

Funktionelle Regulation des Kinesins MCAK durch die Zellzyklus-Kinase Cyclin B1/CDK1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe–Universität

in Frankfurt am Main



von

Mourad Sanhaji

Frankfurt am Main, 2010

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johan Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen

Dekanin: Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn und Herr Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputation:

Meine Eltern
Mahjouba und Hassan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einführung	3
1.1 Modelle zur Bildung der mitotischen Spindel	6
1.2 Die Regulatoren der Dynamik der Mikrotubuli	7
1.3 Die Kinesin-13 Familie der Motorproteine	7
1.3.1 Die subzelluläre Lokalisation der Kinesin-13 Familie in der Mitose	8
1.3.2 Die Kinesine-13 sind für den Aufbau der Spindel erforderlich	9
1.3.3 Die Kinesine-13 regulieren die Spindel Dynamik	10
1.3.4 Die Kinesine-13 sind für die Korrektur der Mikrotubuli-Kinetochor Fehlverknüpfungen verantwortlich	11
1.3.5 Modell zur Depolymerisierung der Mikrotubuli durch die Kinesine-13	12
1.3.6 Modell zur Depolymerisierung der Mikrotubuli durch MCAK	14
1.4 Mitotische Regulation der Aktivität von MCAK	16
1.5 Der MPF-Komplex („ <i>Mitosis Promoting Factor</i> “)	18
1.6 Cyclin B1/CDK1 zwischen Zytoplasma und Kern	20
1.7 Die Ausführung der Mitose unter der Führung von Cyclin B1/CDK1	20
1.7.1 Potentielle Substrate von CDK1	20
1.7.2 Der Zerfall der Nuklear-Membran	21
1.7.3 Die Kondensierung der Chromosomen	21
1.7.4 Aufbau der Spindel	22
1.7.5 Segregation der Chromosomen	22
Ziel der Arbeit	23
2. Ergebnisse	25
2.1 Zellzyklus-abhängige Proteinexpression von MCAK und Cyclin B1/CDK1	25
2.1.1 Die Regulation von MCAK in verschiedenen Tumor Zelllinien	28
2.1.2 Co-Immunopräzipitation des MCAK-Cyclin B1-CDK1 Komplexes	29
2.2 Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert das Protein MCAK <i>in vitro</i>	30

2.3 Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert Threonin 537 innerhalb des katalytischen Bereiches von MCAK	32
2.4 Der Phospho-Antikörper p-MCAK erkennt das phosphorylierte Threonin 537 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	35
2.5 Funktionelle Untersuchungen der Phosphorylierung des Threonin 537 durch Cyclin B1/CDK1	42
2.6 MCAK Mutanten halten die Zellen in der Prometaphase und Metaphase fest	45
2.7 Die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E verursacht Chromosomenfehlverteilungen während die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A aberrante Spindeln erzeugt	48
2.8 Die MCAK T537E Mutante führt zu einer Reduzierung des Abstandes zwischen den Geschwister-Centromeren	51
2.9 Die Kinase CDK1 kontrolliert die centrosomale Lokalisation von MCAK	53
3. Diskussion	58
3.1 Zellzyklus-abhängige Expression und Lokalisation von MCAK und Cyclin B1	59
3.2 CDK1 phosphoryliert MCAK am Threonin 537 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	61
3.3 Die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 vermindert die katalytische Aktivität von MCAK und ermöglicht den Aufbau der mitotischen Spindel	61
3.3.1 Die Phosphorylierung inhibiert die katalytische Aktivität von MCAK	61
3.3.2 Die Phosphorylierung des katalytischen Bereiches von MCAK durch CDK1 ermöglicht den Aufbau einer bipolaren Spindel	64
3.4 MCAK T537E verursacht versetzte Chromosomen in der Metaphase	67
4. Material und Methoden	72
4.1 Chemikalien, Material und Antikörper	72
4.1.1 Western Blot und Immunoprecipitation	72
4.1.2 Immunofluoreszenz	72
4.1.3 Durchflusszytometrische Messungen	73

Inhaltsverzeichnis

4.2 Herstellung eines phospho-spezifischen Antikörpers p-MCAK (pThr 537)	73
4.3 Herstellung der DNA Konstrukte	73
4.4 Transformation von Bakterienzellen	75
4.5 Expression bakterieller Proteine	75
4.6 <i>In vitro</i> Kinase Assay	77
4.7 Zellkultur und Transfektionen	77
4.8 siRNA Experiment und Transfektion	78
4.9 Synchronisation der Zellen	78
4.10 Herstellung von Proteinlysaten	79
4.11 SDS Gelelektrophorese und Western-Blot	79
4.12 Co-Immunoprecipitation	80
4.13 Quantifizierung der Mikrotubuli-Depolymerisierung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	81
4.13.1 <i>In vivo</i> Quantifizierung	81
4.13.2 <i>In vitro</i> Quantifizierung	81
4.14 ATP-Verwertungs-Assay <i>in vitro</i>	82
4.15 Immunofluoreszenz und Messung der intercentromerischen Distanz	83
Statistische Analyse	83
Sonstige Software	84
Referenzen	87
Publikationen	97
Danksagung	98

Zusammenfassung

Die wichtigste Aufgabe der mitotischen Spindel ist die genaue Segregation der duplizierten Chromosomen in der Mitose. Diese dynamische Struktur wird von sich teilenden Zellen gebildet, um die Bewegung der Chromosomen, das Markenzeichen der Mitose, zu dirigieren. Trotz aller Unterschiede in Form und Größe der Spindeln unterschiedlicher Zelltypen, haben alle eukaryontischen Spindeln fundamentale strukturelle Eigenschaften gemeinsam. Eine der wichtigsten Eigenschaften ist die bipolare Symmetrie. Innerhalb der Spindel sind unterschiedliche Klassen der Mikrotubuli vorhanden, die durch ihre Organisation und durch ihre dynamischen Eigenschaften unterteilt sind. Alle Klassen der Mikrotubuli zeigen dynamische Instabilität. Dennoch weisen die Kinetochor-Mikrotubuli und die Spindel-Mikrotubuli zusätzlich ein anderes Verhalten auf, das als polwärts gerichteter Mikrotubuli-Flux („*Poleward Microtubule Flux*“) bezeichnet wird. Dabei werden die Tubulin-Untereinheiten stetig an den Plus-Enden der Mikrotubuli eingefügt und dann zu den Minus-Enden getragen, wo sie abgebaut werden. Dieser polwärts gerichtete Mikrotubuli-Flux ist für die Segregation der Chromosomen von großer Bedeutung. Mehrere regulatorische Proteine der Mikrotubuli, einschließlich der destabilisierenden und der depolymerisierenden Proteine, steuern die Dynamik dieser Mikrotubuli, um eine fehlerfreie Bildung der Spindel und eine korrekte Segregation der Chromosomen gewährleisten zu können. Die Kinesin-13 Familie der Depolymerasen gehört zu den prominentesten Modulatoren der Dynamik der Mikrotubuli. Das am Besten charakterisierte und intensiv studierte Mitglied dieser Familie ist das Protein KIF2C/MCAK. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen von MCAK während der Mitose, an den Spindelpolen, an den Chromosomen-Armen, an den Centromeren/Kinetochoren, kann MCAK eine Reihe an wichtigen Funktionen erzielen. Allerdings bleibt die Korrektur von Kinetochor-Mikrotubuli Fehlverknüpfungen die wichtigste Aufgabe von MCAK während der Mitose. Diese wesentliche Funktion steht unter der Kontrolle von Aurora B. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MCAK während der Mitose auch von einem wichtigen Komplex, dem Cyclin B1/CDK1 Komplex, reguliert wird. In der Tat steuert die Kinase CDK1 sowohl die Lokalisation als auch die katalytische Aktivität von MCAK. Mit Hilfe einer systematischen Reihe an Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass MCAK sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von CDK1 phosphoryliert wird.

CDK1 phosphoryliert den katalytischen Bereich von MCAK genau am Threonin 537 und führt zu einer deutlichen Abnahme der Depolymerisierungsaktivität von MCAK *in vitro* und in humanen Zellen. Diese Inhibition erfolgt wahrscheinlich durch eine Reduzierung der Affinität von MCAK zu den Mikrotubuli-Enden. Die Expression der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante T537E in HeLa-Zellen verursachte eine fehlerhafte Verteilung der Chromosomen in der Mitose. Die Chromosomen waren in Anwesenheit der T537E Mutante nicht mehr in der Lage, sich auf der Metaphaseplatte anzuordnen. Darüber hinaus führte die Expression von T537E zu einer signifikanten Reduzierung des centromerischen Abstandes, was auf eine Anhäufung von Kinetochor-Mikrotubuli Fehlverknüpfungen hindeutet. Ferner zeigt die Expression der nichtphosphorylierbaren Mutante T537A in den HeLa-Zellen eine verstärkte Lokalisation an den Spindelpolen, was zum Auftreten von erheblichen Spindel-Aberrationen führte.

Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell entwickelt, in dem die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 früh in der Mitose stattfinden muss, um einerseits MCAK zu inaktivieren und andererseits diese Depolymerase aus den Spindelpolen zu verdrängen. Beide Ereignisse sind für den Aufbau einer bipolaren Spindel unentbehrlich. Zu späteren Zeitpunkten der Mitose muss das Threonin 537 dephosphoryliert werden, um eine Reaktivierung von MCAK an den Centrosomen/Kinetochoren zu ermöglichen. Dies wird die Korrektur-Funktion für Kinetochor-Mikrotubuli Fehlverknüpfungen von MCAK wiederherstellen, was eine korrekte Anordnung der Chromosomen auf der Metaphaseplatte fördert.

1 Einführung

Die Zellteilung ist ein grundlegender Prozess des Lebens. Durch diesen Prozess entstehen aus einer elterlichen Zelle zwei Tochter-Zellen, die über identisches genetisches Material verfügen. Einer der wichtigsten Aspekte der Zellteilung ist, sicherzustellen, dass die genetische Information konserviert wird, da Fehler in der Chromosomen Verteilung in humanen Zellen zu massiver Tumorentstehung führen können. Darüber hinaus trägt zum Beispiel der Verlust oder der Gewinn von genetischer Information zum Auftreten von Krebserkrankungen bei. In allen eukaryontischen Zellen wird die Trennung der Chromosomen („*Chromosome segregation*“) durch eine sehr wichtige zelluläre Struktur vollendet, durch die mitotische Spindel. Eine spezifische Anordnung sowohl der Mikrotubuli als auch der Chromosomen innerhalb dieser Spindel ist entscheidend für den Verlauf des Trennungsprozesses. Die Mikrotubuli müssen in einem bipolaren Array organisiert werden, so dass jede Hälfte der Spindel über eine gleichmäßige Anzahl an orientierten Mikrotubuli verfügt (Nogales, 2000). Wenn man die Komplexität dieses Prozesses betrachtet, stellt man sich automatisch die Frage: Welche Moleküle sind für diesen Mechanismus verantwortlich?

Die erste Antwort findet man in der molekularen Beschaffenheit der Mikrotubuli selbst. Die Mikrotubuli bestehen aus der Verbindung von α - und β -Heterodimeren. Durch die Assoziation mehrerer α/β -Heterodimere, die weiterhin polymerisieren, bildet sich der typische hohle, zylindrische Mikrotubuli. Dieses Polymer ist zu einem hohen Grad dynamisch und wechselt willkürlich zwischen wachsenden und schrumpfenden Phasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Abb. 1 A). Dieses Verhalten ist als dynamische Instabilität („*dynamic instability*“) bekannt und basiert auf der Bindung und der Hydrolyse des GTP, die an der sogenannten Nukleotid-Austausch-Stelle („*nucleotide exchangeable site*“, kurz: E-site) innerhalb der β -Tubulin-Untereinheit stattfinden. Nur die Dimere, die über GTP in ihrer E-site verfügen, sind in der Lage, zu polymerisieren. Dennoch wird unmittelbar nach der Polymerisierung dieses GTP hydrolysiert und kann nicht mehr ausgetauscht werden. Daraufhin entstand das „GTP-Kappe Modell“ („*GTP cap model*“). Das Modell besagt, dass der Rumpf der Mikrotubuli, der aus GDP-Tubulin besteht, instabil ist. Darüber hinaus wird die komplette Struktur der Mikrotubuli durch eine Art Kappe stabilisiert, die aus GTP-verbundenen Tubulin-Untereinheiten besteht. Diese GTP-Kappe behält die Bindung

zwischen benachbarten Protofilamenten bei. Wenn die GTP-Kappe willkürlich verloren geht, lösen sich die Protofilamente voneinander und es bilden sich typische Strukturen am Ende der Mikrotubuli. Diese Strukturen werden als „peels“ oder „curls“ bezeichnet und ihre Anwesenheit führt zur schnellen Depolymerisierung der Mikrotubuli (Nogales, 2000).

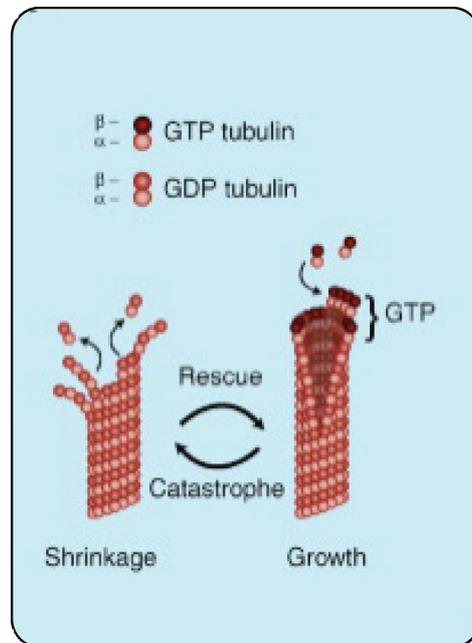


Abbildung 1 A: Die Regulation der Dynamik der Mikrotubuli

Die Hydrolyse der GTP-Kappe durch die Tubulin-Untereinheiten führt zur dynamischen Instabilität der Protofilamente.

(Abbildung modifiziert aus S. Gadde et al., 2004)

Die Organisation der Mikrotubuli in einer polaren Struktur ist eine ihrer wichtigsten Eigenschaften. Die α -Tubulin-Untereinheit wird an einem Ende verlängert und herausgestellt (Minus-Ende), während die β -Tubulin-Untereinheit am anderen Ende herausgestellt wird und das Plus-Ende darstellt (Risinger et al., 2009). Innerhalb der mitotischen Spindel wird das Minus-Ende der Mikrotubuli an den Polen verankert, während das Plus-Ende mit den Chromosomen verbunden wird. Jedes duplizierte Chromosom verfügt über eine spezifische Struktur an den Centromeren, die Kinetochore genannt werden. Sie fungieren während der Mitose als Bindungsstelle für die Mikrotubuli der Kinetochore-Fiber („K-Fiber“) und ermöglichen dadurch eine gerichtete Translokation der Chromosomen innerhalb der Spindel (Rieder et al., 1998). Die meisten tierischen Zellen besitzen eine einzelne Struktur, das Centrosom, aus der die Mikrotubuli organisiert, aufgebaut und verlängert werden. Diese Centrosomen bestehen aus einem Paar Centrioli, die von einem formlosen Material

umgeben sind. Diese amorphe Substanz spielt eine große Rolle beim Aufbau und der Verlängerung der Mikrotubuli (Rieder et al., 1998).

In der Prophase am Anfang der Mitose sind sowohl die Centrosomen als auch die Chromosomen bereits dupliziert worden. Daraufhin setzt eine Kaskade sehr wichtiger Ereignisse ein, einschließlich des Zerfalls der Kernmembran, der Kondensierung der Chromosomen und der Trennung der Centrosomen. Auf der einen Seite trägt die Zunahme der Ereignisse, die zum Verkürzen der Mikrotubuli führen (Mikrotubuli Katastrophen) (Belmont et al., 1990) zum Abbau des interphasischen Mikrotubuli-Netzwerks bei, und auf der anderen Seite findet eine Reduktion der Wachstumsphasen der Mikrotubuli statt (Rusan et al., 2001). Auf diese Weise erfolgt die Herstellung von Interaktionen zwischen den Plus-Enden der Mikrotubuli und den Chromosomen. Während der Metaphase binden einige Mikrotubuli, die aus einem Spindelpol ausströmen, an ein Kinetochor der bereits duplizierten Chromatiden. Die Bindung des Schwester-Kinetochors mit den Mikrotubuli des entgegengesetzten Spindelpols führt zur Entstehung bipolarer Chromosomen. Sobald alle Chromosomen biorientiert und auf der Metaphaseplatte angeordnet sind, befindet sich die Zelle in der Metaphase (Abb.1 B). Wenn die Chromosomen angeordnet und korrekt orientiert sind, wird das zelluläre Kontrollsystem („*Spindle Assembly Checkpoint*“) inaktiviert und anschließend beginnt die Anaphase A. Während der Anaphase A trennen sich die Chromosomen und bewegen sich in Richtung der entgegengesetzten Pole. Die Anaphase B trägt ebenso zur Trennung der Chromosomen bei, da sich die Spindelpole in dieser Phase trennen. Die Telophase wird durch die erneute Bildung der Kernmembran der neu entstandenen Schwester-Kerne und durch die Bildung einer Furche, die beide Zellen trennt, gekennzeichnet (Abb. 1 B).

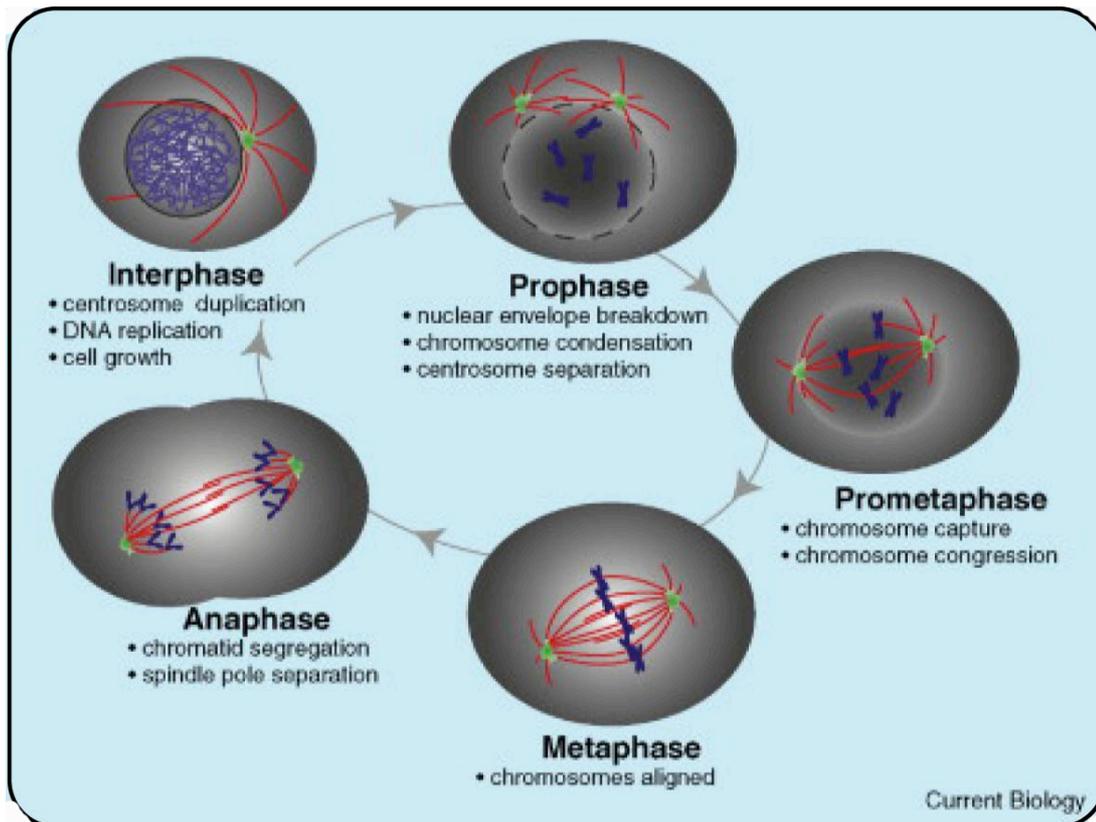


Abbildung 1 B: Schematische Darstellung der mitotischen Phasen

Während der Interphase sind die Chromosomen und Centrosomen bereits dupliziert. In der Prophase beginnt die Kondensierung der Chromosomen, die Centrosomen trennen sich und die Kernmembran zerfällt. Während der Prometaphase werden die Chromosomen von den Mikrotubuli der getrennten Centrosomen „gefangen“. In der Metaphase werden alle Chromosomen zur Metaphaseplatte gebracht. Die Anaphase wird durch den Verlust der Kohäsion zwischen den Schwester-Chromatiden und deren Bewegung in Richtung der Spindelpole gekennzeichnet. (Bild modifiziert aus S. Gadde and Heald, 2004).

1.1 Modelle zur Bildung der mitotischen Spindel

Das vorherrschende Modell zur Bildung der mitotischen Spindeln in Anwesenheit von Centrosomen basiert auf der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli. Dieser Mechanismus wird als „*search and capture*“ Modell bezeichnet (Kirschner et al., 1986): Mikrotubuli, die aus einem Centrosom strömen, werden mehreren Wachstums- und Abbau-Zyklen unterzogen. Durch diesen dynamischen Prozess werden sie nach dem Zufallsprinzip das Zytoplasma erkunden bis sie das Kinetochor eines Chromosoms treffen und eine beständige Bindung eingehen. Weil die Mikrotubuli der duplizierten Centrosomen die bivalenten Kinetochore treffen und an sie binden, entsteht eine bipolare Spindel. Das zweite Modell wird als „*self organization*“ bezeichnet (Kirschner et al., 1986). Im Gegensatz zum ersten Modell

polymerisieren die Mikrotubuli in Abwesenheit von Centrosomen in einer unorganisierten Art und Weise, ohne konzentrierte Spindelpole. Für die Organisation einer bipolaren Spindel in diesen Zellen ist die Aktivität mehrerer Motorproteine unverzichtbar. Diese Proteine sind dafür verantwortlich, die nach dem Zufallsprinzip organisierten Mikrotubuli auszusortieren und zu einer bipolaren Struktur anzuordnen. Dennoch haben in den letzten Jahren mehrere Beweise die Existenz zusätzlicher Mechanismen zur Herstellung der bipolaren Spindel verdeutlicht, was die Komplexität dieses Forschungsgebietes widerspiegelt.

1.2 Die Regulatoren der Dynamik der Mikrotubuli

Mikrotubuli-regulierende Proteine (stabilisierende und destabilisierende Proteine) kontrollieren die Dynamik der Mikrotubuli, um eine korrekte Bildung der mitotischen Spindel und eine reibungslose Trennung der Chromosomen in der Anaphase sicherzustellen (Maney et al., 1998). In der letzten Dekade haben sich viele Arbeiten mit der Rolle und der Aktivität der Kinesin-13 Familie bei der Regulation der Dynamik der Mikrotubuli während der Mitose beschäftigt, da die Mitglieder dieser Familie der Depolymerasen eine wichtige Rolle beim Aufbau der Spindel, bei der Spindel Dynamik, der Bindung der Chromosomen an der Spindel und letztlich bei der korrekten Segregation der Chromosomen spielen.

1.3 Die Kinesin-13 Familie der Motorproteine

Die Superfamilie der Kinesine enthält molekulare Motorproteine, die ATP-Hydrolyse nutzen, um Energie zu produzieren. Ursprünglich wurde angenommen, dass die durch ATP-Hydrolyse produzierte Energie von allen Kinesinen benutzt wird, um sich entlang der Mikrotubuli bewegen zu können. In den letzten Jahren hat die Entdeckung der Kinesin-13 Familie, deren Mitglieder ausschließlich die Mikrotubuli von beiden Enden depolymerisieren, die Annahme widerlegt (Desai et al., 1999). Die Mitglieder der Kinesin-13 Familie wurden in mehreren Studien phylogenetisch eingestuft (Lawrence et al., 2004; Wickstead et al., 2006). Drei Mitglieder dieser Familie wurden in humanen Zellen identifiziert: Kif2A, Kif2B und Kif2C/MCAK („*Mitotic Centromer Associated Kinesin*“). Verwandte Kinesine mit ähnlichen

katalytischen Fähigkeiten oder Sequenzähnlichkeiten wurden ebenfalls bei Invertebraten beschrieben z. B. bei *Saccharomyces cerevisiae* Kip3 (Miller et al., 1999), *Plasmodium falciparum* pKin-I (Moore et al., 2002) und *Drosophila melanogaster* Klp10A, Klp59C (Rogers et al., 2004). Betrachtet man die Proteinstruktur, stellt man fest, dass sie bei allen Kinesin-13 Mitgliedern aus einer globulären N-terminalen Domäne bestehen, die die subzelluläre Lokalisation mitbestimmt (Maney et al., 1998; Wordeman et al., 1990, Kline-Smith et al., 2004). Nach der N-terminalen Domäne folgt eine positiv geladene „Neck“-Domäne, die an der Regulation der katalytischen Aktivität beteiligt ist (Maney et al., 2001). Der katalytische Bereich, der die ATP- und Mikrotubuli-Bindestellen beinhaltet, befindetet sich in der Mitte des offenen Leserasters. Infolge dessen wird die Familie der Kinesine als Kin-M („*Middle Kinesin*“) oder Kin-I („*Internal Kinesin*“) bezeichnet (Vale et al., 1997). Die C-terminale Domäne wird für die Dimerisierung benötigt (Maney et al., 2001) (Abb. 2).

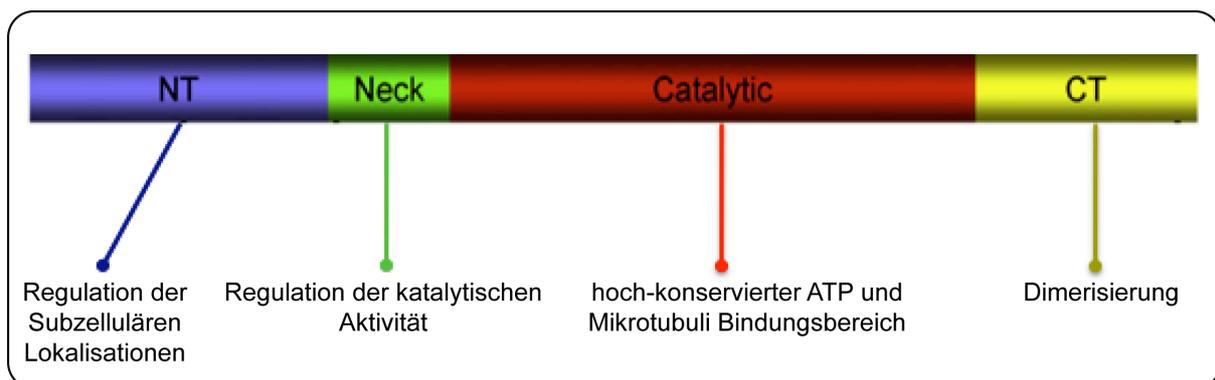


Abbildung 2: Schematische Darstellung der sekundären Aminosäure-Struktur der Kinesine-13 sowie der Funktion der einzelnen Bereiche
(Bild modifiziert aus S.C. Ems-McClung et al., 2010)

1.3.1 Die subzelluläre Lokalisation der Kinesin-13 Familie in der Mitose

Das erste Mitglied der Kinesin-13 Familie, dessen mitotische Lokalisationen beschrieben wurden, war das Protein MCAK. Während der Mitose befindet es sich an den Spindelpolen, an den Centromeren/Kinetochoren, sowie an den Plus-Tips der Mikrotubuli und im Zytoplasma (Wordeman et al., 2005; Moore et al., 2005). Das zweite Mitglied dieser Familie KIF2A ist hauptsächlich an den Spindelpolen lokalisiert (Gaetz et al., 2004; Ohi et al., 2007). Aufgrund der sehr niedrigen Expression von KIF2B, ist die Lokalisation des Proteins noch nicht klar identifiziert. Dennoch weist

das EGFP-KIF2B Fusionsprotein ebenfalls eine centromerische Lokalisation auf und auch eine Präsenz an den Spindelpolen (Manning et al., 2007). Diese verschiedenen Lokalisationen heben das Potential der Kinesin-13 Mitglieder in der Bildung der mitotischen Spindel hervor. Darüber hinaus weist die Überlagerung ihrer mitotischen Lokalisationen auf eine mögliche Redundanz ihrer Funktion hin (Abb. 3 A, B).

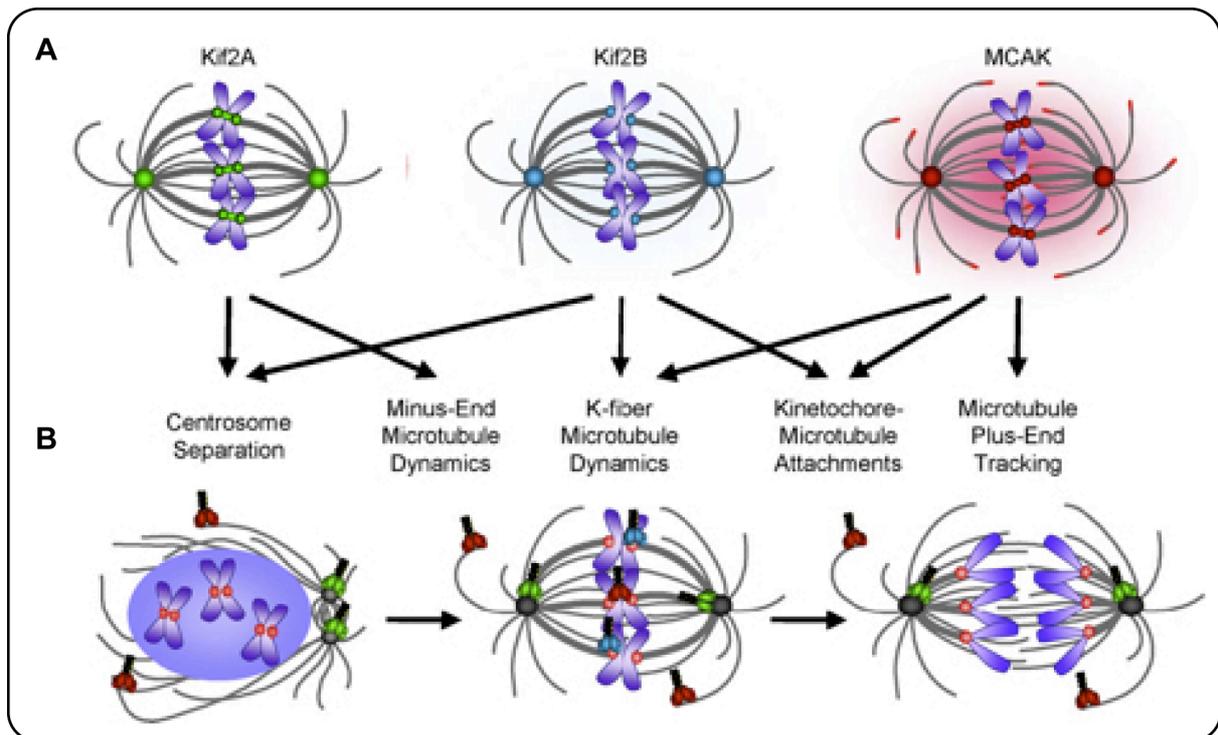


Abbildung 3: Lokalisation und Funktion der Kinesin-13 Familie in der Mitose

A: Die Kinesine-13 der Vertebraten haben überdeckende Lokalisationen an den Spindelpolen, an den Centromeren/Kinetochoren. Zusätzlich wird MCAK im Zytoplasma und an den Plus-Tips der Mikrotubuli beobachtet. (Kif2A in grün, Kif2B in blau und MCAK in rot)

B: Zusammenfassung der Funktionen der Kinesin-13 Familie in der Mitose. Das Modell zeigt die Funktion der Kinesin-13 Mitglieder in der Prophase, Metaphase und Anaphase. (Kif2A in grün, Kif2B in blau und MCAK in rot)
(Abbildung modifiziert aus SC. Ems-McClung et al., 2010)

1.3.2 Die Kinesine-13 sind für den Aufbau der Spindel erforderlich

Es gibt keine Zweifel an der bedeutenden Rolle der Kinesine-13 beim Aufbau der mitotischen Spindel. Dennoch unterscheiden sich die Prozesse, die von diesen Depolymerasen reguliert werden, je nach untersuchtem System. So führt zum Beispiel die Depletion von MCAK in den *Xenopus* Ei-Extrakten zu einem sehr hohen

Prozentsatz an monopolen Spindeln (Walczak et al., 1996), während die Inhibition oder der Einsatz von siRNA gegen MCAK in Mammalia-Zellen nur eine leichte Erhöhung der Rate der monopolen Spindeln verursacht (Cassimeris et al., 2004). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität von MCAK während der embryonalen Entwicklung stärker benötigt wird als in somatischen Zellen. Im Gegensatz zur Inhibition von MCAK, verursacht die Depletion von KIF2A eine drastische Erhöhung der monopolen Spindeln in somatischen Zellen (Ganem et al., 2004; Zhu et al., 2005). Alle diese Erkenntnisse liefern sehr deutliche Beweise für die Funktion der Kinesine-13 in der Herstellung bipolarer Spindeln.

