasan, A., & Scheidtmann, K. (2007). ZIP kinase plays a crucial role in androgen receptor-mediated transcription. *Oncogene*.
- Li, D., Liu, R., Song, L., Zhou, H., Chen, J., & Huang, X. (2007). The special location of p-H3 and p-CENP-A on heterochromatin during mitosis in MCF-7. *Mol Biol Rep*.
- Li, D. W., Yang, Q., Chen, J. T., Zhou, H., Liu, R. M., & Huang, X. T. (2005). Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell Res*, 15(2), 120–126.
- Lo, A. W., Craig, J. M., Saffery, R., Kalitsis, P., Irvine, D. V., Earle, E., Magliano, D. J., & Choo, K. H. (2001). A 330 kb CENP-A binding domain and altered replication timing at a human neocentromere. *EMBO J*, 20(8), 2087–2096.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., & Darnell, J. (2001). *Molekulare Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag, 4th edition.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260.

- MacDonald, J. A., Borman, M. A., Muranyi, A., Somlyo, A. V., Hartshorne, D. J., & Haystead, T. A. (2001a). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2419–2424.
- MacDonald, J. A., Eto, M., Borman, M. A., Brautigan, D. L., & Haystead, T. A. (2001b). Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett*, 493(2-3), 91–94.
- MacKeigan, J. P., Murphy, L. O., & Blenis, J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, 7(6), 591–600.
- Mahajan, S., Ghosh, S., Sudbeck, E. A., Zheng, Y., Downs, S., Hupke, M., & Uckun, F. M. (1999). Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *J Biol Chem*, 274(14), 9587–9599.
- Maiato, H. & Sunkel, C. E. (2004). Kinetochore-microtubule interactions during cell division. *Chromosome Res*, 12(6), 585–597.
- Manderscheid, S. (2007). *Untersuchungen zur Funktion der ZIP Kinase in der Mitose und der Cytokinese*. Dissertation, Universität Bonn.
- Marumoto, T., Zhang, D., & Saya, H. (2005). Aurora-a - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer*, 5(1), 42–50.
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*, 15(7), 371–377.
- Matsumura, F., Totsukawa, G., Yamakita, Y., & Yamashiro, S. (2001). Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct Funct*, 26(6), 639–644.
- McCollum, D. (2005). Cytokinesis: breaking the ties that bind. *Curr Biol*, 15(24), R998–1000.
- McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L., & West, R. R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 193–219.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2), 185–197.
- Meraldi, P., Honda, R., & Nigg, E. A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, 14(1), 29–36.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., & Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*, 19(19), 5194–5201.

- Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., Patnaik, D., Higgins, J., Potier, N., Scheidtmann, K., Buettner, R., & Schule, R. (2007). Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat Cell Biol*.
- Miki, H., Okada, Y., & Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol*, 15(9), 467–476.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., & Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*, 140(3), 627–636.
- Mishima, M., Kaitna, S., & Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell*, 2(1), 41–54.
- Monier, K., Mouradian, S., & Sullivan, K. F. (2007). DNA methylation promotes Aurora-B-driven phosphorylation of histone H3 in chromosomal subdomains. *J Cell Sci*, 120(Pt 1), 101–114.
- Moreno, S. & Nurse, P. (1990). Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell*, 61(4), 549–551.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 261–291.
- Muchmore, S. W., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E. D., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S. C., & Altieri, D. C. (2000). Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell*, 6(1), 173–182.
- Murata-Hori, M., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T., & Hosoya, H. (2001). HeLa zip kinase induces diphosphorylation of myosin ii regulatory light chain and reorganization of actin filaments in nonmuscle cells. *Oncogene*, 20(57), 8175–8183.
- Murata-Hori, M., Suizu, F., Iwasaki, T., Kikuchi, A., & Hosoya, H. (1999). ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS Lett*, 451(1), 81–84.
- Musacchio, A. & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(5), 379–393.
- Neef, R., Gruneberg, U., Kopajtich, R., Li, X., Nigg, E. A., Sillje, H., & Barr, F. A. (2007). Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol*, 9(4), 436–444.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E. A., Mayer, T. U., & Barr, F. A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol*, 162(5), 863–875.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(1), 21–32.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., & Hyman, A. A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 153(6), 1209–1226.

