Für meine Mutter

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Silke Warnke
aus Rostock

Tag der mündlichen Prüfung:

Funktionelle Charakterisierung der humanen Polo-Kinase Plk2/Snk im Zell- und Centrosomenzyklus

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ingrid Hoffmann

Prof. Dr. Christine Clayton

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 1
1.1. Der eukaryontische Zellzyklus (Chromosomenzyklus) 1
1.2. Regulation des Zellzyklus 2
1.3. Regulation des G1/S-Überganges 4
1.4. "Checkpoints“ - die Kontrollpunkte des Zellzyklus 5
1.4.1. "Checkpoint“-Aktivierung nach Schädigung der DNA 6
1.4.2. Der Spindelkontrollpunkt 7
1.5. Der Centrosomenzyklus 7
1.5.1. Aufbau und Funktion der Centrosomen 8
1.5.2. Regulation des Centrosomenzyklus 10
1.6. Die Proteinfamilie der Polo-Kinasen 12
1.6.1. Struktur und Regulation der humanen Polo-Kinasen 13
1.6.2. Die Polo-Kinasen der Säugerzellen 15
1.6.2.1. Plk1 16
1.6.2.2. Plk2 17
1.6.2.3. Plk3 19
1.6.2.4. Plk4 19
2. Zielsetzung 20
3. Material und Methoden 21
3.1. Spezielle Reagenzien, Chemikalien und Lösungen 21
3.2. Radiochemikalien 22
3.3. Puffer und Lösungen 22
3.4. Kommerzielle Kits 23
3.5. GST-Fusionsproteine 23
4. Expressionsvektoren und Plasmide 24
5. Methoden 26
5.1. Zellbiologische Methoden 26
5.1.1. Standardkultivierung der Zellen 26
5.1.2. Steriles Einfrieren und Auftauen von Zellen 26
5.1.3. Bestimmung der Zellzahl 27
5.1.4. Synchronisation der Zellen 27
5.1.4.1. Arrest in der G0-Phase durch Serumentzug 28
5.1.4.2. Synchronisation durch Zugabe von Hemmstoffen 28
5.1.4.3. Centrosomen Verdopplungs-Assay 29
5.1.5. Durchflußzytometrische Analyse (FACS) 30
5.1.5.1. Fixierung und Färbung der Zellen für die FACS-Analyse 30
5.1.6. Transfektion 31
5.1.6.1. Transiente Transfektionen mit Effectene 32
5.1.6.2. Transiente Transfektionen mit Lipofectamine 2000 32
5.1.6.3. Transiente Transfektionen nach der Kalziumphosphat-Methode 33
5.1.6.4. Stabile Transfektionen 34
5.1.7. Herstellung einer Plk2-induzierbaren stabilen Zelllinie 34
5.1.8. Mikroinjektion von Antikörpern 35
5.1.9. RNA-Interferenz 35
5.1.10. Immunfluoreszenz 36
5.1.10.1. Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd 37
5.1.10.2. Alkoholische Fixierung 37
5.1.10.3. Antikörperfärbung 37
5.2. Molekularbiologische Methoden 38
5.2.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 38
5.2.2. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock 39
5.2.3. Plasmidisolierung mit Qiagen-Säulen 39
5.2.4. Aufreinigung von Plasmiden im Cäsiumchloridgradienten 40

5.2.5. Bestimmung der DNA-Konzentration 41
5.2.6. Aufreinigung der DNA im Minimaßstab 42
5.2.7. Isolierung der DNA aus Gelfragmenten 42
5.2.8. Klonierung und Ligation 43
5.2.9. Hybridisierung von Oligonukleotiden 44
5.2.10. Klenow-Reaktion 44
5.2.11. Ortsspezifische Mutagenese 45
5.2.12. Herstellung von Vektoren 46
5.2.13. *In vitro* Transkription und Translation 47
5.2.14. *In vitro* Bindungsstudien 48
5.3. Biochemische Methoden 50
5.3.1. Präparation von Zellextrakten 50
5.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford 50
5.3.3. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE 51
5.3.4. Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western-Blot) 52
5.3.5. Immunblot-Verfahren 53
5.3.6. Immunpräzipitation 53
5.3.7. Messung der Kinaseaktivität 54
5.3.8. Affinitätsreinigung von Antikörpern 55
5.3.9. Antikörper 57
5.4. Zwei-Hybrid-Technik (Yeast-Two-Hybrid Screen) 58
5.4.1. Durchführung des Zwei-Hybrid-Screens in Hefe 59
6. Ergebnisse 60
6.1. Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen die humane Plk2-Kinase 60
6.1.1. Western-Blot-Analyse der Plk2-Antikörper 60
6.1.2. Immunpräzipitation der Plk2-Kinaseaktivität 62
6.2. Konstruktion einer inaktiven Mutante der Plk2-Kinase 63
6.3. Expression und Aktivität von endogenen Plk2 65
6.3.1. Vergleich der Aktivitäten von Plk2 und Cyclin E/Cdk2 in HeLa-Zellen 66
6.3.2. Aktivität und Expression von Plk2 in humanen Fibroblasten (Hs68) 68
6.4. Funktionelle Analyse der Plk2-Kinase 70
6.4.1. Untersuchungen zur Rolle von Plk2 im Zellzyklus 70
6.4.1.1. Die Mikroinjektion spezifischer Antikörper gegen die Plk2-Kinase verhindert den Eintritt von Fibroblasten in die S-Phase 70
6.4.1.2. Auswirkung der Herunterregulation des Plk2-Proteins auf die Verteilung der Zellzyklusphasen 73
6.4.2. Die Rolle von Plk2 im Centrosomenzyklus 77
6.4.2.1. Plk2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Centrosomen-Duplikation 77
6.4.2.2. Plk2-K111R bindet an die Centriolen und hemmt deren Überduplikation in CHO-Zellen 80
6.4.2.3. Plk2 ist beteiligt bei der Duplikation der Centriolen in humanen Fibroblasten 82
6.5. Identifizierung von Substraten der Plk2-Kinase 83
6.5.1. Etablierung einer Plk2-induzierbaren Zelllinie 83
6.5.2. Zwei-Hybrid-Screen in Hefe mit Plk2 als Köderprotein 86
6.5.2.1. Die Plk2-K111R-Mutante verursacht keine autonome Aktivierung der Reportergene und wird in Hefe exprimiert 88
6.5.2.2. Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Screens in Hefe mit Plk2-K111R 89
6.6. Analyse der Interaktion von Plk2 mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb 90
6.6.1 Plk2 bindet direkt an c-Myb *in vitro* 90
6.6.2 Die Plk2-Kinase phosphoryliert c-Myb *in vitro* 91
6.6.3 Plk2 interagiert spezifisch mit der carboxyl-terminalen Domäne von c-Myb 93
6.6.4 Plk2 interagiert mit c-Myb *in vivo* 94

6.6.5 Expression von Plk2 in Jurkat-Zellen 96
7. Diskussion 97
7.1. Aktivierung der humanen Polo-Kinase Plk2 in der späten G1-Phase des Zellzyklus von HeLa-Zellen 97
7.2. Die Funktion von Plk2 am G0/S-Übergang in humanen Fibroblasten 98
7.3. Die Rolle von Plk2 bei der Regulation der Centriolen-Dupikation 100
7.4. Ist die Plk2-Kinase essentiell für den G1/S-Übergang? 104
7.5. Der Transkriptionsfaktor c-Myb als mögliches *in vivo* Substrat der Plk2-Kinase 105
7.6. Ausblick 107
8. Zusammenfassung 109
9. Summary 111
10. Abbildungsverzeichnis 112
11. Abkürzungsverzeichnis 114
12. Tabellenverzeichnis 116
13. Literaturverzeichnis 117

1. Einleitung

1.1. Der eukaryontische Zellzyklus (Chromosomenzyklus)

Der Zellzyklus ist der Weg aller Lebewesen, sich zu vermehren, indem sie ihr genetisches Material verdoppeln und sich anschließend teilen. Voraussetzung dafür ist die akkurate Replikation der Chromosomen und deren korrekte Verteilung auf die Tocherzellen. Deshalb hat sich der eukaryontische Zellzyklus im Laufe der Evolution zu einem hochregulierten, sehr komplexen Mechanismus entwickelt. Fehlregulationen dieser Mechanismen können zu genetischer Instabilität führen und damit zur Entstehung von Krebs beitragen. Auch Störungen bei der Verteilung der Chromosomen können zu schweren Erkrankungen führen. So ist das Down-Syndrom auf eine Störung der Trennung der Chromosomen zurückzuführen, wobei drei anstelle von zwei Kopien des Chromosoms 21 in der Zelle vorhanden sind.

Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus ist in vier Phasen, der G1-, S-, G2- und M-Phase, untergliedert. Dabei sind die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen irreversibel, so dass der Zellzyklus nur in eine Richtung voranschreiten kann.

In der G1-Phase (g = gap (engl): Lücke) findet das eigentliche Wachstum statt. Abhängig von Wachstumsfaktoren oder Hormonen sowie der Verfügbarkeit von Nährstoffen wächst die Zelle heran und bereitet sich auf die anschließende DNA-Replikation vor, indem sie sicherstellt, dass genügend Ressourcen für die DNA-Synthese vorhanden sind und keine Schädigung der DNA vorliegt. Am Ende der G1-Phase liegt der Restriktionspunkt (R, in Hefe auch als Start bezeichnet), an dem die Zelle eine "Alles- oder Nichts- Entscheidung“ fällt. Nach Überschreiten dieses Restriktionspunkt, wird der weitere Zellzyklus komplett vollzogen, unabhängig vom Nährstoffangebot und dem eventuell späteren Fehlen von Wachstumsfaktoren. In der anschließenden S (**S**ynthese)-Phase wird der DNA-Gehalt verdoppelt. Die doppelsträngige DNA wird durch Helikasen aufgewunden und durch die DNA-Polymerase repliziert. Dies erfolgt semi-konservativ, da von beiden Strängen ausgehend je eine neuer komplementärer Strang synthetisiert wird. Die nachfolgende G2-Phase stellt eine weitere Sicherheitspause sowie Wachstumsphase dar. Hier prüft die Zelle, ob die Replikation der DNA korrekt und vollständig ausgeführt wurde. Die Zelle nimmt dabei durch RNA- bzw. Proteinsynthese an Volumen zu und bereitet sich auf die M-Phase vor. Während der M-Phase findet zuerst die Kernteilung (Mitose) und dann die Zellteilung (Zytokinese) statt. Aufgrund der charakteristischen Morphologie der Zelle unterscheidet man fünf Stadien der Mitose, die als Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase bezeichnet werden. In der Prophase fängt sowohl die Kondensation des Chromatins zu einzelnen

Chromosomen als auch der Aufbau des bipolaren Spindelapparates an. Daraufhin folgt in der Prometaphase die Auflösung der Kernmembran. Gleichzeitig treten die Mikrotubulifasern der Spindel mit den Chromosomen in Kontakt. Nun beginnen sich die Schwesterchromatiden in der Äquatorialebene anzuordnen (Metaphase) und es wird überprüft, ob die beiden Kinetochore eines jeden Chromosomes mit Mikrotubuli von beiden Polen verbunden sind. Erst dann wird die Anaphase eingleitet, in der mit Hilfe des Spindelapparates die Schwesterchromatiden getrennt werden und diese sich zu den entgegengesetzten Polen der Zelle bewegen. Abschließend wird in der Telophase um jeden der zwei Chromosomensätze eine neue Kernmembran gebildet und die Chromosomen dekondensieren sich. Damit zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen, wird nun in der Zytokinese das Zytoplasma geteilt, indem es zu einer Abschnürung zwischen den Tochterzellen durch die Wirkung von Aktinfilamenten kommt.
Zellen können den Zellzyklus zeitweilig (bei geringen Nährstoffangebot) oder permanent, zum Beispiel bei einer terminalen Differenzierung (Nervenzellen, Erythrozyten), verlassen und in einen Ruhezustand, die G0-Phase, eintreten. Dies geschieht gewöhnlich in der G1-Phase bevor der Restriktionspunkt überlaufen wird. In der G0-Phase findet zwar weiterhin RNA- und Proteinsynthese statt, die Zellgröße verändert sich allerdings nicht. Manche Zelltypen, wie Lymphozyten oder Leberzellen können zum Beispiel nach Schädigungen von Gewebe durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren beziehungsweise Hormonen oder durch Antigene (Lymphozyten) zum Wiedereintritt in die G1-Phase bewegt werden. Die Stimuli binden an spezifische Rezeptoren der Zytoplasmamembran und lösen dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Des weitern bestimmt der Kontakt zur Nachbarzelle und zur extrazellulären Matrix, sowie die Lage der Zelle im Zellverband über Zellwachstum und Differenzierung. Diese Prozesse sind streng reguliert, um die Zellzahl in einem mehrzelligen Organismus zu kontrollieren.

1.2. Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird als Einheit durch ein Zellzyklus-Kontrollsystem koordiniert, welches sich aus periodisch ablaufenden biochemischen Prozessen zusammensetzt, an denen eine Reihe von sich gegenseitig beeinflussenden Proteinen, im besonderen Kinasen und Phosphatasen, beteiligt sind. Dabei ist das umkehrbare Hinzufügen von Phosphatgruppen an Proteine ein prinzipieller Weg, wie in der Zelle die Proteinaktivität reguliert wird. Durch Phosphorylierungen werden die Enzymaktivitäten sowie die Lokalisation von Proteinen beeinflusst, Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und Bindungsstellen in den phosphorylierten Proteinen induziert.

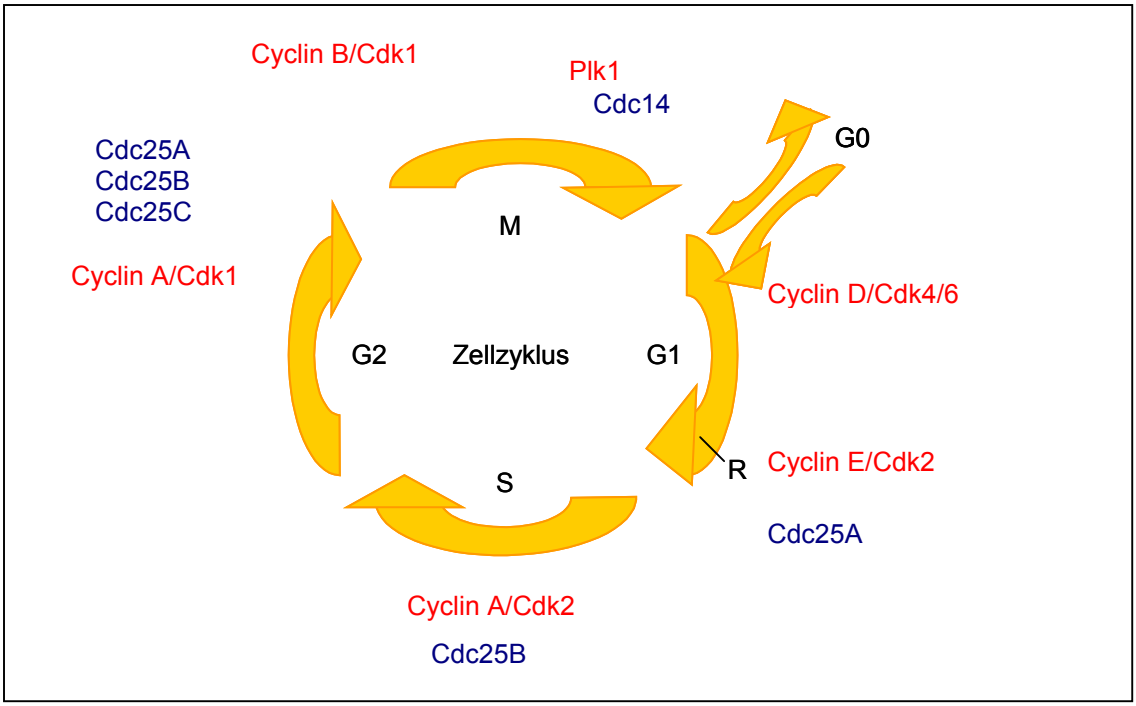

Abbildung 1: Schematische Darstellung des eukaryontischen Zellzyklus.