1.3.3 Die Kinesine-13 regulieren die Spindel Dynamik

Mit der Veröffentlichung von zahlreichen Untersuchungen zu den zellulären Funktionen der Kinesin-13 Depolymerasen in den letzten Jahren, ist klar geworden, dass sie eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Dynamik der Spindel spielen. Diese Erkenntnisse kamen aus Studien, in denen die Inhibition dieser Depolymerasen zur Störung des Verhaltens und der Dynamik der Mikrotubuli-Polymere führten. Interessanterweise wurden diese Beobachtungen in annähernd jedem untersuchten System, sei es mitotisch oder meiotisch, festgestellt (Walczak et al., 1996; Goshima et al., 2003; Rogers et al., 2004; Ganem et al., 2004; Holmfeldt et al., 2004; Morales et al., 2005). Dennoch hängt die betroffene Unterklasse der Mikrotubuli mit dem untersuchten Mitglied der Kinesin-13 Familie zusammen (Abb. 2 B). So führt einerseits die Behandlung von *Drosophila*-Zellen mit einer siRNA gegen KLP10A (KIF2A Homolg) zu erheblichen Störungen des Mikrotubuli-Umsatzes („turnover“) spezifisch in der Nähe der Mikrotubuli Minus-Enden (Buster et al., 2007). Andererseits verursacht die Inhibition von MCAK eine deutliche Reduzierung im Umsatz der Mikrotubuli der Kinetochor-Fiber (später als K-Fiber bezeichnet), aber keinen sichtbaren Effekt auf die Mikrotubuli der Spindel. Die genaue Regulation der Mikrotubuli der K-Fiber durch MCAK ist für die Segregation der Chromosomen während der Anaphase und dadurch für die genomische Stabilität unentbehrlich (Bakhoum et al., 2009). Die unglaublich komplizierten Effekte der Kinesine-13 sowohl auf den Aufbau der Spindel als auch auf die Regulation der Dynamik der Mikrotubuli führen zu einer sehr interessanten Vorstellung, die in den letzten Jahren bestätigt wurde: Störungen in der Dynamik einer Unterklasse der Mikrotubuli, seien es die

Mikrotubuli der Spindel oder die Mikrotubuli der K-Fiber, könnte auf indirektem Weg ebenfalls Störungen in der Dynamik der Mikrotubuli der anderen Klasse hervorrufen (Manning et al., 2007).

Zusammen zeigen diese Studien, dass die Aktivität jedes Mitgliedes der Kinesin-13 Familie in den unterschiedlichen Bereichen der Spindel nachzuweisen und zeitlich fein gesteuert ist, um einen korrekten Aufbau der Spindel und eine reibungslose Segregation der Chromosomen gewährleisten zu können.

1.3.4 Die Kinesine-13 sind für die Korrektur der Mikrotubuli-Kinetochor Fehlverknüpfungen verantwortlich

Die Depletion von centromerischem MCAK in den Säugetierzellen Ptk2 führte zum Auftreten zurückgebliebener oder „lagging“ Chromosome in der Anaphase (Kline-Smith et al., 2004). Im Rahmen einer Arbeit wurden diese „lagging“ Chromosome auf morphologische Unterschiede im centromerischen Bereich nach Depletion von MCAK untersucht. Diese Untersuchungen basierten auf der Analyse der Verteilung von CREST, ein autoimmun Serum, das für die Darstellung der Centromere verwendet wird. Diese „lagging“ Chromosome zeigten eine übermäßig ausgedehnte Färbung im Bereich des Centromers, was auf merotelische Bindungen hindeutete. Dies wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt. „Live Imaging“ Techniken zeigten, dass das Auftreten dieser „lagging“ Chromosome als Folge der Anhäufung von Kinetochor-Mikrotubuli Fehlverknüpfungen nach Depletion von MCAK (Kline-Smith et al., 2004) auftrat. Die Fehlverknüpfungen konnten nicht korrigiert werden und führten zu Problemen bei der Bewegung der Chromosomen in Richtung der Metaphaseplatte („*chromosome congression*“) während der Prometa-Metaphase. In einer anderen interessanten Studie zu den Korrektur-Mechanismen solcher Fehlverknüpfungen konnte gezeigt werden, dass MCAK diese Bindungsfehler nicht nur durch den kompletten Abbau der falsch verbundenen Mikrotubuli aufhebt, sondern agiert auch nur durch die Lockerung der in den Kinetochoren eingebetteten Mikrotubuli. Diese Lockerung führt schließlich zum Verlust der Affinität der Mikrotubuli zu den Kinetochoren und letztlich zum Verlust dieser Fehlverknüpfungen (Wordeman et al., 2007). Aus den Ergebnissen beider Studien lässt sich zusammenfassen, dass die Funktion der Kinesine-13, im Wesentlichen die von

MCAK, sehr wichtig für die Regulation der Kinetochor-Mikrotubuli Bindungen ist und spiegelt gleichzeitig die Komplexität der Mechanismen wider, die von den Kinesinen-13 verwendet werden, um diese Bindungen zu kontrollieren.

1.3.5 Modell zur Depolymerisierung der Mikrotubuli durch die Kinesine-13

Wie genau depolymerisieren die Kinesine-13 die terminalen Tubulineinheiten?

Lange Zeit war diese Frage ein großes Rätsel für Forschungsgruppen, die sich mit der Familie der Kinesine-13 beschäftigt haben. Erst nach der Veröffentlichung einer beeindruckenden Studie im Jahr 2004 (Ogawa et al., 2004), gewann man endlich detaillierte Einblicke in die Mechanismen der Depolymerisierung des Tubulins durch die Kinesin-13 Familie. Eine der wichtigsten Erkenntnisse dieser Studie war die Aufklärung der „X-ray“ Kristallstruktur des minimal-aktiven Konstruktes der Maus KIF2C/MCAK. Dieses minimal aktive Konstrukt bestand aus dem katalytischen Bereich und 50 N-terminalen Aminosäuren des „Neck“ Bereiches (Ogawa et al., 2004). Die Wahl dieses Konstruktes basierte auf vorangegangenen Studien (Maney et al., 2001), die die Fähigkeit des Konstruktes zur Depolymerisierung der Mikrotubuli *in vivo* nachgewiesen haben. Experimentell wurde die Kristallstruktur von MCAK in Anwesenheit von ADP und einem ATP-Analog AMP-PNP angefertigt. Es hatte sich aber feststellen lassen, dass MCAK die gleiche Kristallstruktur aufweist unabhängig davon, mit welchem Nukleotid MCAK verbunden war. An diesem Modell ließ sich beobachten, dass alle konservierten Bereiche, die spezifisch für die Kinesin-13 Familie sind, bestimmte funktionelle Strukturen bilden. Diese hoch-konservierten Bereiche organisieren sich in vier funktionellen Domänen (Abb. 4 A):

1. **Der „Neck“-Bereich:** sehr reich an positiv geladenen Aminosäuren mit einer sehr steifen und klar definierten Struktur. Die proximale Region des „Neck“-Bereiches zeigt eine helikale Struktur. Ein anderes Merkmal ist die Anwesenheit einer Art Schlaufe im Bereich des Familien-spezifischen und hoch-konservierten Prolin 243 (Abb. 4). Mit Hilfe dieser Schlaufe wechselt die „Neck“-Helix die Richtung und erstreckt sich vertikal in Richtung der Mikrotubuli.
2. **Der KVD-Finger:** Ist in der Loop-2 lokalisiert und stellt eine der signifikantesten und Familien-spezifischen Bereiche dar. Er besteht aus zwei

antiparallelen β -Faltblättern („ β -sheets“), die mit einem sogenannten „Turn“ verbunden werden. Dieser „Turn“ besteht aus drei Familien-spezifischen und konservierten Aminosäuren: Lysin 293, Valin 294 und Aspartat 295. Das Ganze bildet eine starke fingerartige Struktur, die eine kritische Rolle bei der Aktivität der Kinesine-13 spielt.

3. **Der „switch I“ (α -Helix 2-Loop 9) Bereich:** Der Bereich, der die ATP-Hydrolyse reguliert.
4. **Der „switch II“ (α -Helix 4- α -Helix 6) Bereich:** Ein sehr gut charakterisierter Bereich, der für die Bindung des Proteins MCAK mit den Mikrotubuli verantwortlich ist.

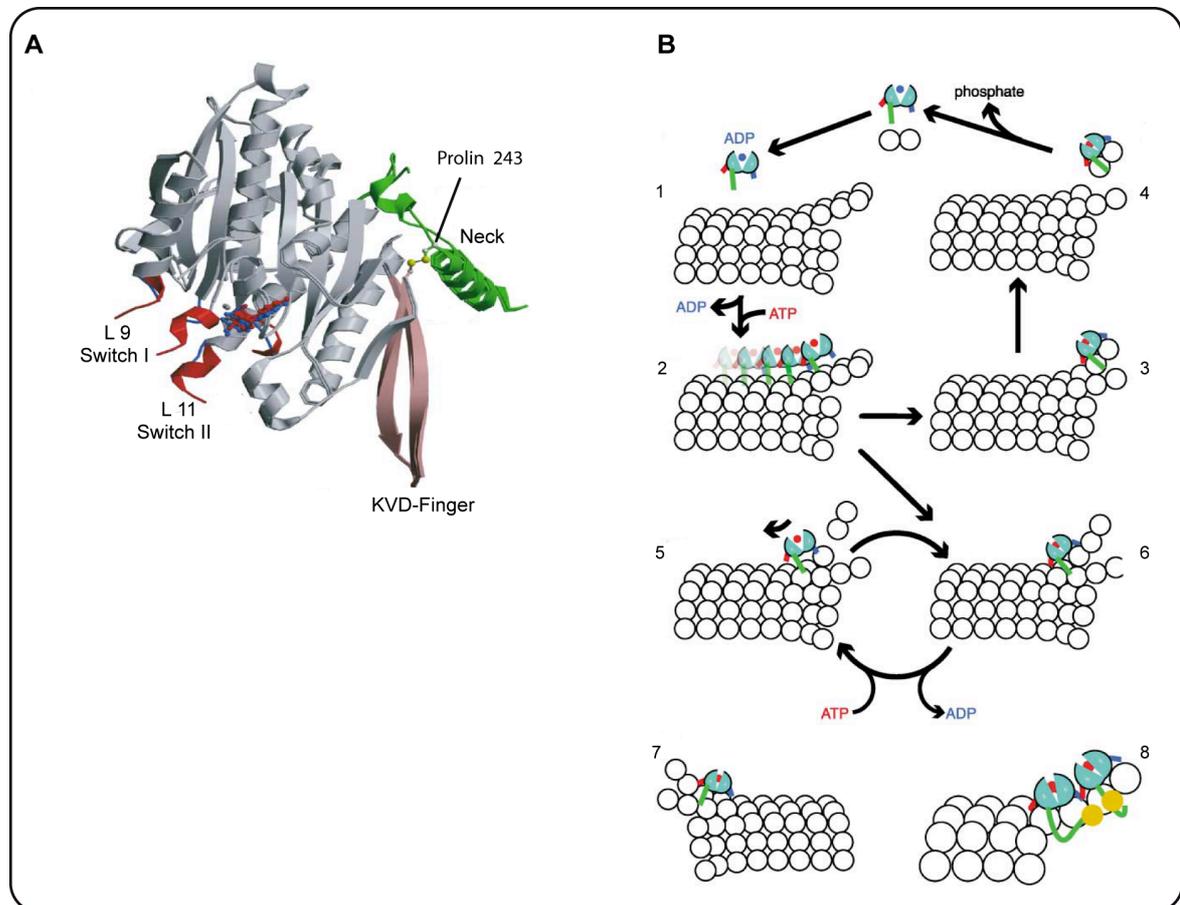


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von MCAK sowie des Mechanismus der Mikrotubuli Depolymerisierung

A: Darstellung der Kristallstruktur von MCAK. Vergleich der Struktur von MCAK in Anwesenheit von ADP („Switch I“ in blau) und vom ATP-Analog AMP-PNP („Switch I“ in rot). Die wichtigsten Domänen für die Mikrotubuli Depolymerisierung wurden ebenfalls dargestellt.

(Bild modifiziert aus Ogawa T. et al., 2004)

B: Der Mechanismus der Mikrotubuli Depolymerisierung durch MCAK. (1) Das ADP-gebundene MCAK (blau) bindet an die Oberfläche der Mikrotubuli. (2) Der positiv geladene „Neck“ interferiert mit der negativ geladenen Mikrotubuli Oberfläche und

verhindert dadurch die Bindung zwischen MCAK und Mikrotubuli. Die ATP-Tasche bleibt offen, so dass keine ATP-Hydrolyse stattfindet bis MCAK das Ende der Mikrotubuli erreicht hat. (3) MCAK erreicht das Ende der Mikrotubuli. Die verbogene Konformation der Protofilamente erlaubt den vollständigen Kontakt zwischen dem katalytischen Bereich von MCAK und den Protofilamenten. Es erfolgt die Hydrolyse des ATP. Anschließend destabilisiert die „Neck“-Helix (grün) die lateralen Verbindungen der benachbarten Protofilamente, und der KVD-Finger (in Rot) führt zur Stabilisierung der verbogenen Konformation der Protofilament-Interdimere. (4) Die Tubulin-Untereinheiten werden spontan aus den Protofilamenten entlassen. Die ATP-Hydrolyse ermöglicht MCAK, sich von den entlassenen Tubulin-Untereinheiten zu trennen und sich für andere Depolymerisierungszyklen vorzubereiten. (5 und 6) Andernfalls bleibt MCAK nach der Entlassung der Tubulin-Untereinheiten an der Oberfläche des Protofilaments und gleitet zurück zum nächsten Tubulin-Dimer. *(Bild modifiziert aus Ogawa T. et al., 2004)*

1.3.6 Modell zur Depolymerisierung der Mikrotubuli durch MCAK

Die ersten Beobachtungen zur Aktivität der Kinesin-13 ließen vermuten, dass die Mitglieder dieser Familie mögliche Interaktionen mit der Mikrotubuli-Oberfläche zeigen. Nachdem gezeigt wurde, dass diese Interaktion sehr instabil ist und die Kinesine-13 vielmehr eine sehr große Affinität zu beiden Enden der Mikrotubuli haben, hat sich die Vermutung als falsch erwiesen. Es steht inzwischen fest, dass die ATP-Hydrolyse nicht oder nur sehr geringfügig auf der Seitenwand der Mikrotubuli stattfindet. Dies bedeutet, dass die Kinesine-13 in der Lage sind, bis an die Enden der Mikrotubuli (Plus-Enden oder Minus-Enden) zu gleiten ohne jeglichen Verlust von Energie (Desai et al., 1999; Hunter et al., 2003). Im Laufe der letzten Jahre ließen sich enorme Fortschritte im Verständnis der Funktion von MCAK und allgemein der Kinesin-13 Familie erzielen. Eines der interessantesten und aufschlussreichsten Modelle (siehe Abbildung 4) wurde im Jahr 2004 publiziert (Ogawa et al., 2004). Es ist bereits bekannt, dass der katalytische Bereich des Proteins MCAK eine konvexe Struktur besitzt. Diese konvexe Struktur passt nicht zu der flachen und geraden Oberfläche der Mikrotubuli, was zu Instabilität zwischen dem katalytischen Bereich und der Oberfläche der Mikrotubuli führt. Diese unstablen Bindungen wurden als „frustrierte“ Bindungen bezeichnet. Dazu inhibieren die sterischen Interferenzen den vollständigen Kontakt zwischen dem „Neck“-Bereich von MCAK und den danebenliegenden Mikrotubuli-Protofilamenten. Zusätzlich unterstützten die elektrostatischen Interaktionen zwischen den positiv geladenen „Neck“-Bereich und der negativ geladenen Oberfläche der Mikrotubuli die eindimensionale Diffusion von MCAK bis zu den Enden der Mikrotubuli. Während

dieser Diffusion bleibt die ATP-„Tasche“ in einem offenen Zustand, so dass das gebundene ATP nicht oder sehr langsam hydrolysiert wird. An den Enden der Mikrotubuli nehmen die Protofilamente spontan eine gebogene Struktur an („*curls*“ oder „*peels*“). Wenn MCAK das gebogene Ende der Protofilamente erreicht, etabliert sich ein vollständiger Kontakt zwischen dem katalytischen Bereich und den Tubulin-Untereinheiten. Nach Herstellung des Kontaktes fügt sich die α 4-Helix in der intradimerischen Furche (Bereich zwischen α -Tubulin-Untereinheit und β -Tubulin-Untereinheit) der Tubulin-Untereinheiten ein, was zur Stabilisierung dieser verbogenen Struktur führt. Erst zu diesem Zeitpunkt schließt sich die ATP-Tasche und daraufhin erfolgt die ATP-Hydrolyse. Parallel zur Hydrolyse wird der KVD-Finger in der interdimerischen Furche (Bereich zwischen zwei α - und β -Tubulin-Einheiten) eingesetzt und führt ebenfalls zur Stabilisierung der verbogenen Struktur am Ende der Protofilamente. Die Helix des „Neck“-Bereiches wird anschließend tief entlang der seitlichen Wand der Protofilamenten eingesetzt. Dies führt zur Destabilisierung der lateralen Kontakte und Wechselwirkungen mit den benachbarten Protofilamenten. Es scheint, als ob die wichtigste Funktion von MCAK die Stabilisierung der spontan entstandenen verbogenen Struktur der Protofilamente am Ende der Mikrotubuli ist. Interessanterweise wurde in mehreren anderen Studien berichtet, dass die Stabilisierung solcher verbogenen Strukturen am Ende der Protofilamente allein ausreichend ist, um die Dynamik der Mikrotubuli in Richtung Depolymerisierung umzuschalten. Die Tubulin-Oligomere werden aufgrund dieser Stabilisierung spontan aus den Enden der Protofilamenten entlassen (Muller Reichert et al., 1998). Als Beispiel wurde in einer Studie gezeigt, dass das Stathmin Protein die Depolymerisierung der Mikrotubuli nur durch eine passive Bindung und Stabilisierung der verbogenen Enden der Protofilamente erzielt (Gigant et al., 2000; Watts et al., 2000). Offenbar verwendet MCAK den gleichen passiven Mechanismus zur Depolymerisierung der Mikrotubuli. MCAK bleibt an den Enden der Mikrotubuli gebunden und führt dabei unwirksam mehrere ATP-Hydrolyse Runden durch, bis die Tubulin-Untereinheiten spontan aus den Protofilamenten entlassen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dieser Mechanismus auf der Rolle von MCAK bei der Stabilisierung der verbogenen Enden der Protofilamente basiert. Diese Stabilisierung erfolgt durch die Wechselwirkungen der drei wichtigen funktionellen Bereiche des Proteins MCAK, dem „Neck“-Bereich, dem KVD-Finger,

und dem „Switch I“-Bereich, mit den intradimeren bzw. interdimeren Furchen der Protofilamente.

1.4 Mitotische Regulation der Aktivität von MCAK

Die Komplexität der von den Kinesin-13 erfüllten Funktionen sowie die erstaunliche Überlappung ihrer Expression in der Mitose deuten darauf hin, dass die Aktivität der Mitglieder dieser Familie sehr genau reguliert ist. Darüber hinaus muss ihre räumliche Verteilung in der Mitose so kontrolliert werden, dass sie zur passenden Zeit am richtigen Ort sind, um ihre Funktion richtig durchführen zu können. Ein großer Schritt im Verständnis der Funktion der Kinesine-13 kam aus den Untersuchungen zur Phosphorylierung von MCAK durch die mitotische Kinase Aurora B (Andrews et al., 2004; Ohi et al., 2004). Interessanterweise führt diese Phosphorylierung zur Inhibition der Depolymerisierungsaktivität von MCAK *in vivo* und *in vitro*. Aurora B phosphoryliert MCAK an mehreren Stellen innerhalb des N-terminalen Bereiches und innerhalb des „Neck“-Bereiches (Andrews et al., 2004; Ohi et al., 2004; Zhang et al., 2007). Es hat sich aber gezeigt, dass das Serin 196 die wichtigste Phosphorylierungsstelle bezüglich der Regulation der Aktivität von MCAK ist (Lan et al., 2004) (Abb. 5 A). Das Serin 196 und die umgebenen Aminosäuren sind bei allen Mitgliedern der Kinesine-13 hoch-konserviert (Abb. 5 B). Dies zeigt, dass möglicherweise andere Kinesine-13 wie KIF2A und KIF2B auch durch die Phosphorylierung dieser Stelle gesteuert werden können.

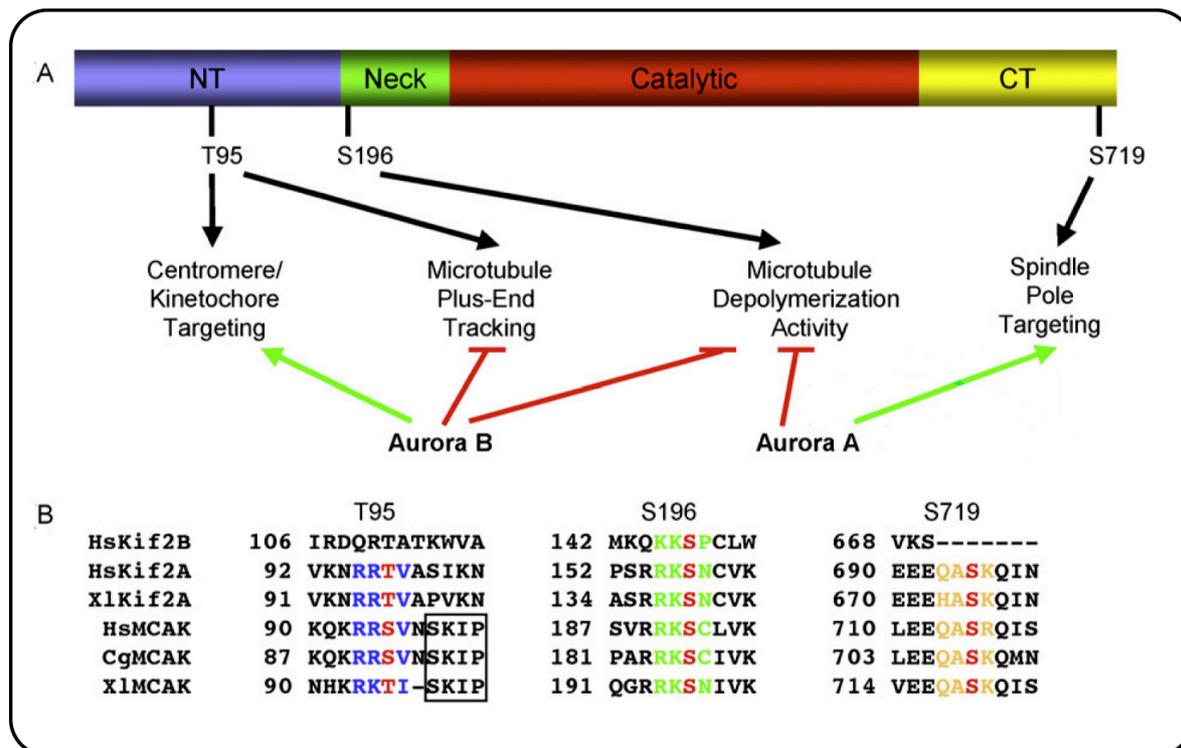


Abbildung 5: Die Lokalisation und Funktion der Kinesine-13 sind durch die Phosphorylierung von konservierten Aminosäuren bestimmt

A: Schematische Darstellung der funktionellen Domäne von MCAK und Zusammenfassung der Effekte der Phosphorylierung durch Aurora B, Aurora A. Die grünen Pfeile stellen eine Förderung und die roten Linien eine Inhibition der Aktivität bzw. der Lokalisation von MCAK dar.

B: Die MCAK Phosphorylierungsstellen, Threonin 95, Serin 196 und Serin 719 sind in KIF2A konserviert, während nur das Serin 196 in KIF2B konserviert ist. Die Phosphorylierungsstellen sind rot beschriftet. Die umgebenen Aminosäuren, die ebenfalls konserviert sind, sind für das Threonin 95 in blau, für das Serin 196 in grün und für das Serin 719 in orange markiert. Das Mikrotubuli-Tip Erkennungssignal, SXIP ist eingerahmt. Dieses Signal ist nur in MCAK konserviert.

Hs = human, XI = *Xenopus laevis*, CgMCAK, *Chinese hamster*.

(Bild modifiziert aus SC. Ems-McClung et al., 2010)

In der Tat wird die depolymerisierende Aktivität des Proteins KIF2A durch die Phosphorylierung von Aurora B am Serin 196 inhibiert (Knowlton et al., 2009). Allerdings ist in *Drosophila* KLP59 C, dem Homolog zu KIF2A, dieses Serin 196 durch Asparaginsäure (Asp 196) ausgetauscht. Möglicherweise führt dieser Austausch zum Vortäuschen der Phosphorylierung von Aurora B, da das Protein KLP59 C eine konstitutiv aktive Mikrotubuli Depolymerase ist (Rogers et al., 2004). Alle diese Beobachtungen bestätigen, dass diese Phosphorylierung von Aurora B am Serin 196 zur Inhibition der Kinesin-13 Familie führt. Dennoch verursachte die Phosphorylierung der Kinesine-13 durch die verschiedenen Kinasen nicht immer eine Inhibition der Depolymerisierungsaktivität: Während Aurora A die Aktivität von MCAK

(Rogers et al., 2004) und KIF2A (Zhang et al., 2008) unterdrückt, verursacht die Phosphorylierung von KIF2A durch die PLK1 Kinase (Polo Like Kinase 1) (Strebhardt, 2010; Strebhardt, 2006, Yuan et al., 1997) eine Stimulierung der KIF2A Aktivität (Zhang et al., 2008).

Interessanterweise steuert die Phosphorylierung von MCAK durch Aurora B gleichzeitig die subzellulären Lokalisationen dieses Kinesins in der Mitose. So führt die Phosphorylierung des Threonin 95 am Anfang der Mitose zur Rekrutierung von MCAK vom Zytoplasma zu den Chromosomen-Armen (Zhang et al., 2007). Später in der Mitose führt ein Zusammenspiel der Dephosphorylierung des Threonin 95 und der Phosphorylierung des Serin 110 zur Rekrutierung von MCAK zu den Centromeren bzw. Kinetochoren (Zhang et al., 2008).

In den letzten Jahren zeigten immer mehr Studien die Effekte der Phosphorylierung von Aurora A auf die Kinesine-13. So steuert die Phosphorylierung von MCAK und KIF2A durch Aurora A die Lokalisation beider Proteine an den Spindelpolen (Zhang et al., 2008; Jang et al., 2009). Offensichtlich wird die Bindung von MCAK an den Centrosomen zum Teil durch die Aurora- Phosphorylierung des Serin 719 gefördert (Zhang et al., 2008).

Diese Phosphorylierungsereignisse, die einerseits die Aktivität und andererseits die räumliche Lokalisationen der Kinesine-13 steuern, spiegeln deutlich den Aufwand wider, den die verschiedenen Kinasen betreiben, um die zeitliche Aktivierung und das korrekte räumliche Vorhandensein dieser wichtigen Familie der Depolymerasen gewährleisten zu können. Deshalb ist es in der Zukunft äußerst wichtig, festzulegen, wann und wo jedes Phosphorylierungsereignis erfolgt, sowie die Mechanismen, bei denen jede Kinase agiert, um sowohl die Lokalisation als auch die Aktivierung bzw. Inhibition der Kinesine-13 steuern.

1.5 Der MPF-Komplex („*Mitosis Promoting Factor*“)

Der Eintritt in die Mitose benötigt von allen eukaryontischen Zellen die Aktivität des MPF-Komplexes („*Mitosis Promoting Factor*“). Dieser Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, der Kinase CDK1 und der regulatorischen Untereinheit Cyclin B1

(Nurse, 1990). In der Interphase akkumuliert Cyclin B1 ab der späten S-Phase und in der G2-Phase durch eine erhöhte Transkription ihrer mRNA.

Danach bindet Cyclin B1 an ihre katalytische Untereinheit CDK1 und bildet den MPF-Komplex. Dieser Komplex bleibt zunächst durch die Phosphorylierung durch zwei Kinasen, Wee1 und Myt1, in einem inaktiven Zustand (Heald et al., 1993). Das Protein Wee1 phosphoryliert CDK1 am Tyrosin 15, während die Kinase Myt1 beide, Tyrosin 15 und Threonin 14, phosphoryliert (Heald et al., 1993; Mueller et al., 1995). Um den Zellen den Eintritt in die Mitose zu ermöglichen, muss der MPF-Komplex aktiviert werden. Dies erfolgt durch die Aktivierung der Phosphatase Cdc25 C, die zusammen mit der Isoform Cdc25 B die Dephosphorylierung beider Stellen, Tyrosin 15 und Threonin 14, einleitet. Diese Dephosphorylierungen sind aber nicht ausreichend für eine vollständige Aktivierung des MPF-Komplexes. Eine zusätzliche Phosphorylierung ist notwendig, damit die CDK1 Kinase vollständig aktiv wird. Sie erfolgt am Threonin 161 und wird von einem bestimmten Komplex, dem CAK-Komplex („*CDK1 Activating Kinase*“), durchgeführt. Erst wenn alle Modifikationen vorhanden sind, können die Zellen mit dem mitotischen Prozess beginnen (Abb. 6).

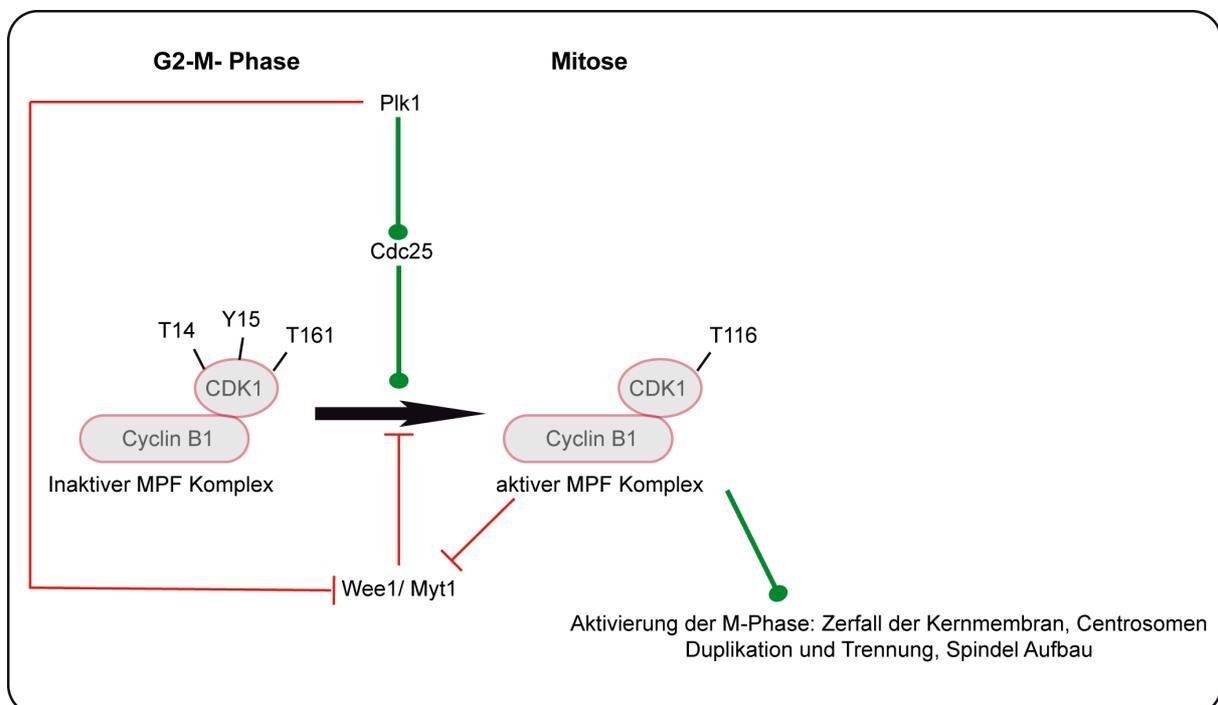


Abbildung 6: Aktivierung des MPF-Komplexes während des Übergangs G2-M-Phase.

Die Cdc25 Phosphatase wird durch Plk1 hyperphosphoryliert und daraufhin aktiviert. Die Dephosphorylierung am Threonin 14, Tyrosin 15 durch Cdc25 führt zur Aktivierung des MPF-Komplexes. Diese Aktivierung wird durch die Inhibition der

Wee1/Myt1 Proteine durch Plk1 verstärkt. Die grünen Linien deuten auf eine Aktivierung und die roten Linien auf eine Inaktivierung hin.

1.6 Cyclin B1/CDK1 zwischen Zytoplasma und Kern

Mehrere Studien zur Lokalisation von Cyclin B1 in *Xenopus* und in HeLa-Zellen haben gezeigt, dass dieses Protein ein hoch dynamisches Verhalten aufweist. Das heißt, dass Cyclin B1 während der Interphase fortlaufend zwischen Zytoplasma und Kern pendelt (Yang et al., 1998). Das Importieren von Cyclin B1/CDK1 in den Kern erfolgt durch die Bindung von Cyclin B1 an β -Importin, dabei spielt CDK1 für die Translokation des Komplexes in den Kern eine unwesentliche Rolle.

Vor dem G2-M Übergang verbleibt Cyclin B1/CDK1 im Zytoplasma. Dies erfolgt durch den Effekt des CRM1-Faktors (Exportin 1). CRM1 erkennt einen bestimmten Bereich in der Aminosäuren-Sequenz von Cyclin B1, das CRS-Motiv („*Cytoplasmic Retention Signal*“), der für die zytoplasmatische Lokalisation von Cyclin B1 verantwortlich ist (Pines et al., 1994). Am Anfang der Mitose wird Cyclin B1 an vier Stellen innerhalb des CRS-Bereiches phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen fördern einerseits die Translokation des Cyclin B1/CDK1 in den Kern, und führen andererseits zum Festhalten des Komplexes innerhalb des Nucleus, wo er für den Verlauf der unterschiedlichen Phasen der Mitose unentbehrlich ist.