- O'Farrell, P. H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol*, 11(12), 512–519.
- O'Regan, L., Blot, J., & Fry, A. M. (2007). Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div*, 2, 25.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., & Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16(8), 948–958.
- Page, G., Kögel, D., Rangnekar, V., & Scheidtmann, K. H. (1999a). Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene*, 18(51), 7265–7273.
- Page, G., Lodige, I., Kögel, D., & Scheidtmann, K. H. (1999b). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett*, 462(1-2), 187–191.
- Pavicic-Kaltenbrunner, V., Mishima, M., & Glotzer, M. (2007). Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell*, 18(12), 4992–5003.
- Peeper, D. S., Parker, L. L., Ewen, M. E., Toebes, M., Hall, F. L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A. J., & Piwnicka-Worms, H. (1993). A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J*, 12(5), 1947–1954.
- Peters, J.-M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, 9(5), 931–943.
- Peterson, C. L. & Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14(14), R546–51.
- Petronczki, M., Lenart, P., & Peters, J.-M. (2008). Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell*, 14(5), 646–659.
- Piekny, A., Werner, M., & Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the rho zone. *Trends Cell Biol*, 15(12), 651–658.
- Pinsky, B. A., Kung, C., Shokat, K. M., & Biggins, S. (2006). The ip11-aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol*, 8(1), 78–83.
- Planchais, S., Glab, N., Trehin, C., Perennes, C., Bureau, J. M., Meijer, L., & Bergounioux, C. (1997). Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J*, 12(1), 191–202.
- Polioudaki, H., Markaki, Y., Kourmouli, N., Dialynas, G., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., & Georgatos, S. D. (2004). Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett*, 560(1-3), 39–44.

- Preuss, U., Bierbaum, H., Buchenau, P., & Scheidtmann, K. H. (2003a). DAP-like kinase, a member of the death-associated protein kinase family, associates with centrosomes, centrosomes, and the contractile ring during mitosis. *Eur J Cell Biol*, 82(9), 447–459.
- Preuss, U., Landsberg, G., & Scheidtmann, K. H. (2003b). Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res*, 31(3), 878–885.
- Prigent, C. & Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*, 116(Pt 18), 3677–3685.
- Rajotte, D., Haddad, P., Haman, A., Cragoe, E. J. J., & Hoang, T. (1992). Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Biol Chem*, 267(14), 9980–9987.
- Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., Valencia, D. W., & Yen, T. J. (1993). CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil Cytoskeleton*, 26(3), 214–226.
- Reagan-Shaw, S. & Ahmad, N. (2005). Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J*, 19(6), 611–613.
- Rieder, C. L. & Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol*, 8(8), 310–318.
- Romano, A., Guse, A., Krascenicova, I., Schnabel, H., Schnabel, R., & Glotzer, M. (2003). Csc-1: a subunit of the aurora b kinase complex that binds to the survivin-like protein bir-1 and the incenp-like protein icp-1. *J Cell Biol*, 161(2), 229–236.
- Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 798–812.
- Salaun, P., Rannou, Y., & Prigent, C. (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol*, 617, 41–56.
- Salomoni, P. & Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell*, 108(2), 165–170.
- Sambrook, J. & Russel, d. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition.
- Sanjo, H., Kawai, T., & Akira, S. (1998). DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem*, 273(44), 29066–29071.
- Santamaria, A., Neef, R., Eberspacher, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D., Prechtel, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wortmann, L., Barr, F. A., & Nigg, E. A. (2007). Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell*, 18(10), 4024–4036.