Der eukaryontische Zellzyklus besteht aus 4 Phasen (G1-, S-, G2- und M-Phase). In jeder Phase des Zellzyklus wird dieser durch Proteinkinasen (rot) und Phosphatasen (blau) reguliert. Hauptregulatoren des Zellzyklus sind Komplexe bestehend aus Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) und phasenspezifischen Cyclinen, die die Ereignisse innerhalb der Phasen bzw. Phasenübergänge kontrollieren.

Mit der Entdeckung des cdc2^{+}-Gens in *Schizosaccharomyces pombe*, welches für eine Cyclin-abhängige Kinase (Cdk) codiert [1], und der Entdeckung der Cycline in Eiern mariner Invertebraten [2] wurden zwei wichtige Proteinfamilien identifiziert, die eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Zellzyklus einnehmen. Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten exprimieren Hefen nur eine Cyclin-abhängige Kinase, die in *Saccharomyces cerevisiae* als Cdc28 [3] und in *Schizosaccharomyces pombe* als Cdc2 bezeichnet wird. Die funktionellen homologen Proteine in höheren Eukaryonten zu Cdc28/Cdc2 stellen Cdk2 am G1/S-Übergang bzw. Cdk1 am G2/M-Übergang dar. Um den Verlauf der einzelne Zellzyklusphasen zu steuern, lagern sich phasen-spezifische Cycline und die entsprechenden Cdks periodisch zu Komplexen zusammen, wobei die Cdks aktiviert werden und spezifische Substrate phosphorylieren (Abb.1). So wird die frühe G1-Phase durch die Cyclin D/Cdk4- bzw. Cyclin D/Cdk6-Komplexe reguliert. Der anschließende Eintritt in die S-Phase wird durch Cdk2 im Komplex mit Cyclin E gesteuert. Für den weiteren Verlauf der S-Phase sowie der G2-Phase ist Cyclin A im Komplex mit Cdk2 und später mit Cdk1 verantwortlich. Der G2/M-Übergang wird durch die Aktivität des Cyclin B/Cdk1-Komplexes initiiert, welcher auch als Reifefödererfaktor MPF(**m**-phase **p**romoting **f**actor) bezeichnet wird [4, 5].

Während die Cdks nicht auf Proteinebene reguliert werden, unterliegen die Cycline im Verlauf des Zellzyklus einem Kreislauf aus Synthese und Ubiquitin-vermittelter Proteolyse [2]. Dabei stellt die Ubiquitin-abhängige Proteolyse durch das 26S-Proteasom zentraler Mechanismus, um den Zellzyklus-Verlauf zu regulieren [6, 7]. Dieses System katalysiert die spezifische Polyubiquitinierung von Zellzyklus-Regulatoren, die dadurch vom Proteasom, einem zylinderförmigen Multiproteinkomplex, erkannt und ATP-abhängig degradiert werden. Bei der Regulation des Zellzyklus spielen zwei Ubiquitin-Ligasen eine wichtige Rolle, der SCF-Komplex (**S**kp1-**C**ullin **f**actor) am G1/S-Übergang und in den späteren Phasen der APC-Komplex ("**a**naphase-**p**romoting **c**omplex“).
In den letzten Jahren wurden andere Familien von Proteinkinasen (Abb.1, rot dargestellt) [8-10] und Phosphatasen (Abb.1, blau dargestellt) [11-12] identifiziert, die neben den Cdks eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen.

1.3. Regulation des G1/S-Überganges

Der G1/S-Übergang im Zellzyklus wird sehr genau reguliert. Bevor die DNA-Replikation eingeleitet wird, muss sichergestellt werden, dass genügend Nährstoffe für die bevorstehende DNA-Synthese vorhanden sind und dass die DNA unbeschädigt ist.
Um den Eintritt in die S-Phase zu ermöglichen, werden abhängig von den Cyclin D/Cdk4- bzw. Cyclin D/Cdk6-Komplexen in der frühen G1-Phase Transkriptionsfaktoren freigesetzt, indem das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein pRb durch die Cyclin D/Cdk4/6-Komplexe phosphoryliert wird. Dieses bildet zusammen mit p107 und p130 die Familie der "pocket"-Proteine [14, 15]. Die "pocket"-Proteine binden an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und verhindern so die Bindung dieser E2F-Proteine an die Promotorstrukturen von Zielgenen. Nach Phosphorylierung von pRb wird gebundenes E2F freigesetzt und bildet zusammen mit DP-Proteinen einen aktiven Transkriptionskomplex, der an so genannte E2F-Bindungsstellen auf der DNA binden kann. Die Bindung der E2F-Komplexe führt zur Aktivierung der Transkription von Genen, wie z.B. c-Myc, Cdc25A, Orc-Proteine, Cyclin A und Cyclin E, welche für den G1/S-Übergang bzw. für die S-Phase relevant sind [14, 15].
In der späten G1-Phase kommt es zur Aktivierung des Cyclin E/Cdk2-Komplexes, der den G1/S-Übergang steuert [16-17]. In der frühen G1-Phase bilden Cdk2 und Cyclin E einen inaktiven Komplex, da Phosphorylierungen an Thr-14 und Tyr-15 im Cdk2-Protein die Aktivierung des Komplexes verhindern. Durch Dephosphorylierung dieser Aminosäurereste durch die ebenfalls am G1/S-Übergang aktive Cdc25A-Phosphatase sowie Phosphorylierung [19-21] am Thr-160 durch die Cyclin-aktivierende Kinase (CAK) [22], wird der Cyclin E/Cdk2-Komplex aktiviert. Daraufhin kann die Phosphorylierung spezifischer Substrate erfolgen.

Bisher sind nur wenige Substrate von Cyclin E/Cdk2 identifiziert worden. Der Komplex phosphoryliert ebenfalls pRb und verstärkt somit die Freisetzung von E2F, wodurch die Cyclin E-Synthese erhöht wird sowie die Expression von Enzymen für die DNA- und Nukleotid-Synthese gefördert wird [23]. Als weiteres Substrat wurde der Cdk-Inhibitor p27 identifiziert, dessen Phosphorylierung zu seiner Ubiquitin-abhängigen Degradation führt [24]. Einige Daten sprechen dafür, dass Cdc25A ebenfalls ein Substrat des Cyclin E/Cdk2-Komplexes sein könnte und dass ein Rückkopplungsmechanismus wie zwischen Cdc25C und Cdk1 am G2/M-Übergang existiert. So wurde gezeigt, dass der Cyclin E/Cdk2-Komplex Cdc25A *in vitro* phosphorylieren und aktivieren kann [20]. Ob dies auch *in vivo* der Fall ist, konnte bisher noch nicht bestätigt werden. Alle diese Mechanismen dienen dazu, möglichst schnell viele aktive Cyclin E/Cdk2-Komplexe in der Zelle zu produzieren, um den Eintritt in die S-Phase einzuleiten.
Als weitere Substrate von Cyclin E/Cdk2 wurden kürzlich das NPAT-Protein [25], welches an der Aktivierung der Transkription der Histone beteiligt ist, sowie Cdc45 [26], einem sogenannten Rekrutierungs-Faktor für die DNA-Polymerase α, beschrieben. Um den fördernden Effekt für den Eintritt in die S-Phase von Cyclin E/Cdk2 zu erklären, sind aber noch andere Substrate zu identifizieren. Der Cyclin E/Cdk2-Komplex koordiniert also Histon-Synthese mit der Initierung der DNA-Replikation am G1/S-Übergang.
Interessant ist, dass sowohl die Deletion beider Cyclin E-Gene als auch die des Cdk2-Genes in der Maus zeigt, dass diese Proteine nicht essentiell für den embryonalen Zellzyklus sind. Das heißt, die Funktion kann von anderen Cdks in der Zelle übernommen werden. Aufgrund einiger Unterschiede im Phänotyp, ist anzunehmen, dass Cyclin E zusätzlich weitere Funktionen bei der Regulation des G1/S-Überganges ausübt, ohne dabei einen Komplex mit Cdk2 zu bilden [27, 28].

1.4. "Checkpoints“ - die Kontrollpunkte des Zellzyklus

Zur Sicherung von kritischen Ereignissen in der Zelle, wie der DNA-Replikation in der S-Phase oder der Trennung der Chromosomen während der Mitose, existieren überlebenswichtige Mechanismen, die als Kontrollpunkte oder "Checkpoints“ bezeichnet werden [29]. Treten in der Zelle Schäden an der DNA, Fehler in der DNA-Replikation oder Schädigungen am Spindelapparat auf, können diese Kontrollpunkte über verschiedene Signaltransduktionswege angeschaltet werden und führen zu einer Unterbrechung im Zellzyklus. Solche Schädigungen können in der Zelle durch externe Faktoren, wie zum Beispiel UV-Strahlung oder chemische Mutagene sowie durch interne Faktoren, wie Änderungen im DNA-Metabolismus oder freie Radikale, hervorgerufen werden.

Die Aktivierung dieser "Checkpoint“-Mechanismen dient dazu, Reparaturmechanismen anzuschalten, welche die auftretenden Schädigungen beseitigen bevor die Zelle in die nächste Phase eintritt oder aber bei irreparablen Schädigungen den Zelltod (Apoptose) einleitet. Um den Arrest zu induzieren, verhindern die "Checkpoint-Mechanismen“ die Aktivierung von Zellzyklusregulatoren.

1.4.1. "Checkpoint“-Aktivierung nach Schädigungen der DNA

Sofort nach dem Auftreten von DNA-Schäden in der G1- und S-Phase wird der Abbau von Cyclin D1 und der Cdc25A-Phosphatase durch das Ubiquitin/Proteasom-System induziert, wodurch es zum Zellzyklusarrest kommt. Durch den Abbau von Cyclin D1 kommt es aus dem Cyclin D1/Cdk4 bzw. Cdk6-Komplexes zu Freisetzung von p21 und p27, welche wiederum an den Cyclin E/Cdk2-Komplex binden und dessen Aktivierung verhindern. Die Cyclin A bzw. E/Cdk2-Aktivität wird weiterhin durch die inhibitorischen Phosphorylierungen an Thr14 und Tyr15 inaktiviert, da Cdc25A nach Phosphorylierung durch den ATM/Chk2- bzw. den ATR/Chk1-Weg degradiert wird und die inhibitorischen Phosphorylierungen nicht entfernt werden können [30, 30a]. Die Aufrechterhaltung des Arrestes erfordert die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch die ATM- oder ATR-Kinase. Durch Phosphorylierung wird die Bindung von p53 an MDM2 unterbunden. Dadurch wird p53 nicht aus dem Zellkern transportiert und degradiert. Als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 die Transkription von p21 und hemmt dadurch längerfristig die Cdk2-Aktivität [31].
In der G2-Phase wird nach Schädigungen der DNA ein Arrest durch ähnliche Mechanismen induziert. Hier kommt es zum Transport von Cdc25C aus dem Kern sowie zur Stabilisierung der Wee1-Kinase, wodurch die inhibitorischen Phosphorylierungen Thr-14 und Tyr-15 durch die Wee1-Kinase am Cyclin B/Cdk2-Komplex erhalten bleiben. Weiterhin wird die Polo-Kinase Plk1 durch einen ATM/ATR-abhängigen Mechanismus inaktiviert, wodurch die Zellen in G2 arretieren. Auch während der M-Phase kommt es nach DNA-Schädigungen zur Inhibierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes durch die inhibitorischen Phosphorylierungen, aufgrund des Abbaus von Cdc25A. Gleichzeitig findet die Dephosphorylierung von Histon H3 sowie die Dekondensation der Chromosomen statt, wodurch die geschädigten Zellen in ein G2-ähnliches Stadium zurückkehren [32].

1.4.2. Der Spindelkontrollpunkt

Eukaryotische Zellen koordinieren die Segregation der Chromosomen (Karyogenese) mit der Zellteilung (Zytokinese). In der Mitose wurden zwei Signalwege identifiziert, welche den Metaphase/Anaphase-Übergang sowie den Austritt aus der Mitose kontrollieren, um aneuploide Zellen und eine Missegregation der Chromosomen zu vermeiden [33].
Der Spindel-Kontrollpunkt inhibiert den Eintritt in die Anaphase. Erst wenn alle Chromosomen korrekt mit je einem Mikrotubuli von jedem Pol der bipolaren mitotischen Spindel verbunden sind, erfolgt die Trennung der Chromosomen. Der Kontakt zwischen Chromosom und Mikrotubuli findet in der Centromer-Region des Chromosom statt. Diese Region wird als Kinetochor bezeichnet, um die herum Proteine konzentriert sind. Wenn keine Verbindung zu den Mikrotubuli besteht, sind in den Kinetochoren Sensorproteine vorhanden, wie MAD1, MAD2, MAD3, BUB1, BUB3, Survivin und Mps1, welche die Aktivierung des APC-Komplexes und damit den Abbau von mitotischen Regulatoren, wie Securin und Cyclin B, inhibieren. Erst die Dissoziation dieser Proteine von den Kinetochoren führt zu Initiierung der Anaphase.
Die Regulation des Austritts aus der Mitose in höheren Eukaryonten ist noch nicht gut untersucht. In der Hefe *S. cerevisiae* wird der Austritt aus der Mitose durch das MEN-Netzwerk (**m**itotic **e**xit **n**etwork) reguliert [34]. Werden Komponenten dieses Netzwerkes inaktiviert, wird der Austritt aus der Mitose blockiert, da der mitotische Cyclin/Cdk-Komplex noch aktiv ist. Es wird angenommen, dass es ein ähnliches Netzwerk in höheren Eukaryonten existiert. Vermutlich sind sowohl die Polo-Kinase Plk1 als auch die Cdc14-Phosphatasen, ähnlich wie in Hefe, Regulatoren des mitotischen Austritts und der Zytokinese.

1.5. Der Centrosomenzyklus

Neben der DNA wird eine weitere Zellorganelle während des Zellzyklus verdoppelt und anschließend auf die Tochterzellen verteilt – die Centrosomem. Die Mechanismen zur Regulation der Anzahl der Centrosomen einer Zelle in Abhängigkeit vom Zellzyklus wird im Centrosomenzyklus (Abb. 3) beschrieben, der sicherstellt, dass sich die Centrosomen verdoppeln bevor sich die Zelle teilt. Für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität in sich teilenden Zellen wird die Duplikation der Centrosomen streng kontrolliert und mit den Phasen des Zellzyklus koordiniert. Deshalb sind an der Regulation des Centrosomenzyklus mehrere Familien von Proteinkinasen, wie z.B. Cdk's, Aurora-Kinasen, Polo-Kinasen und

NIMA („never in mitosis A“)-verwandte Kinasen beteiligt, die ebenfalls die Ereignisse des Chromosomenzyklus kontrollieren [8, 35].