1.7 Die Ausführung der Mitose unter der Führung von Cyclin B1/CDK1

1.7.1 Potentielle Substrate von CDK1

In vitro Kinase-Assays, die mit aufgereinigter CDK1 Kinase durchgeführt wurden, zeigten, dass diese Kinase einen breiten Bereich an Substraten phosphorylieren kann. Beispiel-Substrate sind unter anderem Histone H1, Cyclin B1, Lamin A, B und C, Nucleolin, MAP4 („*Microtubules Associated Protein 4*“), Myosin II, Vimentin, Rb-Protein, P53 und die RNA-Polymerase II (Kishimoto, 1994). Nach genauer Untersuchung der Aminosäure-Sequenzen dieser *in vitro* Substrate entdeckte man, dass alle über ein bestimmtes Sequenz-Motiv verfügen, das als Konsensus-Motiv für die Phosphorylierung durch CDK1 vorgeschlagen wurde.

Dieses Motiv war **S/T-P-X-K/R**, in dem das phosphorylierte Serin oder Threonin von einem Prolin, von einer polaren Aminosäure (X), und schließlich von einer basischen Aminosäure gefolgt wird (Moreno et al., 1990). Die Entdeckung dieses Konsensus-Motivs legte den Meilenstein für die Aufklärung der Kaskade an Ereignissen, die von der genannten „Master“ Kinase CDK1 gesteuert sind und für die Durchführung der Mitose unverzichtbar sind. In der Praxis wird der Komplex Cyclin B1/CDK1 mit dem Zerfallen der Nuklearmembran, mit der Centrosomen Reifung und Trennung, mit der Chromosomen Kondensierung, mit dem Aufbau der Spindel und mit der Chromosomen Segregation verbunden. All das reflektiert die komplizierte Funktion und die große Bedeutung dieser Kinase für den Verlauf jeder Phase der Mitose.

1.7.2 Der Zerfall der Nuklear-Membran: Die Kernhülle besteht aus einer inneren und einer äußeren Kern-Membran. Unter der inneren Kernmembran liegt ein faserförmiges Protein-Netzwerk, das als Nuklear-Lamina bezeichnet wird. Die Hauptkomponente dieser Nuklear-Lamina sind die Lamin-Proteine Typ A und B. So phosphoryliert Cyclin B1/CDK1 während der Mitose das Lamin B Protein an der N-terminalen Domäne am Serin 16. Da die Lamine B zur Familie der intermediären Filamente gehören, führt diese Phosphorylierung zur Depolymerisierung und zum Verlust dieser Komponente von der Kernhülle. Dies verursacht letztendlich den Abbau der Kern-Lamina (Peter et al., 1990).

1.7.3 Die Kondensierung der Chromosomen: Die Chromosomen Kondensierung ist ein recht kompliziertes Ereignis, das am Anfang der Mitose stattfindet. Histone H1 und Histone H3 sind Beispiele der Proteine, die unter anderem an diesem Prozess beteiligt sind. Es wurde bereits nachgewiesen, dass während der Mitose beide Proteine hyperphosphoryliert werden und hervorragende *in vitro* Substrate für CDK1 darstellen (Langan et al., 1989). Das Protein Histon H1 besteht aus drei Domänen: einer zentralen, hydrophoben, globularen Domäne, die mit dem Histon-Kern wechselwirkt, und aus zwei basischen, flexiblen Armen an den N- und C-terminalen Enden, die für das Umklammern des DNA-Linkers verantwortlich sind. Die **K/R- S/T-P-X-K/R** Sequenz an den terminalen Enden des Histons H1 ist gleichzeitig für die enge Interaktion zwischen diesen Enden und dem DNA-Linker verantwortlich

(Churchill et al., 1991) und stellt das Motiv für die Phosphorylierung durch CDK1 dar. In der Tat mindert die Phosphorylierung von Histon H1 durch CDK1 seine Assoziation mit dem DNA-Linker. Die Abnahme dieser Interaktion erlaubt folglich den Zugang zum Chromatin durch die putativen Faktoren, die für die Kondensierung der Chromosomen verantwortlich sind.

1.7.4 Aufbau der Spindel: Während des Übergangs G2/M-Phase wird das komplette Mikrotubuli-Netzwerk neu organisiert, um die Entstehung der mitotischen Spindel zu gewährleisten. Diese Umordnung der Mikrotubuli scheint ebenfalls durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Substrate vom Cyclin B1/CDK1 Komplex gesteuert zu werden. Eines der wichtigsten Substrate von CDK1 sind die Motorproteine, darunter die Kinesine und die Dyneine. In Mammalia-Zellen konnte gezeigt werden, dass CDK1 die Familie der MAP 4 Proteine (*„Microtubules Associated Protein 4“*) *in vivo* phosphorylieren kann. Dies führt zum Verlust des stabilisierenden Effektes dieser Proteine auf die Mikrotubuli, was wiederum zu einem schnellen und ausgeprägten Abbau der Mikrotubuli führt. Darüber hinaus veranlasst die Phosphorylierung des Kinesins Eg5 eine Verstärkung der Affinität des Kinesins zu den Mikrotubuli der Spindel, was für die Bildung einer bipolaren Spindel sehr wichtig ist (Cahu et al., 2008).

1.7.5 Segregation der Chromosomen: Durch die Degradierung von Cyclin B1 während des Übergangs von Metaphase zur Anaphase wird die Kinase CDK1 inaktiviert, was den Zellen die Segregation der bereits duplizierten Chromosomen und dadurch den Austritt aus der Mitose erlaubt. Durch die Degradierung von Cyclin B1 und die darauf folgende Inaktivierung von CDK1 wird das mitotische Kontroll-System (SAC = *„Spindle Assembly Checkpoint“*) außer Gefecht gesetzt. Dieser Schritt führt zur Degradierung der Cohesine (Proteine, die an Schwester-Chromatiden binden) und zur Segregation der Chromosomen (Saskia et al., 2008).

Ziel der Arbeit

Während der Mitose belegt MCAK unterschiedliche Lokalisationen, so ist es an den Spindelpolen, an den Mikrotubuli der Spindel, an den Chromosomen-Armen und an den Centromeren/Kinetochoren zu finden. Die Fähigkeit von MCAK, die Mikrotubuli zu depolymerisieren, zusammen mit seiner Lokalisation an den Kinetochoren machten aus dieser Depolymerase einen hervorragenden Regulator der Mikrotubuli-Kinetochor-Dynamik (Kline-Smith et al., 2004). Störungen dieser Regulation führen zum Auftreten von Problemen bei der Segregation der Chromosomen und zu chromosomaler Instabilität. Aufgrund der starken Lokalisation von MCAK an den Centrosomen stand in den letzten Jahren die Funktion von MCAK an den Spindelpolen im Mittelpunkt. Es war sehr interessant zu beobachten, dass die Depletion von MCAK durch siRNA zu Problemen bei der Herstellung bipolarer Spindeln führt (Stout et al., 2006). In den letzten Jahren sind dies bezüglich sehr interessante Studien erschienen. Dennoch ist wenig über die Funktion von MCAK an den Spindelpolen bekannt. Es ist bereits bekannt, dass eine deregulierte Aktivität des MPF-Komplexes, bestehend aus Cyclin B1/CDK1 sowohl zu chromosomaler Instabilität als auch zu Spindel-Aberrationen führt (Yuan et al., 2006). Es steht noch nicht fest, wie genau diese ganzen Ereignisse von Cyclin B1/CDK1 reguliert werden. Sicher ist, dass es durch Aktivierung bzw. Inhibition von unterschiedlichen Substraten während der Mitose erfolgt. In dieser Hinsicht war es interessant zu untersuchen, ob MCAK eines dieser Substrate ist. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die *in vitro*- und *in vivo*-Interaktionen zwischen CDK1 und MCAK zu untersuchen und zu charakterisieren. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob diese Phosphorylierung in synchronisierten Zellen stattfindet, und wenn Ja, wann und wo diese erfolgt. Ferner ist der Schwerpunkt dieser Studie, die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 zu erläutern. Daher wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Führt die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 zu einer Änderung der katalytischen Aktivität *in vitro* und *in vivo*?
2. Hat diese Phosphorylierung eine Bedeutung für die mitotischen Lokalisationen der Depolymerase MCAK?

3. Weisen Störungen dieser Phosphorylierung Effekte auf den Verlauf des Zellzyklus auf?
4. Führen Störungen der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 in humanen Zellen zum Auftreten von phänotypischen Aberrationen?

2. Ergebnisse

2.1 Zellzyklus-abhängige Proteinexpression von MCAK und Cyclin B1/CDK1

Zum Zweck der Untersuchung, ob Cyclin B1/CDK1 und MCAK in der Regulation der Mitose zusammenwirken, wurde die Expression der einzelnen Proteine im Verlauf des gesamten Zellzyklus verfolgt. Dafür wurden HeLa-Zellen in der G1/S-Phase mittels eines Doppel-Thymidin Blocks synchronisiert und anschließend in frisches Medium entlassen. Zellen wurden anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten für Western-Blot Analysen geerntet. MCAK-, Cyclin B1- und CDK 1-Antikörper wurden für die Detektion der entsprechenden Proteine verwendet (Abb. 7 A). Die Expression von MCAK scheint während des Zellzyklus in den HeLa-Zellen reguliert zu sein: Das MCAK Protein fängt während der S-Phase an zu akkumulieren (Abb. 7 A, obere Reihe, Spur 4), wobei die Menge bis in die G2-Phase kontinuierlich zunimmt (Abb. 7 A, obere Reihe, Spur 5 und 6). Interessanterweise ist eine zusätzliche, langsam migrierende Bande aufgetreten, als die Zellen in die Mitose eintraten (Abb. 7 A, obere Reihe, Spur 7). Diese Bande ist ein Hinweis für eine sekundäre Modifikation von MCAK, die in der Mitose stattfindet. Während die Expression von CDK1 im Verlauf des gesamten Zellzyklus unverändert bleibt (Abb. 7 A, dritte Reihe), zeigt die Expression von Cyclin B1 Zellzyklus-abhängige Veränderungen, vergleichbar mit der des MCAK Proteins. Die Expression von Cyclin B1 erreicht die höchste Konzentration nach 10 Stunden (Abb. 7 A, zweite Reihe, Spur 7). Die maximale Konzentration von Cyclin B1 korreliert zeitlich mit dem Auftreten der phosphorylierten MCAK Bande und stellt einen deutlichen Hinweis für die Phosphorylierung von MCAK durch den aktiven Komplex Cyclin B1/ CDK1 dar. Nach 12 Stunden nimmt sowohl die Konzentration von Cyclin B1 als auch die von MCAK ab. Die Abnahme von MCAK stimmt mit vorherigen Studien überein, die von einer Proteasom-abhängigen Degradierung von MCAK am Ende der Mitose berichten (Ganguly et al., 2008).

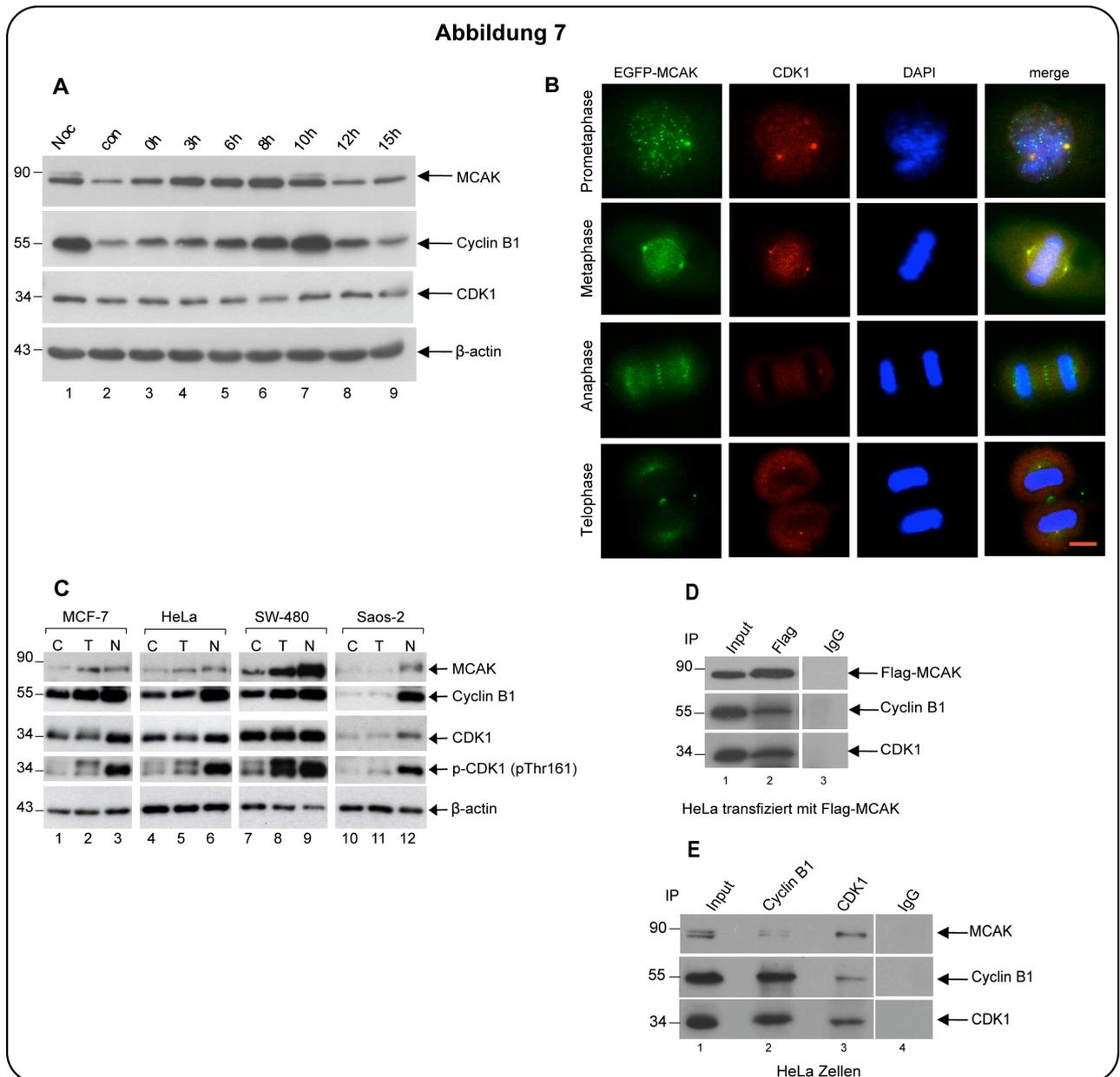


Abbildung 7: Das Zellzyklus-regulierte MCAK colokalisiert und interagiert mit dem Komplex Cyclin B1/CDK1

A: Zellzyklus-abhängige Expression von MCAK und Cyclin B1 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mittels eines Doppel-Thymidin Blocks in die G1/S Phase synchronisiert und anschließend in frisches Medium entlassen. Zu geeigneten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate für Western Blot Analysen hergestellt. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen MCAK (obere Reihe), Cyclin B1 (zweite Reihe), CDK1 (dritte Reihe) und β-Actin (als Standardisierung, letzte Reihe) eingesetzt. Die Molekulargewichte in kDa sind links angegeben.

B: Immunofluoreszenz Färbungen zur räumlichen Verteilung von MCAK und CDK1. HeLa-Zellen wurden mit EGFP-MCAK-WT transfiziert und in die G1/S Phase synchronisiert. Zehn Stunden nach Entlassung der Zellen in frisches Medium, wurden sie fixiert und mit den spezifischen Antikörpern gegen CDK1 und die DNA mit DAPI gefärbt. Das EGFP Signal erkennt man in der ersten Spalte, CDK1 in der zweiten und DAPI in der dritten Spalte. Die drei Spalten werden in dem „merge“ Bild fusioniert. Maßstab: 10µm

C: Expression von MCAK in unterschiedlichen Krebszellen. Western Blot Analysen von MCF-7, SW-480, HeLa, Saos-2 Zellen, die entweder nicht synchronisiert (C), mit einem Doppel-Thymidin Block (T), oder mit Thymidin/Nocodazol (N) synchronisiert wurden. Es wurde die Expression sowohl von MCAK, Cyclin B1, CDK1 als auch die des phosphorylierten CDK1 (mitotische Marker) mittels Antikörpern untersucht. B-Actin wurde als Standardisierung betrachtet. Die Molekulargewichte in KDa sind links angezeigt.

D: Co-Immunopräzipitation in Flag-MCAK WT transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit Flag-MCAK WT transfiziert und mittels Thymidin/Nocodazol in die G2/M Phase synchronisiert. Flag-MCAK WT Protein wurde mittels spezifischen Antikörpern aus den Lysaten präzipitiert. Die Präzipitate wurden einer Western Blot Analyse unterzogen. Flag, Cyclin B1 und CDK1 Antikörper wurden für die Detektion der Proteine eingesetzt. Die Molekulargewichte in KDa sind links angezeigt.

E: Co-Immunopräzipitation in nicht transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit Thymidin/Nocodazol in die G2/M Phase synchronisiert. MCAK, Cyclin B1 und CDK1 wurden aus den Lysaten mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert. Als Kontrolle wurden die Lysate mit normalem Serum (IgG) inkubiert. Die Präzipitate wurden mit Western Blot untersucht. MCAK, Cyclin B1 und CDK1 Antikörper wurden für die Detektion der Proteine benutzt. Die Molekulargewichte in KDa sind links angezeigt.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Expression von Cyclin B1 und MCAK eine ähnliche zeitliche Kinetik aufweisen, und dass das Erscheinen einer phosphorylierten Form von MCAK in der Mitose auch auf die Aktivität von Cyclin B1/CDK1 zurückzuführen sein kann.

Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung, und um dadurch eine mögliche Interaktion zwischen MCAK und CDK1 zu prüfen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit dem EGFP-MCAK-WT (WT = Wildtyp) transfiziert. Die Zellen wurden dann mittels eines Doppel-Thymidin Blocks in die G1/S Phase synchronisiert und anschließend für 10 Stunden in frisches Medium entlassen, so dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Färbung in der Mitose befanden. Das Protein CDK1 wurde mit spezifischem Antikörper gefärbt und die DNA wurde dann mit DAPI gefärbt (Abb. 7 B). Die Abbildung zeigt Beispiele von Zellen, die sich in den unterschiedlichen Phasen der Mitose befinden. Die Abbildung 7 B zeigt deutlich, dass beide Proteine während der Prometaphase auch am Centrosom colokalisieren (Abb. 7 B, erste Reihe). Zusätzlich ist MCAK auch im Zytoplasmabereich und im Chromatinbereich, vorhanden. In der Metaphase zeigen beide Proteine, MCAK und CDK1, hauptsächlich eine Colokalisation an den Centrosomen, sind aber auch entlang der mitotischen Spindel und an der äquatorialen Platte sichtbar (Abb. 7 B, zweite Reihe). In der Anaphase war die

Colokalisation beider Proteine an den Centrosomen kaum nachweisbar, während MCAK im Bereich der Mitte der Spindel sehr stark exprimiert war (Abb. 7 B, dritte Reihe). In der Telophase ließ die Stärke der Signale beider Moleküle an den Centrosomen nach, sie blieben aber dennoch sichtbar. Weiterhin war MCAK an dem „*Spindle midbody*“ erkennbar, während keine Färbung von CDK1 mehr vorhanden war.

Diese Daten zeigten, dass MCAK und CDK1 während der Mitose sowohl an den Centrosomen, an der mitotischen Spindel, als auch an der äquatorialen Platte colokalisieren. Diese Colokalisation beider Proteine gibt Anlass zur Frage, ob beide Moleküle direkt interagieren.

2.1.1 Die Regulation von MCAK in verschiedenen Tumor Zelllinien

Um festzustellen, ob die Expression von MCAK in verschiedenen humanen Tumorzelllinien ebenfalls Zellzyklus-reguliert wird, wurden neben HeLa-Zellen andere Tumorzelllinien untersucht. MCF-7 Zellen (Mamma), SW-480 Zellen (Kolon), Saos-2 Zellen (Osteosarkoma) und HeLa-Zellen wurden jeweils entweder mit einem Doppel-Thymidin Block in die G1/S Phase oder mit Thymidin/Nocodazol in die G2/M Phase synchronisiert. Nach Herstellung der Lysate wurde mittels Western Blot die Proteinexpression von MCAK, CDK1 und pCDK1 (pThr161) untersucht. Der pCDK1-Antikörper wurde als Marker verwendet, der den Anfang der Mitose signalisiert. Die Phosphorylierung von CDK1 am Threonin 161 erfolgt durch den CAK-Komplex (CAK = „*CDK-activating kinase*“), der aus Cyclin H/CDK7 besteht. Dieses Ereignis bezeichnet den Eintritt in die Mitose, in der eine vollständige Aktivierung des Komplexes Cyclin B1/CDK1 benötigt wird. β -Actin wurde zum Zweck der Standardisierung ebenfalls angefärbt (Abb. 7 C). Erneut korrelierten die Expressionen von MCAK, Cyclin B1 und der aktiven Form von CDK1 (p-CDK1) miteinander. Im Gegensatz zu den unsynchronisierten Zellen (Abb. 7 C, Spur 1, 4, 7 und 10) beginnt bei allen untersuchten Zelllinien die Expression sowohl von MCAK als auch von Cyclin B1 in der G1/S Phase zu akkumulieren (Abb. 7 C, Spur 2, 5, 8 und 11). Nachdem die Zellen die G2/M Phase erreicht haben, zeigen MCAK und Cyclin B1 gemeinsam den höchsten Wert ihrer Proteinexpression (Abb. 7 C, Spur 3, 6, 9 und 12).

Diese Beobachtungen untermauern die Zellzyklus-regulierte Expression von MCAK dar. Deutlich ist, dass diese Zellzyklus-Regulation in den unterschiedlichen Tumorzelllinien zu beobachten war, was einerseits die Ergebnisse anderer Studien bestätigt (Shimo et al., 2007; Ishikawa et al., 2008) und andererseits auch eine mögliche Rolle von MCAK im Prozess der Krebsentstehung nicht ausschließt.

2.1.2 Co-Immunopräzipitation des MCAK-Cyclin B1-CDK1 Komplexes

Um zu ermitteln, ob eine physikalische Interaktion innerhalb der Zellen zwischen dem Komplex Cyclin B1/CDK1 und dem Protein MCAK vorhanden ist, wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit exogener Flag-MCAK WT DNA transfiziert und anschließend mit Thymidin/Nocodazol in die G2/M Phase synchronisiert. Nach Herstellung der Lysate wurden spezifische Antikörper gegen das Flag-Protein und normales IgG-Serum (negative Kontrolle) mit dem Zelllysat inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-Komplexe präzipitiert. Sowohl Cyclin B1 als auch CDK1 wurden in dem Flag MCAK WT Präzipitat detektiert (Abb. 7 D, Spur 1 und 2), während in der IgG-Kontrolle keine Proteine detektiert worden sind (Abb. 7 D, Spur 3). In einem nächsten Experiment wurden endogenes MCAK, Cyclin B1 und CDK1 Proteine mittels spezifischer Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert und mithilfe des Western Blot-Verfahrens analysiert (Abbildung 7 E). In allen Fällen konnte ein Komplex aus den drei Proteinen MCAK-Cyclin B1-CDK1 detektiert werden. Diese Daten deuten auf eine Wechselwirkung von MCAK und Cyclin B1/CDK1 in mitotischen Zellen hin. Basierend auf den Daten der Co-Immunoprecipitationen und der Immunofluoreszenz, die sowohl physikalische Wechselwirkungen als auch die räumliche Nähe des Komplexes MCAK-Cyclin B1/CDK1 bestätigten, lassen sich immer mehr Hinweise für eine mitotische Interaktion zwischen MCAK und dem Komplex Cyclin B1/CDK1 erhalten.

2.2 Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert das Protein MCAK *in vitro*

Um die Rolle von Cyclin B1/CDK1 bei der Regulation von MCAK weiter zu studieren, wurden *in vitro* Kinase-Assays durchgeführt. Ein GST-MCAK WT Fusionsprotein wurde bakteriell hergestellt und mit dem Komplex Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit

von radioaktivem [γ - ^{32}P] ATP inkubiert. Die Abbildung 8 A zeigt das Autoradiogramm (obere Reihe) und das Coomassie-gefärbte Gel, das als Kontrolle der Proteinladungen benutzt wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass der Komplex Cyclin B1/CDK1 in der Lage ist, MCAK zu phosphorylieren (Abb.8 A, obere Reihe, Spur 3). Zusätzlich wurden Kinetiken der Phosphorylierung durchgeführt. Das GST-MCAK Fusionsprotein wurde mit dem Cyclin B1/CDK1 Komplex inkubiert, und nach Ablauf der gezeigten Zeiten unterbrochen (Abb. 8 B). Schon nach einer Minute war ein Signal auf dem Autoradiogramm sichtbar und je länger die Inkubationszeit, desto stärker wurde das detektierte Signal. Parallel dazu wurde eine Dosis-abhängige Kinetik durchgeführt. Konstante Mengen Cyclin B1/CDK1 wurden mit steigenden Konzentrationen von MCAK inkubiert (Abb. 8 C). Mit zunehmender MCAK-Konzentration wurde das Signal auf dem Autoradiogramm immer stärker. Um die Spezifität dieser Phosphorylierung zu beweisen, wurde nur das GST-MCAK Fusionsprotein zusammen mit dem radioaktiven [γ - ^{32}P] ATP inkubiert (Abb. 8 C, Spur 1). Hierbei war auf dem Autoradiogramm kein Signal zu sehen. Das GST-Protein wurde in diesem Fall als negative Kontrolle genommen.

Durch die Erkenntnisse der Kinase-Assays konnte bestätigt werden, dass MCAK vom Cyclin B1/CDK1 Komplex *in vitro* phosphoryliert wird. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass diese Phosphorylierung im *in vitro* System spezifisch, zeitabhängig und dosisabhängig ist.

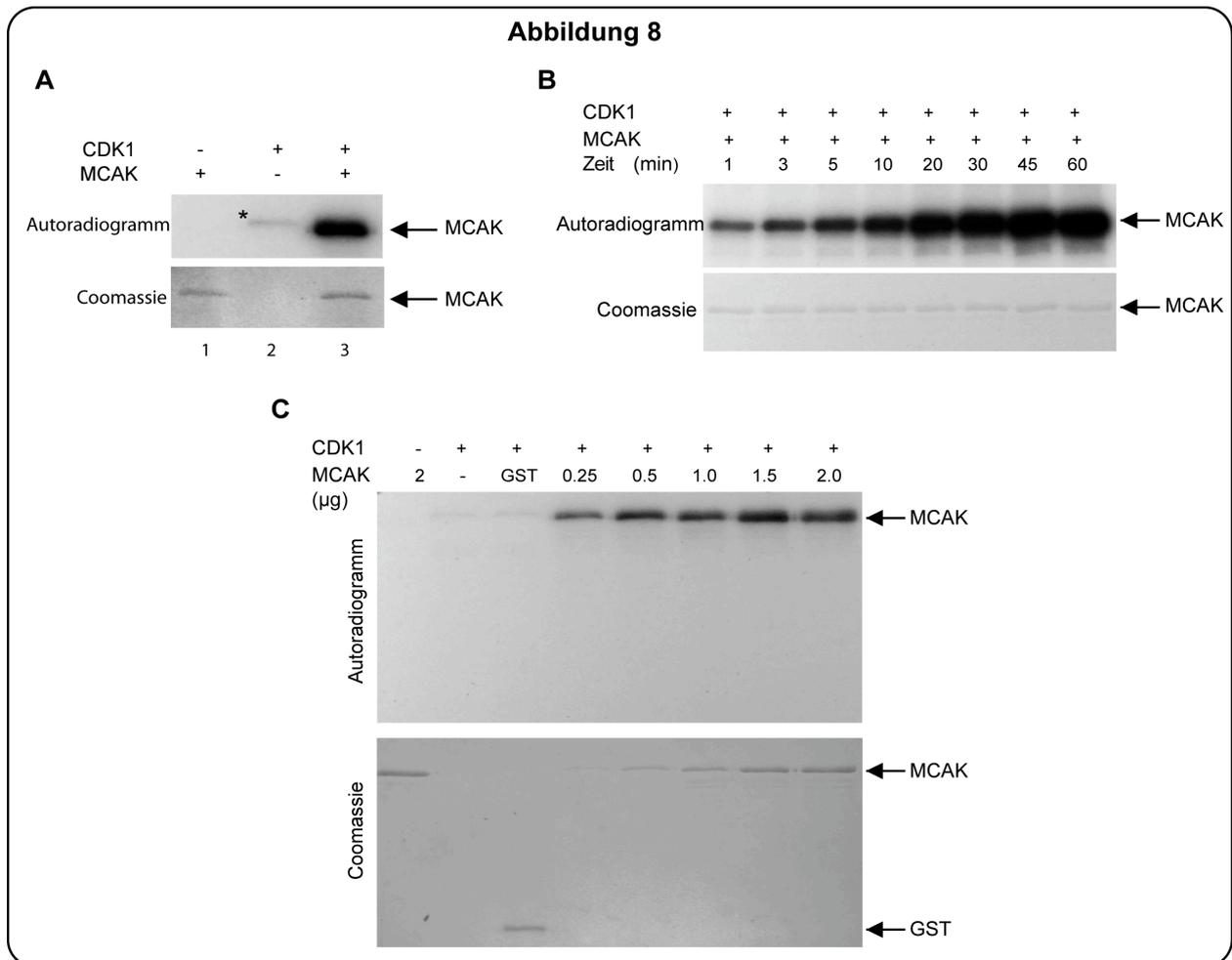


Abbildung 8: Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert MCAK *in vitro*

A: Bakteriell exprimiertes GST MCAK WT Fusionsprotein wurde einem Kinase-Assay in Anwesenheit des Komplexes Cyclin B1/CDK1 und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP unterzogen. Die obere Reihe zeigt das entwickelte Autoradiogramm und die untere Reihe das Coomassie-Gel, das als Kontrolle zur Beladung der GST-Proteine diente.

* = Die Bande zeigt die Autophosphorylierung von Cyclin B1

B: Kinetik zur Phosphorylierung von MCAK durch Cyclin B1/CDK1. GST MCAK WT Fusionsprotein wurde mit Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP inkubiert. Der Kinase-Assay wurde nach Ablauf unterschiedlicher Zeitpunkte (in Minuten) gestoppt. Das Autoradiogramm wird in der oberen Reihe dargestellt, und das Kontroll-Coomassie-Gel in der Unteren.

C: Dosisabhängige Phosphorylierung von MCAK durch Cyclin B1/CDK1. Der Kinase-Assay wurde in Anwesenheit von Cyclin B1/CDK1, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP und steigenden Konzentrationen von MCAK durchgeführt. Das Autoradiogramm wird in der oberen Reihe und das Coomassie-Gel in der unteren Reihe gezeigt. Als Kontrolle wurden entweder das GST MCAK WT Fusionsprotein alleine oder der Komplex Cyclin B1/CDK1 im Reaktionsansatz eingesetzt.

2.3 Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert Threonin 537 innerhalb des katalytischen Bereiches von MCAK

Die ersten *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass der Komplex Cyclin B1/CDK1 das Protein MCAK phosphoryliert. Der nächste Schritt der Untersuchung war die genaue Aminosäure innerhalb der Sequenz des katalytischen Bereiches einzugrenzen, an der diese Phosphorylierung erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die unterschiedlichen strukturellen Domänen von MCAK in den pGex 5x3-Vektor (codiert für GST-Fusionsprotein) subkloniert. Es handelte sich um die N-terminale Domäne (N-T) (1-187 AS), die „Neck“-Domäne („neck“) (188-255 AS), die katalytische Kern-Domäne („core“) (256-590 AS) und die C-terminale Domäne (C-T) (591-725 AS) (Abb. 9 A). Die unterschiedlichen GST-Fusionsproteine wurden bakteriell hergestellt und aufgereinigt. Anschließend wurden sie in einem Kinase-Assay in Anwesenheit von [γ -³²P]-ATP und dem Komplex Cyclin B1/CDK1 inkubiert. Das GST-Protein wurde parallel mit Cyclin B1/CDK1 inkubiert und diente als negative Kontrolle (Abb. 9 B, Coomassie Gel), während die Inkubation des CRS-Bereichs von Cyclin B1 (CRS = „*Cytoplasmic Retention Signal*“) (Pines et al., 1994; Yuan et al., 2002) mit Cyclin B1/CDK1 als positive Kontrolle zur Aktivität der Kinase CDK1 verwendet wurde (Abb. 9 B).

Die Abbildung 9 B zeigt sowohl das Autoradiogramm als auch die Coomassie-Kontrolle zur Ladung der unterschiedlichen Fusionsproteine. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass innerhalb der strukturellen Domäne von MCAK nur die katalytische Domäne („core“) eine deutliche Phosphorylierung zeigt. Das bedeutete, dass nur die katalytische Domäne von Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert wird (Abb. 9 B). Die gesamte Länge des Proteins MCAK zeigt selbstverständlich ebenfalls eine Phosphorylierung, da das Protein auch den katalytischen Bereich beinhaltet.