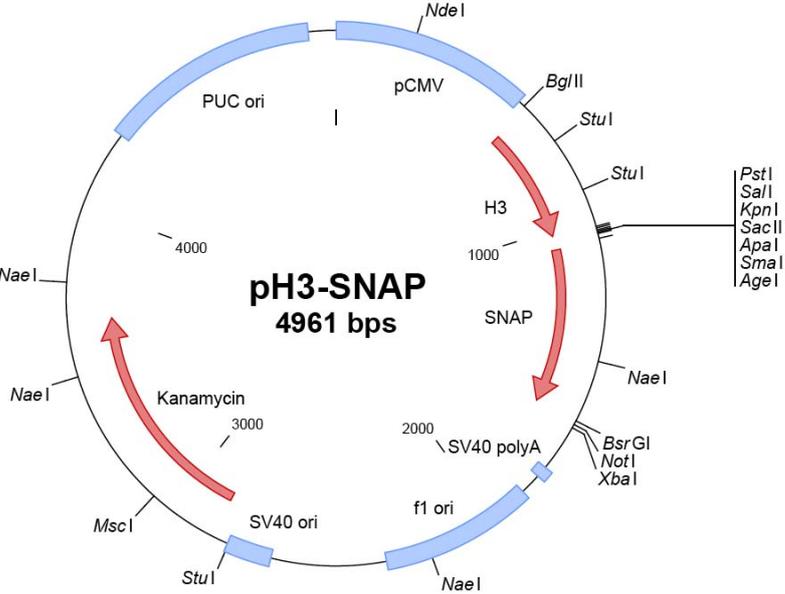
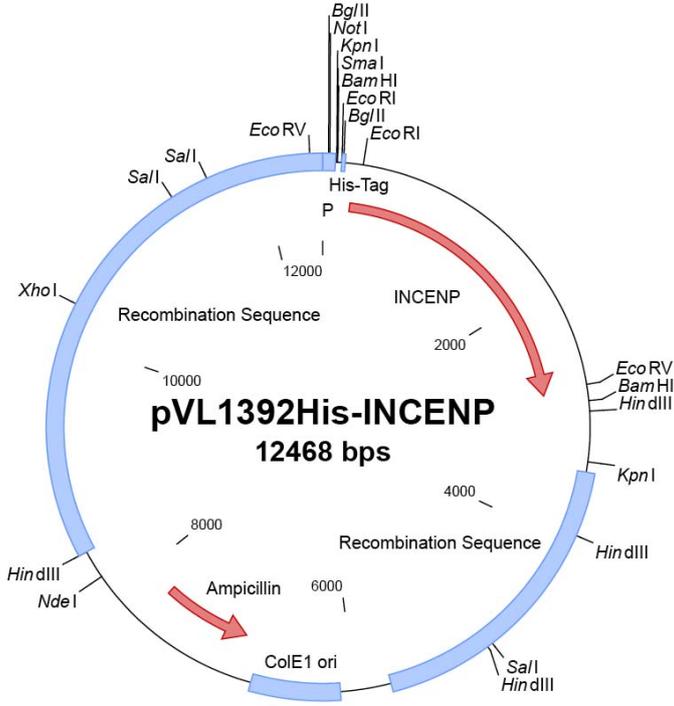
- Sato, N., Kawai, T., Sugiyama, K., Muromoto, R., Imoto, S., Sekine, Y., Ishida, M., Akira, S., & Matsuda, T. (2005). Physical and functional interactions between STAT3 and ZIP kinase. *Int Immunol*, 17(12), 1543–1552.
- Scheidtmann, K. H. (2007). Dlk/ZIP kinase, a novel Ser/Thr-specific protein kinase with multiple functions. *Signal Transduction*.
- Scheidtmann, K. H., Echle, B., & Walter, G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol*, 44(1), 116–133.
- Schiebel, E. (2000). gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1), 113–118.
- Schmidt, A., Durgan, J., Magalhaes, A., & Hall, A. (2007). Rho GTPases regulate PRK2/PKN2 to control entry into mitosis and exit from cytokinesis. *EMBO J*, 26(6), 1624–1636.
- Schroer, T. A. (2004). Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 759–779.
- Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L. B., Schneider, T. R., Stukenberg, P. T., & Musacchio, A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell*, 18(3), 379–391.
- Shah, J. V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., & Cleveland, D. W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr Biol*, 14(11), 942–952.
- Shani, G., Marash, L., Gozuacik, D., Bialik, S., Teitelbaum, L., Shohat, G., & Kimchi, A. (2004). Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol*, 24(19), 8611–8626.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., & Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell*, 132(2), 221–232.
- Shoemaker, C. B. & Chalkley, R. (1980). H3-specific nucleohistone kinase of bovine thymus chromatin. Purification, characterization, and specificity for threonine residue 3. *J Biol Chem*, 255(22), 11048–11055.
- Shoval, Y., Pietrokovski, S., & Kimchi, A. (2007). ZIPK: a unique case of murine-specific divergence of a conserved vertebrate gene. *PLoS Genet*, 3(10), 1884–1893.
- Song, L., Li, D., Liu, R., Zhou, H., Chen, J., & Huang, X. (2007). Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger. *Cell Biol Int*, 31(10), 1184–1190.
- Spencer, V. A. & Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240(1), 1–12.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45.