1.5.1. Aufbau und Funktion der Centrosomen

Für die Organisation der Mikrotubuli in der Zelle gibt es sogenannte Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOC). Diese sind für die Orientierung der mitotischen Spindel sowie für den Ablauf der Zytokinese unabdingbar. Sie stabilisieren die langsam-wachsenden Minus-Enden der Mikrotubuli und bündeln diese um sich herum, was auch als "mikrotubuli-nucleating activity“ bezeichnet wird [36].
Centrosomen sind Bestandteil der Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOC) in Zellen von Vertebraten und das Äquivalent zu den Spindel-Pol-Körpern in Hefen. Ihre Hauptfunktionen sind die Bündelung der Enden der dünnen zytoplasmatischen Mikrotubuli des Zytoskeletts in Interphase-Zellen und der mitotischen Mikrotubuli für die exakte Positionierung der mitotischen Spindel während der M-Phase. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Centrosomen ebenfalls für die Initiierung der S-Phase, für die Beendigung der Zytokinese sowie die Etablierung von "Checkpoints“ wichig sind, indem sie Signalmoleküle um sich herum binden. In einigen tierischen Epithelzelltypen sowie in Pflanzen fehlen die Centrosomen in den MTOCs, was zeigt, dass Zellen auch ohne Centrosomen wachsen und sich teilen können [37].
Das Centrosom ist insofern untypisch, da es als einzige Zellorganelle nicht von einer Membran umgeben ist. Im Elektronenmikroskop erscheinen die Centrosomen als eine Ansammlung von sehr dichten Material, den Centriolen, welches von weniger dichten Material umgeben ist und als pericentrosomales Material (PCM) bezeichnet wird (Abb. 2). In jedem Centrosom sind zwei Centriolen vorhanden, die vergleichbar mit den Basalkörpern von Cillien der Flagellaten sind. Es handelt sich um zylinderförmige symmetrische Strukturen, die aus je neun Triplet-Mikrotubuli bestehen. Beide Centriolen liegen im rechten Winkel zueinander und sind am proximalen Ende miteinander verbunden. Die ältere Centriole hat zusätzliche Anhänge am distalen Ende und wird als Mutter-Centriole bezeichnet. Die exakte Funktion der Centriolen ist noch unklar, es wird aber angenommen, dass die Centriolen für die Ansammlung und Organisation der centrosomalen Komponenten in somatischen Zellen wichtig sind.
Um beide Centriolen herum ist die PCM konzentriert, welche aus einem faserartigen Maschenwerk sowie Aggregaten aus Proteinen aufgebaut ist. Die Matrix ist hoch dynamisch, da sich die Struktrur und Zusammensetzung während des Zellzyklus ändert. Sie enthält vorwiegend "Coiled-Coil“-Proteine, wie Pericentrin, die ein Gerüst für die sogenannten

Ankerproteine (AKAP: "A-kinase-anchoring proteins“) bilden, welche in Stabilisierung und Bündelung der Mikrotubuli sowie in die Bindung von Signalmolekülen involviert sind [38]. So wird das Ankerprotein Asp, ein mikrotubuli-assoziiertes Protein, am Ende der G2-Phase durch die Polo-Kinase Plk1 am Centrosom phosphoryliert [39]. Dadurch werden γ-Tubulin-Ringkomplexe, die in allen MTOCs zu finden sind, vermehrt an die Centrosomen rekrutiert. Diese wiederum sind für die Polymerisation der heterodimeren $\alpha\beta$-Tubulin-Untereinheiten verantwortlich, wodurch die Minus-Enden der Mikrotubuli der mitotischen Spindel stabilisiert werden und um das Centrosom herum gebündelt werden. Die Bindung der Mikrotubuli an das Centrosom erfolgt dann über Ninein und Centriolin, welche an den Minus-Enden der Mikrotubuli gebunden sind.

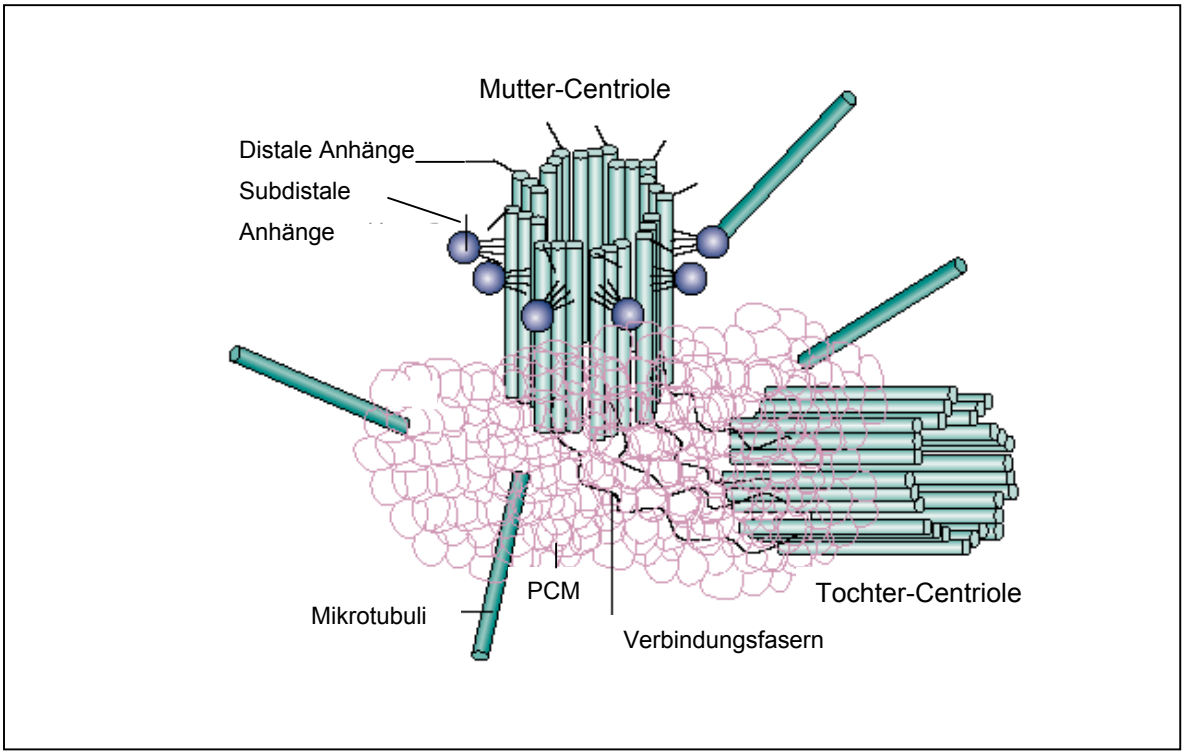

Abbildung 2: Aufbau eines Centrosoms.

Dargestellt ist ein Centriolen-Paar, welches von pericentriolaren Material (PCM) umgeben ist. Dabei konzentrieren sich die Enden der Mikrotubuli um die Centriolen herum. Nur die Mutter-Centriole hat Anhänge, die auch Kontakt zu den Mikrotubuli haben. Zwischen den Centriolen existieren Fasern, die beide Centriolen miteinander verbinden (Abbildung von S. Doxsey, [40]).

Jede Zelle besitzt zwei Centrosomen, wodurch während der Mitose eine Bipolarität in der Zelle zustande kommt, die ein wichtiges Charakteristikum der mitotischen Spindel darstellt. Nach der Mitose erhält jede Tochterzelle ein Centrosom. Aus diesem Grund muss das Centrosom im Verlauf der folgenden Interphase dupliziert werden. Ähnlich wie die DNA wird das Centrosom genau einmal während des Zellzyklus verdoppelt. Erfolgt keine Verdopplung des Centrosoms, kommt es zur Ausbildung einer monopolaren Spindel. Dadurch kann die

Kernteilung sowie die Zytokinese nicht korrekt ablaufen, wodurch polyploide Zellen entstehen können. Dupliziert sich das Centrosom dagegen mehr als einmal pro Zellzyklus, so bildet sich in der Mitose eine multipolare Spindel aus, was zu einer ungleichen Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen führen kann. In beiden Fällen kann die Deregulation der Centrosomen-Duplikation zu genetischer Instabilität sowie aneuploiden Zellen führen und kann dadurch potentiell zur Entstehung eines Tumors beitragen. So ist gezeigt worden, dass Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen eine erhöhte Anzahl von Centrosomen besitzen [40]. Auch die Abwesenheit des Tumorsuppressorproteins p53 korreliert mit einer erhöhten Anzahl von Centrosomen in der Zelle [41]. Aus diesem Grund ist der Prozess der Centrosomen-Duplikation bedeutend für die Ätiologie von Krebs.

1.5.2. Regulation des Centrosomenzyklus

In Säugerzellen beginnt der Prozess der Verdopplung der Centrosomen in der späten G1-Phase, wobei die orthogonale Verbindung zwischen der Mutter-Centriole und der Tochter-Centriole aufgehoben wird, wodurch sich beide Centriolen geringfügig voneinander entfernen (Abb. 3). Dieser Prozess wird auch als Disorientierung oder "Splitting“ der Centriolen bezeichnet und wird durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex reguliert [42]. Der Cyclin E/Cdk2-Komplex phosphoryliert die Proteine CP110 [43] und Nukleophosmin [44] am Centrosom. Nucleophosmin dissoziiert dadurch vom Centrosom und leitet eine neue Runde der Centrosomen-Duplikation ein. Des weiteren phosphoryliert die Cyclin E/Cdk2-Kinase das Rb-Protein, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F aus dem Komplex mit Rb freigesetzt wird. Dieser wird anschließend in den Nukleus transportiert und aktiviert die Transkription von S-Phase-Genen, deren Produkte sowohl für die Regulation der DNA-Replikation als auch für die Centrosomen-Verdopplung essentiell sind [46].

Parallel dazu, ist der rapide Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration am G_1/S-Übergang als "Trigger“ für die Initiation der Centrosomen-Duplikation verantwortlich, wodurch die Calmodulin-abhängige Kinase II (Abb. 3) aktiviert wird [47]. Diese reguliert ebenfalls die Prozesse am G1/S-Übergang. Des weitern ist der SCF-Komplex limitierend für die Centrosomen-Duplikation. Die Mutation von SCF-Komponenten in der Maus und in *Drosophila* führt zu vermehrten Verdopplung der Centrosomen [48, 49].

Während der S-Phase und G2-Phase wachsen die neuen Centriolen weiter. Dieser Prozess ist abhängig von der Cyclin A/Cdk2-Aktivität [46]. Centrosomale Substrate von Cyclin A/Cdk2 wurden bisher noch nicht identifiziert. Es wird vermutet, dass der Cyclin A/Cdk2-Komplex den phosphorylierten Status von Nucleophosmin aufrechterhält. Die Proteine für den Aufbau

der neuen Centriole, wie z. Bsp. Pericentrin, Centrin und Ninein, werden durch Dynein Mikrotubuli-abhängig zum Centrosom transportiert [50].

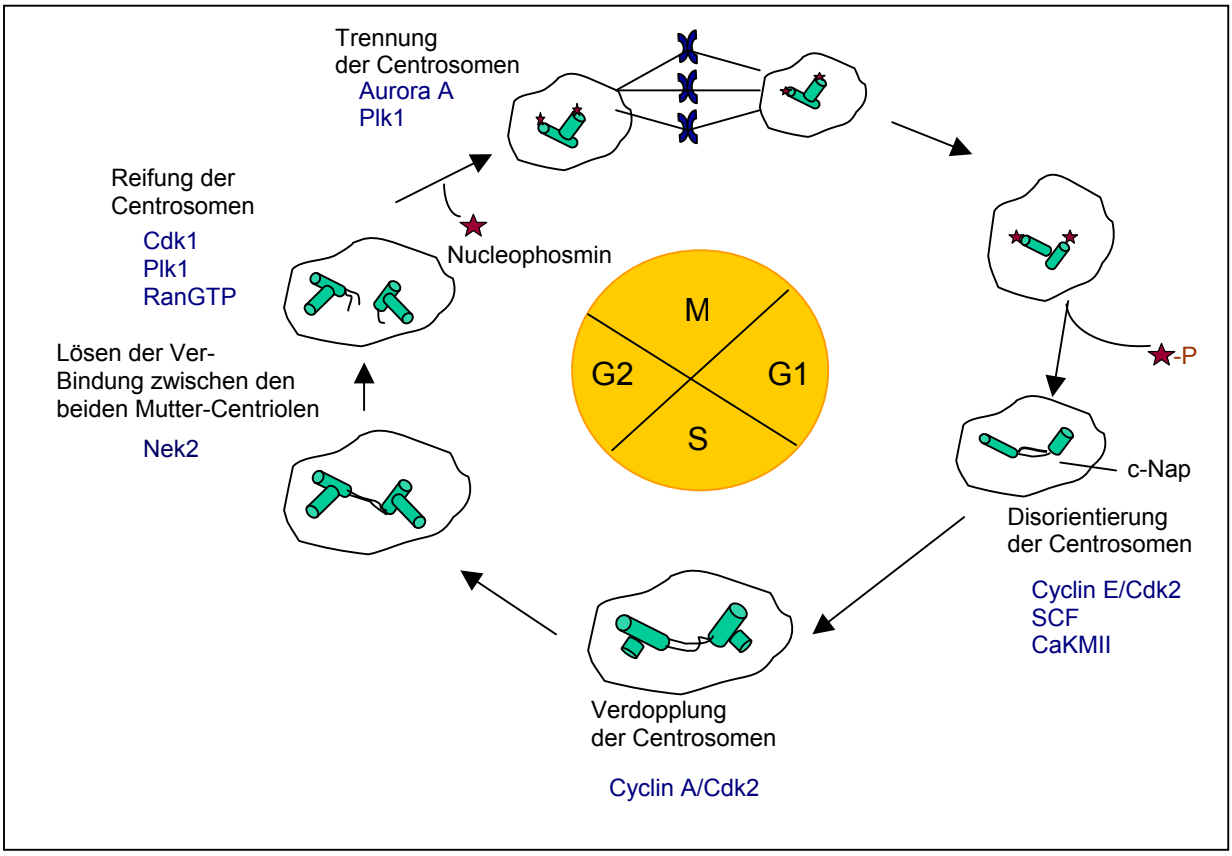

Abbildung 3: Regulation des Centrosomenzyklus.

Der Verlauf des Centrosomenzyklus ist eng an den Chromosomenzyklus gekoppelt. Ähnlich wie die DNA werden die Centrosomen im Verlauf des Zellzyklus dupliziert und anschließend auf die Tochterzellen verteilt. Dabei liegen die beiden Centriolen eines Centrosoms eng beeinander. Erst im Verlauf der G1-Phase entfernen sich die Centrosomen geringfügig voneinander (Disorientierung), damit die Centrosomen-Duplikation am G1/S-Übergang eingeleitet werden kann. Dabei wächst eine neue Procentriole am proximalen Ende der Mutter-Centriole. Während der S-Phase wächst die neue Centriole und erreicht ihre volle Größe in der G2-Phase. Die Duplikation und Reifung der Centriolen ist abgeschlossen, wenn Proteine wie Ninein und Cenexin an der neuen Centriole gebunden sind. Am G2/M-Übergang expandiert das PCM (pericentriolares Material) und es werden viele der centrosomalen Proteine phosphoryliert, damit vermehrt Mikrotubuli der mitotischen Spindel um die Centrosomen gebündelt werden können. Dieser Prozess wird auch als Reifung der Centrosomen bezeichnet. Während dieses Prozesses wird auch die Verbindung zwischen den beiden Mutter-Centriolen, welche hauptsächlich aus dem Protein c-Nap1 besteht, gelöst, indem c-Nap1 durch die Nek2-Kinase phosphoryliert wird und anschließend vom Centrosom dissoziiert. Im Anschluss wandern die nun separaten Centrosomen zu den entgegengesetzten Seiten des Zellkerns und später zu den entgegengesetzten Polen der Zelle (Separation), um die mitotische Spindel korrekt auszurichten.

Die Centrosomen erreichen ihre volle Größe am Beginn der Mitose und es werden vermehrt Signalmoleküle sowie γ-Tubulin-Komplexe rekrutiert. In diese Prozesse sind verschiedene mitotische Kinasen involviert (Abb. 3). In der Prophase wird durch den chromatin-gebundenen Nukleotid-Austausch-Faktor RCC1 hohe Mengen an Ran-GTP produziert, wodurch Signalmoleküle wie NuMA und TPX2 vom Importin dissoziieren welche dann zu den

Polen der Zelle transportiert werden und bei der Formation der Aster aus Mikrotubuli um das Centrosom herum beteiligt sind [51, 52]. NuMA bildet ein Gitter zwischen den Centrosomen und den Minus-Enden der Mikrotubuli und stabilisiert diese [53]. TPX2 ist in die Aktivierung von Aurora A involviert [54], indem es die Protein-Phosphatase 1 (PP1) inhibiert und interagiert mit dem Motorprotein Xklp1 [55]. Aurora A wiederum phosphoryliert Substrate, wie D-TACC, am Centrosom und ist dadurch bei der Reifung der Centrosomen beteiligt [56].
Die Trennung der beiden reifen Centriolenpaare zu Beginn der Mitose erfolgt in zwei voneinander unabhängigen Schritten. Ausgelöst wird diese Trennung durch die Aktivierung der NIMA-verwandten Kinase Nek2 [57]. Am zweiten Schritt sind mehrere Motorproteine beteiligt (z.B. Eg5), welche die ATP-abhängige Trennung der Centrosomen entlang von Mikrotubuli vermitteln [58]. In der folgenden Mitose assoziiert Nucleophosmin wieder mit den Spindelpolen, möglicherweise als Antwort auf die erhöhte Cyclin B/Cdk1-Aktivität [59].