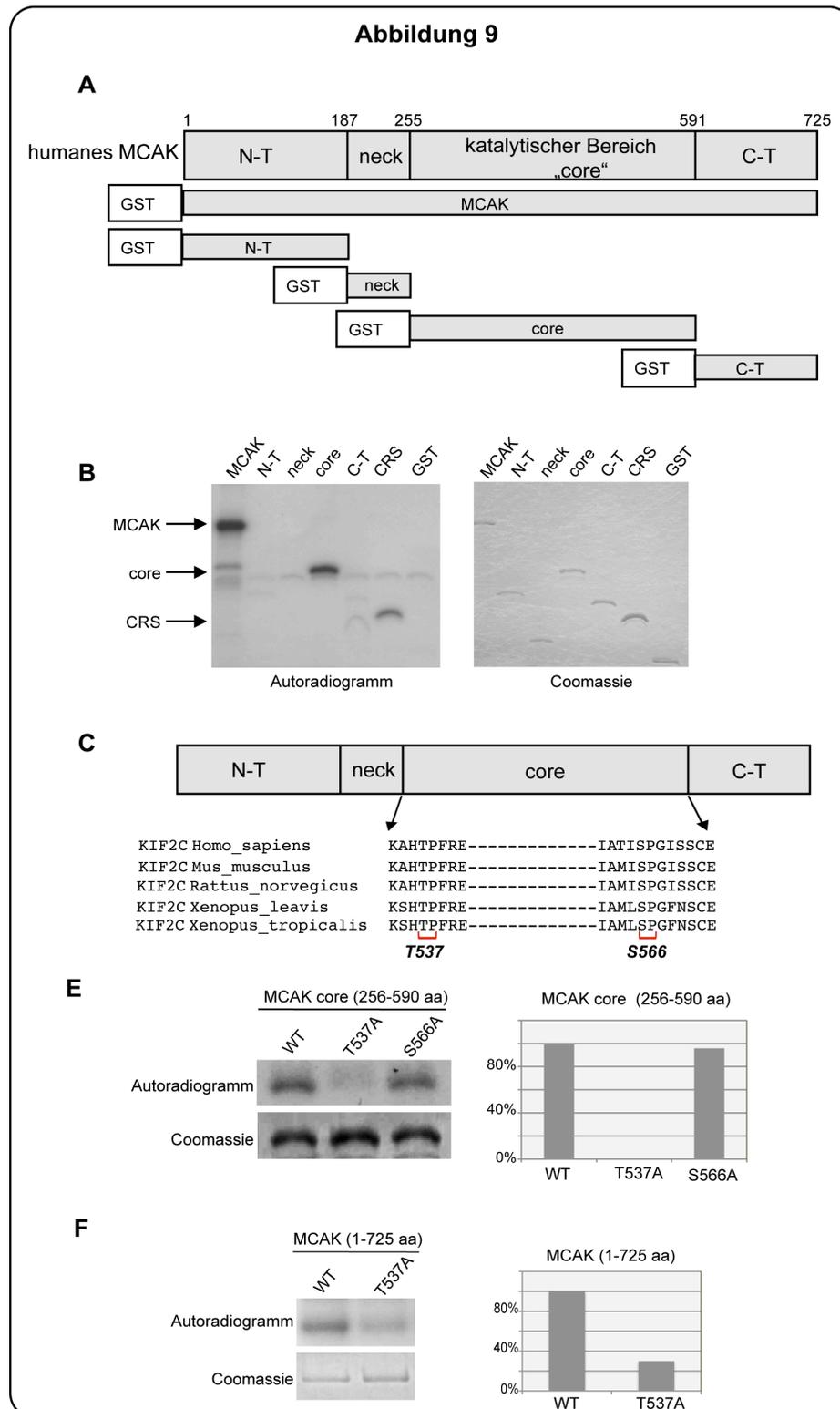


Abbildung 9: Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert Threonin 537 innerhalb der katalytischen „core“ Domäne von MCAK *in vitro*

A: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Domänen von MCAK, die für *in vitro* Untersuchungen kloniert und bakteriell exprimiert wurden

B: *In vitro* Phosphorylierung von MCAK und dessen struktureller Domäne durch CDK1. Die GST-gekoppelte Domäne von MCAK (siehe schematische Darstellung 3A) wurde mit CyclinB1/CDK1 in Anwesenheit von radioaktivem [γ - 32 P] ATP inkubiert. GST-Protein und CRS („cytoplasmic retention signal“) aus Cyclin B1 wurden

respektiv als negative und positive Kontrolle verwendet. Das Autoradiogramm ist links und das entsprechende Coomassie-Gel rechts gezeigt.

C: Darstellung des Konservierungsgrades von Threonin 537 und von Serin 566 innerhalb unterschiedlicher Spezies.

E: Die GST-gekoppelte katalytische „core“ Domäne Wildtyp und die Varianten T537A, S566A wurden mit Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit von radioaktivem [γ - 32 P] ATP inkubiert. Das Autoradiogramm wird oben links und das Coomassie Kontrollgel unten links gezeigt. Die Intensität des Phosphorylierungssignals wurde im Verhältnis zum Wildtyp ermittelt und rechts graphisch dargestellt.

F: Das GST-gekoppelte MCAK und dessen Varianten T537A, S566A wurden mit Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit von radioaktivem ATP inkubiert. Das Autoradiogramm ist oben links dargestellt und das Coomassie Kontrollgel unten links. Die Intensität des Phosphorylierungssignals wurde im Verhältnis zum Wildtyp ermittelt und ist rechts graphisch dargestellt.

Anhand der von diesem Kinase-Assay erhaltenen Hinweise, ist es deutlicher geworden, dass die Suche nach der oder den Aminosäuren, die von CDK1 phosphoryliert werden, auf den katalytischen Bereich „core“ eingeschränkt werden kann. Nach genauer Betrachtung der Protein-Sequenz des „core“ Bereiches wurden zwei putative Aminosäuren detektiert, die von CDK1 phosphoryliert werden könnten. Diese Aminosäuren sind Threonin an Position 537 (später als T537 bezeichnet) und Serin an Position 566 (S566). Beide Aminosäuren liegen in der minimalen Konsensussequenz der CDK1 Kinase, nämlich ein Serin, bzw. ein Threonin gefolgt von Prolin. Eine phylogenetische Analyse mehrerer Spezies (Mensch, Maus, Ratte und *Xenopus*) bestätigte, dass beide Aminosäuren T537 und S566 während der Evolution hoch konserviert geblieben sind (Abb. 9 C).

Im nächsten Schritt der Untersuchung, ob die CDK1 Phosphorylierung am T537, am S566, oder an beiden Aminosäuren erfolgt, wurden die Aminosäuren mithilfe gerichteter Mutagenese gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die Alanin-Varianten der jeweiligen Aminosäuren (als T537A und S566A bezeichnet) wurden sowohl in der gesamten Länge des GST-MCAK Fusionsprotein, als auch im GST-„core“ Fusionsprotein erzeugt. Anschließend wurden diese Proteine in Anwesenheit von CDK1 und radioaktivem ATP einem Kinase-Assay unterzogen. Im Gegensatz zum „core“ Bereich des Wildtyps und zur Mutation des Serin 566, die ähnliche Phosphorylierungen zeigten, führte die Mutation des T537 zur kompletten Aufhebung der Phosphorylierung durch CDK1, wenn die Mutationen in den katalytischen „core“-Bereich eingeführt wurden (Abb. 9 E, Autoradiogramm links). Dies wurde durch graphische Darstellung der Intensität des Phosphorylierungssignals bestätigt (Abb. 9

E, graphische Darstellung rechts). Parallel dazu wurde die Alanin-Variante der Gesamtlänge des MCAK Proteins ebenfalls einem Kinase-Assay mit CDK1 unterzogen. In diesem Fall war das Konstrukt MCAK-T537A in der Lage, nur 30% der Phosphorylierung im Vergleich mit dem MCAK-WT zu zeigen (Abb. 9 F Autoradiogramm links). Dies wurde erneut durch eine graphische Darstellung der Intensität des Phosphorylierungssignals bestätigt (Abb. 9 F, graphische Darstellung rechts).

Anhand dieser erhaltenen Daten wurde sichergestellt, dass Threonin 537 die Hauptphosphorylierungsstelle innerhalb der Sequenz von MCAK für CDK1 *in vitro* darstellt.

2.4 Der Phospho-Antikörper p-MCAK erkennt das phosphorylierte Threonin 537 *in vitro* und *in vivo*

Anhand der Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zur Phosphorylierung von MCAK durch Cyclin B1/CDK1 konnten zwei wichtige Erkenntnisse gewonnen werden:

- Cyclin B1/CDK1 phosphoryliert das Protein MCAK
- Die Phosphorylierung findet im katalytischen „core“-Bereich des Proteins MCAK am Threonin 537 statt

Der nächste Schritt war herauszufinden, ob diese Phosphorylierung auch innerhalb von Zellen auftritt und darüber hinaus, welche funktionelle Bedeutung diese Phosphorylierung für den Verlauf der Mitose haben könnte. Um diese Fragen zu klären, wurde ein spezifischer Phospho-Antikörper „p-MCAK“ erzeugt, der das phosphorylierte Threonin 537 erkennt. Für die Erzeugung des p-MCAK Antikörpers wurden Kaninchen gegen die folgende Peptidsequenz CGQNKAHpTPFRES (pT = phospho-Threonin) immunisiert. Der p-MCAK Antikörper wurde dann durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde zunächst *in vitro* getestet. Dafür wurden GST-MCAK WT und die GST-MCAK-Domäne mit Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit von nicht-radioaktivem ATP in einem sogenannten kalten Kinase-Assay inkubiert. Als negative Kontrollen wurden die gleichen Mengen der jeweiligen GST-Proteine mit ATP ohne Cyclin B1/CDK1

inkubiert. Nach Anfertigung eines Western Blots erfolgte die Detektion der Phosphorylierung mit Hilfe des neuen p-MCAK Antikörpers (Abb.10 A). Die obere Reihe der Abbildung 10 A zeigt den p-MCAK Immuno-Blot, auf dem klar zu erkennen ist, dass nur bei der Gesamtlänge des Proteins GST-MCAK (Spur 1) und auch bei der GST-„core“ Domäne ein Signal vorhanden ist (Abb. 10 A oben, Spur 7). Um festzustellen, ob die Ladung der unterschiedlichen GST-Proteine gleichmäßig war, wurde in einem nächsten Schritt die gleiche Membran mit einem Antikörper gefärbt, der spezifisch das GST-Protein erkennt (Abb. 10 A, unten).

Die Anwendung des erzeugten Antikörpers bestätigt einerseits die Spezifität des Antikörpers, und andererseits die vorherigen *in vitro* Befunde, dass die Phosphorylierung an der „core“-Domäne stattfindet.

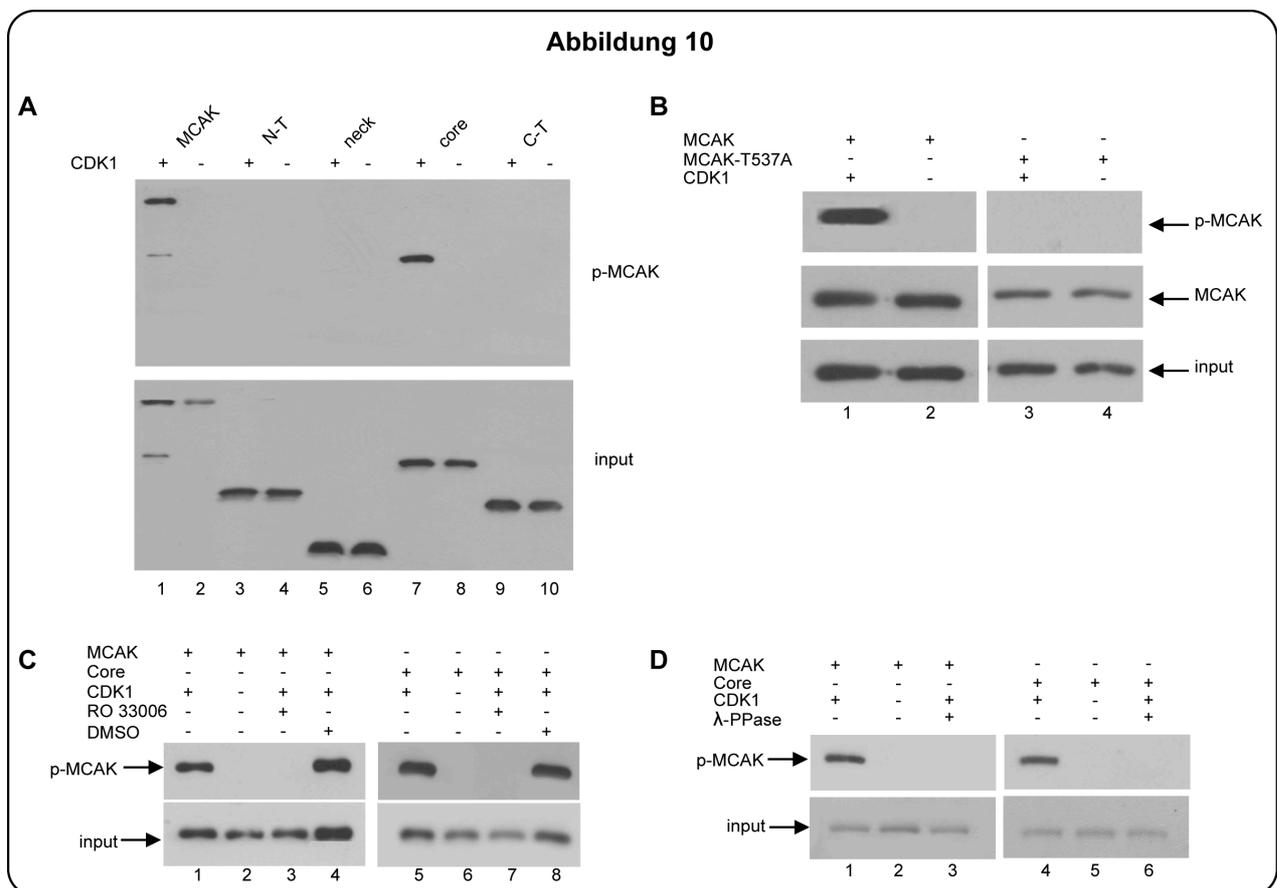


Abbildung 10: Der Phospho-Antikörper „p-MCAK“ ist spezifisch und erkennt das durch Cyclin B1/CDK1 phosphorylierte Threonin 537 *in vitro*

A: GST-gekoppeltes MCAK, N-Terminus (N-T), Neck, Core und C-Terminus (C-T) von MCAK wurden in einem Kinase-Assay mit Cyclin B1/CDK1 und nicht-radioaktivem ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben einer Western Blot Analyse mittels des Phospho-Antikörpers gegen das phosphorylierte Threonin 537 von MCAK (p-MCAK) unterzogen (oben). Die gleiche Membran wurde danach mit

dem GST-Antikörper gefärbt, um die Mengen der unterschiedlichen GST-gekoppelten Proteine zu überprüfen (unten).

B: Der GST-gekoppelte MCAK Wildtyp und die Variante GST-T537A wurden in einem Kinase-Assay mit Cyclin B1/CDK1 und nicht-radioaktivem ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben einer Western Blot Analyse mit dem Phospho-Antikörper gegen das phosphorylierte Threonin 537 von MCAK (p-MCAK) unterzogen (oben). Die gleiche Membran wurde danach sowohl mit einem MCAK-Antikörper (Mitte), als auch mit dem GST-Antikörper (unten) inkubiert, um die Ladung der unterschiedlichen GST-Proteine überprüfen zu können.

C: Die gesamte Länge des Proteins MCAK und die katalytische „core“-Domäne wurden getrennt in einem Kinase-Assay in Anwesenheit von spezifischem CDK1 Inhibitor RO-3306 oder mit DMSO (negative Kontrolle) inkubiert und ein Western Blot angefertigt. P-MCAK Antikörper (oben), und GST-Antikörper wurden für die Detektion verwendet.

D: Das Gesamtprotein MCAK und die katalytische „core“-Domäne wurden getrennt in einem Kinase-Assay mit und ohne λ -Phosphatase (λ -PPase, obere Reihe) inkubiert. Für den Western Blot wurden zur Detektion p-MCAK Antikörper (obere Reihe) und GST-Antikörper (untere Reihe) verwendet.

Zur Bekräftigung dieser Erkenntnisse wurden GST-MCAK WT und die nichtphosphorylierbare Variante GST-MCAK T537A zunächst mit und ohne Cyclin B1/CDK1 in Anwesenheit von nicht-radioaktivem ATP inkubiert und ein Western Blot erstellt. Anschließend erfolgte die Detektion mittels des p-MCAK Antikörpers. Während bei dem GST MCAK WT ein Phospho-Signal sichtbar war (Abb. 10 B, oben, Spur 1), konnte bei der nichtphosphorylierbaren Variante GST MCAK T537A kein Signal nachgewiesen werden (Abb. 10 B, oben, Spur 3). Dies zeigt, dass der Austausch des Threonin 537 durch Alanin innerhalb der Sequenz des Proteins MCAK die Phosphorylierung durch CDK1 verhindert. Erneut untermauert dieses Experiment die Spezifität des p-MCAK zur Erkennung des von Cyclin B1/CDK1 phosphorylierten Threonins 537. Als Kontrolle der Ladung der GST-Proteine wurde die gleiche Membran einmal mit dem MCAK-Antikörper (Abb. 10 B, zweite Reihe) und einmal mit dem GST-Antikörper angefärbt (Abb. 10 B, dritte Reihe).

Außerdem wurde der spezifische CDK1 Inhibitor RO-3306 verwendet (Vassilev et al., 2006), um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung des Threonin 537 von der Aktivität der CDK1 Kinase abhängig ist. Dafür wurde die gesamte Länge des Proteins MCAK und die katalytische „core“-Domäne getrennt mit und ohne CDK1 in Anwesenheit von ATP und dem RO-3306 Inhibitor inkubiert. Als negative Kontrolle zum RO-3306 Inhibitor wurden die gleichen Ansätze mit DMSO an Stelle des Inhibitors inkubiert, so dass die Aktivität von CDK1 nicht negativ beeinträchtigt wurde. Mit allen Ansätzen wurden ein Western Blot angefertigt und die Detektion der

Phosphorylierung wurde mittels des p-MCAK Antikörpers durchgeführt. Die Abbildung 10 C zeigt, dass in Anwesenheit des Inhibitors die Aktivität von CDK1 vollständig inhibiert wird und weder das Gesamtprotein von MCAK, noch die katalytische „core“-Domäne ein Phospho-Signal zeigen (Abb. 10 C, oben, Spur 3 und 7). Im Gegensatz dazu, zeigte die Inkubation mit DMSO keinerlei Effekte auf die Aktivität von CDK1, und folglich konnte ein Phospho-Signal sowohl beim Gesamtprotein von MCAK als auch bei der katalytischen „core“-Domäne beobachtet werden (Abb. 10 C, oben, Spur 4 und 8). Als Ladungskontrolle der GST-Proteine wurde die gleiche Membran mit dem GST-Antikörper gefärbt (Abb. 10 C, unten). Ferner wurde nach der Durchführung des Kinase-Assays (Cyclin B1/CDK1, GST-MCAK oder GST-„core“ und nicht-radioaktivem ATP inkubiert) λ -Phosphatase zugegeben. Die Zugabe von λ -Phosphatase führte zum vollständigen Verschwinden des Phospho-Signals sowohl beim Gesamtprotein als auch bei der katalytischen „core“ Domäne (Abb. 10 D, oben, Spur 3 und 6).

Alle Erkenntnisse, die aus den *in vitro* Experimenten zur Spezifität des erzeugten Antikörpers p-MCAK erhalten wurden, weisen ebenso darauf hin, dass das Protein MCAK ein Substrat von Cyclin B1/CDK1 ist. Die Phosphorylierung scheint an einer Aminosäure (Threonin 537) innerhalb der katalytischen „core“-Domäne stattzufinden.

Die *in vitro* Experimente zur Spezifität des p-MCAK Antikörpers zeigten zweifellos, dass dieser Antikörper in der Lage ist, das durch CDK1 phosphorylierte Threonin 537 genau zu erkennen. Die nächste zu lösende Aufgabe war, festzustellen, ob MCAK *in vivo* durch CDK1 phosphoryliert wird. Dafür wurden HeLa-Zellen mit siRNAs gegen Cyclin B1 (si Cyclin B1), gegen die kodierende Sequenz von MCAK (si MCAK1) und eine Kontroll-siRNA transfiziert (Abb. 11 A). Anschließend wurden die Zellen in der G2/M Phase mittels Thymidin/Nocodazol synchronisiert. Zellen, die nicht synchronisiert wurden, (Kon 1, Abb. 11 A, Spur 1) wurden ebenfalls verwendet, um zu untersuchen, ob es phosphoryliertes MCAK außerhalb der Mitose gibt. Zelllysate der unterschiedlichen Behandlungen wurden für einen Western Blot vorbereitet und anschließend wurde p-MCAK zusammen mit anderen Antikörpern für die Detektion verwendet (Abb. 11 A). Verglichen mit den interphasischen Zellen (Kon 1), zeigten die mitotischen Extrakte (Zellen in der G2/M Phase) ein deutliches p-MCAK Signal (Abb. 11 A, obere Reihe, Spur 1 und 2). Dies wies darauf hin, dass die Phosphorylierung nur stattfindet, wenn sich die Zellen in der Mitose befinden. Dies

korreliert mit der Aktivität von CDK1, die in der Mitose am höchsten ist. Im Gegensatz zur siRNA Kontrolle, die kaum einen Effekt auf das Phospho-Signal zeigte, war die siRNA gegen MCAK (si MCAK1) in der Lage, das p-MCAK Signal zu unterbinden (Abb. 11 A, obere Reihe, Spur 1, 3 und 5). Dies bedeutete, dass der p-MCAK Antikörper mit hoher Spezifität nur phosphoryliertes MCAK in der Mitose erkennt.

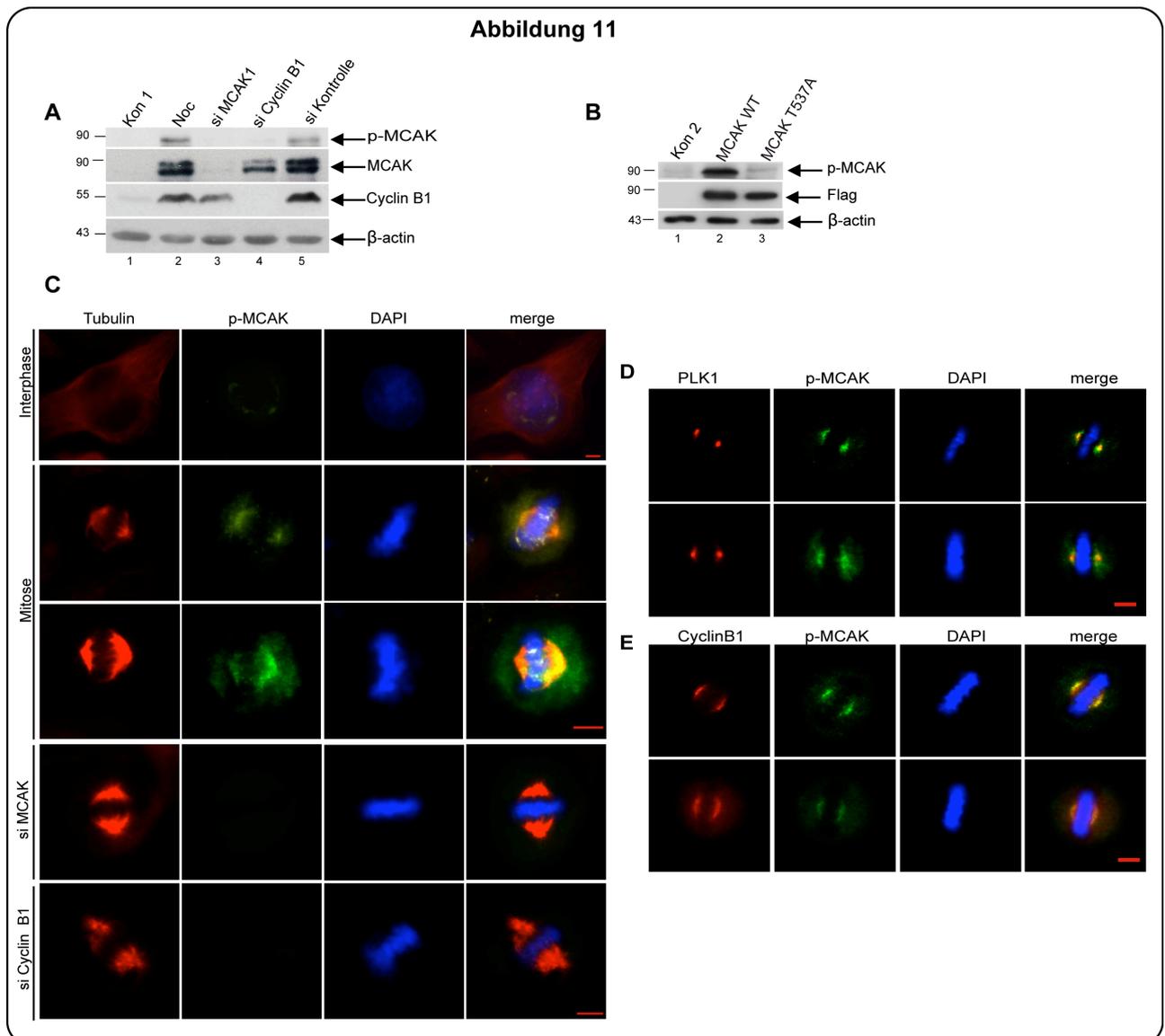


Abbildung 11 : Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung von MCAK durch Cyclin B1/CDK1 mittels des p-MCAK Antikörpers

A: HeLa-Zellen wurden entweder mit einer siRNA Kontrolle (Spur 5), einer siRNA gegen MCAK (Spur 3) oder einer siRNA gegen Cyclin B1 (Spur 4) transfiziert und anschließend in der G2/M-Phase mit Thymin/Nocodazol synchronisiert. Zur Protein Detektion wurde der p-MCAK Antikörper (obere Reihe), der MCAK Antikörper (zweite Reihe), der Cyclin B1 Antikörper (dritte Reihe) und der β-Actin Antikörper für die Standardisierung verwendet. Kon1 = Lysate von nicht-synchronisierten Zellen, Noc = Lysate von G2/M synchronisierten, aber nicht-transfizierten Zellen.

B: HeLa-Zellen wurden mit Flag-MCAK Wildtyp oder mit Flag-T537A in der G2/M Phase synchronisiert. Western Blot Analysen wurden mit dem p-MCAK Antikörper durchgeführt. Die gleiche Membran wurde mit dem anti-Flag Antikörper und mit dem β -Actin Antikörper behandelt, um respektiv die Transfektionseffizienz und die Standardisierung zu überprüfen.

C: Immunofluoreszenz Färbungen von HeLa-Zellen. Färbung mit p-MCAK Antikörper, α -Tubulin und DAPI. Ein Beispiel von interphasischen HeLa-Zellen (obere Reihe), von mitotischen HeLa-Zellen (zweite und dritte Reihe), von mitotischen und mit siRNA gegen MCAK (vierte Reihe) oder mit siRNA gegen CyclinB1 (letzte Reihe) behandelte Zellen sind dargestellt. Maßstab in rot = 10 μ m

D: Beispiele von mitotischen HeLa-Zellen, die mit Plk1-, p-MCAK und α -Tubulin Antikörpern gefärbt zum Nachweis der centrosomalen Colokalisation gefärbt wurden. Die DNA ist mit DAPI gefärbt. Maßstab = 10 μ m

E: Beispiele von mitotischen HeLa-Zellen, die mit Cyclin B1, p-MCAK und α -Tubulin Antikörpern zum Nachweis der centrosomalen Colokalisation gefärbt wurden. Die DNA ist mit DAPI gefärbt. Maßstab = 10 μ m

Aufgrund der Erkenntnisse, dass Cyclin B1 die regulatorische Untereinheit des Komplexes Cyclin B1/CDK1 ist, sollte eine Hemmung des Cyclin B1 zur Inaktivierung der Aktivität von CDK1 führen. Da MCAK ein potentielles Substrat des Komplexes Cyclin B1/CDK1 *in vivo* darstellt, sollte die Hemmung von Cyclin B1 durch spezifische siRNA zur Aufhebung der mitotischen Phosphorylierung führen und dadurch sollte kein p-MCAK Signal sichtbar sein. Dies wurde in der Abbildung 11 A bestätigt. Nach Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Cyclin B1 war kein p-MCAK Signal mehr sichtbar, während die Kontroll-Transfektion einen p-MCAK Signal aufwies (Abb. 11 A, obere Reihe, Spur 4 und 5). Um die Effizienz der siRNA Transfektionen zu überprüfen, wurden MCAK- (Abb. 11 A, zweite Reihe) und Cyclin B1-Antikörper (Abb. 11 A, dritte Reihe) verwendet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mitotische Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigte p-MCAK eine hohe Spezifität bei der Erkennung dieser Phosphorylierung.

Weiterhin wurden diese Ergebnisse durch Überexpression von Flag-gekoppeltem MCAK Wildtyp und von der nichtphosphorylierbaren Variante Flag-T537A in HeLa-Zellen bestätigt. Nach der Transfektion beider Konstrukte wurden die Zellen mit Thymidin/Nocodazol in der G2/M Phase synchronisiert. Die Zellysate wurden anschließend auf einem Western Blot dargestellt. Der p-MCAK Antikörper zeigte eine deutliche Bande bei den mit Flag MCAK Wildtyp transfizierten Zellextrakten (Abb. 11 B, obere Reihe, Spur 2). Im Gegensatz dazu konnte der p-MCAK Antikörper bei den mit der nichtphosphorylierbaren Variante (Flag-T537A) transfizierten Zellen nur ein

schwaches Signal zeigen (Abb. 11 B, obere Reihe, Spur 3). Dieses schwache Signal ähnelt dem der Kontroll-Zellen, die ebenfalls in die G2/M Phase synchronisiert wurden, und stellt die Phosphorylierung des endogenen MCAKs dar (Abb. 11 B, obere Reihe, Spur 1 und 3). Um die Transfektionseffizienz beider Konstrukte überprüfen zu können, wurde die gleiche Membran mit dem Flag Antikörper gefärbt (Abb. 11 B, zweite Reihe) und mit β -Actin als Standard (Abb. 11 B, letzte Reihe).

Die subzelluläre Lokalisation des phosphorylierten MCAKs wurde ebenfalls in HeLa-Zellen mittels Immunofluoreszenz untersucht. So wurden interphasische und mitotische HeLa-Zellen, die durch einen Doppel-Thymidin Block erhalten wurden, mit dem p-MCAK Antikörper, α -Tubulin und DAPI gefärbt (Abb. 11 C). Während interphasische HeLa-Zellen kein phosphoryliertes MCAK Protein aufwiesen (Abb. 11 C erste Reihe), zeigten mitotische HeLa-Zellen ein starkes p-MCAK Signal an den Spindelpolen, genau an den sogenannten Centrosomen (Abb. 11 C, zweite und dritte Reihe). Um die centrosomale Lokalisation des phosphorylierten MCAK Proteins zu bestätigen, wurden Doppelfärbungen mit spezifischen Proteinen, die als Centrosomen-Marker gelten, durchgeführt. Zahlreiche Studien haben über die centrosomale Lokalisation von Plk1 („Polo Like Kinase 1“) mit seinen wichtigen Funktionen berichtet (Krämer et al., 2004). Aufgrund der etablierten Lokalisation des Proteins Plk1 wurde es als Centrosomen-Marker verwendet und zusammen mit dem p-MCAK Antikörper in mitotischen HeLa-Zellen gefärbt. Die Abbildung 11 D zeigt, dass das p-MCAK Signal vollständig mit der Färbung von Plk1 übereinstimmt. Als weiterer Nachweis wurde Cyclin B1 ebenfalls als Centrosomen-Marker verwendet (Chen et al., 2008) Erneut zeigte das p-MCAK Signal eine vollständige Übereinstimmung mit dem Protein Cyclin B1 in mitotischen Zellen (Abb. 11 E). Mithilfe beider Färbungen wurde die Lokalisation des phosphorylierten MCAK an den Centrosomen bzw. an den Spindelpolen bestätigt. Interessanterweise war das p-MCAK Signal nach Behandlung der Zellen mit siRNA gegen Cyclin B1 oder gegen MCAK nicht mehr sichtbar (Abb. 11 C, vierte und fünfte Reihe). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung spezifisch ist und auf den aktiven Cyclin B1/CDK1 Komplex zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunofluoreszenz Daten die vorherigen Ergebnisse bestätigen. Zusätzlich erfolgt die Phosphorylierung von MCAK in der Mitose und wird durch den Komplex Cyclin B1/CDK1 vermittelt.