- Sumara, I., Gimenez-Abian, J. F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., & Peters, J.-M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol*, 14(19), 1712–1722.
- Sumara, I., Vorlauffer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., & Peters, J.-M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell*, 9(3), 515–525.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*, 30(2), 106–114.
- Taylor, W. R. & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803–1815.
- Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S., & Otsu, M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J*, 17(3), 667–676.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350–4354.
- Uckun, F. M., Dibirdik, I., Qazi, S., Vassilev, A., Ma, H., Mao, C., Benyumov, A., & Emami, K. H. (2007). Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK). *Bioorg Med Chem*, 15(2), 800–814.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., & Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6654), 990–994.
- Vader, G., Cruijisen, C. W. A., van Harn, T., Vromans, M. J. M., Medema, R. H., & Lens, S. M. A. (2007). The chromosomal passenger complex controls spindle checkpoint function independent from its role in correcting microtubule kinetochore interactions. *Mol Biol Cell*, 18(11), 4553–4564.
- Vader, G., Kauw, J. J. W., Medema, R. H., & Lens, S. M. A. (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep*, 7(1), 85–92.
- Vader, G. & Lens, S. M. A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1786(1), 60–72.
- Vader, G., Maia, A. F., & Lens, S. M. (2008). The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div*, 3, 10.
- Vagnarelli, P. & Earnshaw, W. C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*, 113(5), 211–222.
- Van Hooser, A., Goodrich, D. W., Allis, C. D., Brinkley, B. R., & Mancini, M. A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci*, 111 (Pt 23), 3497–3506.

- Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C., & Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28), 10660–10665.
- Verdecia, M. A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D. A., Hunter, T., & Noel, J. P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol*, 7(7), 602–608.
- Vernos, I. & Karsenti, E. (1996). Motors involved in spindle assembly and chromosome segregation. *Curr Opin Cell Biol*, 8(1), 4–9.
- Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol*, 43(2-3), 203–220.
- Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., & Allis, C. D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7480–7484.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., & Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97(1), 99–109.
- Weinl, V. (2003). *Untersuchungen zur Dlk-spezifischen Histon Phosphorylierung*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Wheatley, S. P., Carvalho, A., Vagnarelli, P., & Earnshaw, W. C. (2001). Incenp is required for proper targeting of survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol*, 11(11), 886–890.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862.
- Wittmann, T., Hyman, A., & Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol*, 3(1), E28–34.
- Wong, O. K. & Fang, G. (2005). Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores. *J Cell Biol*, 170(5), 709–719.
- Wu, J.-Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R., & Pollard, T. D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell*, 5(5), 723–734.
- Wu, J.-Q., Sirotkin, V., Kovar, D. R., Lord, M., Beltzner, C. C., Kuhn, J. R., & Pollard, T. D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol*, 174(3), 391–402.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D. J., & Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell*, 14(5), 787–797.
- Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K., & Okazaki, T. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13), 7266–7271.