1.6. Die Proteinfamilie der Polo-Kinasen

Polo-Kinasen stellen eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen dar, die sich strukturell von den Cyclin-abhänigen Kinasen unterscheiden und als Regulatoren des Zell- und Centrosomenzyklus identifiziert wurden. Die Familie wurde nach dem Polo-Gen, welches in *Drosophila melanogaster* zuerst beschrieben wurde, benannt [60]. Die Mutation dieses Genes in Neuroblasten von Drosophila-Larven führt zu mitotischen Defekten. Es wurden monopolare sowie auch multipolare mitotische Spindeln und eine abnormale Segregation der Chromosomen sowohl während der Mitose als auch während der Meiose beobachtet. Dies ließ eine Funktion von Polo-Kinasen während der Mitose vermuten [61].
Inzwischen wurden Polo-Kinasen in vielen eukaryontischen Organismen beschrieben, wobei Hefen nur eine Polo-Kinase, höhere Eukaryonten dagegen mehrere Polo-Kinasen exprimieren (Tabelle 1). Bis jetzt wurden hauptsächlich mitotische Funktionen für Polo-Kinasen beobachtet. Eine Studie über Cdc5p, das strukturelle und funktionelle Homolog von Polo in *S.cerevisiae*, welches ebenfalls an der Ausbildung der mitotischen Spindel beteiligt ist und den Austritt aus der Mitose reguliert [62], beschreibt zusätzlich eine zweite Funktion während der S-Phase [63].

Organismus	Name der Kinase	Funktion
Drosophila melanogaster	Polo Sak	Regulation der M-Phase Korrekte Orientierung der Spindel [61] ?
Saccharomyces cerevisiae	Cdc5p	Metaphase/Anaphase-Übergang [64] Austritt aus der Mitose durch Regulation des MEN („mitotic exit network“) [65]
Schizosaccharomyces pombe	Plo1p	Spindel-Formation und Septen-Bildung [66] Regulation des SIN ("septum-inducing network") [67]
Caenorhabditis elegans	Plc1 Plc2 Plc2	Regulation der M-Phase [68] ? ?
Xenopus laevis	Plx1 Plx2 Plx3	Regulation der M-Phase [69] ? embryonale Entwicklung [70] ? embryonale Entwicklung [70]
Homo sapiens	Plk1 Plk2 (Snk) Plk3 (Prk/Fnk) Plk4 (Sak)	Regulation der M-Phase (s. auch Abb. 6) ? (identifiziert als frühes Gen) Regulation der synaptischen Plastizität in Neuronen Aktivierung ATM/Chk2-Signalweg nach DNA- oder Spindel-Schädigung Regulation der synaptischen Plastizität Embryonale Entwichklung Zytokinese

Tabelle 1: Polo-Kinasen der verschiedenen Organismen und ihre Funktion im Zellzyklus.

1.6.1. Struktur und Regulation der humanen Polo-Kinasen

Alle Polo-Kinasen sind durch eine konservierte katalytische Domäne am amino-terminalen Ende und eine Sequenz, die sogenannte Polo-Box-Domäne (PBD), am carboxyl-terminalen Ende (Abb. 4) charakterisiert. Im Vergleich zu anderen Ser/Thr-Kinasen besitzt die Subdomäne I der katalytischen Domäne statt des üblichen GxGxxGxV-Motivs ein GxGGFAxC-Motiv. Außerdem wurde in der Subdomäne VIII („T-loop“ oder Aktivierungssegment) von Plk1 ein konservierter Threonin-Rest Thr-210 identifiziert [71], der essentiell für die Kinase-Funktion ist und eine aktivierende Phosphorylierungsstelle darstellt. Unklar ist, ob die Phosphorylierung durch eine andere Kinase oder durch Plk1 (Autophosphorylierung) ausgeführt wird.

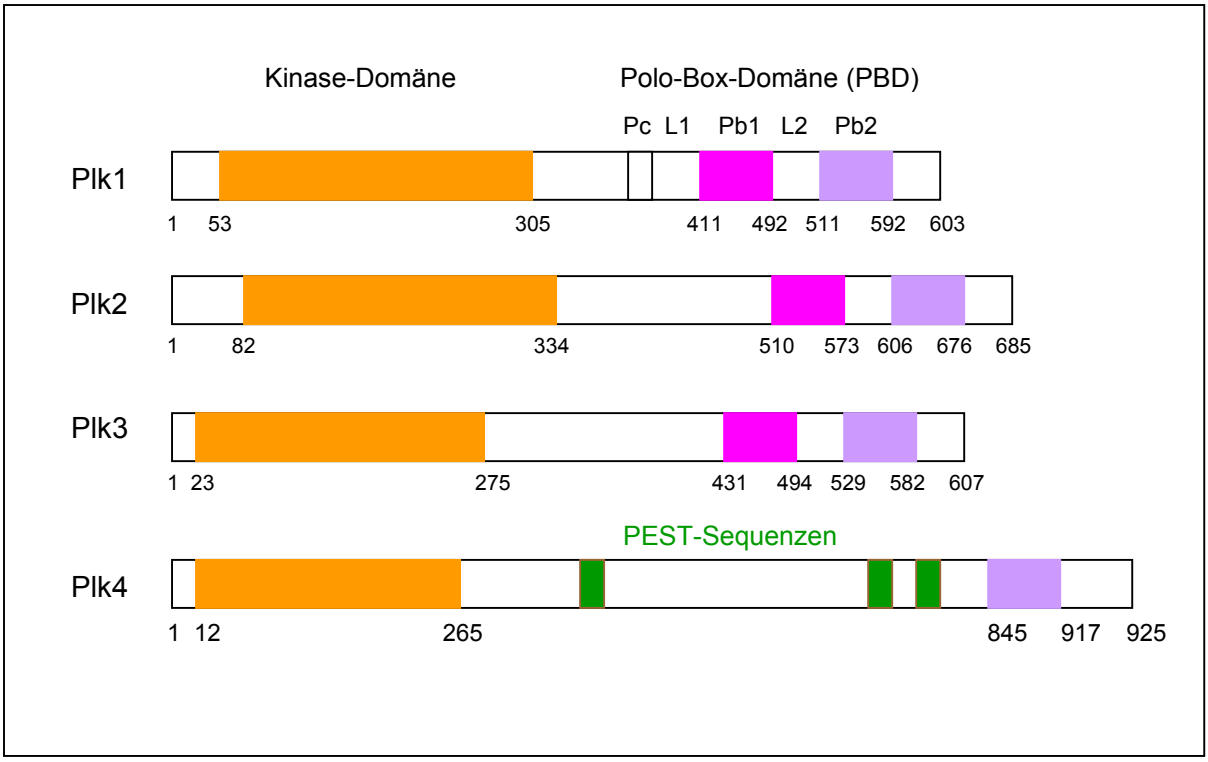

Abbildung 4: Struktur der Polo-Kinasen.

Domänen-Struktur der humanen Polo-Kinasen. Die Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine amino-terminale Kinase-Domäne und durch die Polo-Box-Domäne (PDB) am carboxyl-terminalen Ende. Diese besteht aus einer (Plk4) oder zwei (Plk1, Plk2 und Plk 3) Polo-Boxen (Polo Box 1, Pb1 und Polo Box 2, Pb2) sowie einer Polo-Kappen-Region („Polo-cap region“ = Pc). Zwischen den Poloboxen und zwischen der Pc-Region und der Pb1 befinden sich die sogenannten „Linker“-Strukturen (L1 und L2), die wichtig für die Stabilisierung der Bindung zwischen Phosphopetid und PBD sind. Plk4 besitzt zusätzlich drei PEST-Sequenzen, welche die Ubiquitin-abhängige Degradation des Proteins in der G1-Phase vermitteln.

Die Polo-Box-Domäne (PBD) stellt ein spezifisches Proteinmotiv dar, welches nur in Polo-Kinasen vorkommt. Sie vermittelt die Bindung von Polo-Kinasen an die mitotischen Strukturen sowie an die entsprechenden Substrate. Dabei ist die PBD eine Phosphopetid-Bindungsdomäne, ähnlich wie die SH_2-Domäne in Tyrosinkinasen oder den Binungsdomänen in 14-3-3-Proteinen, die speziell an phosphorylierte Proteine binden [72-74]. Dabei bestehen beide Polo-Boxen aus einer $\beta_6\alpha$-Struktur (β = β-Faltblatt, α = α-Helix) und bilden eine Tasche, in der die Interaktion mit dem Phosphopetid stattfindet (Abb. 5). Als optimale Bindungsstelle für Polo-Kinasen wurde die Sequenz S-pT/pS-P/x identifiziert. Dabei ist ein Serin in Position –1 unbedingt erforderlich, während das Prolin an Position +1 nicht essentiell ist. Dieses Motiv findet sich in vielen mitotischen Proteinen wieder, welche während der Mitose bevorzugt durch prolin-gerichtete Kinasen, wie Cdk1 oder MAP-Kinasen, phosphoryliert werden. So wird die Cdc25C-Phosphatase am Threonin-130 durch Cyclin B/Cdk1 phosphoryliert, wodurch Plk1 an Cdc25C binden kann und weitere Cdc25C-Moleküle aktiviert, welche wiederum Cyclin B/Cdk1-Komplexe aktivieren. Diese Proteine bilden am

G2/M-Übergang einen Rückkopplungsmechanismus, wodurch der Eintritt in die M-Phase eingeleitet wird.

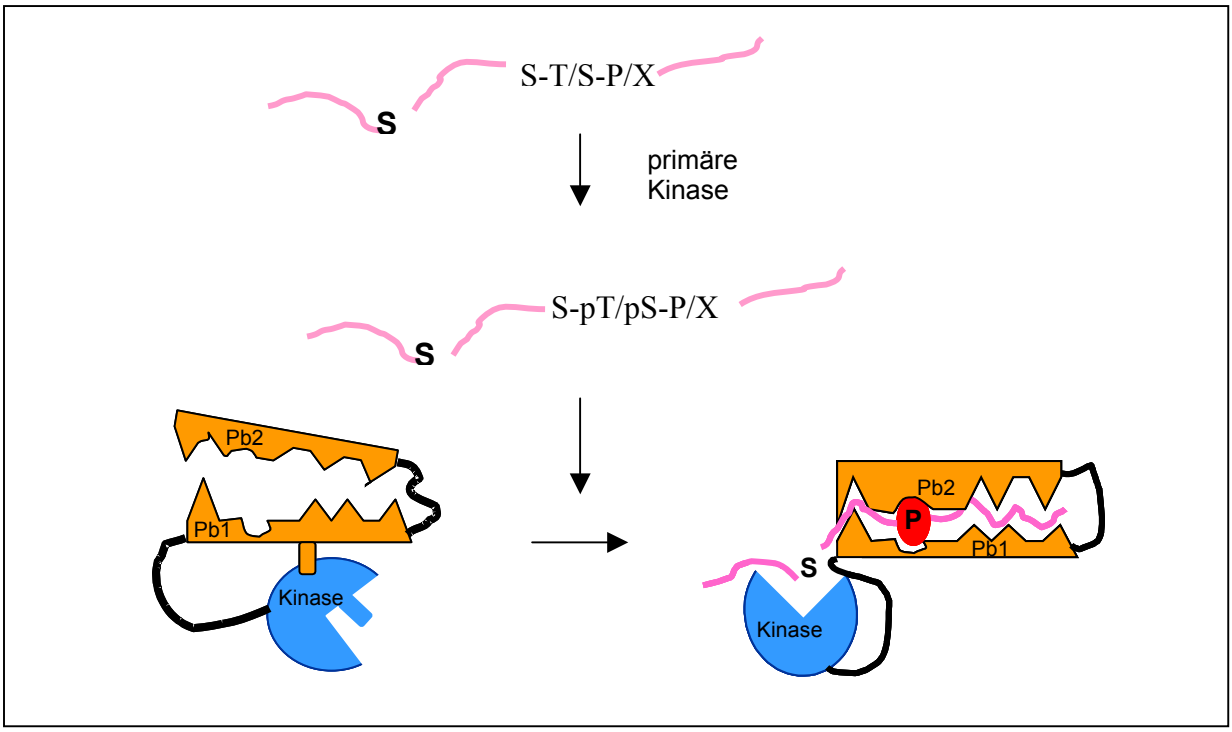

Abbildung 5:Die Regulation der Plk1-Funktion durch die PBD.

Generell können durch Phosphorylierung Bindungsstellen in den phosphorylierten Proteinen geschaffen werden, an welche andere Proteine durch sogenannte Phosphopetid-Bindungsdomänen binden können. Die PDB stellt solch eine Phosphopetid-Bindungsdomäne dar, die für die Bindung von Plk1 an subzelluläre Strukturen oder Substrate nach Phosphorylierung dieser durch eine primäre Kinase verantwortlich ist. Dabei wird die inhibitorische Interaktion zwischen Kinase-Domäne (blau) und PBD (orange) durch die Bindung des Phosphopetid an die PDB aufgehoben und phosphoryliert entweder das gleiche Protein oder andere Proteine, die ebenfalls an der gleichen subzellulären Struktur lokalisiert sind.

Die Regulation von Polo-Kinasen durch Phosphorylierung ist noch nicht hinreichend untersucht. In Plx1 wurden die Phosphorylierungsstellen Thr-10, Ser137, Ser-326 und Ser-340 identifiziert, die *in vitro* durch Plkk1 ("Polo-like kinase kinase 1“), Cyclin B/Cdk1 und durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden, die die Aktivität von Plx1 regulieren könnten [75].

1.6.2. Die Polo-Kinasen der Säugerzellen

In Säugerzellen werden vier verschiedene Polo-Kinasen exprimiert. Dabei ist Plk1 das funktionell homologe Protein zu Polo und bislang am besten untersucht [71]. Die Funktionen der weiteren Polo-Kinasen sind noch nicht bekannt. Studien zeigen, dass die

Überexpression von Plk1 [75] oder Plk3 [76] die Defekte in der Zellteilung temperatur-sensitiver Cdc5^{-}-Mutanten (*S. cerevisiae*) komplementieren können, nicht aber die Überexpression von Plk2 (R. Jansen und I. Hoffmann, unveröffentlichte Daten). Dies lässt vermuten, dass die Polo-Kinasen höherer Eukaryonten unterschiedliche Funktionen im Zellzyklus ausüben.

1.6.2.1. Plk1

Plk1 ist in zahlreiche mitotische Prozesse involviert. Die RNA- und Proteinmengen von Plk1 sind während der G_1-Phase niedrig. Im Verlauf der S- und G_2-Phase wird die Plk1-Kinase in der Zelle angereichert und durch Phosphorylierung am G2/M-Übergang aktiviert [77]. Am Ende der Mitose wird Plk1 durch den APC-Komplex abgebaut. Plk1 ist essentiell für den G2/M-Übergang, da die Plk1-Kinase an der Aktivierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes beteiligt ist. Erstens phosphoryliert Plk1 Cyclin B in der NES-Sequenz ("**n**uclear **e**xport **s**equence“), wodurch Cyclin B in den Kern transportiert wird [78]. Zweitens aktiviert Plk1 die Cdc25C-Phosphatase, die ihrerseits die inhibitorischen Phosphorylierungen an Cdk1 entfernt [79]. Der Transport von Cyclin B in den Nukleus sowie die Aktivierung von Cdc25C führt zu vielen aktiven Cyclin B/Cdk1-Komplexen, was entscheidend für die Auflösung der Kernmembran ("nuclear envelope breakdown“) ist.

In der anschließenden Prophase ist Plk1 am Centrosom lokalisiert und phosphoryliert spezifische Substrate, wie Nlp [80] und Asp [39], die an der Reifung sowie an der Separation der Centrosomen beteiligt sind. Die Mikroinjektion Plk1-spezifischer Antikörper in transformierte oder nichttransformierte Zellen zeigt, dass Plk1 für den Aufbau einer bipolaren Spindel verantwortlich ist, da sich die duplizierten Centrosomen nicht trennen und dadurch monopolare Spindel entstehen.

Am Übergang von der Metaphase zu Anaphase befindet sich Plk1 in der Äquatorialebene und phosphoryliert Untereinheiten des APC-Komplexes (Cdc16, Cdc27) [81], wodurch die Proteasom-abhängige Degradation von Cyclin B und Securin gefördert wird. Weiterhin wird Scc1, eine Untereinheit des Cohesins, phosphoryliert, woraufhin diese durch die Separase gespalten werden kann und die Verbindung zwischen den Schwesterchromatiden gelöst wird [82]. Beides sind wichtige Voraussetzungen für die Trennung der Schwesterchromatiden und den Austritt aus der Mitose.