2.5 Funktionelle Untersuchungen der Phosphorylierung des Threonin 537 durch Cyclin B1/CDK1

Aufgrund der Lokalisierung der eingeführten Mutationen im katalytischen „core“ Bereich von MCAK, der sowohl für die Interaktion zwischen MCAK und den Mikrotubuli, als auch für die Hydrolyse von ATP verantwortlich ist, war die nächste Aufgabe die funktionelle Bedeutung dieser Phosphorylierung zu erläutern. Dafür wurden zunächst *in vitro* Depolymerisierungsversuche durchgeführt. His₆-gekoppeltes MCAK Wildtyp Protein und die Varianten His₆-T537A und His₆-T537E wurden bakteriell exprimiert und aufgereinigt. Die Fähigkeit von MCAK und der Mutanten, die Mikrotubuli *in vitro* zu depolymerisieren, wurde mittels des *in vitro* Depolymerisierungs-Assays untersucht (Elenius et al., 2006). Für diesen Zweck wurde Tubulin aus dem Gehirn von Schweinen isoliert, aufgereinigt und mit dem GMP-CCP stabilisiert. Diese Mikrotubuli wurden anschließend auf der Oberfläche von Objektträgern immobilisiert und die Depolymerisierung der Mikrotubuli ist durch die Zugabe von Sättigungskonzentrationen der unterschiedlichen aufgereinigten MCAK Proteinvarianten MCAK WT, MCAK T537A oder MCAK T537E (ca. 500 ng) eingeleitet worden. Interessanterweise zeigte die MCAK T537E Variante, die die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 vortäuscht, eine starke Abnahme ihrer depolymerisierenden Aktivität. Das Protein MCAK T537E war noch in der Lage, die Mikrotubuli zu depolymerisieren, allerdings viel langsamer verglichen mit dem MCAK Wildtyp Protein (Abb. 12 B). Dies wurde durch die Mittelwerte der Depolymerisierungsrate der jeweiligen Proteine bestätigt. Während der Mittelwert bei $1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ bei dem MCAK Wildtyp Protein lag, lag er im Falle des Proteins MCAK T537E nur bei $0,3 \pm 0,21 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 12 B). Zudem zeigte die Variante MCAK T537A ein sehr ähnliches Verhalten zum MCAK Wildtyp. Der Mittelwert der Depolymerisierung lag bei $1,24 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$, was nahezu so hoch wie der des MCAK Wildtyps ist (Abb. 12 B).

Die Ergebnisse des *in vitro* Depolymerisierungs-Assays deuten daraufhin, dass die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 zu einer drastischen Inhibition der Fähigkeit von MCAK, die Mikrotubuli zu depolymerisieren, führte. Die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E war unfähig, die enzymatische Aktivität, die Mikrotubuli zu destabilisieren, zu behalten.

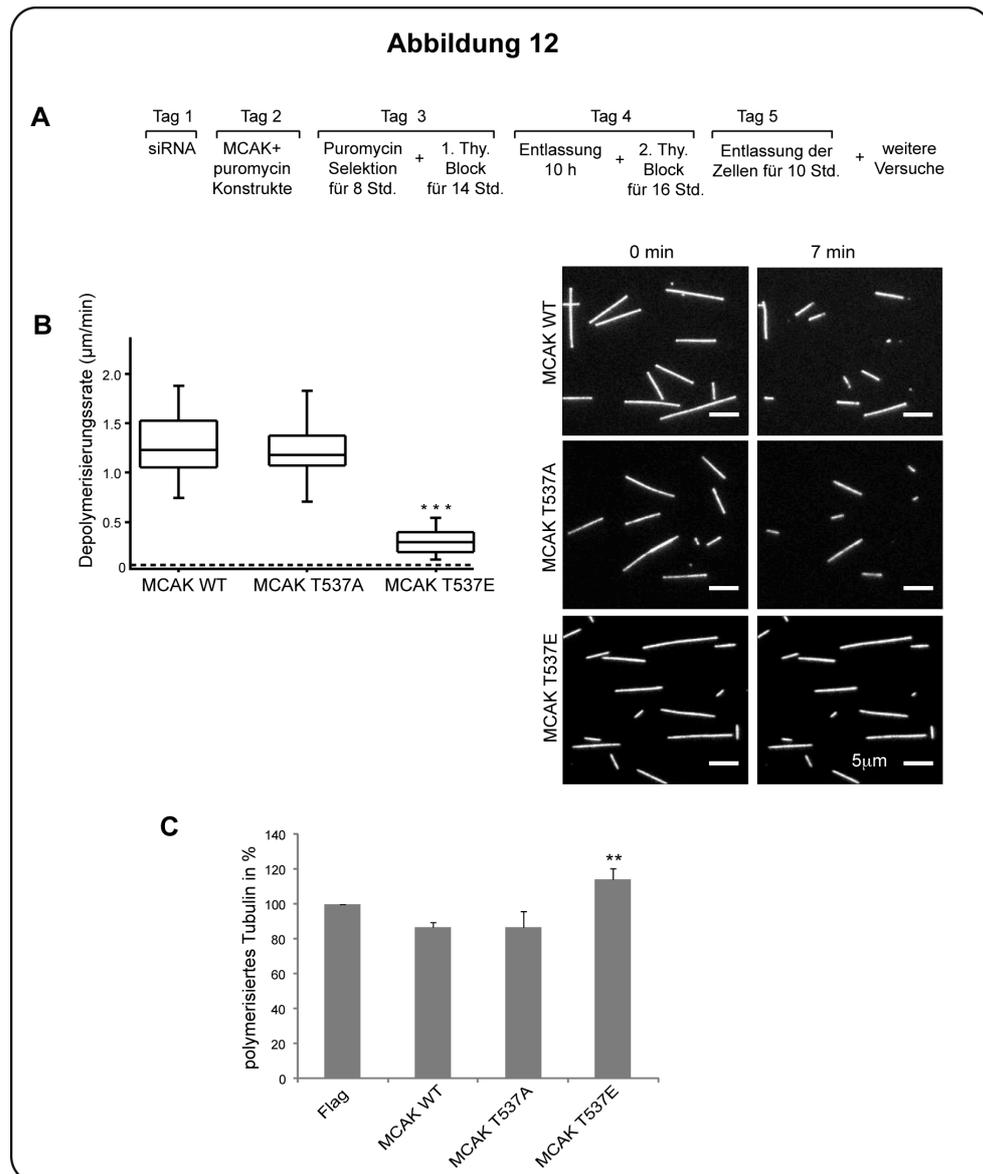


Abbildung 12: Die Phosphorylierung von MCAK am Threonin 537 durch Cyclin B1/CDK1 reduziert die enzymatische Aktivität von MCAK

A: Schematische Darstellung des Ablaufs der „rescue“-Experimente

B: *in vitro* Depolymerisierungs-Assay. Die graphische Darstellung der Depolymerisierungsraten der einzelnen Mikrotubuli nach Zugabe von sättigenden Konzentrationen von MCAK Wildtyp ($n=45$), MCAK T537A ($n=44$) und MCAK T537E ($n=59$). *** = $p < 0.001$. Die gestrichelte Linie zeigt die spontane Depolymerisierung der stabilisierten Mikrotubuli in der eingesetzten Probe. Die untere Reihe zeigt Beispiele der Epifluoreszenz Bilder von immobilisierten Mikrotubuli vor Abgabe (0 min) oder 7 Minuten nach Abgabe der Sättigungskonzentration von MCAK WT, MCAK T537A und MCAK T537E. Maßstab = 5 μm .

C: Quantifizierung des intrazellulären Tubulins. HeLa-Zellen wurden mit Flaggekoppeltem WT MCAK, mit den unterschiedlichen Mutanten, oder mit dem leeren Flag-Plasmid in Anwesenheit von endogenem MCAK transfiziert und in der G1/S Phase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Stunden entlassen und extrahiert, fixiert und mit dem Tubulin-Antikörper gefärbt. Intrazelluläres und polymerisiertes Tubulin wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die ermittelte Quantität des polymerisierten Tubulins nach der Transfektion des leeren Flag-Plasmides wurde als 100% definiert. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm SD ($n=3$)

(Standardabweichung) und werden graphisch dargestellt. ** = $p < 0,01$ in Bezug auf MCAK WT.

Es ist durchaus denkbar, dass die eingeführten Mutationen eine Änderung der dreidimensionalen Struktur des „core“-Bereiches hervorrufen. Diese Strukturänderungen werden folglich sowohl die Interaktion zwischen MCAK und den Mikrotubuli, als auch die Hydrolyse von ATP negativ beeinträchtigen. Daher stellt sich folgende Frage: Kommt die *in vitro* beobachtete Inhibition der enzymatischen Aktivität der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E nur durch eine Änderung der dreidimensionalen Struktur dieses Bereiches zustande? Führt dies zum Verlust einer der wichtigsten MCAK Funktionen, nämlich der ATP-Hydrolyse?

Um diese Frage beantworten zu können, wurde das WT (Wildtyp) MCAK Protein, die nichtphosphorylierbare Variante MCAK T537A und die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E *in vitro* in einem sogenannten ATP-Verwertungsversuch auf ihre Fähigkeit, ATP zu hydrolysieren, untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten deutlich, dass sich die ATP-Umsatzrate des MCAK T537A und des MCAK T537E nicht signifikant vom WT MCAK unterschied. Die Werte betragen $0,52 \pm 0,09 \times 10^{-3}$ für das WT MCAK, $0,67 \pm 0,06 \times 10^{-3}$ für MCAK T537A und $0,78 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ für MCAK T537E. Durch dieses Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die eingeführten Mutationen keinen erheblichen Effekt auf die Struktur des „core“ Bereiches ausgeübt haben, und dass die Abnahme der enzymatischen Aktivität der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E auf eine spezifische Inhibition zurückzuführen ist.

Die *in vivo* Depolymerisierungsrate von WT MCAK und der Varianten MCAK T537A und MCAK T537E wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurde eine bestimmte Methode angewendet: Das „rescue“-Experiment. Zu diesem Zweck wurde am ersten Tag der Experimente die Translation von MCAK in HeLa-Zellen mit der siRNA MCAK2 gehemmt. Diese siRNA ist in der Lage, nur endogenes MCAK zu hemmen, da sie gegen die 3'-untranslatierte Region des MCAK-Gens gerichtet ist. Am zweiten Tag wurden die Flag-gekoppelten MCAK Plasmide und das pBabe-Puro Plasmid in die Zellen transfiziert. Durch Einbringen der exogenen Konstrukte in Abwesenheit von endogenem MCAK ließen sich die alleinigen Effekte der Mutanten beobachten. Das pBabe-puro Plasmid verleiht den transfizierten Zellen eine Resistenz gegenüber dem

Antibiotikum Puromycin. Nach der Selektion mit Puromycin wurden die Zellen am dritten und vierten Tag einem doppelten Thymidin-Block unterzogen. Nach Entlassung (nach 10 Stunden) befanden sich die Zellen in der Mitose, wurden geerntet und für die weiteren Experimente vorbereitet. Die Abbildung 12 A zeigt die schematische Darstellung des detaillierten Ablaufes der „rescue“-Experimente.

Für den *in vivo* Depolymerisierungs-Assay wurde der lösliche Anteil des Tubulins aus den Zellen extrahiert. Daraufhin wurden sie fixiert und intrazellulär mit einem spezifischen α -Tubulin Antikörper gefärbt (siehe 4.13.1). Anschließend wurde depolymerisiertes Tubulin in den transfizierten Zellen mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Interessanterweise wurde in den mitotischen HeLa-Zellen, die mit der Variante MCAK T537E transfiziert worden sind, über 25% mehr polymerisiertes Tubulin im Vergleich zu den mitotischen Zellen, die mit WT-MCAK oder MCAK T537A transfiziert wurden, detektiert (Abb. 12 C). Dies zeigt, dass die depolymerisierende Aktivität des MCAK T537E, die eine Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 vortäuscht, auch *in vivo* signifikant reduziert ist verglichen mit denen des MCAK Wildtyps und MCAK T537A.

Anhand der Daten der *in vitro* und *in vivo* Experimente lässt sich bestätigen, dass die Phosphorylierung von MCAK am Threonin 537 durch CDK1 zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität der MCAK-Depolymerase führt.

2.6 MCAK Mutanten halten die Zellen in der Prometaphase und Metaphase fest

Vorherige Studien haben berichtet, dass die Überexpression oder die Depletion von MCAK die Zellen in der Prometaphase festhält, dennoch wird der mitotische Index dadurch nur leicht verändert (Holmfeldt et al., 2004; Homfeldt et al., 2005; Hedrick et al., 2008). Um die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von MCAK am Threonin 537 durch Cyclin B1/CDK1 in der Regulation der Mitose untersuchen zu können, wurde zunächst der mitotische Index in den unterschiedlichen Transfektionsgruppen ermittelt. Dafür wurden HeLa-Zellen ähnlich wie im vorherigen Experiment behandelt, es wurde ein „rescue“-Experiment durchgeführt (Abb. 12 A). Die Abbildung 13 A zeigt, dass das endogene MCAK sehr effizient durch die siRNA MCAK 2 depletiert wurde (Abb. 13 A, Spur 3). Die Abbildung (Abb. 13 A) zeigt ebenfalls, dass das Expressionslevel der Flag-gekoppelten MCAK Plasmide ähnlich

sind (Abb. 13 A, Spur 4, 5, 6, exo. MCAK) und vergleichbar mit den zellulären endogenen Mengen des Proteins (Abb. 13 A, Spur 1, 2, endo. MCAK). Parallel dazu wurden gleich behandelte Zellen für die Immunfluoreszenz mit dem Phospho-Histon H3 Antikörper (pHH3), ein etablierter Mitose Marker, und DAPI gefärbt. Die positiven Zellen für pHH3 wurden in den unterschiedlichen Transfektionsgruppen ermittelt, dadurch entstand der mitotische Index (Abb. 13 B). Wie sich feststellen ließ, zeigte der Austausch des endogenen MCAK-Proteins durch MCAK WT, MCAK T537A und T537E leichte Effekte auf den mitotischen Index. Eine 5%ige Erhöhung des mitotischen Index wurde nach der Transfektion beider Mutanten beobachtet. Er betrug nach der Transfektion von MCAK WT 40,5%, erhöhte sich auf 45,4 % nach der Zugabe von MCAK T537A und auf 44,7% im Falle der MCAK T537E Mutante. Interessanterweise zeigten die Immunfluoreszenz Untersuchungen der Verteilung der unterschiedlichen Mitosephasen, dass das Ersetzen von endogenem MCAK durch die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A oder die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E zu einer Verschiebung der Verteilung dieser Phasen im Vergleich zum MCAK Wildtyp führt. Auf der einen Seite verursachte MCAK T537A eine Zunahme des Anteils der Zellen in der Prometaphase (28% der Zellen in der Prometaphase) um einen Faktor von 1,6 im Verhältnis zum MCAK Wildtyp (17% der Zellen in der Prometaphase) (Abb. 13 C). Auf der anderen Seite führte MCAK T537E zu einer Zunahme des Anteils der Zellen in der Metaphase (54,6% der Zellen). Eine 1,4 fache Erhöhung in Bezug auf den Wildtyp (38,4% der Zellen in der Metaphase) war zu beobachten. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Zellen, die mit der nichtphosphorylierbaren Mutante MCAK T537A transfiziert sind, bereits Schwierigkeiten in der Prometaphase haben, während diejenigen, die die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E exprimieren, erst Probleme während des Übergangs von Metaphase zur Anaphase aufweisen. Darüber hinaus deuten diese Daten darauf hin, dass beide Proteine, MCAK WT und MCAK T537A, unterschiedlich innerhalb der Zelle agieren, was z.B. durch Unterschiede in der zellulären Lokalisation erklärbar wäre.

Abbildung 13

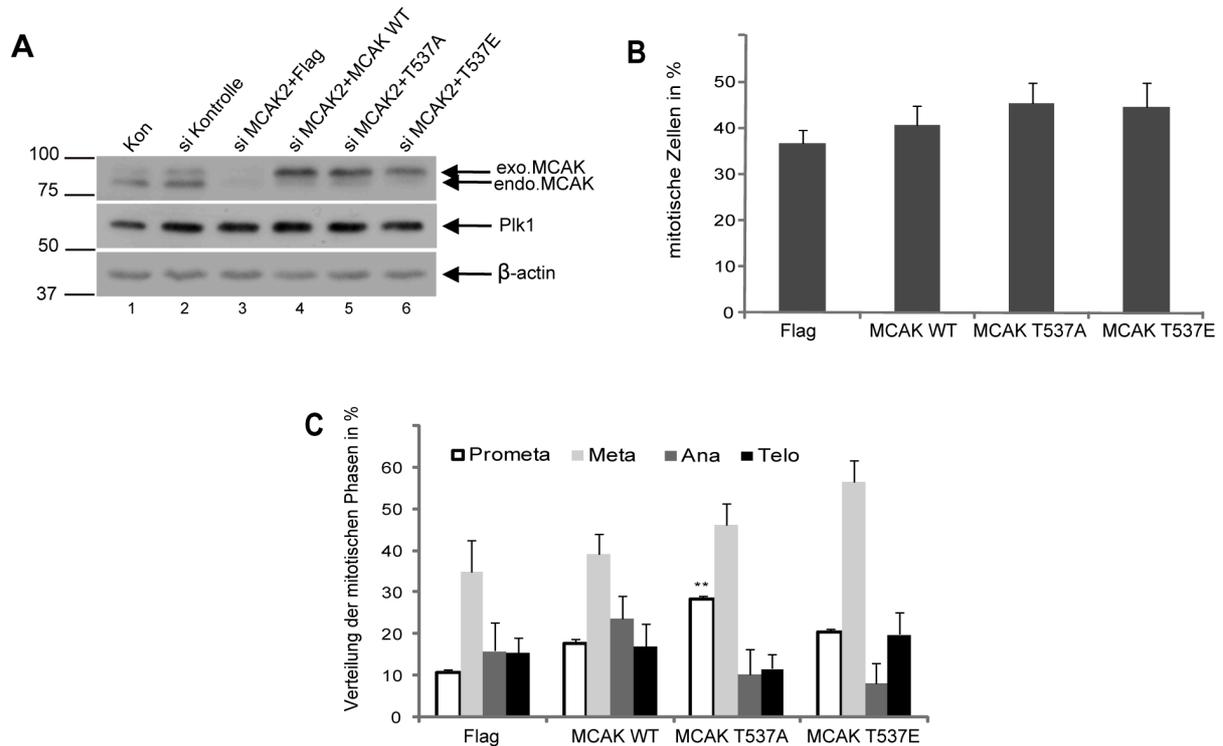


Abbildung 13: Der Austausch von Threonin 537 führt zum Arrest der Zellen in der Prometaphase oder Metaphase

A: Western Blot Analyse. HeLa-Zellen wurden nach Depletion endogenem MCAKs durch siRNA MCAK2 mit Flag-gekoppelten MCAK WT, MCAK T537A, MCAK T537E und mit leerem Flag-Plasmid transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in der G1/S Phase synchronisiert und für 10 Stunden entlassen. Western Blot Analysen wurden mit Flag-Antikörper (obere Reihe, exo MCAK) mit MCAK-Antikörper (obere Reihe, endo MCAK), Plk1-Antikörper (als mitotischer Marker, zweite Reihe), und mit β-Actin (Ladungskontrolle, letzte Reihe) behandelt. Als Kontrolle dienen Extrakte von synchronisierten HeLa-Zellen, die nicht transfiziert waren (Kon), und die mit der siRNA Kontrolle transfiziert worden sind (siKontrolle).

B: Der mitotische Index. Zellen wurden ähnlich wie oben behandelt und anschließend für die Immunfluoreszenz gefärbt. DNA wurde mit DAPI gefärbt und die Histone H3 mit dem Phospho-Histon H3 (ser 10) Antikörper, einem mitotischen Marker. Die mitotischen Indizes wurden für die unterschiedlichen Transfektionsgruppen mikroskopisch ermittelt. Die Ergebnisse werden als graphische Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichungen gezeigt.

C: Untersuchung zur Verteilung der mitotischen Phasen. HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt und für die Immunfluoreszenz mit α-Tubulin und DAPI gefärbt. Der Prozentsatz der mitotischen Phasen der unterschiedlichen Transfektionsgruppen wurde mikroskopisch ermittelt. Die Mittelwerte ± Standardabweichung sind graphisch dargestellt.

2.7 Die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E verursacht Chromosomenfehlverteilungen während die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A aberrante Spindeln erzeugt

Um weitere funktionelle Aspekte der Phosphorylierung des Threonin 537 aufklären zu können, wurden phänotypische Analysen durchgeführt. HeLa-Zellen sind mit der siRNA MCAK 2, die nur das endogene MCAK erkennt, transfiziert worden. Ein andere siRNA MCAK 1, die sowohl endogenes MCAK als auch exogenes MCAK erkennt, wurde ebenfalls in die Zellen transfiziert. Wie erwartet, führte die Transfektion beider siRNAs zum Auftreten von Chromosomenfehlverteilungen (Abb. 14 A und 14 B, zweite Reihe, weißer Pfeil auf DAPI-Färbung). Außerdem ist die Struktur der Spindel nach der Transfektion der siRNAs betroffen. Insbesondere bilden die Zellen der Prometaphase und Metaphase häufig „haarige“ Spindeln aus, die einen typischen Phänotyp der Depletion von MCAK darstellen (Abb. 14 B, zweite Reihe, Tubulin Färbung). Dies bestätigte die Befunde anderer Studien (Holmfeldt et al., 2004; Zhu et al., 2005; Hedrick et al., 2008). Nach Zugabe von WT MCAK zu den Zellen, die mit den siRNAs transfiziert wurden, wurden die Defekte in der Chromosomenverteilung und die Spindel Aberrationen aufgehoben, allerdings nur in den Zellen die mit der siRNA MCAK 2 transfiziert worden sind. Die Chromosomen zeigten einen signifikanten Rückgang der Fehlverteilungen und waren in der Lage, sich auf der Metaphaseplatte zu ordnen. Die Spindeln zeigten auch nach der Transfektion von WT MCAK eine normale Mikrotubuli Länge (Abb. 14 A und B, dritte Reihe, Tubulin und DAPI). Da die siRNA MCAK 1 nicht in der Lage ist, endogenes von exogenem MCAK zu unterscheiden, konnte die Zugabe von Flag-gekoppeltem MCAK Protein keinen rettenden positiven Effekt auf die Zellen zeigen (Abb. 14 A).

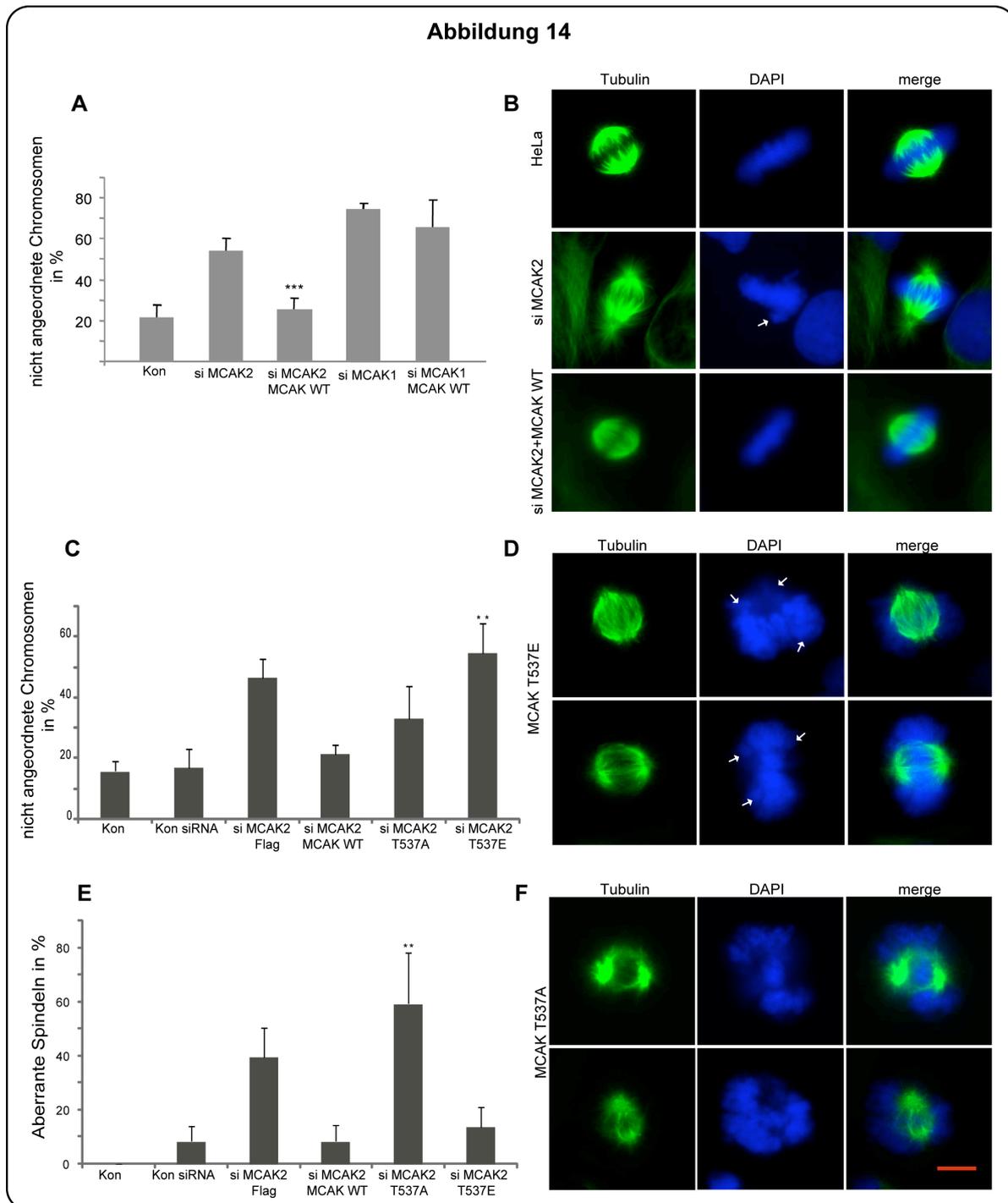


Abbildung 14: MCAK T537E verursacht Chromosomen-Fehlverhalten und MCAK T537A erzeugt aberrante Spindeln

A: Das „rescue“-Modell: In HeLa-Zellen wurde das endogene MCAK durch die siRNA MCAK 2 depletiert, anschließend wurde Flag-gekoppeltes WT MCAK Protein in die Zellen transfiziert, in der G1/S Phase synchronisiert und für 10 Stunden entlassen. Die Zellen, die Chromosomen-Fehlverhalten aufzeigten, wurden mittels der DNA- und Tubulin-Färbungen quantifiziert. Die Ergebnisse werden als graphische Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen gezeigt. *** $P < 0,001$. Die Behandlung mit der siRNA MCAK1 und die Kombination siRNA MCAK1 + MCAK WT wurden als Kontrollen verwendet (keine Unterscheidung zwischen endogenem und exogenem MCAK).

B: Einige Beispiele von mitotischen HeLa-Zellen (obere Reihe), HeLa-Zellen nach der Depletion von endogenem MCAK mittels siRNA MCAK 2 (zweite Reihe), HeLa-Zellen, die mit Flag-gekoppeltem MCAK WT nach Depletion des endogenen MCAK transfiziert wurden (letzte Reihe).

C: Die Prozentsätze der Chromosomen, die ein Fehlverhalten zeigten, wurde mikroskopisch ermittelt. Die Ergebnisse werden als graphische Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen gezeigt. $**P < 0,01$.

D: Beispiele von HeLa-Zellen, die mit der MCAK T537E Mutante nach Depletion des endogenen MCAKs transfiziert wurden. Die weißen Pfeile zeigen nicht angeordnete Chromosomen an.

E: Die Frequenz der Zellen, die Spindel Aberrationen gezeigt haben, wurde mikroskopisch ermittelt. Die Ergebnisse werden als graphische Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichungen gezeigt. $**P < 0,01$. Maßstab = 10 μ m.

Basierend auf dem gleichen Prinzip („rescue“-Experiment) war es interessant zu untersuchen, ob das Ersetzen von endogenem MCAK durch die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A oder die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E den ursprünglichen, normalen Phänotyp wiederherstellen können. Dafür wurden HeLa-Zellen entweder mit MCAK T537A oder mit MCAK T537E nach Depletion von endogenem MCAK transfiziert und in der Mitose synchronisiert (Abb. 12 A). Durch die DNA und die Tubulin Färbungen konnte sowohl das Chromosomen-Verhalten als auch die Spindel-Morphologie untersucht werden. Nach Zugabe der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante zeigten die Chromosomen große Schwierigkeiten, sich auf der Metaphaseplatte anzuordnen (Abb. 14 D, DAPI, weiße Pfeile). Insbesondere schienen ein oder mehrere Chromosomen um den Bereich des Spindel-Äquators verankert zu sein und nicht mehr fähig, sich auf der Metaphaseplatte anzuordnen (Abb. 14 D, DAPI, weiße Pfeile). Ferner wurde die Frequenz der Zellen in der Metaphase, die Chromosomen-Fehlverhalten zeigten, mikroskopisch ermittelt. Dafür wurden 200 bis 300 metaphasische Zellen der jeweiligen Transfektionsgruppen (leere Flag-Plasmide, MCAK WT, MCAK T537A und MCAK T537E) nach chromosomalem Fehlverhalten untersucht. In Abbildung 14 C werden die Raten des Chromosomen-Fehlverhaltens in den unterschiedlichen Transfektionsgruppen repräsentiert. Die Transfektion des leeren Flag-Konstruktes konnte die chromosomalen Anordnungsfehler, die durch die Depletion des endogenen MCAK mittels siRNA MCAK 2 verursacht wurden, nicht aufheben. Die Anordnungsfehlerrate betrug 46,7% im Vergleich zu der siRNA Kontrolle mit nur 17% Anordnungsfehler (Abb. 14 C). Während die Transfektion der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E (nach Depletion von

endogenem MCAK) eine Verstärkung der chromosomalen Anordnungsfehler zeigte, die bis auf 54,6% gestiegen sind, war die Transfektion des WT MCAK in der Lage, diese chromosomale Aberration bis auf 21,4% zu reduzieren und dadurch den ursprünglichen Phänotyp wiederherzustellen. Diese Werte beziehen sich ebenfalls auf die Transfektion des leeren Flag-Plasmides (Abb. 14 C). Die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A konnte nur teilweise die chromosomalen Anordnungsfehler beheben. Die Fehlerrate ist leicht zurückgegangen bis auf 31% bezogen auf den Wert des leeren Flag-Plasmides 46,7%. Darüber hinaus wurden die Spindel Aberrationen ebenfalls in den gleichen Transfektionsgruppen untersucht. Die MCAK T537E Mutante war fähig, bipolare Spindeln zu bilden (nur 13,5 % aberrante Spindeln vergleichbar mit dem Wert des MCAK Wildtyps von 8,4% und dem der nicht transfizierten Zellen mit 8%) (Abb. 14 E) Während dessen war die Fähigkeit der MCAK T537A Mutante, bipolare Spindeln zu bilden, stark beeinträchtigt: Die Mikrotubuli Struktur erschien als zwei dichte sternförmige Astern und die meisten Mikrotubuli in der Nähe der Chromosomen waren nicht sichtbar (Abb. 14 F, Tubulin Färbung). Die Rate der aberranten Spindeln in der MCAK T537A Gruppe betrug 59,2% im Vergleich zu 8,4% beim MCAK Wildtyp oder zu 8% in nicht transfizierten Zellen (Abb. 14 E). Folglich konnten die Spindeln Defekte für den Prometaphase Arrest der Zellen, die die MCAK T537A Mutante exprimieren, verantwortlich sein (Abb. 13 C). Zudem könnte die chromosomale Fehlverteilung ein Grund für den beobachteten Metaphase Arrest in den Zellen, die MCAK T537E exprimieren, sein (Abb. 13 C).

2.8 Die MCAK T537E Mutante führt zu einer Reduzierung des Abstandes zwischen den Geschwister-Centromeren

Aufgrund der centromerischen Lokalisation und der depolymerisierenden Aktivität von MCAK, die für die Korrektur der Fehlverknüpfungen zwischen den Mikrotubuli der „K-Fiber“ und den Kinetochoren benötigt wird (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004), spielt MCAK eine wichtige Rolle bei der Herstellung lokaler Spannung zwischen den Schwester-Centromeren bzw. Kinetochoren. Ohne diese erforderliche Spannung sind die Zellen nicht in der Lage, den Übergang von der Metaphase zur Anaphase durchzuführen und dadurch ist ein Austreten aus der Mitose unmöglich. In der Praxis würden Schwester-Centromeren, die über ein funktionelles MCAK

verfügen, eine optimale Spannung aufweisen. Folglich werden diese Zellen in Immunfluoreszenz Untersuchungen einen größeren Abstand zwischen den Centromeren/Kinetochoren aufweisen als in Zellen, in denen die Aktivität von MCAK auf irgendeine Weise gestört ist.

Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Depolymerisierungs-Assays haben zweifellos nachgewiesen, dass die katalytische Aktivität von MCAK durch die Phosphorylierung von Cyclin B1/CDK1 deutlich reduziert wird (Abb. 12). Dies würde bedeuten, dass die Zellen, die MCAK T537E exprimieren, möglicherweise Problemen bei der Korrektur von Kinetochor-Mikrotubuli Fehlverbindungen begegnen und folglich falsche Spannungsverhältnisse zwischen den Schwester-Centromeren zeigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen nach der Depletion von endogenem MCAK mit dem MCAK Wildtyp, der Mutante MCAK T537A oder MCAK T537E transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in der Mitose synchronisiert und mit dem Centromer-Marker Cenp-A, Tubulin und DAPI immunzytochemisch gefärbt. Eine signifikante Reduzierung des centromerischen Abstandes wurde in den HeLa-Zellen beobachtet, die die Mutante MCAK T537E exprimieren (Abb. 15 A, letzte Reihe) im Vergleich zu denen, die mit MCAK WT transfiziert wurden (Abb. 15 A, zweite Reihe). Wie erwartet, führte die Depletion von endogenem MCAK (Abb. 15 A, obere Reihe) zu einer Abnahme des intercentromerischen Abstandes im Vergleich zu den MCAK WT Zellen. Interessanterweise zeigten die mit der nichtphosphorylierbaren Mutante MCAK T537A transfizierten Zellen, die die Metaphase erreichten, ebenfalls einen leicht reduzierten intercentromerischen Abstand (Abb. 15 A, dritte Reihe). Dies deutet darauf hin, dass die Mutante MCAK T537A nicht in der Lage ist, die korrekte zelluläre Funktion zu erfüllen, trotz einer vollständigen und normalen Depolymerisierungsaktivität. Dies ist möglicherweise durch Unterschiede der zellulären Lokalisation zwischen dem MCAK Wildtyp und der MCAK T537A Mutante zu erklären. Weitere Quantifizierungen ergaben, dass der durchschnittliche intercentromerische Abstand 1,5 μm für die MCAK WT exprimierenden Zellen, 1,1 μm für die MCAK T537A Mutante und 0,9 μm für die MCAK T537E betrug (Abb. 15 B).

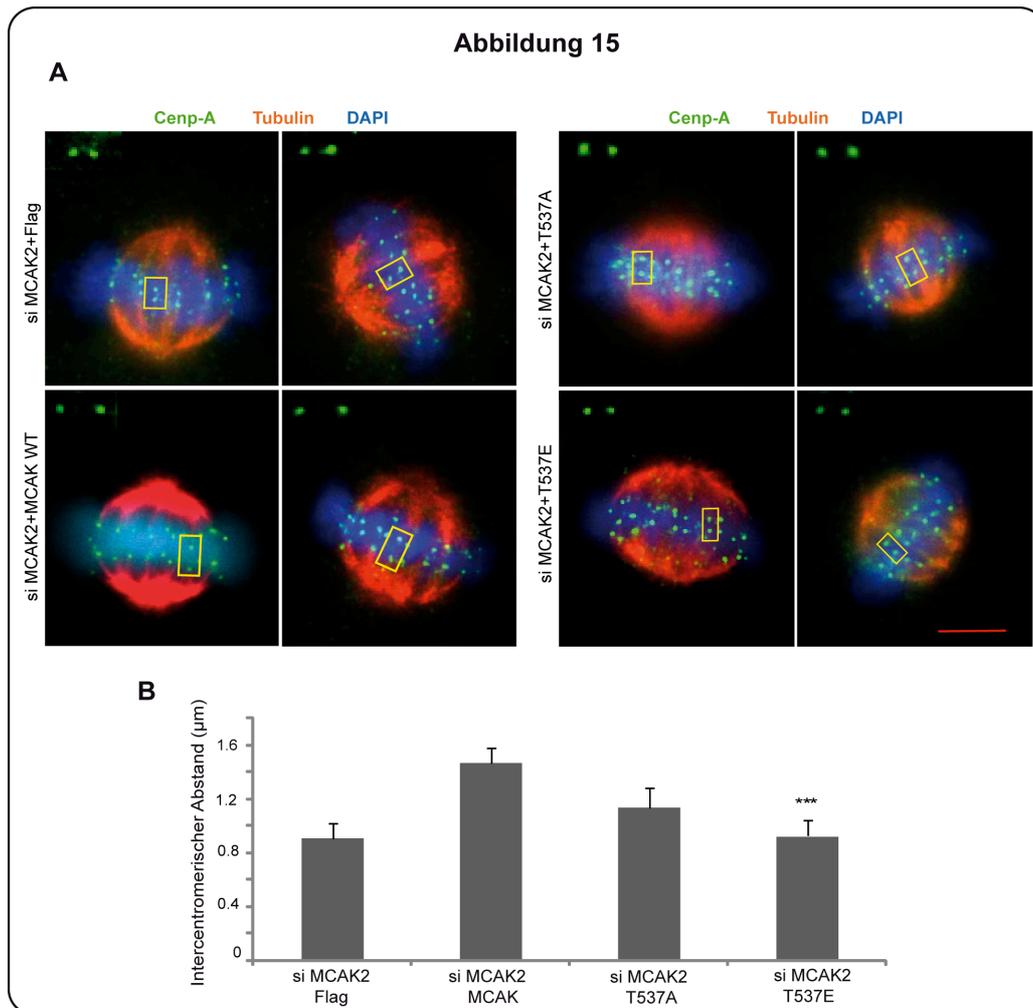


Abbildung 15: Die Mutation des Threonin 537 führt zur Reduzierung des intercentromerischen Abstandes

A: Messung des intercentromerischen Abstandes. HeLa-Zellen wurden entweder mit dem Flag-Plasmid, mit Flag MCAK WT oder mit den Mutanten MCAK T537A und MCAK T537E nach der Depletion von endogenem MCAK transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in die Mitose synchronisiert und mit dem Cenp-A Antikörper (Centromer-Marker), und dem Tubulin-Antikörper gefärbt. Beispiele solcher Zellen sind dargestellt. Die intercentromerischen Abstände wurden entsprechend den Angaben in Material und Methoden ermittelt. Die zwei Schwester-Centromere, die eingerahmt sind, wurden auf jedem Bild oben links vergrößert. Maßstab = 5 µm.

B: Der durchschnittliche intercentromerische Abstand in den mit Flag-Plasmid, MCAK WT, MCAK T537A, und MCAK T537E nach der Depletion des endogenen MCAK transfizierten HeLa-Zellen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert des Abstandes \pm SD graphisch dargestellt. *** $P < 0,001$.

2.9 Die Kinase CDK1 kontrolliert die centrosomale Lokalisation von MCAK

Um zu erforschen, ob die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 eine Wirkung auf die subzelluläre Lokalisation von MCAK in der Mitose hat, wurden HeLa-Zellen mit vergleichbaren Mengen von EGFP MCAK WT, EGFP MCAK T537A oder

EGFP MCAK T537E transfiziert. Das EGFP-Plasmid wurde ebenfalls in die Zellen transfiziert und als Kontrolle verwendet. Die Abbildung 16 A zeigt, dass die in die Zellen eingebrachten Mengen der unterschiedlichen Fusionsproteine vergleichbar sind.

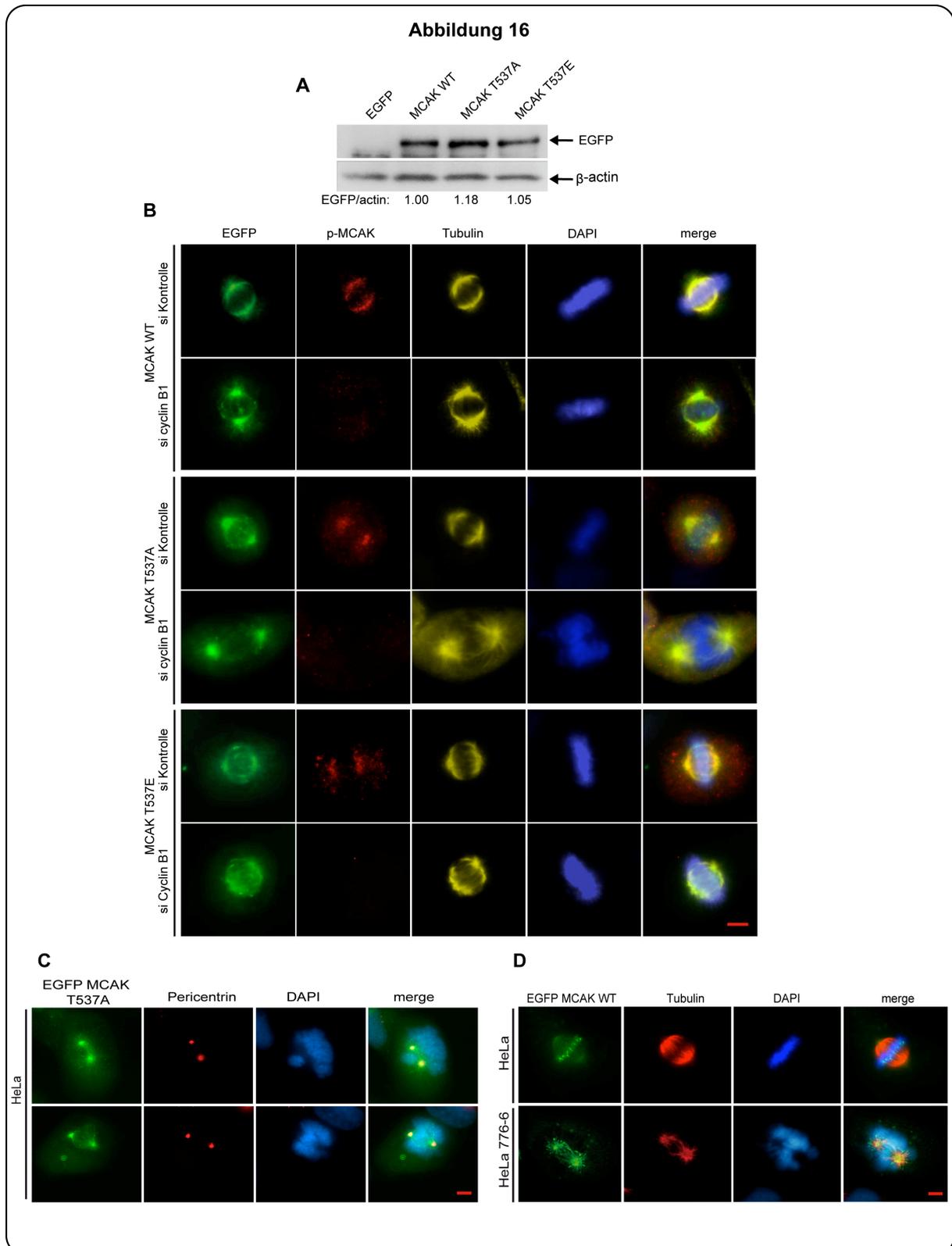


Abbildung 16: CDK1 kontrolliert die zelluläre Lokalisation von MCAK während der Mitose

A: HeLa-Zellen wurden mit vergleichbaren Mengen an EGFP MCAK WT, EGFP MCAK T537A oder EGFP MCAK T537E transfiziert. Die Kontroll-Zellen wurden mit dem leeren EGFP-C2 Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurde eine Western Blot Analyse mit Hilfe des EGFP Antikörpers (obere Reihe) und des β -Actin Antikörpers (untere Reihe) durchgeführt. Die Mengen der transfizierten Plasmide wurden im Verhältnis zum β -Actin Signal berechnet.

B: Die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 führt zur centrosomalen Freigabe von MCAK. HeLa-Zellen wurden am ersten Tag mit einer siRNA gegen Cyclin B1 oder mit einer siRNA Kontrolle behandelt. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit EGFP MCAK WT, EGFP MCAK T537A oder EGFP MCAK T537E transfiziert und anschließend in der Mitose synchronisiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit p-MCAK Antikörper, α -Tubulin und DAPI gefärbt. Beispiele der Zellen, die mit EGFP MCAK WT (erste und zweite Reihe), EGFP MCAK T537A (dritte und vierte Reihe) und EGFP MCAK T537E (vorletzte und letzte Reihe) transfiziert wurden, sind dargestellt. Maßstab = 5 μ m.

C: MCAK T537A ist an den Centrosomen lokalisiert. HeLa-Zellen wurden mit EGFP MCAK T537A transfiziert und in der Mitose synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Pericentrin-Antikörper und DAPI gefärbt. Maßstab = 5 μ m.

D: HeLa-Zellen und HeLa 776-6 Zellen, in denen die Aktivität von CDK1 durch Depletion von Cyclin B1 reduziert ist, wurden mit EGFP MCAK WT transfiziert und anschließend in der Mitose synchronisiert. Färbung mit α -Tubulin und DAPI
Maßstab = 5 μ m.

In einem anderen Experiment wurden HeLa-Zellen nach der Behandlung entweder mit siRNA gegen Cyclin B1 oder einer siRNA Kontrolle mit EGFP MCAK WT, EGFP T537A oder EGFP MCAK T537E transfiziert. Anschließend wurden sie in der Mitose synchronisiert. Diese wurden dann mit p-MCAK Antikörper, Tubulin Antikörper und DAPI immunzytochemisch gefärbt. In den mitotischen Zellen, die EGFP MCAK WT exprimieren, war das EGFP Signal an den Centrosomen und entlang der Spindel sichtbar (Abb. 16 B, erste Reihe). Das p-MCAK Signal war ebenfalls im Bereich des Centrosoms erkennbar (Abb. 16 B, erste Reihe). Außerdem wurde nach Behandlung der Zellen mit der siRNA Cyclin B1 eine starke Akkumulation des EGFP MCAK WT an den Centrosomen beobachtet (Abb. 16 B, zweite Reihe), die von einer bemerkenswerten Reduzierung des p-MCAK Signals (Abb. 16 B, zweite Reihe) begleitet wurde. Diese Reduzierung des p-MCAK Signals ist auf die siRNA Behandlung (gegen Cyclin B1) zurückzuführen, da die Anwesenheit von Cyclin B1 für eine Aktivierung der Kinase CDK1 notwendig ist. Entsprechend dieser Beobachtungen konnte unabhängig von dem Vorhandensein von Cyclin B1 festgestellt werden, dass die EGFP MCAK T537A Mutante überwiegend an den Centrosomen der prometa/metaphasischen Zellen lokalisiert ist (Abb. 16 B, dritte und vierte Reihe). Diese Lokalisation wurde durch das Verwenden eines Centrosomen-

Markers, das Pericentrin Protein, bestätigt. In der Abbildung 16 C wird deutlich gezeigt, dass die Mutante EGFP MCAK T537A vollständig mit dem Pericentrin Signal colokalisiert. Dies würde einerseits bedeuten, dass die nichtphosphorylierbare Mutante MCAK T537A an den Centrosomen festgehalten wird und andererseits, dass die Phosphorylierung durch CDK1 notwendig ist, damit MCAK seine unterschiedlichen Sublokalisationen in der Mitose, nämlich an den Centrosomen/Kinetochoren, belegt, und so seine Funktionen an diesen Orten erfüllen kann. Das beobachtete p-MCAK Signal in den Zellen, die mit der EGFP MCAK T537A nach der Behandlung mit der siRNA Kontrolle transfiziert wurden, resultiert aus der Phosphorylierung des endogenen MCAKs durch den Komplex Cyclin B1/CDK1 (Abb.16 B, dritte Reihe). Dieses Signal verschwindet nach Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen Cyclin B1 (Abb. 16 B, vierte Reihe). Dies bestätigt noch einmal die Spezifität der Phosphorylierung von MCAK durch den Komplex Cyclin B1/ CDK1.

Die Phosphostatus-vortäuschende Mutante zeigte nach Behandlung der Zellen mit der siRNA Kontrolle eine diffuse Verteilung. Sie wurde an den Centrosomen und der Spindel und auch an den Centromeren der Chromosomen beobachtet (Abb. 16 B, fünfte Reihe). Anders als der EGFP MCAK WT führte die Depletion von Cyclin B1 zu keiner Veränderung der Verteilung der MCAK T537E Mutante. Sie behielt die diffuse Lokalisation an den Centrosomen, der Spindel und den Centromeren bei und wies keine Verlagerung an den Centrosomen auf. Dies bestätigt, dass die Phosphorylierung durch CDK1 eine Rolle bei der subzellulären Verteilung von MCAK während der Mitose spielt. Darüber hinaus wurden in 300 prometa/metaphasischen Zellen, die mit MCAK WT, MCAK T537A oder MCAK T537E transfiziert wurden, weitere mikroskopische Analysen zur Lokalisation der unterschiedlichen Konstrukte durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass 65% der mit der MCAK T537A transfizierten Zellen eine verstärkte centrosomale Lokalisation aufwiesen im Gegensatz zu 4% für den MCAK WT und 14% für die MCAK T537E Zellen. Weitere Nachweise, dass die centrosomale Lokalisation von MCAK mit der Aktivität der CDK1 Kinase verbunden ist, sind durch Immunfluoreszenz Untersuchungen an der HeLa 776-6 Zelllinie erbracht worden. In dieser Zelllinie wurde die Aktivität von CDK1 durch die Depletion von Cyclin B1 stark reduziert (Yuan et al., 2006). HeLa-Zellen und HeLa 776-6 wurden mit dem EGFP-MCAK WT transfiziert. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen, die eine diffuse Lokalisation von MCAK an den Centrosomen, an der

Spindel und an den Centromeren aufwies, (Abb. 16 D, erste Reihe), legte das EGFP MCAK WT Protein vorzugsweise eine centrosomale Lokalisation vor, die von Spindel Aberrationen begleitet wurde (Abb 16 C, zweite Reihe). Die Centrosomen erschienen als zwei dichte sternförmige Astern vergleichbar mit den in Abbildung 14 F gezeigten Phänotypen.

Diese Daten liefern die Beweise, dass die mitotische Lokalisation von MCAK unter der Kontrolle von CDK1 steht, und dass die verstärkte Lokalisation von MCAK an den Centrosomen auf die reduzierte Aktivität von CDK1 zurückzuführen ist.

3. Diskussion

Die bipolare mitotische Spindel besteht aus einer bestimmten Anordnung dynamischer Mikrotubuli und den sogenannten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Diese Proteine erfüllen eine wichtige Funktion während der Mitose, und zwar die Trennung und die gleichmäßige Verteilung der Chromosomensätze auf die neu entstandenen Schwester-Zellen (Gadde et al., 2004). Dynamische Mikrotubuli sind für die Organisation und Funktion der mitotischen Spindel von großer Bedeutung. Eine Reihe von bereits untersuchten Proteinen ist durch Stabilisierung oder Destabilisierung in der Lage, die Dynamik der Mikrotubuli zu regulieren. MCAK („*mitotic centromere-associated kinesin*“) ist ein depolymerisierendes Protein, das die Mikrotubuli an ihren Plus- und Minus-Enden destabilisiert. Es spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der mitotischen Spindel und bei der Trennung und Segregation der Chromosomen (Lan et al., 2004). In mehreren Studien standen die Mechanismen zur Regulation der katalytischen Aktivität von MCAK im Mittelpunkt. Dabei fungierte zunächst die Aurora B Kinase als Hauptkinase, die sowohl die depolymerisierende Aktivität als auch die subzelluläre Lokalisation von MCAK während der Mitose reguliert (Andrews et al., 2004; Moore et al., 2004; Zhang et al., 2007). Aurora B phosphoryliert MCAK während der Mitose an drei wichtigen Stellen innerhalb des N-terminalen- und „Neck“-Bereiches. Das Threonin 95 wird am Ende der G2-Phase phosphoryliert und was zur Rekrutierung von MCAK vom Zytoplasma zu den Chromosomenarmen führt. Die Phosphorylierung des Serin 110 findet am Anfang der Mitose statt und verursacht die Anreicherung von MCAK an den Centromeren. Anschließend wird das Serin 196 phosphoryliert und führt zur Inaktivierung der katalytischen Aktivität von MCAK (Zhang et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass ein weiteres Mitglied der Aurora-Kinasen, die Aurora A Kinase, ebenfalls das Protein MCAK an den Centrosomen durch Phosphorylierung des gleichen Serin 196 und Serin 719 am C-terminalen Ende reguliert (Zhang et al., 2008). Diese Studie zeigte zum ersten Mal, dass MCAK eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Spindel-Bipolarität in der Mitose spielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass, anders als im Falle von Aurora A oder Aurora B, die Phosphorylierung von Cyclin B1/CDK1 in dem katalytischen Bereich von MCAK am Threonin 537 erfolgt. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente war es möglich, nachzuweisen, dass diese

Phosphorylierung die katalytische Aktivität von MCAK, nämlich die Mikrotubuli zu destabilisieren oder zu depolymerisieren, negativ beeinträchtigt und die räumliche Verteilung dieses Kinesins in der Mitose kontrolliert.

3.1 Zellzyklus-abhängige Expression und Lokalisation von MCAK und Cyclin B1

Vorherige Studien haben gezeigt, dass die Expression des Proteins Cyclin B1 Zellzyklus-abhängig ist. Diese Expression erreicht den höchsten Wert und akkumuliert am Ende der G2-Phase, während die Zellen sich für den Eintritt in die Mitose vorbereiten (Pines et al., 1991). Diese Proteinmenge bleibt während der ersten Phasen der Mitose auf einem hohen Level, nimmt aber am Ende der Mitose schnell ab und ermöglicht somit den Zellen den Austritt aus der Mitose (Pines et al., 1991).

Mit Hilfe der durchgeführten Kinetik konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinexpression von MCAK ebenfalls Zellzyklus-reguliert ist (Abb. 7 A). MCAK fängt während der G2-Phase an zu akkumulieren und erreicht den höchsten Expressionswert in der Mitose zwischen 8 und 10 Stunden nach der Entlassung der Zellen aus dem Doppel-Thymidin Block. Interessanterweise konnte eine zusätzliche langsam migrierende MCAK Bande beobachtet werden als sich die Zellen in der Mitose befanden. Diese langsam migrierende Bande kann auf eine mitotische Phosphorylierung des Proteins hinweisen und korrelierte mit der Phase, in der die Expression von Cyclin B1 am höchsten und somit auch mit der Phase, in der die Aktivität der CDK1 Kinase am höchsten ist (Abb. 7 A). Dies war der erste Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen MCAK und dem Komplex Cyclin B1/CDK1.

Die in den letzten Jahren eingeführten Verbesserungen der immunzytochemischen Untersuchungen haben erneut das Interesse an den Sublokalisationen der regulatorischen Untereinheit des Cyclin B1/CDK1 Komplexes, nämlich Cyclin B1, geweckt. Dank der „*time-laps*“-und „*spinning-disk*“- Mikroskopie konnten die bereits in vorherigen Studien beobachteten mitotischen Sublokalisationen von Cyclin B1 bestätigt werden. Nach dem Zerfallen der Kernmembran („*nuclear envelop breakdown*“ = NEB) am Anfang der Mitose wird Cyclin B1 zu den Centrosomen

rekrutiert, wo es an der Bildung der mitotischen Astern beteiligt ist. Danach wird es zu den Mikrotubuli des Spindelapparates und zum Chromatin gezogen (Pines et al. 1991; Hagting et al., 1998; Clute et al., 1999). Interessanterweise wurde vor kurzer Zeit über die centromerische Lokalisation von Cyclin B1 berichtet (Bentley et al., 2007; Chen et al., 2008). Cyclin B1/CDK1 wurde an mit Nocodazol behandelten Kinetochoren, die nicht mehr mit den Mikrotubuli der K-Fiber verbunden sind, beobachtet. Dort spielt dieser Komplex eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Kontrollmechanismus „*spindle assembly checkpoint*“, der den Verlauf der Mitose überwacht (Bentley et al., 2007; Chen et al., 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenz Experimente zur Untersuchung der mitotischen Lokalisation der Proteine CDK1 und MCAK durchgeführt. Das Hauptziel dieser Experimente war nicht nur die oben beschriebenen zellulären Lokalisationen zu bestätigen, sondern auch zu erforschen, ob beide Proteine CDK1 und MCAK sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dies würde eine mögliche Interaktion andeuten. Die Abbildung 7 B zeigt, dass während der frühen Phasen der Mitose (Prophase, Prometaphase und Metaphase) die Expressionsmuster von MCAK und CDK1 identisch sind. MCAK kann während der Prometaphase in den Centrosomen und in den Centromeren/Kinetochoren beobachtet werden. Gleichzeitig zeigt CDK1 die gleiche centrosomale Lokalisation, aber auch eine diffuse Färbung im Bereich der Spindel und des Chromatins. Während der Metaphase, eine der wichtigsten Phasen der Mitose, behält MCAK die centrosomale Lokalisation bei, zeigt aber eine deutliche Färbung im Bereich der Metaphase-Platte. An diesem Ort übt MCAK eine seiner wichtigsten mitotischen Funktionen aus, und zwar die Korrektur von Fehlverknüpfungen zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli der „K-Fiber“ (Kline-Smith et al., 2004). Interessanterweise zeigte CDK1 in dieser Phase die gleiche subzelluläre Lokalisation wie MCAK. In den späteren Phasen der Mitose (Anaphase und Telophase), in denen die Aktivität von CDK1 durch den Abbau der regulatorischen Untereinheit Cyclin B1 kaum vorhanden ist, unterschied sich die räumliche Verteilung beider Proteine. Basierend auf diesen Beobachtungen konnte man vermuten, dass diese mögliche Wechselwirkung zwischen CDK1 und MCAK aufgrund der zeitlich begrenzten räumlichen Nähe spätestens bis zur Metaphase stattfindet.

Ferner bestätigten Experimente, in denen sowohl MCAK, Cyclin B1 als auch CDK1 aus mitotischen Zellextrakten immunoprecipitiert wurden, dass all diese Proteine

physikalisch miteinander wechselwirken oder sich zumindest innerhalb eines einzigen Komplexes befinden (Abb. 7 D, E).

3.2 CDK1 phosphoryliert MCAK am Threonin 537 *in vitro* und *in vivo*

Der endgültige Beweis für die Interaktion zwischen dem Komplex CyclinB1/CDK1 und MCAK wurde mittels eines *in vitro* Kinase-Assays erbracht (Abb. 8). Dank Deletionsmutanten konnte die genaue Stelle, an der MCAK durch CDK1 phosphoryliert wird, identifiziert werden. Es handelt sich um das Threonin 537, das innerhalb des katalytischen Bereiches von MCAK lokalisiert ist. Diese Entdeckung war hoch interessant, da es sich zum ersten Mal um eine Phosphorylierung innerhalb des Bereiches, der für die ATP-Hydrolyse, für die Bindung mit den Mikrotubuli und auch für die Depolymerisierung der Mikrotubuli verantwortlich ist, handelte (Abb. 9). Diese Phosphorylierung wurde eben falls *in vivo* mit Hilfe des spezifischen p-MCAK Antikörpers nachgewiesen (Abb. 11 A, B). Es war sehr interessant zu beobachten, dass die immunzytochemischen Färbungen mit p-MCAK ausschließlich ein Signal an den Spindelpolen zeigten (Abb. 11 C). Diese Lokalisation wurde mit Hilfe anderer Centrosom- oder Spindelpol-Marker bestätigt (Abb. 11 D, E). Dies wiederum wies auf einen neuen regulatorischen Mechanismus zur Kontrolle der Aktivität von MCAK an den Centrosomen hin. Vor allem gehört der Modulator dieser Regulation nicht zur Aurora-Kinasen Familie, sondern es handelt sich um die „Master Kinase“ CDK1.

3.3 Die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 vermindert die katalytische Aktivität von MCAK und ermöglicht den Aufbau der mitotischen Spindel

3.3.1 Die Phosphorylierung inhibiert die katalytische Aktivität von MCAK

Der grundlegende Schritt der Depolymerisierung der Mikrotubuli durch die Mitglieder der Kinesin 13 Familie, darunter MCAK, ist die Herstellung von bogenförmigem Tubulin an den Mikrotubuli Enden (Desai et al., 1997). Mikrotubuli, die mit Paclitaxel oder mit dem nicht hydrolysierbaren GTP Analog GMPCPP stabilisiert sind, wurden aufgrund der Schwierigkeiten beim Experimentieren mit nicht-stabilisiertem Tubulin in

mehreren Kinesin Studien eingesetzt (Maney et al., 2001; Moores et al., 2002; Hertzler et al., 2006). Basierend auf diesen Experimenten wurde zunächst in einem *in vitro* Depolymerisierungs-Assay die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung des Threonin 537 durch CDK1 untersucht. GMPCPP-stabilisiertes Tubulin wurde mit MCAK WT, mit der nicht phosphorylierbaren Mutante MCAK T537A oder mit der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E inkubiert (Abb. 12 B). Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 eine signifikante Inhibierung der Depolymerisierungsfähigkeit von MCAK verursacht ($1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$ für den MCAK WT und nur $0,3 \pm 0,21 \mu\text{m}/\text{min}$ für die MCAK T537E Mutante). Diese Beobachtung konnte man ebenfalls in dem *in vivo* Depolymerisierungs-Assay feststellen (Abb. 12 C). Die Menge an polymerisiertem Tubulin ist nach der Inkubation von HeLa-Zellen mit der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E signifikant angestiegen. Diese Erkenntnisse verstärken die Hypothese, dass die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 die katalytische Aktivität dieses Kinesins *in vitro* und *in vivo* inhibiert. Dank der in den letzten Jahren veröffentlichten Kristallstruktur von MCAK konnte die genaue Lokalisation des Threonin 537 determiniert werden (Ogawa et al., 2004). Es ist in der Loop-12 lokalisiert, in direkter Nähe zur $\alpha 4$ -Helix des katalytischen Bereiches oder „core“-Bereiches. Die $\alpha 4$ -Helix ist bekannterweise das Hauptenergie-produzierende Element des katalytischen Bereiches und ist unmittelbar in die Depolymerisierung der Mikrotubuli involviert, da sie während des Prozesses der Depolymerisierung über der Tubulin-intradimeren Schnittstelle sitzt und dadurch in der Lage wäre, Tubulin zu „verbiegen“ (Ogawa et al., 2004; Niederstrasser et al., 2002; Moores et al., 2003)

In anderen Studien wurde berichtet, dass Mutationen im Bereich der $\alpha 4$ -Helix oder Mutationen von Aminosäuren in der Nähe dieser Helix zum Affinitätsverlust zwischen MCAK und den Mikrotubuli führt (Niederstrasser et al., 2002; Ogawa et al., 2004). Es ist folglich durchaus möglich, dass die Einführung einer negativen Ladung in der Region neben der $\alpha 4$ -Helix, resultierend aus der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1, zur Störung der Interaktion zwischen MCAK und den „gebogenen“ Strukturen am Ende der Mikrotubuli führt. Dies würde die Depolymerisierungsaktivität des gesamten Proteins negativ beeinträchtigen (Abb. 17).

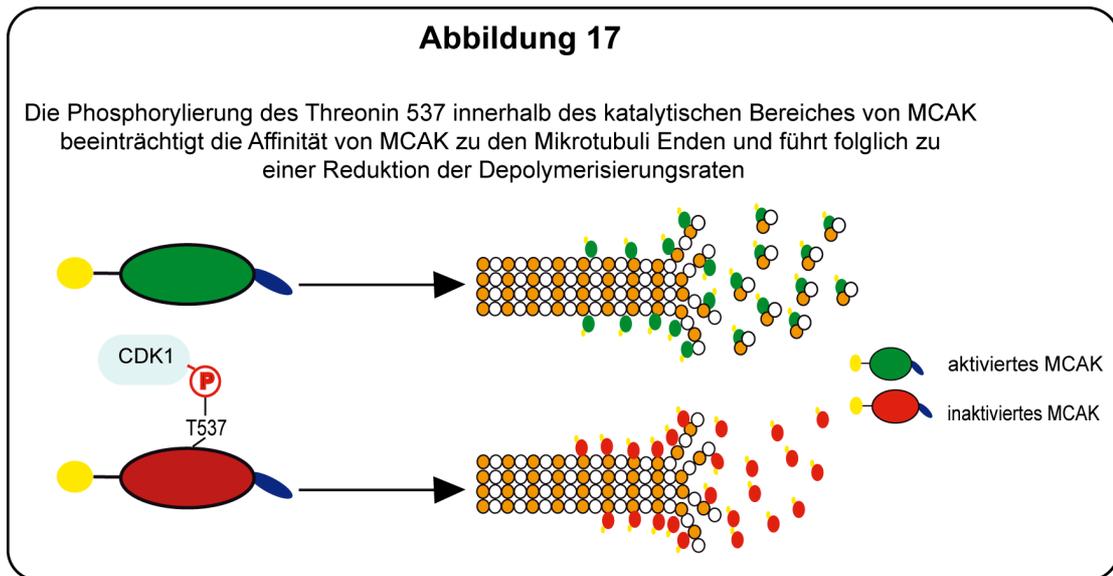


Abbildung 17 : Schematische Darstellung der Effekte der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1

Eine andere logische Erklärung zur beobachteten Inhibition der katalytischen Aktivität der MCAK T537E Mutante bietet sich außerdem an. Es ist durchaus denkbar, dass die Veränderung des Threonin 537 zu Glutamat 537 die dreidimensionale Struktur des Proteins MCAK so verändert, dass die wichtigsten Funktionen von MCAK verloren gehen (z.B. ATP Hydrolyse), folglich würde die beobachtete Inhibition nur einen sekundären Effekt dieser strukturellen Modifikationen widerspiegeln. Um diese Hypothese ausschließen zu können, wurde ein sogenannter ATP-Verwertungs-Assay durchgeführt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass trotz der Einführung beider Mutationen, Threonin 537 zu Alanin 537 und zu Glutamat 537, die Verwertung des ATPs (ATP Hydrolyse) bei allen Mutanten gleich bleibt und außerdem vergleichbar mit der des MCAK Wildtyps ist. Dies zeigte, dass die Mutationen die Struktur von MCAK nicht beeinträchtigt haben und bestätigte gleichzeitig, dass die beobachtete Unfähigkeit der Mutante MCAK T537E, Mikrotubuli zu depolymerisieren, nur auf eine Störung der Bindung zwischen MCAK und den Mikrotubuli-Enden zurückzuführen ist.