- Yokoyama, T., Goto, H., Izawa, I., Mizutani, H., & Inagaki, M. (2005). Aurora-b and rho-kinase/rock, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (erm). *Genes Cells*, 10(2), 127–137.
- Zeitlin, S. G., Shelby, R. D., & Sullivan, K. F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*, 155(7), 1147–1157.
- Zhou, H., Li, D., Song, L., Liu, R., Chen, J., & Huang, X. (2007). Thr11 phosphorylated H3 is associated with centromere DNA during mitosis in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem*, 311(1–2), 45–51.

Anhang



Ergebnis der *in-silico*-Analyse

Protein-blast gegen das H3pT11-Epitop TARKSTG. Genutzt wurde das BLASTP-Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Angegeben sind die Gen-ID, Name und Accession-Nr. Außerdem wurde das entsprechende Epitop der identifizierten Proteine dargestellt. Die Zahlen beziehen sich auf die Position in der Aminosäuresequenz.

Tabelle 5.1: *Protein-blast* gegen das H3pT11-Epitop TARKSTG.

Query = H3pT11-Epitop

Sbjct = Epitop des identifizierten Proteins

<i>Gen-ID</i>	<i>Name</i>	<i>Abgleich</i>	<i>Accession-Nr.</i>
440093 LOC440093	histone H3-like	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	NP 001013721.2
644914 LOC644914	similar to H3 histone, family 3B	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	XP 935204.1 XP 001128558.1 XP 001720197.1
8350 HIST1H3A	histone cluster 1, H3a	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	
8290 HIST3H3	histone cluster 3, H3	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	NP 003484.1
126961 HIST2H3C	histone cluster 2, H3c	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	NP 066403.2 NP 001005464.1 NP 001116847.1
3020 H3F3A	H3 histone, family 3A	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 7 TARKSTG 13	NP 002098.1 NP 005315.1
26148 C10orf12	hypothetical protein LOC26148	Query 1 TARKST 6 TARKST Sbjct 186 TARKST 191	NP 056467.2
10455 PECl	peroxisomal D3, D2-enoyl-CoA isomerase	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 102 TDRKSTG 108	NP 006108.2
10129 FRY	furry homolog	Query 1 TARKSTG 7 TARKSTG Sbjct 1950 TARKSTG 1957	NP 075463.2
1639 DCTN1	dynactin 1 isoform 4	Query 1 TARKST 6 TARKST Sbjct 7 TARKTT 12	NP 001128513.1
340096 LOC340096	similar to hCG1642908	Query 1 TARKST 6 TARKST Sbjct 52 TARKAT 57	XP 293943.3 XP 001724344.1 XP 001132114.2

Tabelle 5.1: *Protein-blast* gegen das H3pT11-Epitop TARKSTG.

Query = H3pT11-Epitop

Sbjct = Epitop des identifizierten Proteins

<i>Gen-ID</i>	<i>Name</i>	<i>Abgleich</i>	<i>Accession-Nr.</i>
391769 LOC391769	hypothetical protein	Query 1 TARKST 6 TARK+T Sbjct 7 TARKAT 12	XP 373079.1 XP 941436.1 XP 001713953.1
1639 DCTN1	dynactin 1 isoform 2	Query 1 TARKST 6 TARK+T Sbjct 7 TARKTT 12	NP 075408.1
1639 DCTN1	dynactin 1 isoform 1	Query 1 TARKST 6 TARK+T Sbjct 141 TARKTT 146	NP 004073.2
651709 LOC651709	similar to double homeobox, 4	Query 2 ARKSTG 7 ARK TG Sbjct 411 ARKNTG 416	XP 001732942.1
645685 LOC645685	hypothetical protein	Query 2 ARKSTG 7 ARK+TG Sbjct 113 ARKATG 118	XP 001714163.1
55778 ZNF839	similar to potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 29 RKSTG 33	XP 001713952.1 XP 001715584.1 ref XP 001719006.1
285527 FRYL	furry-like	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 1912 RKSTG 1916	NP 055845.1
642103 LOC642103	similar to hCG1811191	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 733 RKSTG 737	XP 941326.3
645685 LOC645685	hypothetical protein	Query 2 ARKSTG 7 ARK+TG Sbjct 148 ARKATG 153	XP 001129117.1
645685 LOC645685	hypothetical protein	Query 2 ARKSTG 7 ARK+TG Sbjct 113 ARKATG 118	XP 933787.2
57449 PLEKHG5	pleckstrin homology domain containing, family G, member 5	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 108 RKSTG 112	NP 001036128.1
83744 ZNF484	zinc finger protein 484 isoform b	Query 2 ARKST 6 ARKST Sbjct 666 ARKST 670	NP 001007102.1
57706 DENND1A	DENN/MADD domain containing 1A	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 552 RKSTG 556	NP 065997.1