Während der Zytokinese ist Plk1 an der post-mitotischen Zytoplasmabrücke (*„post-mitotic bridge“*) zwischen den Tochterzellen lokalisiert und phosphoryliert die Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine MKlp1 und 2 [83] sowie NudC [84], ein Dynein-assoziiertes

Protein, die an Organisation der Mikrotubuli und der Trennung der Tochterzellen beteiligt sind.

Eine Übersicht über die zahlreichen mitotischen Funktionen von Plk1 ist in Abbildung 6 dargestellt.

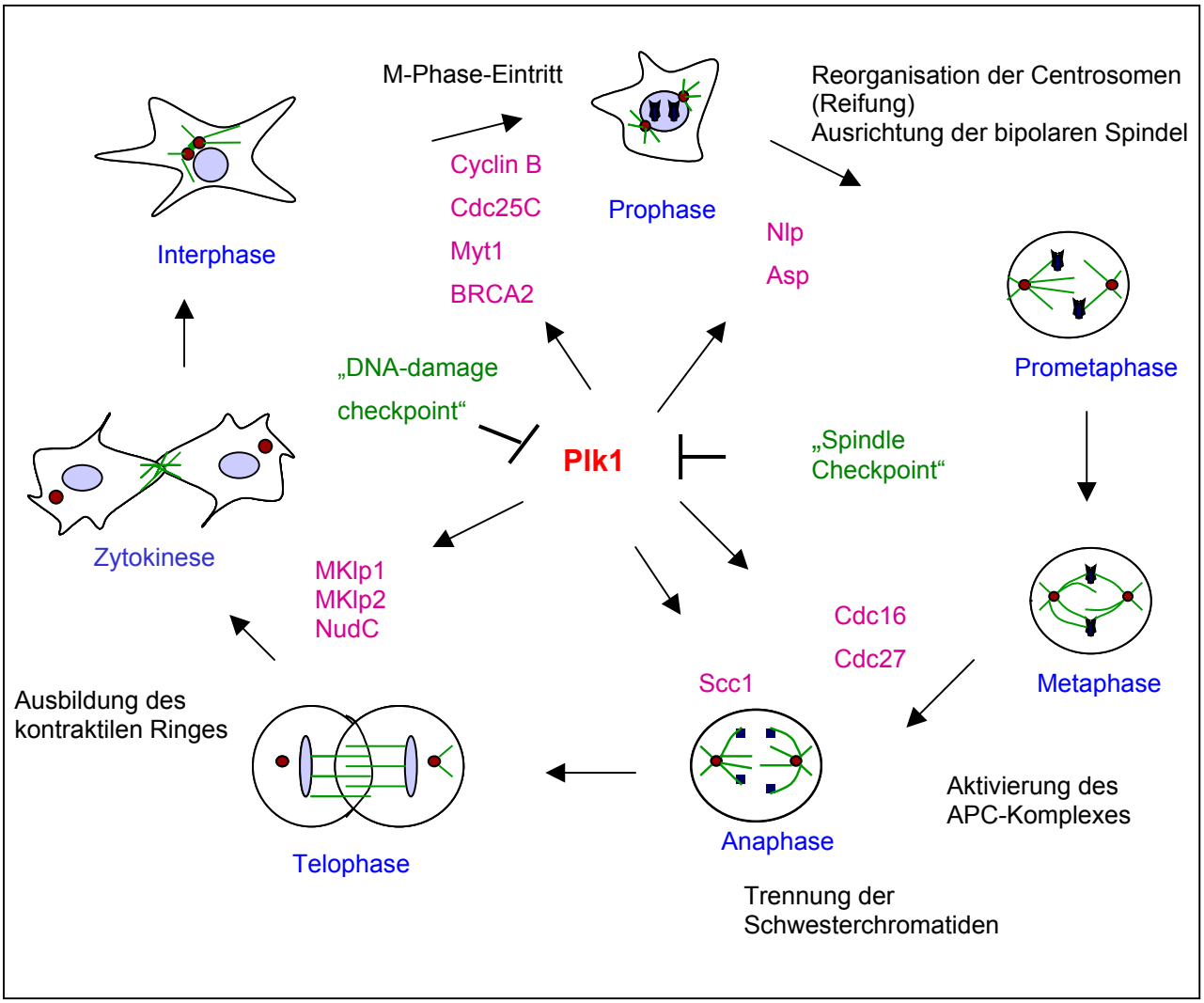

Abbildung 6: Die mitotischen Funktionen der Polo-Kinase Plk1.

Plk1 ist an zahlreichen mitotischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören u.a. die Ausbildung einer bipolaren Spindel, die Aktivierung von Cdk1/Cyclin B durch Phosphorylierung von Cdc25C. Weiterhin kontrolliert Plk1 den Metaphase/Anaphase-Übergang sowie die Ausbildung des kontraktilen Actin-Ringes bei der Zytokinese. Außerdem wird Plk1 eine Rolle bei der Regulation des Centrosomenzyklus zugeschrieben, indem Plk1 an der Reifung der Centrosomen am G2/M-Übergang beteiligt ist. Gemäß der Funktionen ist Plk1 mit zahlreichen mitotischen Strukturen wie den Spindelpolen, den Kinetochoren und dem Mittelkörper (*„midbody“)* assoziiert.

1.6.2.2. Plk2 (Snk)

Plk2 wurde ursprünglich als frühes Transkript beziehungsweise Serum-induzierbare Kinase (*„serum inducible kinase“*, Snk) in der Maus identifiziert [85]. Nachdem Fibroblasten durch

Serumentzug in G0 arretiert wurden, wird durch die Zugabe von Serum der Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert, was zu einem Anstieg der mRNA von Plk2 führt. Dass Plk2 eine Funktion beim Wiedereintritt in den Zellzyklus hat, konnte in einer späteren Studie verstärkt werden, da auch das endogene Plk2-Protein sowie die Kinaseaktivität 1 Stunde nach Stimulation mit Serum in Fibroblasten der Maus nachgewiesen werden konnte. Auch nachdem die Fibroblasten aus einem mitotischen Arrest in die nächste G1-Phase entlassen wurden, konnte Plk2 in der frühen G1-Phase detektiert werden. Des weiteren wurde beobachtet, dass der Plk2-Proteingehalt Zellzyklus-abhängig reguliert wird, da Plk2 nur für 1 Stunde in der Zelle nachweisbar ist [86].

Aufgrund dieser Studien wird angenommen, dass Plk2 eine Rolle bei der Regulation der G1-Phase spielt. Verstärkt wird diese Annahme durch eine kürzlich erschienene Studie über die "knock-out“-Maus von Plk2 [87]. Sie zeigt, dass die Plk2$^{-/-}$-Maus nicht letal ist. Die Analyse des Phänotyps der neugeborenen Mäuse zeigt, dass sie im Vergleich zur Wildtyp-Maus kleiner sind, die Haut blasser ist und dass sie keine korrekt geschlossenen Augenlieder besitzen. Sie sind aber fruchtbar und histologische Untersuchungen zeigen keine Anomalien in den Geweben. Weiterhin wurde in Untersuchungen zur Entwicklung der Plk2$^{-/-}$-Maus beobachtet, dass das Wachstum in der Labyrinthschicht der Plazenta reduziert ist. Auch der Zellzyklus der Fibroblasten, die aus der Maus isoliert wurden, dauert länger, aufgrund einer verlängerten G1-Phase.

Ob die Funktion von Plk2 nur auf die G1-Phase beschränkt ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Plk2 p53-abhängig in der Mitose nach Behandlung der Zellen mit dem mikrotubuli-stabilisierenden Wirkstoff Taxol induziert wird und an der Etablierung des Spindel-Kontrollpunktes beteiligt ist [88]. Die Herunterregulation des Plk2-Proteins durch RNA-Interferenz führt zu einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies lässt auf eine zusätzliche Rolle von Plk2 in der Mitose schließen.

Bis jetzt wurden noch keine Substrate von Plk2 identifiziert, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Als Interaktionspartner wurde CIB ("*Ca^{2+}- and integrin-binding protein*“) identifiziert, welches vermutlich bei der Regulation der Plk2-Aktivität involviert ist [86].

Weiterhin wurde eine Funktion von Plk2 außerhalb des Zellzyklus beschrieben [89,90]. Plk2 ist an der Regulation der Aktivität von Neuronen beteiligt. Bei anhaltender Stimulation der Neuronen ist Plk2 an der Ausbildung der synaptischen Plastizität beteiligt. Das Plk2-Protein wird zu den dendritischen Fortsätzen transportiert und phosphoryliert dort Substrate. So wurde SPAR (postsynaptisches actin-regulierendes Protein) als Substrat identifiziert, welches nach Phosphorylierung durch Plk2 abgebaut wird.

1.6.2.3. Plk3

Ähnlich wie Plk2 wurde Plk3 (*„FGF-inducible kinase“* , Fnk sowie *„Polo-related kinase“*, Prk) ursprünglich als „immediate early gene product“ identifiziert [91]. Die Proteinmengen von Plk3 sind während des gesamten Zellzyklus konstant, während die Kinaseaktivität im Zellzyklus noch nicht gemessen werden konnte. Beim Eintritt in die Mitose wurde aber gezeigt, dass Plk3 phosphoryliert wird [92]. Während des Zellzyklus ist Plk3 über einen längeren Zeitraum an den Centrosomen und am Golgi-Apparat sowie während der Telophase am Mittelkörper lokalisiert [93, 94]. Da die Überexpression von Plk3 zu einem mitotischen Arrest sowie zu zytokinetischen Defekten führt, wird angenommen, dass Plk3 eine mitotische Funktion ausübt [93, 95]. Es wird unter anderem diskutiert, dass Plk3 an der Fragmentierung des Golgi-Apparates zu Beginn der Mitose beteiligt ist. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Plk3 nach gentoxischen Stress über den ATM/Chk2-Signalweg aktiviert wird, was auf eine Rolle von Plk3 bei der Etablierung des Kontrollpunktes nach Schädigung der DNA während der Mitose hindeutet [96].

1.6.2.4. Plk4

Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich die Struktur von Plk4 (Sak: "*Snk/Plk-akin Kinase*“) von den drei anderen Polo-Kinasen in Säugern [97]. Die Sak-Kinase liegt als Dimer vor und zeichnet sich durch den Besitz von nur einer Polo Box aus. Es wird angenommen, dass , im Gegensatz zu den anderen Polo-Kinasen die Polo-Box-Domäne von Plk4 kein Phospho-Bindungs-Motiv ist. Plk4 besitzt außerdem drei PEST-Sequenzen, die die Degradation von Plk4 über den Ubiquitin/Proteasom-Weg im Verlauf der G1-Phase vermittelt [98, 99]. In der Maus wurden zwei alternative Spleißformen gefunden (Sak-a und Sak-b). Sie sind während der Zytokinese im Bereich der Teilungsfurche sowie an den Centrosomen (G_2/M-Übergang) lokalisiert. Sak-a ist für die Embryonalentwicklung der Maus essentiell [100]. Es wurde gezeigt, dass die Deletion beider Sak-a Allele (*„Knockout“*) zum Absterben der Maus in einem frühen Entwicklungstadium führt.

2. Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsarbeit

Der eukaryontische Zellzyklus hat sich im Laufe der Evolution zu einem hochregulierten, sehr komplexen Netzwerk entwickelt, um die Weitergabe des genetischen Materials zu gewährleisten. Der Verlust von Kontrollmechanismen oder Fehler beim Ablauf des Zellzyklus können zum unkontrollierten Wachstum führen und tragen damit zur Entstehung von Krebs bei. Deshalb ist es wichtig die Regulationsmechanismen des Zellzyklus aufzuklären, um so neue Therapien gegen Krebs zu entwickeln.

In den letzten Jahren wurde eine neue Proteinfamilie, die der Polo-Kinasen, in der Literatur beschrieben. Polo-Kinasen üben neben den Cyclin-abhängigen Kinasen wichtige Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus aus. Im Gegensatz zu Plk1 sind die Funktionen der anderen Polo-Kinasen Plk2, Plk3 und Plk4 noch unzureichend untersucht. Gegenstand dieser Arbeit ist es daher, die Rolle der humanen Polo-Kinase Plk2 im Zell- und Centrosomenzyklus zu charakterisieren. Insbesondere soll die Funktion von Plk2 auf die einzelnen Zellzyklus-Übergänge genauer studiert sowie Substrate der Plk2-Kinase identifiziert werden.

Als erstes sollten bereits vorhandene Antikörper gegen das Plk2-Protein charakterisiert werden, um dann mit deren Hilfe die Expression und die Aktivität des endogenen Plk2-Proteins während des Zellzyklus zu bestimmen. Außerdem soll eine stabile Plk2-induzierbare Zelllinie generiert werden, um die Effekte der Überexpression von Plk2 auf den Verlauf des Zellzyklus sowie auf mögliche Substrate zu untersuchen. Weiterhin wird die Plk2-Funktion in Zellen durch Mikroinjektionen spezifischer Antikörper gegen Plk2 sowie durch RNA-Interferenz ausgeschaltet und der Phänotyp untersucht.

Plk2 ist an den Centrosomen lokalisiert (Stefan Kemmler, Diplomarbeit DKFZ Heidelberg 2003). Deshalb sollte eine mögliche Beteiligung von Plk2 bei der Regulation des Centrosomenzyklus untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von Substraten der Plk2-Kinase. Aus diesem Grund sollte ein Two-Hybrid-Screen in der Hefe durchgeführt werden. Die Interaktion zwischen Plk2 und den möglichen Substraten soll anschließend sowohl durch *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien als auch durch *in vitro* Kinasestudien mit rekombinanten Plk2 untersucht werden. Des weiteren soll eine funktionelle Analyse der Interaktion helfen, die Rolle von Plk2 in die bei der Kontrolle des Zellzyklus aufzuklären.

3. Material und Bezugsquellen

Alle verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien werden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Fluka, Merck und Roth bezogen. Die speziellen Chemikalien sind unten aufgelistet. Die Restriktionsenzyme stammen von Roche oder New England Biolabs (NEB). Materialien, die für den Zwei-Hybrid-Screen verwendet wurden, stammen von Clontech.

3.1. Spezielle Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

1 kb DNA Leiter	Invitrogen
100 bp DNA Leiter	Invitrogen
Albumin bovine Fraktion V (BSA)	Sigma
Aprotinin	Boehringer Mannheim
BES (N,N-bis(2-Hydroxy-yethyl)-2-aminoethansulfonic acid)	Sigma
α-Casein	Sigma
CNBr-aktivierte Sepharose 6MB	Amersham Pharmacia Biotech
ECL (**e**nhancend **c**hemo**l**uminescence)	Perkin Elmer
Geneticin	GibcoBRL
Hydroxyharnstoff	Sigma
Hygromycin	Calbiochem
Kaninchen IgG	Sigma
Leupeptin	Roche
LLnL (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal)	Sigma
Nocodazole	Sigma
PIN (Sojabohnen Trypsininhibitor)	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protein A Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
Protein G Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
Proteinmarker #P7708L	New England Biolabs
Puromycin	Sigma
RNAse A	Boehringer Mannheim
TLCK (1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon)	Roche
TPCK (1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-butanon)	Roche

3.2. Radiochemikalien

Adenosin 5‘-[^{32}P]-triphosphat 250 µCi	#AA0018	Amersham
L-[^{35}S]-Methionin 15 mCi/ml	#SJ1515	Amersham

3.3. Puffer und Lösungen

PBS

NaCl	150 mM
Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4, pH 7,2	10 mM

TE-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

10x TBE-Puffer

Tris Base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 ml
H_2O	ad 1l

TBS

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Lysepuffer

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	250 mM
NaF	50 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	0,1% (v/v)

Milder Lysepuffer (für *in vivo* Interaktions-Studien)

HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
Glycerol	10 %
Tween-20	0,1 %
NaF	1 mM
β-Glycerophosphat	10 mM

3.4. Kommerzielle Kits

Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen
Endofree DNA Kit	Qiagen
Gelextraktions Kit	Qiagen
Lipofecamine 2000	Invitrogen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
QuickChange Mutagenesis Kit	Stratagene
TNT Retikulozytenlysat	Promega
Matchmaker Gal 4 Two-Hybrid System 3	Clontech

3.5. GST-Fusionsproteine

Die GST-Myb Fusionsproteine wurden von Kan Jiang (RWTH Aachen) in *E. coli* produziert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Als Expressionsvektor wurde der pGEX-Vektor von Amersham verwendet.