Während der Vorbereitungen dieser Arbeit, wurden unsere erzielten Erkenntnisse durch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe zum Teil bestätigt. Es war sehr interessant die Arbeit einer anderen Gruppe, die am *Drosophila* MCAK Homolog Protein KLP10A gearbeitet hat, zu verfolgen (Mennella et al., 2009). Sie waren in der

Lage, nachzuweisen, dass die Casein Kinase 1 α das Kinesin 13 KLP10 A innerhalb des katalytischen Bereiches am Serin 573, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führte zu einer Reduzierung der Depolymerisierungsaktivität des Kinesins. Die Mutante KLP10A S573E zeigte 40% weniger Aktivität verglichen mit dem KLP10A Wildtyp. Zusätzlich führte diese Phosphorylierung zur erheblichen Störungen der Bindungen zwischen dem Protein KLP10A und den Mikrotubuli der mitotischen Spindel. Diese Ergebnisse sind nahezu identisch mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Der einzige Unterschied liegt im experimentellen System, einerseits handelte es sich um *Drosophila*-Zellen und andererseits um humane Zellen, und an der regulierenden Kinase. Die ähnliche Regulation der Kinesine 13 in diesen unterschiedlichen Systemen bekräftigt die Wichtigkeit und Konservierung der mitotischen Regulation des katalytischen Bereiches durch Phosphorylierung.

3.3.2 Die Phosphorylierung des katalytischen Bereiches von MCAK durch CDK1 ermöglicht den Aufbau einer bipolaren Spindel

In *Xenopus* Ei-Extrakten spielt MCAK eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Dynamik der Mikrotubuli. Die Immunodepletion von MCAK führte zum Auftreten von extrem langen und unorganisierten Mikrotubuli (Walczak et al., 1996). Kürzlich erschien eine neue Studie, die über die Rolle von MCAK bei der Herstellung von bipolaren Spindeln in Anwesenheit von Centrosomen und Chromatin berichtete (Ems-McClung et al., 2007). Im Allgemeinen wird der depolymerisierenden Aktivität von MCAK durch die Mikrotubuli stabilisierende Tätigkeit von MAPs-Proteinen („*Microtubuli Associated Proteins*“) am Beispiel von XMAP215/TOGp, Tau, MAP4 und EB1 entgegengewirkt. Dadurch werden die Centrosomen vor der depolymerisierenden Aktivität von MCAK geschützt (Tournebize et al., 2000; Kinoshita et al., 2001; Holmfeldt et al., 2002). Die MAP-Proteine fördern die Polymerisierung der Mikrotubuli durch einen ständigen Aufbau des Tubulins an den Mikrotubuli Plus-Enden (Brouhard et al., 2008). Darüber hinaus sind die MAP-Proteine ebenfalls in der Lage, die Mikrotubuli an den Minus-Enden zu stabilisieren.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 in der Mitose stattfindet (Abb. 11 A, B). Des Weiteren konnte ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden, dass diese Phosphorylierung hauptsächlich an den

Spindelpolen erfolgt (Abb. 11 C) und dass sie für den Aufbau einer bipolaren Spindel in humanen Zellen erforderlich ist.

Um die Funktion der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 in der Organisation der Spindel zu untersuchen, wurde das endogene MCAK durch siRNA depletiert und anschließend wurden die MCAK Konstrukte in die Zellen transfiziert. Die Zellen, die die Mutante MCAK T537A exprimierten, zeigten anormale Spindeln. Die Mikrotubulstruktur an den Spindelpolen erschien gestört und die meisten Mikrotubuli waren kurz und nicht mehr in der Lage, die Region nahe des Chromatins zu erreichen (Abb. 14 F). Die Rate solcher aberranten Spindeln in MCAK T537A exprimierenden Zellen betrug 59,2% verglichen mit 8,4% in Falle des MCAK WT und 13,5% für die MCAK T537E Mutante (Abb. 14 E). Scheinbar sind die Spindelpole der MCAK T537A exprimierenden Zellen nicht in der Lage, die Mikrotubuli aus den Mikrotubuli-organisierenden Zentren aufzubauen und zu verlängern. Dieser Phänotyp spiegelt eine überhöhte Aktivität von MCAK an den Spindelpolen wider, wie auch in mehreren Studien berichtet wird (Holmfeldt et al., 2004; Segerman et al., 2003). Die Unfähigkeit der MCAK T537A exprimierenden Zellen eine richtige Spindel zu bilden, ist die logische Erklärung für den beobachteten Prometaphase-Arrest (17% für MCAK WT, 28% für MCAK T537A und 18% für MCAK T537E) (Abb. 13 C). Zusätzlich ermöglichten Immunofluoreszenz Untersuchungen zur Lokalisation der MCAK Mutanten eine sehr wichtige Beobachtung. Während der EGFP MCAK WT und die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E ähnliche subzelluläre Lokalisationen an den Spindelpolen, Mikrotubuli der Spindel und im Bereich der Centromeren/Kinetochoren aufwies (Abb. 16 B), zeigte die nicht-phosphorylierbare Mutante MCAK T537A überwiegend eine centrosomale bzw. eine Spindelpol-Lokalisation, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Cyclin B1 (Abb. 16 B, dritte und vierte Reihe). Aus dem Wissen, dass MCAK T537A eine vollständige depolymerisierende Aktivität ähnlich zum MCAK WT besitzt (Abb. 12 B, C), lassen sich folgende Erkenntnisse ableiten:

- Die Phosphorylierung durch CDK1 reguliert die centrosomale Lokalisation von MCAK
- Die Abwesenheit von CDK1 führt zum Festhalten von vollständig aktivem MCAK an den Centrosomen. Dies veranlasst die Bildung von aberranten Spindeln und verursacht den registrierten Prometaphase-Arrest

- Scheinbar sind bei inaktivierter CDK1 Kinase die endogenen Mengen an Mikrotubuli-stabilisierenden Proteinen wie z.B. XMAP215/TOGp nicht ausreichend, um die Mikrotubuli Minus-Enden vor der unkontrollierten Aktivität von MCAK zu schützen

In einer veröffentlichten Studie zur Rolle von MCAK bei der Herstellung von Ran-Protein-abhängiger Bipolarität der Spindel (Ran = „*ras-related nuclear protein*“) (Zhang et al., 2008) wurde demonstriert, dass MCAK in der Mitte der Ran-Protein Asten von *Xenopus* Ei-Extrakten lokalisiert ist. Zusammen mit dem XMAP215/TOGp und anderen Proteinen fördert MCAK an dieser Stelle den Übergang von Ran-Protein Asten zu bipolaren Spindeln. Mit Hilfe der Depletion endogenen MCAK, konnte die genaue Funktion von MCAK an diesen Asten untersucht werden. Der Verlust der Funktion von MCAK führte zur Entstehung von breiten und vergrößerten Asten mit sehr langen Mikrotubuli und daher nicht fokussierten Spindelpolen. Dies verstärkte den Verdacht, dass MCAK an der Regulation der Dynamik der Mikrotubuli Minus-Enden beteiligt ist. Trotz des Ausgleichs der destabilisierenden Aktivität von MCAK durch die MAP-Proteine (darunter XMAP215/TOGp) muss diese katalytische Funktion an den Spindelpolen reguliert werden, um einen möglichen Spindelkollaps zu verhindern. In der gleichen Studie fungierte Aurora A als einer der Modulatoren dieser depolymerisierenden Aktivität in der Mitose. Während der ersten Phase zur Entstehung der Ran-Protein Asten inhibiert Aurora A die katalytische Aktivität von MCAK durch eine direkte Phosphorylierung was den Aufbau und eine kontrollierte Verlängerung der Mikrotubuli ermöglicht. Dadurch erfolgt die Bildung einer bipolaren Spindel.

Anhand der oben beschriebenen Studie und der vorliegenden Arbeit ist deutlich zu verstehen, dass die Aktivität von MCAK in den frühen Phasen der Entstehung einer bipolaren Spindel an den Centrosomen bzw. Spindelpolen streng kontrolliert werden muss. Es ist noch nicht untersucht, ob die Aurora A Regulation von MCAK auch in humanen Zellen besteht. Sicher ist, dass humane Zellen über einen anderen Mechanismus zum Schutz der Bipolarität der Spindel verfügen. Die Hauptdarsteller sind CDK1 und MCAK. Während der ersten Phasen der Mitose phosphoryliert CDK1 MCAK am Threonin 537. Diese Phosphorylierung zeigt zwei Effekte: Auf der einen Seite wird der Überschuss an MCAK aus den Centrosomen ausgetrieben und übernimmt anschließend die anderen bekannten mitotischen Lokalisationen

(Mikrotubuli der Spindel, Chromosomenarme, Centrosomen/Kinetochoren). Auf der anderen Seite wird der restliche MCAK Pool an den Centrosomen inaktiviert, denn vorherige Experimente dieser Arbeit haben nachgewiesen, dass MCAK durch die Phosphorylierung von CDK1 *in vivo* inhibiert wird (Abb. 12 C). Alle diese erforderlichen Maßnahmen haben den Schutz und die korrekte Bildung einer bipolaren Spindel als Ziel. Gleichzeitig führt die Störung der Regulation von MCAK durch CDK1 zur Bildung aberranter Spindeln (Abb. 14 E, F) und zu einem Zellzyklus Arrest (Abb. 13 C).

3.4 MCAK T537E verursacht versetzte Chromosomen in der Metaphase

Aus den funktionellen Untersuchungen der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 konnte abgeleitet werden, dass die Phosphorylierung in der frühen Phase der Mitose notwendig ist, um den Zellen eine korrekte Spindelbildung zu erlauben (Abb. 14). Es war sehr interessant zu beobachten, dass die Mutante MCAK T537A über eine normale katalytische Aktivität verfügt (Abb. 12) aufgrund der centrosomalen Verlagerung aber erhebliche Spindelaberrationen zeigt (Abb. 14 E, F) und einen Prometaphase-Arrest hervorruft (Abb. 13 C). Im Gegensatz dazu führte die Expression der Phosphostatus-vortäuschenden Mutante MCAK T537E nicht zu einer Spindelaberration, wohl aber zu einem Metaphase-Arrest und zu einer Zunahme der Chromosomen-Anordnungsfehler. Die Expression der MCAK T537E Mutante konnte die Chromosomen-Anordnungsfehler, die durch die Depletion von endogenem MCAK verursacht wurden, nicht wiederherstellen (54,6%), während die Expression des MCAK WT diese Fehler vollständig aufgehoben hat (21,4% verglichen mit den Kontrollzellen) (Abb. 14 A, B, C, D). Demnach wären die Chromosomen-Anordnungsfehler die logische Erklärung für den beobachteten Metaphase-Arrest. Im Fall der MCAK T537E exprimierenden Zellen können sich die Chromosomen nicht auf der Metaphaseplatte anordnen, was möglicherweise den SAC („*Spindle Assembly Checkpoint*“) aktiviert und dann zu dem beobachteten Metaphase-Arrest führt (Kops, 2008).

Interessanterweise konnte die Mutante MCAK T537A nur zum Teil die Chromosomen-Anordnungsfehler korrigieren (36%). Dies ist durch die bevorzugte centrosomale Lokalisation der Mutante, die die Bildung einer korrekten Spindel

verhindert, erklärbar (Abb. 14, C). Alle genannten Fakten weisen darauf hin, dass die Dephosphorylierung des Threonin 537, sowie die Änderung von MCAK durch andere Kinasen während des Übergangs von Prometaphase zur Metaphase notwendig sind, um den Chromosomen eine korrekte Anordnung auf der Metaphaseplatte zu ermöglichen.

Während der Mitose sind die Chromosomen mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindel durch spezielle Strukturen, den Kinetochoren, verbunden. Diese Kinetochore sind Protein-Strukturen, die an der äußeren Ebene der Centrosomen der Schwester-Chromatiden lokalisiert sind (Rieder, 1982). In der frühen Phase der Mitose nach dem Zerfall der nuklearen Membran beteiligen sich die Schwester-Kinetochore an der Herstellung der Biorientierung der einzelnen Chromosomen (McIntosh et al., 2002). Im Laufe der Prometaphase binden sich immer mehr dynamische Mikrotubuli an die Kinetochore und schieben bzw. ziehen die Chromosomen in Richtung des Spindeläquators. In dieser Phase entsteht eine Art Spannung zwischen den Schwester-Kinetochoren. Diese Spannung wird in der Praxis als der physikalische Abstand zwischen den gegenüberliegenden Kinetochoren wahrgenommen. Dieser Abstand erreicht in der Metaphase den höchsten Wert, da die einzelnen Kinetochore mit der größten Zahl an Mikrotubuli verbunden sind und die Chromosomen vollständig biorientiert sind (ungefähr 25 Mikrotubuli im Falle der somatischen Zellen der Vertebraten) (McEwen et al., 1997). Es ist bereits bekannt, dass in den frühen Phasen der Mitose viele Fehlverknüpfungen zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli auftreten (Nicklas, 1997). In mitotischen Systemen sind viele dieser Fehlverknüpfungen instabil und werden vor oder während der Anaphase korrigiert (Rieder et al., 1998). Bereits die ersten Studien, die sich mit dem Kinesin MCAK beschäftigt haben, konnten die Korrektur dieser natürlich vorkommenden und spontan entstehenden Mikrotubuli-Kinetochor Fehlverknüpfungen mit MCAK verknüpft werden (Kline-Smith et al., 2004). Erstaunlicherweise bewirkte in diesen Studien die Depletion von centromerischem MCAK durch die Injektion eines dominant-negativen Konstruktes das Auftreten von Kongressionsfehlern und Chromosomen-Anordnungsfehlern. Diese Phänotypen wurden von einer deutlichen Reduktion des Abstandes zwischen den Schwester-Centromeren begleitet. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Studie und der Tatsache, dass MCAK T537E eine reduzierte katalytische Aktivität aufweist, war es einfach, den in dieser Arbeit beobachteten Chromosomen-Anordnungsfehlern mit der Unfähigkeit der

Phosphostatus-vortäuschenden Mutante Mikrotubuli-Kinetochore Fehlverknüpfungen zu korrigieren, zusammenzubringen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde in den Zellen die MCAK WT, MCAK T537A oder T537E exprimierten der intercentromerische Abstand gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass dieser Abstand in den Zellen, die MCAK T537E exprimierten, viel kleiner ist als beim Wildtyp (Abb. 15 A, B). Der durchschnittliche Wert des centromerischen Abstandes lag bei 1,5 μm für die MCAK WT exprimierenden Zellen, bei 1,1 μm für die MCAK T537A Mutante und bei nur 0,9 μm für die MCAK T537E. Interessant ist außerdem, dass die nicht phosphorylierbare Mutante MCAK T537A einen veränderten centromerischen Abstand zeigt. Dies könnte durchaus durch die centromerische Lokalisation der Mutante erklärt werden. MCAK T537A bleibt an den Spindelpolen festgehalten und gelangt nicht zu den Centromeren, wo sie die Korrektur der Fehlverknüpfungen durchführen kann (Abb. 15 A, B).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die anhaltende Phosphorylierung durch CDK1 die Funktion von MCAK hemmt. Zusätzlich ist eine zeitabhängige Dephosphorylierung von MCAK um den Bereich der Centrosomen/Kinetochoren unvermeidlich für die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte und folglich für einen reibungslosen Verlauf der Mitose.

Abgeleitet aus den Erkenntnissen dieser Arbeit wurde ein Modell zur Art und Weise der Regulation der mitotischen Funktionen von MCAK durch die Phosphorylierung durch CDK1 entwickelt (Abb. 18). In den frühen Phasen der Mitose fördert die CDK1 Phosphorylierung die Entlassung von MCAK aus den Spindelpolen und unterstützt dadurch die Bildung der bipolaren Spindel (Abb. 18 obere Reihe). Während der Metaphase ist, sowohl die Dephosphorylierung von MCAK in der Nähe der Centromeren/Kinetochoren, als auch andere Modifikationen mittels anderer Kinasen für die weitere Aktivierung dieses Kinesins erforderlich. Aurora B ist ein Beispiel dieser Kinasen. In der Metaphase übernimmt Aurora B die Kontrolle über die Aktivität von MCAK und fördert die Korrektur der Mikrotubuli-Kinetochor Fehlverknüpfungen (Abb. 18 obere Reihe). Während MCAK T537A vorzugsweise eine Spindelpol-Lokalisation aufweist und defekte mitotische Spindeln verursacht (Abb. 18 mittlere Reihe), erhöhte MCAK T537E die Chromosomen-Anordnungsfehler drastisch und verhinderte eine korrekte Anordnung der Chromosomen auf der Metaphaseplatte (Abb. 18 letzte Reihe). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation von

MCAK durch CDK1 in der frühen Phase der Mitose und die Kontrolle der Aktivität von MCAK durch Aurora B in der Metaphase kooperieren, um eine einwandfreie zeitliche und räumliche Aktivität von MCAK sicherzustellen.

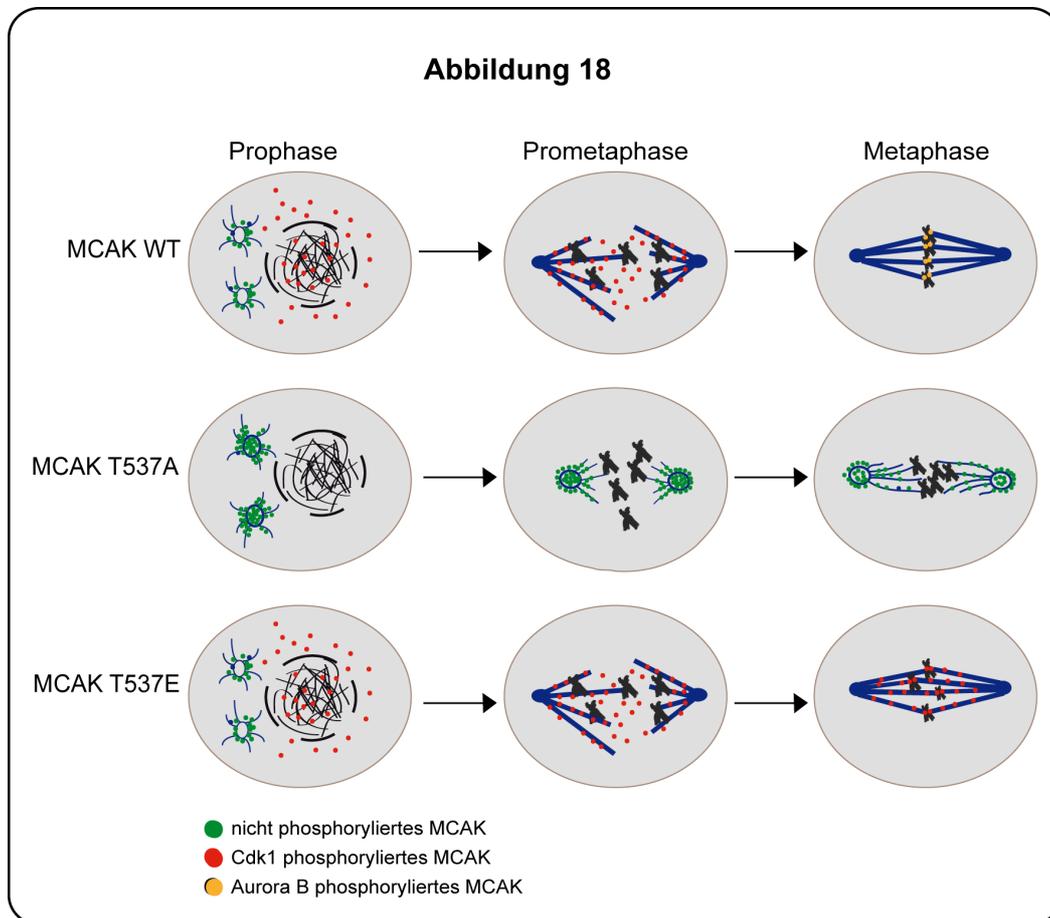


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Regulation von MCAK durch CDK1 Kinase

Die Phosphorylierung durch CDK1 führt zur Entlassung von MCAK aus den Spindelpolen und begünstigt die Bildung der mitotischen Spindel durch die in der Prophase/Prometaphase erfolgte Inhibierung der katalytischen Aktivität von MCAK. Um die Aktivität von MCAK wiederherstellen zu können, muss das Threonin 537 während der Metaphase in der Nähe der Centromere/Kinetochore dephosphoryliert werden. Dank dieser Dephosphorylierung können die Fehlverknüpfungen zwischen den Mikrotubuli und den Kinetochoren aufgehoben werden (obere Reihe). MCAK T537A, die nicht-phosphorylierbare Mutante, wird an den Spindelpolen festgehalten und führt zur Bildung aberranter Spindeln (mittlere Reihe). Die Phosphostatus-vortäuschende Mutante MCAK T537E verursacht Chromosomen-Anordnungsfehler (letzte Reihe)

Dennoch sind in der Zukunft weitere Untersuchungen unerlässlich, um die präzise Reihenfolge dieser regulatorischen Ereignisse, die von CDK1 und den Aurora Kinasen (Aurora A und Aurora B) und wahrscheinlich auch PLK1 gesteuert werden,

aufzuklären. Dafür könnte die „*time laps*“ Mikroskopie und der Einsatz des p-MCAK Antikörpers zur Ermittlung der genauen Kinetik der Phosphorylierung von MCAK durch CDK1 in lebenden humanen Zellen genutzt werden. Darüber hinaus sollte ebenfalls mittels der gleichen Technik die genaue Zeit der Dephosphorylierung des Threonin 537 festgestellt werden. Dies wäre wichtig, um nachvollziehen zu können, in welchen Phasen der Mitose die Phosphorylierung von CDK1 notwendig für die Regulation von MCAK ist. Ferner wird die Etablierung von HeLa-Zelllinien, die konstitutiv EGFP MCAK WT, die Phosphostatus-vortäuschende Mutante EGFP-MCAK T537E oder die nichtphosphorylierbare Mutante EGFP-MCAK T537 A exprimieren, zusammen mit dem Einsatz von spezifischen Kinase Inhibitoren (RO-3306 für CDK1, Hesperadin oder ZM 447439 für die Aurora Kinasen, BI 2536 und Poloxin für PLK1) uns erlauben, die richtige Reihenfolge der Phosphorylierungen von MCAK durch CDK1, Aurora B und PLK1 im Hinblick auf die Lokalisation, die enzymatische Aktivität und die gesamte Funktion von MCAK während der Mitose aufzuklären.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Material und Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden sofern nicht anders erwähnt von Sigma-Aldrich (Steinheim/Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen. Die Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen wurden von Sarstedt (Nürnberg) und Nunc (Langenselbold), Isotope wurden von Perkin Elmer (Boston, USA) bezogen.

Die folgenden Antikörper wurden für Western Blot, Immunoprecipitationen, Immunofluoreszenz und für die Durchflusszytometrie Analyse eingesetzt:

4.1.1 Western Blot und Immunoprecipitation:

Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

Maus anti-KIF2C (Abnova, Taipei, Taiwan), Maus anti-Cyclin B1 (sc-245, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Maus anti-CDK1 (sc-54, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Maus anti- β -Actin (clone AC-15, Sigma), Maus anti-FlagM2 (F1804, Sigma), Maus anti-PLK1 (F-8 Santa Cruz Biotechnology), Maus anti-GST (sc-138, Santa Cruz Biotechnology) und Maus anti-EGFP (sc-9996, Santa Cruz Biotechnology). Die primären Antikörper wurden laut den Angaben der Hersteller eingesetzt. Alle sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (HRP = „Horseradish Peroxidase“) wurden von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bezogen und entsprechend der Herstellerangaben angesetzt.

4.1.2 Immunofluoreszenz:

Die folgenden Antikörper wurden benutzt:

Maus anti-Cyclin B1 (sc-245, Santa Cruz Biotechnology), Maus anti-CDK1 (sc-54, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Maus anti-PLK1 (F-8 Santa Cruz Biotechnology), Kaninchen anti-CenpA (Cell signaling, Frankfurt am Main), Kaninchen anti-Pericentrin (ab-4448, Abcam, Cambridge, England), Maus anti- α -Tubulin (clone B-5-1-2 Sigma) und Maus anti-phospho-Histone H3 ser 10 (clone 3H10 Millipore, Frankfurt am Main). Die primären Antikörper wurden entsprechend der Angaben der Hersteller verwendet.

Die für die Immunofluoreszenz geeigneten sekundären Antikörper FITC-gekoppelte-Ziege anti-Maus, FITC-gekoppelte-Ziege anti-Kaninchen, Cy3-gekoppelte-Esel anti-Maus und Cy5-gekoppelte-Esel anti-Kaninchen wurden von der Firma "Jackson ImmunoResearch" (Newmarket, UK) bestellt und entsprechend Herstellerangaben verwendet.

4.1.3 Durchflusszytometrische Messungen

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen des intrazellulären Tubulingehalts wurde der Maus anti- α -Tubulin Antikörper (Clone T5168 Sigma) angewendet. Der FITC-gekoppelte Kaninchen anti-Maus (DAKO, F0313, Eching) wurde als sekundärer Antikörper für diese Art Experimente benutzt.

4.2 Herstellung eines phospho-spezifischen Antikörpers p-MCAK (pThr 537)

Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierten Threonine an der Position 537 (T537) in der MCAK/KIF2C Peptidsequenz erzeugt. Die Herstellung des Antikörpers erfolgte in der Firma Eurogentech (Seraing, Belgien). Die Kaninchen wurden gegen die folgende Peptidsequenz CGQNKAHpTPFRES (pT = phospho-Threonin) immunisiert und der p-MCAK Antikörper wurde dann durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der p-MCAK Antikörper wurde sowohl in Western Blot Untersuchungen als auch in der Immunofluoreszenz eingesetzt.

4.3 Herstellung der DNA Konstrukte

Die vollständige humane MCAK/Kif2c cDNA („*complementary*“ DNA) wurde als rekombinantes Plasmid pCMV-SPORT6-Kif2c von dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) erhalten. Die gesamte Länge der MCAK/Kif2c-cDNA wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels spezifischer Primer Kif2c-for und Kif2c-rev amplifiziert (Tabelle 2), wofür die *Pfu Ultra II DNA-Polymerase* (Stratagene) verwendet wurde. Die amplifizierte Kif2c DNA wurde anschließend mit dem „Wizard SV Gel und PCR clean-up System“

(Promega, Madison, USA) aufgereinigt und für die Klonierung verwendet. Die Klonierung der gesamten Länge von Kif2c erfolgte sowohl in eukaryontischen Plasmiden 3xFlag-CMV 7.1 (Invitrogen) und pEGFP-C2 (Clontech, CA, USA) als auch im bakteriellen Plasmid pGEX-5x3 (Clontech, CA, USA).

Nach Aufreinigung der unterschiedlichen Plasmide mit Hilfe des „QIAprep spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) wurden die Plasmide und die Kif2c PCR-Produkte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers linearisiert bzw. verdaut.

Die Plasmide pGEX-5x3 und 3xFlag-CMV 7.1 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI (New England Biolabs (NEB), Frankfurt) linearisiert. Das pEGFP-C2 Plasmid wurde mit *Xho*I und *Eco*RI (New England Biolabs) linearisiert.

Mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase (NEB, Frankfurt) erfolgte die Ligation der einzelnen linearisierten Plasmide mit den komplementären Kif2c PCR-Produkten. Alle Ligationen sind laut Herstellerangaben durchgeführt worden. Alle entstandenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft und bestätigt.

Verschiedene Subdomänen der humanen Kif2c, die N-Terminale Domäne (Aminosäure 1-187), die Neck Domäne (Aminosäure 188-255), die Core Domäne (Aminosäure 256-590) und die C-Terminale Domäne (Aminosäure 591-725) wurden durch PCR amplifiziert und in der gleichen Weise in pGEX-5x3 subkloniert (Tabelle 2).

Zum Zweck der Untersuchung der *in vitro* und *in vivo* Interaktion zwischen CDK1 und KIF2C wurden durch zielgerichtete Mutagenese Punktmutationen innerhalb der Kif2c-DNA Sequenz eingeführt. Diese Punktmutationen wurden mit Hilfe des „*Quik Change site-directed mutagenesis kit*“ (Stratagene, Amsterdam, Holland) nach Herstellerangaben erzeugt. Die Punktmutationen wurden so angesetzt, dass Threonin 537 (T537) entweder zu Alanin 537 (A537) oder zu Glutamat 537 (E537), und ebenso Serin 566 (S566) zu Alanin 566 (A566) oder Glutamat 566 (E566) mutiert (Tabelle 2).

Diese Mutationen wurden sowohl in den bakteriellen rekombinanten Plasmide zum Zweck der bakteriellen Proteinsynthese, als auch in den eukaryontischen

rekombinanten Plasmide erzeugt, um funktionelle Untersuchungen innerhalb der Zellen durchzuführen. Alle Konstrukte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

4.4 Transformation von Bakterienzellen

Folgende Bakterienstämme von Invitrogen (Karlsruhe) wurden zu Transformationen eingesetzt.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
DH5 α	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)

Die direkte Aufnahme von DNA-Molekülen in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Dazu werden kompetente Bakterienzellen (DH5 α oder BL21) auf Eis aufgetaut. Je Transformationsansatz werden 1 bis 5 ng DNA oder 5 bis 10 μ l eines Ligationsansatzes zu 50 μ l kompetenten Bakterien gegeben, die anschließend zur DNA-Aufnahme 25 Minuten lang auf Eis inkubiert werden. Nach dieser Inkubationszeit werden die Bakterien einem 2 minütigen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt und anschließend werden die transformierten Bakterien für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Bakterien sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden 12 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.5 Expression bakterieller Proteine

1 bis 5 ng Plasmid-DNA werden in 50 μ l kompetente BL21 transformiert und auf selektivem Medium ausplattiert. Nach 20 Stunden werden die Bakterienklone von der Agarplatte in 6 ml selektives LB-Medium überführt und über Nacht im Schüttler bei

37°C und 250 rpm expandiert. 5 ml der Bakteriensuspension werden in 100 ml selektives LB-Medium überführt und bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Anschließend wird die Bakteriensuspension mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; AppliChem, Darmstadt), einem Aktivator der Transkription und somit der Proteinexpression, versetzt und für ca. 2,5 Stunden im Schüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension (Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor GSA: 5.000 rpm, 5 min, 4°C) wird das Pellet in 10 ml Bakterien-Lyse-Puffer (*250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% Glycerol, 1% Triton-X-100*), der 200 µl Proteaseinhibitor (50x Complete) enthält, resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird die Lösung mit 50 µl Lysozym und 1 µl Benzonase (Novagen, Nottingham, UK) versetzt.

Zum weiteren Zellaufschluss werden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im 37°C Wasserbad aufgetaut. Der Vorgang wird dreimal wiederholt. Anschließend wird die Suspension zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor: SS-34: 10.000 rpm, 15 min, 4°C). Um das bakteriell exprimierte GST- (Glutathion S-Transferase) gekoppelte Protein zu isolieren, wird der Überstand in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl GST-*beads* versetzt. Die Kopplungsreaktion wird für mindestens 1 Stunde bis über Nacht bei 4°C auf dem Rotator durchgeführt.

Am nächsten Tag werden die GST-*beads* zentrifugiert (2500 rpm, 5 min, 4°C), zum Waschen mit 500 µl Bakterien-Lyse-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (2400 rpm, 3 min, 4°C). Die Pellets werden mit 500 µl Bakterien-Lyse-Puffer gewaschen und anschließend noch zwei weitere Male mit 500 µl PBS. Die GST-Fusionsproteine werden mit 60 bis 70 µl Elutionspuffer (*45 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,19 M NaCl, 21 mg Glutathion, pH auf 8,5 mit 1 M NaOH einstellen*) für mindestens 1 Stunde bei 4°C auf dem Rotator eluiert und abschließend bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände mit den GST-Fusionsproteinen werden zur Stabilisierung mit 20% Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

4.6 *In vitro* Kinase Assay

Zur Durchführung des *in vitro* Kinase Assays wurden ca. 100 bis 200 ng sowohl bakteriell exprimiertes GST-KIF2C Fusionsprotein als auch die unterschiedlichen GST-KIF2C-Domänen mit dem Komplex Cyclin B1/CDK1 (New England Biolabs) in Anwesenheit von 2 μCi [γ - ^{32}P] ATP und 100 μM nicht radioaktivem ATP bei 30°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden anschließend bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Es wurden gleiche Mengen von jeder Probe auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und es folgte die Protein Auftrennung bei 160 V. Die Gele wurden danach mit der Coomassie-Färbelösung (40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 0,125% Coomassie Brilliant blau R 250 (w/v)) gefärbt und anschließend mit Schnellentfärber (40% ETOH (v/v); 20% Essigsäure (v/v); 40% H₂O bidest. (v/v)) entfärbt. Die Coomassie-gefärbten Gele wurden dokumentiert und dienten als Ladungskontrolle. Die Inkorporation (Aufnahme) von [γ - ^{32}P] ATP wurde mittels des Programms „Kodac Geldock system“ quantifiziert.

4.7 Zellkultur und Transfektionen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C mit einem CO₂ Gehalt von 5% kultiviert. Alle Zelllinien wurden von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. HeLa-Zellen („*human cervix carcinoma*“), Hela 776-6 Zellen (stabile Klone mit shRNA gegen cyclin B1 transfiziert) (Yuan et al., 2006), Saos Zellen („*human osteogenic sarcoma*“), MCF-7 Zellen („*human breast adenocarcinoma*“) und Sw480 Zellen („*human colon adenocarcinoma*“) wurden in ihren entsprechenden Medien kultiviert (Tabelle 1).