Tabelle 5.1: *Protein-blast* gegen das H3pT11-Epitop TARKSTG.

Query = H3pT11-Epitop

Sbjct = Epitop des identifizierten Proteins

<i>Gen-ID</i>	<i>Name</i>	<i>Abgleich</i>	<i>Accession-Nr.</i>
8522 GAS7	growth arrest-specific 7, isoform c	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 150 RKSTG 154	NP 958839.1
57511 COG6	component of oligomeric golgi complex 6	Query 1 TARKST 6 TAR+ST Sbjct 271 TARRST 276	NP 065802.1
9895 KIAA0329	hypothetical protein	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 211 RKSTG 215	NP 055659.1
5341 PLEK	pleckstrin	Query 2 ARKST 6 ARKST Sbjct 110 ARKST 114	NP 002655.2
1180 CLCN1	chloride channel 1, skeletal muscle	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 894 RKSTG 898	NP 000074.2
84248 FYTDD1	forty-two-three domain containing 1 isoform 2	Query 2 ARKSTG 7 ARK+TG Sbjct 16 ARKTTG 21	NP 001011537.1
200317 FLJ23865	hypothetical protein FLJ23865	Query 3 RKSTG 7 RKSTG Sbjct 37 RKSTG 41	XP 001723574.1 XP 001725326.1 XP 001726803.1
3624 INHBA	inhibin beta A precursor	Query 2 ARKST 6 ARKST Sbjct 213 ARKST 217	NP 002183.1
54812 AFTPH	aftiphilin protein	Query 2 ARKSTG 7 ARKS+G Sbjct 514 ARKSSG 519	NP 001002243.1 NP 982261.2
9859 CEP170	centrosomal protein 170kDa	Query 1 TARKST 6 T RKST Sbjct 948 TERKST 953	NP 055627.2 NP 001035863.1
91653 BOC	brother of CDO Boc homolog (mouse)	Query 2 ARKSTG 7 ARKS+G Sbjct 811 ARKSSG 816	NP 150279.1
6404 SELPLG	selectin P ligand	Query 2 ARKSTG 7 AR+STG Sbjct 87 ARRSTG 92	NP 002997.1

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die fachliche Unterstützung und für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für seine Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

Prof. Dr. Norbert Koch und Prof. Dr. Martin Reuter danke ich für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission als fachnaher und fachangrenzender Gutachter.

Vielen Dank an Dirk Stabenow (AG Knolle, IMMEI, Bonn) für die Unterstützung bei der Aufnahme der Live-Cell-Bilder.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Scheidtmann möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an Gerd und Andrea für die vielen Anregungen, bereichernden Diskussionen und die freundschaftliche Laboratmosphäre. Vielen Dank Sarah für deine Freundschaft.

Ein großer Dank geht auch an alle übrigen Institutsmitglieder für die immerwährende Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Besonders der guten Seele des Instituts möchte ich für ihre offene Art und die Informationen für alle Lebenslagen danken.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie, Sebastian und den 8s. Vielen Dank für das gebotene Zuhause, für den liebevollen Umgang und die Unterstützung in jeder Situation. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.