Das Plk2-Gesamtprotein wird ebenfalls als GST-Fusionsprotein exprimiert, über Glutathion-Sepharose aufgereinigt (Ingrid Hoffmann, 1999) und für die Affinitätsreinignug des Anti- Plk2-FL-Antikörpers verwendet.

4. Expressionsvektoren und Plasmide

pX-Vector

Dieser eukaryontische Expressionsvektor (3,9 kb) wurde von Giulio Superti-Furga, EMBL, Heidelberg [101] konstruiert und für die transienten Transfektionen in eukaryontischen Zellen verwendet. Das Plasmid besitzt als Selektionsmarker eine Ampicillin-Resistenz.

pUHD-10-3-Vektor

Für die Herstellung der stabilen Zelllinie (U2OS tet off) wird die Plk2 cDNA in den pUHD-10-3-Vektor [102] kloniert. Dieser Vektor enthält siebenmal das „Tetrazyklin- Response Element" (TRE) und den Minimal-Promotor des Cytomegalovirus. In Abwesenheit von Tetrazyklin wird die Transkription von Plk2 durch Bindung des Transaktivators (tTA) an das TRE induziert. Der Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenz. Für die Transfektion wird der pUHD-10-3-Vektor durch XhoI liniearisiert.

pBabe-Puro

Der pBabe-Puro-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor. Er wird zusammen mit den pSUPER-Konstrukten ko-transfiziert und dient zur Selektion transfizierter Zellen durch Puromycin. Er kodiert außerdem für ein Ampicillin-Resistenzgen.

pSUPER

Dieses 3176 bp-Konstrukt, kloniert von Reuven Agami (The Netherlands Cancer Institute, [103]), basiert auf dem pBluescript-Vektor und enthält einen H1-RNA-Promotor für die Synthese kleiner Haarnadel-RNAs (*„short hairpin RNAs",* shRNAs*)*. Dieser Promotor, welcher unter der Kontrolle des RNA-Polymerase III-Expressions-Systems steht, kontrolliert normalerweise die Expression kleiner RNA-Transkripte ohne Poly-A-Schwanz (z.B. tRNAs) und eignet sich dadurch für die Expression von shRNAs. Über BglII- und HindIII-Restriktionsschnittstellen wurden zwei hybridisierte 64 bp-Oligonukleotide in den Vektor kloniert, welcher außerdem ein RNA-Polymerase III-spezifisches T5-Terminationssignal (5 terminale Uridine) enthält. Die Transkription terminiert nach dem zweiten Uridin, wodurch das charakteristische Ende der Primärtranskripte zustande kommt. Die Konstrukte für die Expression von sh-RNAs wurden von Stefan Kemmler (Diplomarbeit 2003, Dkfz Heidelberg) kloniert. Das Lamin-spezifische pSUPER-

Konstrukt diente als Positivkontrolle und wurde freundlicherweise von Melanie Volkening (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Name der verwendeten pSUPER-Konstrukte	**19nt-Zielsequenz auf der mRNA relativ zum Startcodon**
pSUPER-Plk2-(1)	1483-1501
pSUPER-Plk2-(2)	766-783
pSUPER-Lamin A/C	608-626

Tabelle 2: Verwendete pSUPER-Konstrukte

Der pSUPER Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz.

pTK-Hyg

pTK-Hyg ist ein Selektionsvektor, durch den humane Zellen resistent gegen das Antibiotikum Hygromycin werden und dadurch stabil transfizierte Zellen selektioniert werden können. Er wird ko-transfiziert mit dem pUHD-10-3-Vektor und zeichnet sich durch eine Ampicillin-Resistenz aus. Für die Transfektion wird er mit HindIII liniearisiert.

pEGFP

pEGFP ist ein eukaryontischer Expressionsvektor, der für eine Variante des fluoreszierenden Proteins GFP, welches aus der Qualle *Aequora victoria* isoliert wurde, codiert (Ex 488nm, Em 507nm). Durch Fusion des gewünschten Proteins mit EGFP, kann die Lokalisation des Proteins in der lebenden Zelle beobachtet werden. Der Vektor besitzt eine Kanamycin-Resistenz.

5. Methoden

5.1. Zellbiologische Methoden

5.1.1. Standardkultivierung der Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen werden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und einem 5 %igen CO_2-Gehalt in feuchter Atmosphäre kultiviert. Regelmäßig wird nach 2-3 Tagen das Medium gewechselt, bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen ausgebildet haben. Erreichen die Zellen eine Konfluenz von 80 %, ist es notwendig, die Zellen zu passagieren. Dazu wird das verbrauchte Medium steril abgesaugt und die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem PBS/CMF (GIBCO) gewaschen. Anschließend wird 1 ml Trypsin-EDTA-Puffer (GIBCO) zur Zerstörung der Zell-Zell-Verbindungen zu den Zellen gegeben. Damit das Trypsin optimal proteolytisch wirksam ist, wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wird das Ablösen der Zellen vom Untergrund der Zellkulturschale verfolgt. Um die Wirkung des Trypsin aufzuheben, werden die abgelösten vereinzelten Zellen anschließend in Medium aufgenommen, gezählt und dann in neue Zellkulturschalen überführt.
Alle verwendeten Medien werden supplementiert mit hitzeinaktiviertem 10 %igem FKS (Biochrom), 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung (Life Tech.) und 1% Glutamin (2 mM Endkonzentration, Life Tech.). HeLa (Zervixkarzinom Zelllinie) und U2OS (Osteosarkoma Zelllinie) werden in DMEM (Sigma) mit 1 g Glukose/l, Hs68 (Fibroblasten der Vorhaut) und 293T (Nierenepithel Zelllinie) in DMEM mit 4,5 g Glukose/l kultiviert. Dem Medium der U2OS tet off-Zellen, welche das regulatorische pTet-Off-Plasmid in ihre chromosmale DNA integriert haben, wird zusätzlich 500 µg/ml G418 (Geneticinsulfat, GIBCO BRL) zur Selektion hinzugefügt. Die CHO-Zellen (Ovarienzellen vom chinesischen Hamster) wurden in HAM´S F12, supplementiert mit 10 %FKS und 1% P/S-Lösung, kultiviert.

5.1.2. Steriles Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um auf Zellen gleicher Passage zurückgreifen zu können, werden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei –196°C längerfristig oder kurzfristig bei –80°C gelagert. Da es beim Einfrieren zu einer Schädigung der Zellen kommen kann, verursacht durch eine Dehydrierung des

Zytoplasmas, enthält das Medium 10 % DMSO als Frostschutzmittel. Weiterhin ist ein schnelles Arbeiten unter sterilen Bedingungen erforderlich, um weitgehende Schädigungen der Zellen zu vermeiden.
Die Zellen werden trypsiniert (s. 5.1.1), in 10 ml Medium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die anschließende Zentrifugation erfolgt bei 194 x g für 5 Minuten und einer Temperatur von 4°C. Des Zellpellet wird in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension in verschließbare Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen werden für 24 h bei –80 °C eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei –196°C aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgt im Wasserbad. Die aufgetaute Zellsuspension wird in 10 ml Medium aufgenommen, in Zentrifugenröhrchen gegeben und unter gleichen Bedingungen wie beim Einfrieren zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in gewünschter Zelldichte ausplattiert. Beim Einfrieren der stabilen Zelllinie ist zu beachten, dass das Einfriermedium keine Antibiotika enthält. Auch nach dem Auftauen werden die Zellen für 12 h in Medium ohne Antibiotika kultiviert, um ein massives Sterben der Zellen zu verhindern.

5.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgt mittels einer Neubauer-Kammer der Fa. Neolab. Ein Kleinquadrat, bestehend aus 16 Kleinstquadraten, wird ausgezählt. Die Fläche eines Kleinstquadrates beträgt 0,0625 mm², die Tiefe 0,2 mm. Daraus ergibt sich nach folgender Formel die Zelldichte pro ml in der jeweiligen Zellsuspension:

$$\text{Zellen pro Millimeter} = \frac{\text{Zellen / Kleinstquadrat x 1000}}{\text{16 x 0,0625 mm}^2 \text{ x 0,2 mm}}$$

Um die Fehlerrate zu verringern, zählt man 4 Kleinstquadrate aus und dividiert dann durch vier.

5.1.4. Synchronisation der Zellen

Um Prozesse, die den Zellzyklus kontrollieren, studieren zu können, ist es notwendig, die Zellen in spezifischen Phasen des Zellzyklus zu synchronisieren. Dies umfasst (1) einen

verhältnismäßig vollständigen Arrest der Zellen an einem definierten Punkt des Zellzyklus, (2) der verursachte Arrest muss reversibel sein, und (3) die aus den Arrest wieder freigelassenen Zellen müssen sich erholen, um gleichmäßig den Zellzyklus durchlaufen zu können [104].
Die Synchronisation und der Verlauf durch den Zellzyklus werden durch die durchflußzytometrische Analyse verfolgt (FACS-Scan, s. 5.1.5.).

5.1.4.1. Arrest in der G0-Phase durch Serumentzug

Um die Funktion von Plk2 am G1/S-Übergang zu untersuchen, ist es notwendig, dass die Zellen synchron von der G1-Phase in die S-Phase eintreten. Hs68-Zellen sind humane Fibroblasten, die zur Proliferation in Kultur Wachstumsfaktoren brauchen. Diese Wachstumsfaktoren sind im FKS enthalten, das dem Medium zugesetzt wird. Durch Depletion des FKS treten die Zellen in einen Ruhezustand ein, der G0 genannt wird. Dieser ist charakterisiert durch eine geringe metabolische Aktivität. Durch erneute Zugabe von FKS wird der synchrone Wiedereintritt in die frühe G1-Phase des Zellzyklus induziert.
Zu diesem Zweck werden die Hs68-Zellen in 15 cm Platten in einer Dichte von 1,5 Millionen Zellen pro Schale (0,5 Millionen bei einer 10 cm Schale) ausgesät. 24 h später werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Serum zu entfernen. Die Zellen werden dann für 64 h mit Medium ohne FKS kultiviert. Anschließend wird das alte Medium entfernt und durch neues Medium mit 20 % FKS ersetzt, um den Wiedereintritt in G1 zu induzieren.

5.1.4.2. Synchronisation durch Zugabe von Hemmstoffen

HeLa-Zellen sind transformierte Zellen, die unabhängig von dem Zusatz von FKS wachsen. Deshalb werden HeLa-Zellen in der Mitose durch die Zugabe von Nocodazol arretiert und können durch Wegwaschen des Nocodazol in die nächste G1-Phase entlassen werden. Nocodazol bindet wie Colchicin an Tubulin und verhindert so die Polymerisation des Tubulins und die damit verbundene Ausbildung der mitotischen Spindel.
Um die HeLa-Zellen in der Metaphase zu arretieren, werden sie in 175 cm^2 große Zellkulturflaschen ausgesät. Erreichen die Zellen eine Konfluenz von 70 %, werden sie mit PBS gewaschen und frisches Medium mit 50 ng/ml Nocodazol wird auf die Zellen gegeben. Nach 12 bis 14 h werden die Zellen zweimal mit PBS (+ Nocodazol) vorsichtig gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen. Um G1-Phase-Zellen herzustellen, werden anschließend die abgerundeten

mitotischen Zellen in PBS (+ Nocodazol) abgeschüttelt, in Zentrifugenröhrchen überführt und 7 x mit PBS ohne Nocodazol gewaschen. Das Zellpellet wird dann in frischem Medium resuspendiert, in neue Zellkulturflaschen (2 Millionen Zellen pro 50 cm^2) überführt und die Zellen nach 10 h bzw. alle 2 h für die Zeitkurvenstudien geerntet. Um M-Phase-Extrakte herzustellen können die abgeschüttelten Metaphase-Zellen direkt verwendet werden. Zur Gewinnung der G2-Phase-Zellen werden die restlichen, noch adhärenten Zellen nach dem Abschütteln der mitotischen Zellen abtrypsiniert und ebenfalls Extrakte hergestellt. Für die Herstellung von S-Phase-Zellen werden die Zellen 24 h mit Hydroxyharnstoff (15mM) behandelt und dann geerntet.

5.1.4.3. Centrosomen-Verdopplungs-Assay

Für die Untersuchung der Beteiligung von Plk2 bei der Initiierung der Centrosomen-Verdopplung, wird das Plk2-Protein durch RNA-Interferenz herunterreguliert und anschließend der Centrosomen Verdopplungs-Assay [46] durchgeführt. Dabei wird die DNA-Replikation durch einen DNA-Synthese-Inhibitor (Hydroxyharnstoff) blockiert, was zu einer experimentellen Entkopplung der Centrosomen-Duplikation von der DNA-Replikation führt und es dadurch zu einer mehrmaligen Duplikation der Centrosomen kommt, so dass mehr als 2 Centrosomen bzw. mehr als 4 Centriolen in der Zelle detektierbar sind.
Für den Verpopplungs-Assay werden die U2OS-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit dem pBabe-Puro-Vektor und den entsprechenden pSUPER-Konstrukten (Verhältnis 1:8) mit Hilfe der Kalziumchlorid-Methode (s.5.1.6.2.) transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgt die Selektion der transfizierten Zellen mit Puromycin (2 µg/ml) für weitere 24 h. Am nächsten Tag werden die U2OS-Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit Hydroxyharnstoff (15 mM) in der frühen S-Phase arretiert. Durch Behandlung mit Hydroxyharnstoff wird die DNA-Replikation blockiert, indem die Deoxyribonukleotidtriphoshat-Synthese inhibiert wird. Nach 3 Tagen werden die Zellen auf Deckgläschen fixiert, die Centrosomen mittels Immunfluoreszenz mit einem Anti-γ-Tubulin-Antikörper angefärbt und pro Zelle gezählt. Als Kontrolle werden die Zellen mit dem leeren pSUPER-Vektor sowie mit dem pSUPER-Lamin A/C-Vektor transfiziert. Für die Auswertung werden die Centrosomen von ungefähr 300 Zellen pro Experiment ausgezählt.
Für den Verdopplungs-Assay in CHO-Zellen, werden die CHO-Zellen nach der Transfektion mit der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R für 48 Stunden mit Hydroxyharnstoff behandelt und anschließend fixiert. Hier wurden die Centriolen mit dem Anti-GT335-Antikörper angefärbt.

5.1.5. Durchflußzytometrische Analyse (FACS)

Um die Verteilung der Zellen einer Population in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bestimmen, wird die FACS-Analyse (**f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orter) durchgeführt. Die FACS-Messung ist eine Analyse von Einzelzellen in einer Zell-Suspension auf der Grundlage einer statistischen Analyse, die (1) auf der Messung des DNA-Gehaltes in der Zelle und (2) auf den Streulichteigenschaften der Zelle beruht. Die Zellen werden mit Propidiumiodid (Sigma) angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA interkaliert und bei entsprechender Anregung durch einen Laserstrahl ein rotes Fluoreszenz-Signal aussendet. Durch die Messung der Fluoreszenz-Intensität der gefärbten Zellkerne kann der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Diploide Zellen besitzen in der G0- oder G1-Phase einen DNA-Gehalt von 2n, der in der S-Phase ansteigt und in G2/M einen DNA-Gehalt von 4n erreicht. Das Signal jeder einzelnen Zelle wird über einen Detektor aufgenommen und dann über einen Digital-Analogumwandler (alles von Becton Dickinson FACSort) zusammen mit einem Computer und der entsprechenden Software (Cell Quest) verarbeitet. Dabei ist jedem Zellparameter eine Anzahl von Kanälen zugeordnet, die gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen ein Histogramm ergeben. Aus diesem Histogramm kann man dann die Zellzyklusphasenverteilung in der Population ablesen.

5.1.5.1. Fixierung und Färbung der Zellen für die FACS-Analyse

Die trypsinierten, gezählten Zellen werden in 10 ml eiskaltes PBS aufgenommen und bei 194 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und anschließend tropfenweise zu 10 ml 70 %igem vorgekühlten (-20°C) Ethanol gegeben. Die so fixierten Zellen können für 2 Monate bei –20°C bis zur weiteren Behandlung gelagert werden.
Für die Färbung werden die Ethanol-fixierten Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 194 x g pelletiert. Anschließend werden die Zellen in Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM $MgCl_2$), dem 10 µg/ml RNAse A zugesetzt werden, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wird 70 µg/ml Propidiumiodid zu dem Mix gegeben. Die Zellen werden über Nacht im Dunkeln bei 4°C gefärbt und am nächsten Tag gemessen. Anschließend werden die Histogramme mit dem Programm Cell Quest ausgewertet.