Die Zellen wurden transient mit den unterschiedlichen DNA-Konstrukten mittels Fugeen 6 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) oder mit unterschiedlichen siRNAs mittels Oligofectamine (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) transfiziert. Alle Transfektionen erfolgten nach Angaben der Hersteller.

4.8 siRNA Experiment und Transfektion

Es wurden zwei siRNAs zum Unterdrücken der zellulären Expression von KIF2C chemisch hergestellt (Sigma Aldrich). Die erste siRNA war gegen die Position 1666 bp bis 1686 bp der kodierenden Sequenz von KIF2C gerichtet (Tabelle 3). Diese siRNA wurde als siRNA MCAK1 bezeichnet. Die zweite siRNA war gegen die 3'-nicht-translatierte Region des Proteins KIF2C (3'-UTR) gerichtet, genau zwischen der Position 11 bp und 31 bp. Diese siRNA wurde als siRNA MCAK2 bezeichnet (Tabelle 3). Eine Kontroll-siRNA wurde von der Firma Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA) bezogen. Alle siRNAs wurden so verdünnt, dass sie über eine 20 µM konzentrierte Stammlösung verfügten. Für die Transfektion der siRNAs in den Zellen wurde das Oligofectamine (Invitrogen) als Transfektionsreagenz benutzt. Alle Transfektionen sind entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt worden. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen 50-60% konfluent ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde für eine einzige 6-Well 10 nM siRNA mit 250 µl OptiMEM (Invitrogen) zusammengegeben. Zur gleichen Zeit wurden 5 µl Oligofectamine zu 70 µl OptiMEM gegeben. Beide Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der kurzen Inkubationszeit wurde die siRNA mit dem Transfektionsreagenz gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann auf die Zellen gegeben und für 4 Stunden im Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Transfektion durch Zugabe vom passenden Medium, das mit 30% FCS versetzt war, abgestoppt. Die behandelten Zellen wurden nach 24 bis 96 Stunden für weitere Experimente geerntet.

4.9 Synchronisation der Zellen

Um die Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus untersuchen zu können, wurden sie durch den Einsatz verschiedener chemischer Substanzen in der gewünschten Phase des Zellzyklus arretiert und angereichert. Zur Synchronisation der Zellen in der G1/S Phase, wurden die Zellen einem doppelten Thymidin Block (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) unterzogen. Dem Kulturmedium wurde 0,2 mg/ml (2 mM) Thymidin zugesetzt, zu den Zellen gegeben und 16–18 Stunden in diesem Medium inkubiert.

Der Zellzyklus-Block wurde für 8 Stunden durch Waschen mit PBS und Zugabe von frischem Medium aufgehoben und anschließend wiederholt.

Um Zellen in der G2/M-Phase zu synchronisieren, wurden diese zuerst für 16 Stunden mit 0,5 mg/ml (2 mM) Thymidin (Sigma-Aldrich) inkubiert, dann für 8 Stunden in frisches Medium überführt und anschließend mit 50 ng/ml Nocodazol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 16 Stunden inkubiert.

4.10 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden adhärente Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschalen gelöst. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert (1400 rpm, 10 min, 4°C) und zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde dann mit dem RIPA-Lysis Puffer (*150 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,4; 0,25% Na-Desoxycholat (w/v); 1% NP-40 (v/v); 0,1% SDS (w/v); 1 mM EDTA; 50 mM NaF; pH 7,4 einstellen und komplementiert mit 1 mM DTT; 100 µM Na₃VO₄; 400 µM PMSF; 1x Proteaseinhibitor*) resuspendiert. Nach Inkubation von mindestens 30 Minuten auf Eis werden die Zellen erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4°C) und der entstandene Überstand (Proteinlysate) wird in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Bestimmung des Proteingehaltes werden die Lysate für weitere Experimente eingesetzt oder bei -20°C eingelagert.

4.11 SDS Gelelektrophorese und Western-Blot

Mit der SDS-PAGE können Proteine aus heterogenen Suspensionen analysiert werden, in dem sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden. 25 bis 35 µg Proteinlysate werden mit dem 4xSDS-Probenpuffer (*240 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,6% Bromphenolblau (w/v); 40% Glycerol (v/v); 5% β-Mercaptoethanol (v/v); 6% SDS (w/v)*) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C zur Proteindenaturierung inkubiert. Anschließend werden die Proteinlysate auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel geladen und in einem SDS-Laufpuffer (*1,4% Glycin (w/v); 0,3% Tris (w/v); 0,2% SDS (w/v)*) für 1-1,5 Stunden konstant bei 160 V in einer mini-Protean Gelkammer (Invitrogen) getrennt.

Anschließend wurde das Gel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Roth) in Blot-Puffer (1,4% Glycin (w/v); 0,3% Tris (w/v); 20% MeOH (v/v)) bei konstanter Spannung von 32 V (ca. 300 mA) für 75 Minuten in einer Mini-Blotapparatur (Invitrogen) geblottet. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Membran in Blocking-Puffer (5% Milchmagerpulver (w/v); 1xPBS) wurde die Membran mit den primären Antikörpern, die in der gewünschten Konzentration im Blocking-Puffer enthalten sind, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift (jeweils 10 min) der Membran mit PBST (1xPBS; 0,02% Tween) wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit einer Chemilumineszenz-Lösung (Pierce, IL, USA) für 2 Minuten inkubiert. Die Signale wurden mit Hilfe eines Röntgenfilm-Hyperfilm ECL (Amersham, Freiburg) detektiert.

4.12 Co-Immunoprecipitation

Zum Zweck der Untersuchung der möglichen Protein-Protein Interaktionen zwischen MCAK/KIF2C und dem Komplex CyclinB1/CDK1 wurden Co-Immunoprecipitationen durchgeführt. Am Tag vor der Immunoprecipitation wurden die Zellen in der G2/M-Phase mittels Nocodazol synchronisiert. Die Zellen wurden geerntet und Zelllysate hergestellt. Die Durchführung der Co-Immunoprecipitationen erfolgte nach Angaben der Hersteller der Dynabeads (Invitrogen). Als erstes wurden 1-2 µg Antikörper mit den Dynabeads Protein G (Invitrogen) bei Raumtemperatur für 30 Minuten rotierend inkubiert, anschließend wurde 500-600 µg Proteinlysate zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Der Komplex Beads-Präzipitat-Co-Präzipitat wurde dreimal mit Lysis-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Co-Immunokomplexe mit 4xSDS-Probenpuffer vermischt, bei 95°C inkubiert und einer SDS-Elektrophorese unterzogen.

4.13 Quantifizierung der Mikrotubuli-Depolymerisierung *in vivo* und *in vitro*

4.13.1 *In vivo* Quantifizierung

Um festzustellen, ob die Transfektion der unterschiedlichen MCAK-DNA Konstrukte einen Effekt auf das Polymerisationsverhalten der intrazellulären Mikrotubuli zeigt, wurde ein *in vivo* Polymerisations-Assay durchgeführt. HeLa-Zellen wurden am ersten Tag mit siRNA MCAK2, und am zweiten Tag mit den unterschiedlichen MCAK-Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Doppel-Thymidin Blocks in der G1/S Phase synchronisiert und für 10 Stunden in frischem Medium inkubiert, so dass die Zellen in der Mitose angereichert werden. Die Zellen werden geerntet, in PEM-Puffer extrahiert (0,1 M PIPES; 2 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; pH 7,4), zugesetzt mit 0,2% Saponin; 25 nM Paclitaxel für 4 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in Fixierungspuffer (PEM pH7,4; 4% PFA; 0,2% Saponin) für 15 Minuten bei 37°C fixiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in Blocking-Puffer (0,9% NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 mg/ml BSA) der jedes Mal frisch mit 10%FCS versetzt wird, für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Färbung des intrazellulären Tubulins wurden die Zellen mit dem α -Tubulin Antikörper (clone T5168, Sigma) gefärbt. Der primäre Antikörper wurde im gleichen Blocking-Puffer verdünnt und die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (FITC-gekoppelte Kaninchen anti-Maus) (DAKO, clone F0313, Eching) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometrischen Messungen vorbereitet. Die Messungen erfolgten in einem FACScan Gerät (BD Biosciences, Heidelberg) und die Ergebnisse der Messungen wurden graphisch dargestellt. Die Experimente wurden fünfmal unabhängig voneinander jeweils dreimal parallel durchgeführt.

4.13.2 *In vitro* Quantifizierung

Die *in vitro* Quantifizierung der Tubulin-Depolymerisierung nach Zugabe der MCAK-Konstrukte wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jonathon Howard im Max-Planck-Institut (Dresden) im Rahmen einer Kooperationsarbeit durchgeführt. Dazu wurde Tubulin aus dem Gehirn von Schweinen isoliert, aufgereinigt und

anschließend mit Rhodamin gekoppelt (TAMRA, Invitrogen) (Hunter et al., 2003; Vladimir Varga et al., 2006). Der Depolymerisierungs-Assay wurde mit den GMP-CCP stabilisierten Mikrotubuli in BRB20-Puffer (*80 mM PIPES-KOH pH 6.9; 1 mM MgCl₂; 1 mM EGTA*) komplementiert mit 75 mM KCl; 1 mM ATP; 0.1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA), 1% β -Mercaptoethanol; 40 mM Glucose, 40 μ g/ml Glucoseoxidase, und 16 μ g/ml Catalase durchgeführt. Diese Mikrotubuli wurden auf der Oberfläche von Objektträgern immobilisiert und die Depolymerisierung der Mikrotubuli ist durch die Zugabe von Sättigungskonzentrationen der unterschiedlichen aufgereinigten MCAK Proteinvarianten MCAK WT, MCAK T537A oder MCAK T537E (ca. 500 ng) eingeleitet worden.

Die mit Rhodamin gekoppelten Mikrotubuli wurden mittels eines Axiovert 200M Mikroskops (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) ausgestattet mit einem 100x α Plan FLUAR Objektiv beobachtet und die Bilder wurden mit einer Metamorph (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) Software-gesteuerten MicroMAX:512BFT CCD Kamera aufgenommen. Metamorph wurde benutzt, um die Bilder zu bearbeiten und für die Messungen der Länge der Mikrotubuli.

4.14 ATP-Verwertungs-Assay *in vitro*

Dieses Experiment ist ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jonathon Howard durchgeführt worden. Die Rate der ATP-Verwertung oder ATP-Hydrolyse wurde durch die „*acid quenching samples*“ Methode aus einem Reaktionsgemisch bestehend aus 2 μ M MCAK Protein oder die Varianten T537A, T537E, 2 mM MgATP in einem Puffer aus 20 mM PIPES pH 6,9; 75 mM KCl gemessen. In jeder Probe wurde das ADP von ATP mit Hilfe einer C₁₈ Säule unter isokratischen Durchfluss Bedingungen in einem Puffer aus 100 mM Kalium-Phosphat pH 6,5; 10 mM Terbutylammonium-Bromid und 10% Acetonitril getrennt. Die Rate der ATP-Hydrolyse der MCAK Proteine und die der Varianten T537A und T537E wurde nach der Freisetzung von ADP als Fraktion der gesamten Nukleotide gemessen.

4.15 Immunofluoreszenz und Messung der intercentromerischen Distanz

Für die Immunofluoreszenz Experimente wurden die Zellen in sogenannten „slide flasks“ (Nunc) ausgesät und anschließend mit siRNA oder mit den MCAK Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden für 8 Minuten mit kaltem Methanol (-20°C) sowohl fixiert als auch permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in Blocking-Puffer (0,9% NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 mg/ml BSA), der jeweils frisch mit 10% FCS angesetzt wird, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle primären Antikörper wurden im gleichen Blocking-Puffer verdünnt und auf die Objektträger gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger 30 Minuten mit PBS gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Die Objektträger wurden erneut mit PBS gewaschen, die DNA wurde mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochloride) (Roche, Mannheim) gefärbt. Die Objektträger wurden dann mit Vectashield (Vector, CA, USA) eingedeckt. Die Objektträger wurden mittels eines Axioimager Z.1 Mikroskops (Zeiss, Göttingen), das mit einem 40 x Plan Neofluar Objektiv ausgestattet ist, beobachtet und die Bilder wurden mithilfe einer Software Axio Cam MRm Kamera (Zeiss, Göttingen) aufgenommen.

Für die Messung der intercentromerischen Abstände wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und mit dem Cenp-A („cell signaling“) Antikörper gefärbt. Mindestens 10 Zellen, die sich in der Metaphase befinden, wurden untersucht. Dabei wurde die Distanz zwischen 8 bis 10 Schwester-Centromeren jeder einzelnen Zelle mit Hilfe des 63 x Plan Neofluar Objektivs und der gelieferten Software „Axiovision release 4.6“ erfasst.

Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde der „Student's *t*-test“ benutzt, um die Signifikanz der Behandlungen mit MCAK WT und den Varianten 537A, 537E oder die Behandlung mit den siRNAs im Vergleich zu den Kontrollen evaluieren zu können. Unterschiede wurden als statistisch bedeutend betrachtet wenn $P < 0,05$ ist.

Sonstige Software

Abbildungen wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS3 angefertigt und die Beschriftung sowohl der Abbildungen als auch der schematischen Darstellungen wurde mit dem Adobe Illustrator CS3 durchgeführt.

Tabelle 1: Die unterschiedlichen Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Medium
HeLa	MEM-Medium (Sigma) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penn strep (Sigma)
HeLa 776-6	MEM-Medium (Sigma) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penn strep (Sigma) + G418 Antibiotikum (Invitrogen)
Saos	McCoy's Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penn strep (Sigma) + 1% L-Glutamine
MCF-7	RPMI 1640 (Sigma) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penn strep (Sigma)
SW-480	Medium (Lonza, Köln, Deutschland) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penn strep (Sigma)
Medium für die siRNA Transfektion	optiMEM Sigma-Aldrich (Steinheim/Taufkirchen)
Lösen der Zellen von der Schalenoberfläche und Passagieren der Zellen	Trypsin EDTA Sigma-Aldrich (Steinheim/Taufkirchen)

Tabelle 2: Liste der für die Klonierung benutzten Primersequenzen

Primer	Sequenz 5' - 3'	Verwendungszweck
MCAK-for	5'- GATAGGATCCAGATGGCCATGGACTCGTCGC TTCAGG-3'	Klonierung in pGEX-5x3
MCAK-rev	5'- ACAGAATTCTCACTGGGGCCGTTTCTTGCTGC TTATTTG-3'	
MCAK-F-rev	5'- AATTGAATTCAATGGCATGGACTCGTCCCTTC AGG-3'	Klonierung in 3xFlag-CMV 7.1
MCAK-F-for	5'- GATCCGGATCCTCACTGGGGGCCGTTTCTTG CTGCTTCTTTG-3'	
MCAK-EGFP-for	5'- TCGACTCGAGGATGGCCATGGACTCGTCGCT TCAGG-3'	Klonierung in pEGFP-C2
MCAK-EGFP-rev	5'- ACAGAATTCTCACTGGGGCCGTTTCTTGCTGC TTATTTG-3'	
N-Terminal-for	5'- GATAGGATCCAGATGGCCATGGACTCGTCGC TTCAGG-3'	Klonierung in pGEX-5x3
N-Terminal-rev	5'- GCGCGAATTCAACTGAGTTCACAGGGTTTGC AGAAGAGCT-3'	
Neck-for	5'- CTCAGGATTCCGGTTCGGAGGAAATCATGTTT GTG-3'	Klonierung in pGEX-5x3
Neck-rev	5'- GACAGAATTCAACACAGACACATATTCTGTGC TC TTCGATAGG-3'	
Core-for	5'- GATAGGATTCAGGAGCACAGAATATGTGTCT GTGTTAGGAAACGCC-3	Klonierung in pGEX-5x3
Core-rev	5'- GACAGAATTCGGGGCTCAGCTCCTTGACCCT GTCTGC-3'	

Material und Methoden

C-Terminal-for	5'- GATAGGATCCAGCACAGTGGGCCAGTGGAGAGC AGTTGATTC-3'	Klonierung in pGEX-5x3
C-Terminal-rev	5'- ACAGAATTCTCACTGGGGCCGTTTCTTGCTGCTTAT TTG-3'	
A537-up	5'-AGAACAAGGCTCACGCCCGTTCCGTGAG-3'	zielgerichtete Mutagenese
A537-down	5'-CTCACGGAACGGGGCGTGAGCCTTGTTCT-3'	
E537-up	5'- GGACAGAACAAGGCTCACGAACCGTTCCGTGAGA GCAAG-3'	zielgerichtete Mutagenese
E537-down	5- CTTGCTCTCACGGAACGGTTCGTGAGCCTTGTTCT GTCC-3'	
A566-up	5-CATGATTGCCACGATCGCACCAGGCATAAGCTC- 3'	zielgerichtete Mutagenese
A566-down	5-GAGCTTATGCCTGGTGCATCGTGGAATCATG- 3'	

Tabelle 3: Die Sequenzen der verwendeten siRNAs

siRNA	Sequenz	Verwendungszweck
siRNA MCAK1	Sense siRNA: CUCUAGGACUUGCAUGAUUTT Antisense siRNA: AAUCAUGCAAGUCCUAGAGTT	gegen die kodierende Sequenz von MCAK
siRNA MCAK2	Sense siRNA: AAAUCUGUUUGGUUUGACATT Antisense siRNA: UGUCAAAACCAACAGAUUUTT	gegen die 3'-nicht translatierte Region der MCAK/Kif2c Sequenz (3'UTR)
siRNA cyclin B1	Sense siRNA: GAAUUGUACCCUCCAGAAATT Antisense siRNA: GCUGACCCUGAAGUUCAUCUU	gegen die kodierende Sequenz von Cyclin B1

Referenzen

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

Bakhoun SF, Thompson SL, Manning AL, Compton DA. Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* 2009; 11:27-35.

Belmont LD, Hyman AA, Sawin KE, Mitchison TJ. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell* 1990; 62:579-89.

Bentley AM, Normand G, Hoyt J, King RW. Distinct sequence elements of cyclin B1 promote localization to chromatin, centrosomes, and kinetochores during mitosis. *Mol Biol Cell* 2007; 18:4847-58.

Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, et al. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 2008; 132:79-88.

Buster DW, Zhang D, Sharp DJ. Poleward tubulin flux in spindles: regulation and function in mitotic cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18:3094-104.

Cahu J, Olichon A, Hentrich C, Schek H, Drinjakovic J, Zhang C, et al. Phosphorylation by Cdk1 increases the binding of Eg5 to microtubules in vitro and in *Xenopus* egg extract spindles. *PLoS One* 2008; 3:e3936.

Cassimeris L, Morabito J. TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2004; 15:1580-90.

Chen Q, Zhang X, Jiang Q, Clarke PR, Zhang C. Cyclin B1 is localized to unattached kinetochores and contributes to efficient microtubule attachment and proper chromosome alignment during mitosis. *Cell Res* 2008; 18:268-80.

Churchill ME, Travers AA. Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Trends Biochem Sci* 1991; 16:92-7.

Clute P, Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1999; 1:82-7.

Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13:83-117. Desai A, Verma S, Mitchison TJ, Walczak CE. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 1999; 96:69-78.

Ducommun B, Brambilla P, Felix MA, Franza BR, Jr., Karsenti E, Draetta G. cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J* 1991; 10:3311-9.

Ems-McClung SC, Hertzner KM, Zhang X, Miller MW, Walczak CE. The interplay of the N- and C-terminal domains of MCAK control microtubule depolymerization activity and spindle assembly. *Mol Biol Cell* 2007; 18:282-94.

Gadde S, Heald R. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol* 2004; 14:R797-805.

Gaetz J, Kapoor TM. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J Cell Biol* 2004; 166:465-71.

Ganem NJ, Compton DA. The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J Cell Biol* 2004; 166:473-8.

Ganguly A, Bhattacharya R, Cabral F. Cell cycle dependent degradation of MCAK: evidence against a role in anaphase chromosome movement. *Cell Cycle* 2008; 7:3187-93.

Gigant B, Curmi PA, Martin-Barbey C, Charbaut E, Lachkar S, Lebeau L, et al. The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* 2000; 102:809-16.

Goshima G, Vale RD. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J Cell Biol* 2003; 162:1003-16.

Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J* 1998; 17:4127-38.

Heald R, McLoughlin M, McKeon F. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 1993; 74:463-74.

Hedrick DG, Stout JR, Walczak CE. Effects of anti-microtubule agents on microtubule organization in cells lacking the kinesin-13 MCAK. *Cell Cycle* 2008; 7:2146-56.

Helenius J, Brouhard G, Kalaidzidis Y, Diez S, Howard J. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature* 2006; 441:115-9.

Hertzer KM, Ems-McClung SC, Kline-Smith SL, Lipkin TG, Gilbert SP, Walczak CE. Full-length dimeric MCAK is a more efficient microtubule depolymerase than minimal domain monomeric MCAK. *Mol Biol Cell* 2006; 17:700-10.

Holmfeldt P, Brattsand G, Gullberg M. MAP4 counteracts microtubule catastrophe promotion but not tubulin-sequestering activity in intact cells. *Curr Biol* 2002; 12:1034-9.

Holmfeldt P, Stenmark S, Gullberg M. Differential functional interplay of TOGp/XMAP215 and the Kin I kinesin MCAK during interphase and mitosis. *EMBO J* 2004; 23:627-37.

Holmfeldt P, Zhang X, Stenmark S, Walczak CE, Gullberg M. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation. *EMBO J* 2005; 24:1256-66.

Hummer S, Mayer TU. Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Curr Biol* 2009; 19:607-12.

Hunter AW, Caplow M, Coy DL, Hancock WO, Diez S, Wordeman L, et al. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol Cell* 2003; 11:445-57.

Ishikawa K, Kamohara Y, Tanaka F, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, et al. Mitotic centromere-associated kinesin is a novel marker for prognosis and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98:1824-9.

Jang CY, Coppinger JA, Seki A, Yates JR, 3rd, Fang G. Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J Cell Sci* 2009; 122:1334-41.

Kinoshita K, Arnal I, Desai A, Drechsel DN, Hyman AA. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 2001; 294:1340-3.

Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 1986; 45:329-42.

Kishimoto T. Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int J Dev Biol* 1994; 38:185-91.

Kline-Smith SL, Khodjakov A, Hergert P, Walczak CE. Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell* 2004; 15:1146-59.

Knowlton AL, Vorozhko VV, Lan W, Gorbsky GJ, Stukenberg PT. ICIS and Aurora B coregulate the microtubule depolymerase Kif2a. *Curr Biol* 2009; 19:758-63.

Kops GJ. The kinetochore and spindle checkpoint in mammals. *Front Biosci* 2008; 13:3606-20.

Kramer A, Lukas J, Bartek J. Checking out the centrosome. *Cell Cycle* 2004; 3:1390-3.

Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, et al. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* 2004; 14:273-86.

Langan TA, Gautier J, Lohka M, Hollingsworth R, Moreno S, Nurse P, et al. Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol* 1989; 9:3860-8.

Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 2004; 167:19-22.

Lee MJ, Gergely F, Jeffers K, Peak-Chew SY, Raff JW. Msp/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol* 2001; 3:643-9.

Maney T, Hunter AW, Wagenbach M, Wordeman L. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol* 1998; 142:787-801.

Maney T, Wagenbach M, Wordeman L. Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* 2001; 276:34753-8.

Maney T, Wagenbach M, Wordeman L. Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* 2001; 276:34753-8.

Manning AL, Ganem NJ, Bakhoun SF, Wagenbach M, Wordeman L, Compton DA. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18:2970-9.

Matthess Y, Kappel S, Spankuch B, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K. Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive, H1 promoter-driven silencing of PLK1. *Oncogene* 2005; 24:2973-80.

McEwen BF, Heagle AB, Cassels GO, Buttle KF, Rieder CL. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol* 1997; 137:1567-80.

McIntosh JR, Grishchuk EL, West RR. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18:193-219.

Mennella V, Tan DY, Buster DW, Asenjo AB, Rath U, Ma A, et al. Motor domain phosphorylation and regulation of the Drosophila kinesin 13, KLP10A. *J Cell Biol* 2009; 186:481-90.

Moore A, Wordeman L. The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol* 2004; 14:537-46.

Moore AT, Rankin KE, von Dassow G, Peris L, Wagenbach M, Ovechkina Y, et al. MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. *J Cell Biol* 2005; 169:391-7.

Moores CA, Hekmat-Nejad M, Sakowicz R, Milligan RA. Regulation of KinI kinesin ATPase activity by binding to the microtubule lattice. *J Cell Biol* 2003; 163:963-71.

Moores CA, Yu M, Guo J, Beraud C, Sakowicz R, Milligan RA. A mechanism for microtubule depolymerization by KinI kinesins. *Mol Cell* 2002; 9:903-9.

Morales-Mulia S, Scholey JM. Spindle pole organization in Drosophila S2 cells by dynein, abnormal spindle protein (Asp), and KLP10A. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3176-86.

Moreno S, Nurse P. Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell* 1990; 61:549-51.

Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; 270:86-90.

Muller-Reichert T, Chretien D, Severin F, Hyman AA. Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphonate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3661-6.

Nicklas RB. How cells get the right chromosomes. *Science* 1997; 275:632-7.

Niederstrasser H, Salehi-Had H, Gan EC, Walczak C, Nogales E. XKCM1 acts on a single protofilament and requires the C terminus of tubulin. *J Mol Biol* 2002; 316:817-28.

Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:277-302.

Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344:503-8.

Ogawa T, Nitta R, Okada Y, Hirokawa N. A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* 2004; 116:591-602.

Ohi R, Burbank K, Liu Q, Mitchison TJ. Nonredundant functions of Kinesin-13s during meiotic spindle assembly. *Curr Biol* 2007; 17:953-9.

Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2004; 15:2895-906.

Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990; 61:591-602.

Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 1994; 13:3772-81.

Rieder CL. The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *Int Rev Cytol* 1982; 79:1-58.

Rieder CL, Salmon ED. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8:310-8.

Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:255-61.

Rogers GC, Rogers SL, Schwimmer TA, Ems-McClung SC, Walczak CE, Vale RD, et al. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* 2004; 427:364-70.

Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell* 2001; 12:971-80.

Segerman B, Holmfeldt P, Morabito J, Cassimeris L, Gullberg M. Autonomous and phosphorylation-responsive microtubule-regulating activities of the N-terminus of Op18/stathmin. *J Cell Sci* 2003; 116:197-205.

Shimo A, Tanikawa C, Nishidate T, Lin ML, Matsuda K, Park JH, et al. Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008; 99:62-70.

Shiple K, Hekmat-Nejad M, Turner J, Moores C, Anderson R, Milligan R, et al. Structure of a kinesin microtubule depolymerization machine. *EMBO J* 2004; 23:1422-32.

Stout JR, Rizk RS, Kline SL, Walczak CE. Deciphering protein function during mitosis in PtK cells using RNAi. *BMC Cell Biol* 2006; 7:26.

Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*; 9:643-60.

Strebhardt K. Small molecules keep mitotic kinases in check. *ACS Chem Biol* 2006; 1:683-6.

Strebhardt K, Ullrich A. Another look at imatinib mesylate. *N Engl J Med* 2006; 355:2481-2.

Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:321-30.

Suijkerbuijk SJ, Kops GJ. Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786:24-31.

Tournebize R, Popov A, Kinoshita K, Ashford AJ, Rybina S, Pozniakovsky A, et al. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol* 2000; 2:13-9.

Vale RD, Fletterick RJ. The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13:745-77.

86. Vassilev LT, Tovar C, Chen S, Knezevic D, Zhao X, Sun H, et al. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:10660-5.

Walczak CE, Mitchison TJ, Desai A. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; 84:37-47.

Watts NR, Sackett DL, Ward RD, Miller MW, Wingfield PT, Stahl SS, et al. HIV-1 rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J Cell Biol* 2000; 150:349-60.

Wickstead B, Gull K. A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. *Mol Biol Cell* 2006; 17:1734-43.

Wordeman L, Mitchison TJ. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 1995; 128:95-104.

Wordeman L, Wagenbach M, von Dassow G. MCAK facilitates chromosome movement by promoting kinetochore microtubule turnover. *J Cell Biol* 2007; 179:869-79.

Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 1998; 12:2131-43.

Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsco E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002; 21:8282-92.

Yuan J, Horlin A, Hock B, Stutte HJ, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am J Pathol* 1997; 150:1165-72.

Yuan J, Kramer A, Matthess Y, Yan R, Spankuch B, Gatje R, et al. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo. *Oncogene* 2006; 25:1753-62.

Zhang X, Ems-McClung SC, Walczak CE. Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell* 2008; 19:2752-65.

Zhang X, Lan W, Ems-McClung SC, Stukenberg PT, Walczak CE. Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell* 2007; 18:3264-76.

Zhu C, Zhao J, Bibikova M, Levenson JD, Bossy-Wetzel E, Fan JB, et al. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3187-99.

Zhu C, Zhao J, Bibikova M, Levenson JD, Bossy-Wetzel E, Fan JB, et al. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell* 2005; 16:3187-99.

Publikationen

- 1 **Sanhaji, M.**, C. T. Friel, N. N. Kreis, A. Kramer, C. Martin, J. Howard, K. Strebhardt, and J. Yuan. Functional and spatial regulation of mitotic centromere-associated kinesin by cyclin-dependent kinase 1. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2594-607.

- 2 Kreis, N. N. *, **M. Sanhaji** *, A. Kramer, K. Sommer, F. Rodel, K. Strebhardt, and J. Yuan. Restoration of the tumor suppressor p53 by downregulating cyclin B1 in human papillomavirus 16/18-infected cancer cells. *Oncogene* 2010. (* equal contribution)

- 3 Vogt, E., **M. Sanhaji**, W. Klein, T. Seidel, L. Wordeman, and U. Eichenlaub-Ritter. MCAK is present at centromeres, midspindle and chiasmata and involved in silencing of the spindle assembly checkpoint in mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 2010.

- 4 Kreis, N. N., K. Sommer, **M. Sanhaji**, A. Kramer, Y. Matthes, M. Kaufmann, K. Strebhardt, and J. Yuan. Long-term downregulation of Polo-like kinase 1 increases the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). *Cell Cycle* 2009; 8:460-72.

- 5 Matthes, Y., M. Raab, **M. Sanhaji**, I. N. Lavrik, K. Strebhardt. Cdk1/cyclin B1 controls Fas-mediated apoptosis by regulating caspase-8 activity. *Mol Cell Biol* 2010. (in press)

- 6 Yuan, J., **M. Sanhaji**, A. Krämer, W. Reindl, M. Hoffman, N. N. Kreis, B. Zimmer, T. Berg, K. Strebhardt. Inhibition of the polo-box domain by the small molecule Poloxin activates the spindle checkpoint and inhibits tumor growth in vivo. *PNAS* 2010. (Submitted)

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Betreuung. Seine kritischen Denkanstöße unterstützten ein erfolgreiches Umsetzen dieses Projektes. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Manfred Kaufmann für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bereiter-Hahn möchte ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit im Rahmen des Fachbereichs Biologie der Johan-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt und für das Erstellen des Gutachtens danken.

Frau PD. Dr. Juping Yuan danke ich ganz besonders für die intensive Betreuung, für die kritischen Anmerkungen, die vielen neuen Ideen sowie die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen, die einen großen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit geleistet haben.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors danken, die durch ihre fachspezifische und private Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders Lisa Kunrunici-Csacsco, Brigitte Zimmer, Susanna Roth, Andrea Krämer, Yves Matthess und PD Dr. Monika Raab.

Besonderer Dank gebührt meinen geliebten Eltern, die nie aufgehört haben, an mich zu glauben und mich in guten und schlechten Zeiten unterstützt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit. Bei Kristina Ehrich möchte ich mich ebenfalls für die Geduld und die Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mohamed Mourad Sanhaji
Geburtsdatum	19.7.1977
Geburtsort	Rabat, Marokko
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Marokkanisch

Institutsadresse

Universitätsklinikum Frankfurt
Zentrum für Gynäkologie und Frauenheilkunde
Institut für Molekulare Gynäkologie
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Kurzprofil

Angestrebter Abschluss: Dr. phil. nat. im Fachbereich der Biowissenschaften in Frankfurt am Main
Diplom der Biologie an der Universität Bielefeld

Studium und Ausbildung

07/2006 – heute	J. W. Goethe-Universität, Universitätsklinikum Institut für Molekulare Gynäkologie Promotion der Biowissenschaften Thema: „ Funktionelle Regulation des Kinesins MCAK durch die Zellzyklus-Kinase Cyclin B1/CDK1“
04/2006	Diplom in Biologie an der Universität Bielefeld Thema: „ Untersuchung zur Funktion und Regulation von MCAK bei der Oozyten Reifung“

2002 - 2006	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
1995 – 2001	Studium der Biologie an der Universität Mohammed V (Rabat, Marokko) und an der Universität Bordeaux I (Bordeaux Frankreich)
1995	Abitur an der Hassan II Schule in Rabat

Wissenschaftliche Nebentätigkeiten

2008 – 2010	Dozent an der staatlichen Schule für die MTA-Ausbildung in Frankfurt am Main im Fach Molekularbiologie
2005 – 2006	Studentische Hilfskraft Betreuung von Praktikumsveranstaltungen und Seminaren

Sprachkenntnisse

Arabisch	Sehr gut
Französisch	Sehr gut
Deutsch	Sehr gut
Englisch	Gut

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den..31.08.2010..... ..

Mourad Sanhaji

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Funktionelle Regulation des Kinesins MCAK durch die Zellzyklus-Kinase Cyclin B1/CDK1“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt am Main, den 31. 08. 2010

.....
Mourad Sanhaji