5.1.6. Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode für das Einschleusen von DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Sie ist somit ein wichtiges Werkzeug, um die Expression eines Genes zu studieren bzw. zu kontrollieren. Die klonierten Gene können in Zellen transfiziert werden, um sie biochemisch zu charakterisieren, Effekte von Mutationen im Gen zu erforschen, zur Untersuchung der Überexpression von einem Gen auf das Zellwachstum oder um ein Protein für die Aufreinigung zu produzieren.

Generell unterscheidet man zwei Typen von Transfektionen – transiente und stabile Transfektionen. Diese zwei Typen der Transfektion wurden für unterschiedliche experimentelle Anwendungen entwickelt und erfordern unterschiedliche Vektoren.

Bei transienten Transfektion werden die eingeschleusten Gene nur vorübergehend exprimiert und gehen nach mehreren Zellteilungen verloren. Dabei wird die eingeschleuste DNA nicht in das Genom der Zelle integriert und repliziert. Die transiente Transfektion ist am effizientesten, wenn die "Supercoiled"-Form des Plasmid transfiziert wird.

Im Gegensatz zu transienten Transfektionen sind stabile Transfektionen nur mit linerarisierten DNA-Vektoren möglich, da die transfizierte DNA in die chromosomale DNA integriert werden muss. Um eine stabil-transfizierte homogene Zellpopulation zu gewinnen, ist eine Ko-Transfektion mit einem selektionierbaren Marker-Gen (gewöhnlich ein Antibiotika-Resistenz Gen) notwendig.

Dabei gibt es verschiedene Methoden für das Einschleusen der DNA. Zu den klassischen Transfektions-Techniken gehören die DEAE (**D**i**e**thyl**a**mino**e**thyl)-Dextran-Technik, die Kalziumphosphat-Kopräzipitation und die liposomenvermittelte Transfektion. In der vorliegenden Dissertation wurden die Kalziumphosphat-Technik sowie eine von Qiagen entwickelte Methode, die auf der liposomenvermittelten Transfektionstechnik basiert, eingesetzt. Dabei handelt es sich um Effectene, das aus verschiedenen nicht-liposomalen polykationischen Lipiden zusammengesetzt ist. Im Gegensatz zu den bimolekular lamellar angeordneten Membranen der Liposomen, formen diese Lipide mizelluläre Strukturen. Die positiv geladene Oberfläche der Mizelle interagiert mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückrat der DNA, so dass ein schwach positiv geladener Transfektions-Komplex entsteht, der an der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembran binden kann und dadurch in das Zellinnere aufgenommen wird.

5.1.6.1. Transiente Transfektionen mit Effectene

Für die transienten Transfektionen werden die U2OS-Zellen in 10 cm Schalen in einer Dichte von 0,5 Millionen Zellen pro Schale ausgesät. 24 h später wird die Transfektion nach Anleitung des Herstellers unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die optimalen Bedingungen für eine hohe Transfektions-Effizienz, das Verhältnis zwischen DNA und Effectene sowie die DNA-Menge, wurden vorher ermittelt.

- Plasmid-DNA (2µg) in 300 µl EB-Puffer verdünnen
- pro µg DNA werden 8 µl Enhancer zugegeben, gemischt und 5 min bei RT inkubiert
- Zugabe von 20 µl Effectene pro µg DNA
- Inkubation für 10 min bei RT
- in der Zwischenzeit Zellen mit PBS waschen und 7 ml frisches Medium auf die Zellen geben
- Aufnahme des Transfektionsansatzes in 3 ml Medium
- Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen geben
- Zellen nach 15-20 Stunden ernten

Zur Stabilisierung des exogen-exprimierten Plk2 werden die Zellen 4 h bevor sie geerntet werden mit 25 µg/ml LLnL (N-Acetyl-**L**eu-**L**eu-**n**or**L**eu-al), einem Protease-Inhibitor, behandelt.

5.1.6.2. Transiente Transfektionen mit Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000 wurde für die Transfektion der CHO-Zellen eingesetzt. Nach dem Aussähen in einer 6-well-Zellkulturplatte wurden die Zellen nach Anleitung des Herstellers mit 4 µg DNA und 10 µl Lipofectamine 2000 bei einer Konfluenz von 80 % transfiziert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend DMEM (4,5g Glukose/l) ohne FKS und ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben. 6 Stunden nach der Transfektion wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt, indem die Zellen viermal mit PBS gewaschen und dann in HAM´S-Medium mit 10 % FKS weiterkultiviert wurden.

5.1.6.3. Transiente Transfektionen nach der Kalziumphosphat-Methode

Einen Tag vor der Transfektion werden die Zellen in der gewünschten Zelldichte (U2OS: 1 Millionen Zellen pro 10 cm Schale, 293T: 0,7 Millionen Zellen pro 10 cm Schale) ausgesät. 2-4 h vor der Transfektion wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen zu entfernen.
Alle Lösungen müssen vor der Transfektion auf RT erwärmt werden. Zur Transfektion werden in einem Eppendorfgefäß nacheinander 530 µl TE-Puffer, 60 µl 2,5 M $CaCl_2$-Lösung und 40 µg der zu transfizierenden DNA gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit wird in einem 15 ml Falcon Röhrchen 600 µl 2 x HBS vorgelegt. Anschließend wird das DNA-Gemisch unter konstantem Mischen auf dem Vortex tropfenweise zu der 2 x HBS Lösung pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei RT werden 1 ml des Gemisches auf die Zellen gegeben. Nach 14 h wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen werden mit LLnL behandelt (s. 5.1.6.1.) und 20 h nach der Transfektion geerntet.

2 x HBS:	50 mM	HEPES-KOH pH 7,1
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na_2HPO_4 x $2H_2O$

1/10 TE:	2 mM	Tris-HCl pH 7,8
	0,01 mM	EDTA pH 8,0

Um HeLa-Zellen zu transfizieren, wird der BES-Puffer (N,N-bis(2-Hydroxy-yethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) verwendet. Bei dieser Methode wird die DNA (20 µg) zunächst mit 500 µl $CaCl_2$ (250 mM) sowie demselben Volumen an 2x BES-Puffer gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wird dann tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale gleichmäßig verteilt. Anschließend werden die Zellen bei 35°C und 3% CO_2-Gehalt für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation der Zellen mit den DNA/Ca_2PO_4-Komplexen wird das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium bei 37°C und 5% CO_2 weiterkultiviert und zu dem gewünschten Zeitpunkt geerntet.

2x BES:	50 mM	BES pH 6.95
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na_2HPO_4 x $2H_2O$

5.1.6.4. Stabile Transfektionen

Zur Herstellung einer Plk2-induzierbaren Zelllinie wird die Zelllinie U2OS tet off mit dem pUHD-11-3-HA-Plk2-Vektor und dem Hygromycin- Resistenz-Vektor pTk-Hyg im einem Verhältnis von 20:1 ko-transfiziert. Dazu werden beide Vektoren durch einen Restriktionsverdau linerarisiert. Die Transfektion mit Effectene wird, wie unter 5.1.6.1. beschrieben, durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass dem Medium bereits während der Transfektion 2 µg/ml Tetrazyklin zugesetzt wird, um eine Aktivierung der Expression von HA-Plk2 zu inhibieren.

5.1.7. Herstellung einer Plk2-induzierbaren stabilen Zelllinie

Zwei Tage nach Transfektion mit pUHD-10-3-HA-Plk2 und pTk-Hyg wird dem Medium (s. 5.1.) 200 µg/ml Hygromycin B (CALBIOCHEM®) zugesetzt, um die transfizierten U2OS tet off-Zellen zu selektionieren. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt und das Wachstum der resistenten Klone unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald die nicht-resistenten Zellen gestorben sind, werden die resistenten Klone isoliert. Dabei wird ein mit Vaseline abgedichteter steriler Silikon-Ring (∅ 5 mm) um den Klon gelegt und 10 µl Trypsin in das Innere des Ringes pipettiert. Nach dem Ablösen werden die Zellen in eine 24 well Zellkultur-Schale überführt und solange kultiviert, bis genug Zellen eines Klones vorhanden sind, um den Klon auf die Induktion von HA-Plk2 hin, zu überprüfen.
Die U2OS tet off-Zellen exprimieren einen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA), der in Abwesenheit von Tetrazyklin an das Tetrazyklin-Response Element des Promotors im pUHD-10-3-Vektor bindet und die Transkription des integrierten Genes, in diesem Falle Plk2, aktiviert. Um die Überexpression von Plk2 zu induzieren, wird das Tetrazyklin durch zweimaliges Waschen mit PBS weggewaschen und neues Medium ohne Tetrazyklin auf die Zellen gegeben. Nach 12 h wird die Expression von HA-Plk2 im Western-Blot (Anti-HA, Babco) und durch Immunfluoreszenz mit einem Anti-HA-Antikörper (Roche) überprüft. Als Kontrolle werden Zellen analysiert, die in Medium mit Tetrazyklin kultiviert wurden. Sind die Zellen neu aufgetaut (s. 5.1.2.), ist zu beachten, dass die Zellen mindesten zwei Wochen in Kultur mit dem entsprechenden Medium und Antibiotika gehalten werden, bevor sie induziert werden.

5.1.8. Mikroinjektion von Antikörpern

Mikroinjektion ist der direkte Transfer von gelösten Substanzen, wie zum Beispiel affinitätsgereinigten Antikörpern, DNA, RNA, Peptide oder Oligonukleotide in eine lebende Zelle. Die Mikroinjektionseinheit besteht aus einem Mikroinjektor (AIS-2 System von CellBiology Trading, Rudolf Kern), der an ein inverses Mikroskop (Axiophot 200 von Carl Zeiss Jena) und einen Computer mit entsprechender Software (AIS2) angeschlossen ist. Die zu injizierende Flüssigkeit (5-10 nl) wird durch den Injektionsdruck (zwischen 40-200 hPa), der vom Mikroinjektor bereitgestellt wird, von einer Glaskapillare (innerer Druchmesser: 0.2-1 µm) in die gewünschte Zelle transferiert. Dabei wird der Injektionsdruck und die Injektionszeit für den Zelltyp optimal eingestellt, um Schädigungen in der Zelle zu vermeiden.
Für die Mikroinjektion von affinitätsgereinigten Anti-Plk2-FL-Antikörpern werden Hs68-Zellen auf spezielle Deckgläschen (CELLocate, 175 µm Raster von Eppendorf) ausgesät. Nach Arretieren der Zellen in G0 durch Serumentzug wird der Wiedereintritt in die G1-Phase durch Serumzugabe stimuliert. 3 h später werden die Deckgläschen mit den Zellen in eine 10 mm Zellkulturschale gelegt und frisches Medium mit 20 mM HEPES-KOH pH 7,5 auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen entlang der Buchstaben des Rasters auf den Deckgläschen injiziert. Direkt nach der Mikroinjektion wird neues Medium mit 50 µM BrdU (5-**Br**omo-2'-**d**eoxy-**U**ridine) zu den Zellen gegeben. BrdU wird während der S-Phase in die sich replizierende DNA eingebaut und kann durch Immunfluoreszenz mit einem Anti-BrdU-Antikörper detektiert werden. 24 h nach der Zugabe von BrdU werden die Zellen auf den Deckgläschen mit Methanol fixiert und gefärbt.

5.1.9. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ursprünglich ein evolutionär konservierter zellulärer Abwehrmechanismus, der die Expression artfremder Gene in Eukaryoten kontrolliert. Auf dieser Basis wurde von Tuschl [105] eine neue und effiziente Methode entwickelt, um die Funktion eines Genes in embryonalen und somatischen Zellen zu erforschen. Dabei wird doppelsträngige RNA (dsRNA), die homolog zu einer Sequenz in der Ziel-mRNA ist, in die Zellen eingeführt, wodurch ein **p**ost-**t**ranskriptionelles „**G**en-**S**ilencing" (PTGS)-Phänomen hervorgerufen wird. Dabei kommt es zu einer siRNA-vermittelten (siRNA: **s**mall **i**nterfering **RNA**) Degradation der komplementären mRNA, woraufhin die Synthese des entsprechenden Proteins unterdrückt wird [106,107]. Die Art und Weise, in der die dsRNA den Abbau der homologen Ziel-mRNA hervorruft, ist ein nur

teilweise verstandener Prozess. Man geht davon aus, dass RNAi durch 21-23 nt dsRNAs [108] vermittelt wird, welche wiederum durch Prozessierung aus längeren Vorläufer-RNAs hervorgehen (Initiator-Schritt). Diese sogenannten siRNAs werden in einen Ribonukleoprotein-Komplex (RISC: **R**NA-**i**nduced **s**ilencing **c**omplex) integriert. Dessen Aktivierung ist von einer mit dem Komplex assoziierten Helikase abhängig, welche die ATP-abhängige Entwindung der doppelsträngigen siRNA vermittelt. Daraufhin paart sich deren „antisense"-Strang mit den komplementären Basen der Ziel-mRNA. Nach erfolgter Bindung sorgt eine ebenfalls mit dem RISC-Komplex-assoziierte Endonuklease (möglicherweise Mut-7) für die hydrolytische Spaltung der mRNA.

Das in dieser Arbeit verwendete RNAi-System basiert auf der *in vivo* Transkription der siRNAs mit Hilfe des pSUPER-Vektors (**Sup**pression of **e**ndogenous **R**NA) und erlaubt eine stabile Expression von siRNAs. In diesen Vektor werden zwei hybridisierte 64 bp-DNA-Oligonukleotide kloniert, welche für sogenannte shRNAs („short hairpin-RNAs") codieren (s.4.). Die doppelsträngigen Bereiche dieser shRNAs sind homolog zu einer 19 bp-Region im Plk2-Gen. Diese Primärtranskripte des Vektors dienen als Substrat für das RNAseIII-verwandte zelluläre Enzym Dicer, das die shRNAs ATP-abhängig zu kurzen dsRNAs prozessiert. Die prozessierten Produkte (siRNAs) besitzen am 3'-Ende zwei überhängende Uridine und stellen die eigentlich aktiven Effektoren der RNA-Interferenz dar.

Für die Induktion der RNA-Interferenz in Kulturzellen werden die entsprechenden pSUPER-Konstrukte mittels Ca_2PO_4-Methode (s. 5.1.6.2.) transfiziert.

5.1.10. Immunfluoreszenz

Durch die Methode der indirekten Immunfluoreszenz können subzelluläre Lokalisierungen von Proteinen in einer Zelle untersucht, sowie Transfektionseffizienzen ermittelt werden. Nach Fixierung der Zellen auf Deckgläschen können die Antigene mit Hilfe von primären Antikörpern nachgewiesen werden, dessen konstanter Fc-Teil wiederum von einem sekundären Antikörper erkannt wird. Dieser sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy3 oder Alexa 488) gekoppelt und kann im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) durch Anregung mit Licht und durch Auswahl der entsprechenden Anregungs-/Sperrfilter Kombination sichtbar gemacht werden.

5.1.10.1. Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS werden diese mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung für 20 Minuten bei RT fixiert. Zur Herstellung dieser Lösung wird die entsprechende Menge an Paraformaldehyd in PBS bei 50 °C gelöst. Anschließend wird der pH Wert mit 1 M Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Nach der Fixierung werden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann mit 0,25 %igen Triton X-100/PBS permeabilisiert, um die Zugänglichkeit der Antigene zu ermöglichen.

5.1.10.2. Alkoholische Fixierung

Für die Färbung der Centrosomen werden die Zellen für 6 Minuten bei – 20°C mit 100 %igen Methanol fixiert. Da Methanol auch gleichzeitig permeabilisierend wirkt, entfällt die Triton X-100-Behandlung.

5.1.10.3. Antikörperfärbung

Standardprotokoll:

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, werden die Deckgläschen zunächst für 10 Minuten mit einer 1%igen BSA/PBS-Lösung inkubiert. Während dieser Zeit wird der primäre Antikörper in der BSA/PBS-Lösung entsprechend verdünnt. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgt bei RT in einer feuchten Kammer für 60 Minuten. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper, der konjugiert mit Cy2 (Ex 488 nm, Em 506 nm), Cy3 (Ex 550, Em 615 nm) oder Alexa 488 (Ex 495, Em 519) vorliegt, ebenfalls bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Wenn zwei Proteine in einer Zelle angefärbt werden sollen, wird die Färbung für das zweite Protein im Anschluss an die erste Färbung mit den entsprechenden Antikörpern, wie oben beschrieben, wiederholt. Nach drei weiteren PBS-Waschschritten wird der Zellkern fünf Minuten mit dem DNA-Farbstoff Hoechst-33258 angefärbt und die Zellen anschließend 2 x mit dH_2O und 1 x mit Ethanol gewaschen. Die an der Luft getrockneten Deckgläschen werden mit der zellbeschichteten Seite nach unten auf einen Objektträger mit Mowiol 4-88-Lösung (6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol 4-88, 6 ml H_2O, 12 ml Tris-HCl pH 8,5) geklebt, um dann das Mowiol über Nacht bei 4°C aushärten zu lassen.

Färbung der mikroinjizierten Zellen:

Die mikroinjizierten Zellen werden mit Paraformaldehyd (s. 5.1.11.2.) fixiert und dann permeabilisiert. Anschließend werden die mit Kaninchen-Antikörpern mikroinjizierten Zellen mit einem Anti-Kaninchen-konjugierten-Cy3 sekundären Antikörper angefärbt. Zur nachfolgenden Färbung des in die DNA eingebauten BrdU, ist es notwendig, die Histone zu extrahieren. Dazu werden die Zellen mit 1,5 M HCl für 30 Minuten behandelt. Um wieder einen neutralen pH-Wert zu erreichen, werden die Zellen 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wird die Färbung, wie im Standardprotokoll beschrieben, durchgeführt.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Damit prokaryotische Zellen in der Lage sind, fremde DNA aufzunehmen, müssen Sie kompetent gemacht werden. Bei *E. coli* wird diese Kompetenz durch $CaCl_2$-Behandlung induziert.
Für die Klonierungen werden die *E. coli*-Stämme XL-1 blue oder XL-2 blue der Fa. Stratagene eingesetzt.

Stamm	Eigenschaften
XL-1 blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA lac* [F'*proAB lac*^{q}*Z* □ *M15 Tn10 (Tet*^{r}*)*]
XL-2 blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA lac* [F'*proAB lac*^{q}*Z* □ *M15 Tn10 (Tet*^{r}*)*] Amy Cam^r

Tabelle 3: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

Die Zellen werden mittels einer Impföse in ca. 10 ml LB-Medium (10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl *ad* 1L Wasser) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 300 Upm geschüttelt. Davon werden am folgenden Tag 1 ml in 100 ml LB-Medium überimpft. Die Kultur lässt man bei 37°C in einem Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte, gemessen bei 600 nm ($OD_{600\ nm}$), von 0.6 wachsen. Die Kultur wird geerntet, indem die Bakteriensuspension in sterile vorgekühlte PP-Zentrifugenbecher überführt und für 10 -15 min auf Eis inkubiert wird. Die Sedimentierung erfolgt bei 2000 x g für 15 Minuten in einer vorgekühlten Zentrifuge. Das Pellet wird anschließend in

eiskalten 20 ml Kalziumchlorid-Puffer (100 mM $CaCl_2$, 15% Glycerol) 1 x gewaschen, danach resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten XL1-Blue Bakterien werden direkt zur Bestimmung der Transformationseffizienz eingesetzt oder in Aliquote zu je 200 µl in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei - 70°C gelagert.

5.2.2. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Als Transformation bezeichnet man die Einschleusung von fremder Plasmid-DNA in Prokaryonten. Ziel der Transformation ist die Vermehrung der gewünschten Plasmide durch die Kultivierung von Bakterien und anschließender Isolierung der Plasmide.
Die kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Von der Bakteriensuspension werden 100 µl in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Ansatz werden 5-20 ng des gereinigten Plasmides bzw. 1-5 µl eines Ligationsansatzes (s. 5.2.8.) gegeben, dieser vorsichtig gemischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschritt für exakt 45 Sekunden bei 42°C, wobei das Plasmid von den Bakterien aufgenommen wird. Danach werden die Zellen sofort 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium lässt man die Bakterien 30-60 min bei 37°C unter Schütteln wachsen. Anschließend werden 50 µl der Kultur auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar) mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen, bei Ligationen wird die Bakterienkultur zuvor 5 min bei 5000 Upm pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Man kultiviert die Bakterien über Nacht für mindestens 16 h bei 37°C.

5.2.3. Plasmidisolierung mit Qiagen-Säulen

Die Aufreinigung der Plasmide mit Qiagen-Säulen basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien [109, 110], gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule unter geeigneten niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. Kontaminationen wie RNA, Proteine, Farbstoffe und weitere niedrigmolekulare Verunreinigungen werden durch eine mittlere Salzkonzentration entfernt. Anschließend wird die Plasmid-DNA durch einen Puffer hoher Salzkonzentration eluiert, die DNA einkonzentriert und diese dann durch Präzipitation mit Isopropanol sowie Waschen mit 70 %igen Ethanol entsalzt.
Im Allgemeinen wird die DNA je nach benötigter Quantität mittels Qiagen Plasmid Maxi bzw. Midi Kits nach Vorschrift der Fa. Qiagen aufgereinigt. Zur Transfektion sensitiver

eukaryontischer Zellen mit Effectene wird Endotoxin-freie DNA benötigt. Endotoxine (Lipopolysaccharide) sind Bestandteile der Zellmembran Gram-negativer Bakterien und können die Transfektions-Effizienz drastisch reduzieren. Um dies zu vermeiden, wird das "EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Fa. Qiagen verwendet, wo durch zusätzliche Schritte das neutralisierte Bakterienlysat filtriert wird und mit einem Endotoxin-Entfernungs-Puffer die Endotoxine der Bakterien aus dem Lysat heraus gefällt werden. Die Plasmidisolierung wird nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.
Im Anschluss an die Plasmidreinigung wird die erhaltene DNA quantifiziert und auf einem Agarosegel überprüft.

5.2.4. Aufreinigung von Plasmiden in Cäsiumchloridgradienten

Zur Transfektion mit der Kalziumchlorid-Methode werden große Mengen Supercoiled-DNA benötigt. Daher wird, bedingt durch die hohe Ausbeute der Methode, die DNA mittels alkalischer Lyse und anschließender Reinigung im Cäsiumchloridgradienten isoliert.

Alkalische Lyse:

- Sedimentieren der Bakterien durch Zentrifugation bei 6000 Upm, 15 min und 4°C im Sorvall GS3 Rotor
- Resuspension des Sediments in 6 ml Glukosepuffer (50 mM Glukose, 20 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0)
- Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 5 min bei RT inkubieren
- Alkalische Lyse der Zellen mit 12 ml Lysepuffer (0.2 M NaOH, 1 % SDS) für 10 min bei 4°C
- Neutralisieren mit 9 ml 3 M Na-Acetat pH 5.2 für 10 min auf Eis
- Zentrifugieren bei 20000 x g, 30 min und 4°C im Sorvall SS-34 Rotor
- Den Überstand abnehmen, 20 µl RNase (10 mg/ml) dazu geben und 10 min bei 37°C inkubieren
- Fällung der DNA mit einem Reaktionsvolumen Isopropanol und anschließend bei 10000 x g für 30 min in der Heraeus (Megafuge) Zentrifuge zentrifugieren
- DNA-Pellet in 4 ml TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) lösen, 4 ml 5 M LiCl zugeben und 30 min auf Eis inkubieren
- bei 10000 x g für 10 min Zentrifuge pelletieren

- den Überstand in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführen und durch Zugabe von 20 ml Ethanol die DNA für 15 min auf Eis präzipitieren
- DNA bei 10000 x g für 20 min in der Heraeus (Megafuge) Zentrifuge pelletieren
- Pellet bei RT trocknen lassen und in 3.5 ml TE lösen

Herstellung und Durchführung des Gradienten:

- Zur gelösten DNA werden 4,4 g CsCl gegeben und die DNA in Ultracrimp-Röhrchen der Firma Kendro überführt
- Anschließend 300 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugeben und mit TE bis zum Konus des Röhrchens auffüllen
- Exaktes Austarieren der Röhrchen und Ultrazentrifugation im TV-865 Rotor bei 20 °C über Nacht bei 48000 Upm oder 6 h mit 56000 Upm
- Die DNA-Bande wird mit UV-Licht (320 nm) visualisiert und mit Hilfe einer Spritze und Kanüle abgenommen
- Um die Reinheit der DNA zu erhöhen, wird ein zweiter Reinigungsschritt im Cäsiumchloridgradienten (siehe oben) durchgeführt
- Die doppelt gereinigte DNA wird mit TE-Puffer 5-fach verdünnt
- Entfernen des Ethidiumbromids durch ca. 10-maliges Ausschütteln mit wasser-gesättigtem n-Butanol
- Präzipitation der DNA mit dem 2.5-fachen Volumen Ethanol für 30 min auf Eis oder bei 4°C über Nacht
- Pelletieren der DNA bei 5000 Upm in der Heraeus (Megafuge) Zentrifuge bei 4°C
- Trocknen der DNA bei RT und Lösen in 1ml TE
- Quantifizierung der DNA

5.2.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgt durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Um eine Kontamination mit Proteinen auszuschließen, wird gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient der Absorptionen OD_{260}/OD_{280} gebildet. Der Quotient der genannten Wellenlängen sollte im optimalen Fall zwischen 1,7 und 2,0 liegen, da sonst eine Kontamination der DNA vorliegt.

Man mischt und misst folgenden Ansatz:

2-10	µl	DNA-Lösung
998-990	µl	Wasser

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{DNA-Konzentration (mg/ml)} = \frac{E_{260\ nm} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

5.2.6. Aufreinigung der DNA im Minimaßstab

Zur Verifizierung der Klonierungsschritte wird aus *E. coli* die DNA mittels Minisäulen von Qiagen aufgereinigt. Die *E. coli* werden mit dem Ligations-Ansatz transformiert und auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Von den entstandenen Kolonien werden ca. 5 Einzelklone über Nacht in 2 ml LB-Medium inklusive des notwendigen Selektionsantibiotikums kultiviert. Anschließend erfolgt die Isolierung der DNA mit dem Miniprep Kit nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wird die isolierte Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau analysiert.

5.2.7. Isolierung von DNA aus Gelfragmenten

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in andere Expressionsvektoren werden die gewünschte DNA und die Plasmide durch Restriktionsendonukleasen geschnitten bzw. liniearisiert. Um die ungeschnittene DNA von der geschnittenen DNA zu isolieren erfolgt die Separation im Agarosegel (0.5-4 % Agarose in TBE-Puffer) durch Elektrophorese. Für die anschließende Isolation der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel werden diese aus dem Gel unter UV-Kontrolle (320 nm) ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit der Firma Qiagen nach Anleitung aufgereinigt.

5.2.8. Klonierung und Ligation

Nach der Isolierung der geschnittenen DNA aus Gelfragmenten werden die Vektor- und Insert-DNA durch die T4-DNA-Ligase zusammen ligiert. Sie katalysiert die Formation von Phosphodiester-Brücken zwischen den 3'-OH- und 5'-P-Enden der doppelsträngigen DNA.
Zuerst bestimmt man die DNA-Konzentration mittels einer „Tüpfelplatte". Man gibt 1 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung auf eine Agaroseplatte, die Ethidiumbromid enthält und verwendet je 1 µl einer DNA-Verdünnungsreihe im Bereich von 10-100 ng/µl als Mengenkontrolle. Durch Visualisierung der DNA unter UV-Licht (254 nm) kann die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt werden. Diese annähernde DNA-Bestimmung ist ausreichend für die nachfolgende Ligation.
Es werden verschiedene Ligationsansätze mit unterschiedlichen Vektor-Insert-Ratien pipettiert:

- Vektor-DNA ohne Insert als Kontrolle (dient zur Abschätzung der Re-Ligation)
- Vektor-Insert-Ratien 1:1 und 1:3 für überhängende kohäsive Enden
- Vektor-Insert-Ratien 1:3 und 1:5 für glatte Enden

Gemäß folgender Formel wird die benötigte Insert-DNA-Menge für ein äquimolares Verhältnis berechnet:

$$\frac{150 \text{ ng Vektor x Insert (kb)}}{\text{Vektor (kb)}} = \text{Insert (ng)}$$

<u>Ansatz:</u>

Vektor-DNA	150	ng
Insert-DNA	(äquimolar oder im Überschuss)	
10-fach Ligationspuffer	2	µl
T4-DNA-Ligase (Roche) [1U/µl]	2	µl
Wasser	ad 20	µl

Die Ansätze werden über Nacht bei 4°C (für glatte Enden) oder alternativ, bei Ligationen mit überhängenden kohäsiven Enden, 15 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 1-5 µl des Ansatzes in kompetente Bakterien transformiert und durch Restriktionsverdaue analysiert.
Wird der Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass der Vektor re-ligiert. Deshalb ist es notwendig vor der Ligation die 5'-P-Enden der DNA zu dephosphorylieren, um eine Re-Ligation zu verhindern.

Folgender Ansatz wird piperttiert:

DNA	1	pmol
10x Dephosphorylierungspuffer	2	µl
Shrimp Alkalische Phosphatase	1	unit
Wasser	ad 20	µl

Die Reaktionsansätze werden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase anschließend bei 65°C für 15 Minuten inaktiviert.

5.2.9. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zwei komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide werden gemäß folgendem Standard-protokoll zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid hybridisiert:

- Je 10 nmol 5´- und 3´- Oligonukleotid werden auf 100 µl mit 10 mM Tris-HCl pH 8.5 aufgefüllt
- 5 min bei 85°C erhitzt und langsam auf unter 50°C abgekühlt
- Zur Ligation werden 50-, 100- und 300-fach molarer Überschuss des Oligos im Bezug auf die Vektor-DNA eingesetzt

5.2.10. Klenow-Reaktion

Eine einfache Ligation ist nur mit kohäsiven Enden möglich, das heißt wenn Vektor und Insert mit dem gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden. Sind nach einem Restriktionsverdau jedoch nicht-komplementäre Enden vorhanden, so gibt es die Möglichkeit, durch Auffüllen der überstehenden Enden mit dem Klenowenzym (großes Bruchstück der DNA-Polymerase I) glatte Enden zu generieren. Diese glatten Enden können dann in der Ligation zusammengeführt werden. Dabei katalysiert das Enzym den Einbau von Mononukleotiden an den 3´-OH-Enden der DNA.

Folgender Ansatz wird pipettiert:

aufzufüllende DNA	1	µg
dNTPs (je 10 mM)	2	µl
10x Reaktionspuffer	2	µl
(500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$,		
10 mM DTT, 500 µg/ml BSA)		
Klenowenzym (Roche) [2 U/µl]	1	µl
Wasser	ad 20	µl

Die Reaktion wird 15 min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wird das Klenowenzym bei 65°C für 10 min inaktiviert.

5.2.11. Ortsspezifische Mutagenese

Um eine kinase-inaktive Mutante von Plk2 herzustellen, wird die ATP-Bindungsstelle in Plk2 mutiert. Dabei wird das Lysin an Position 111 zu Arginin mutiert. Die resultierende Mutante erhält die Bezeichnung Plk2-K111R. Eine weitere kinase-inaktive Mutante von Plk2, Plk2-N142A, wurde von Christine Lammer (DKFZ Heidelberg) konstruiert.
Mit Hilfe des “QuikChange Mutagenese Kits“ der Firma Stratagene ist es möglich, die gerichtete Mutation in der Ziel-DNA mit nur einem einzigen PCR-Schritt unter Verwendung eines komplementären Primerpaares zu erreichen. Während der PCR wird die Mutation eingeführt und der komplette Vektor amplifiziert, wobei allerdings kein zirkuläres, neues Plasmid entsteht, da die DNA-Polymerase nicht das Ende und den Anfang des synthetisierten Stranges mit einander verknüpfen kann. Diese Art Lücke bezeichnet man auch als “nick“. Im zweiten Schritt wird die parentale DNA durch Restriktionsverdau mit DpnI verdaut. Hier macht man sich den Umstand zunutze, dass die aus Bakterien isolierte Ursprungs-DNA methyliert vorliegt. Das DpnI-Enzym, das ausschließlich methylierte DNA erkennt und abbaut, lässt die während der PCR synthetisierte DNA intakt. Zum Schluss wird ein Aliquot des Reaktionsansatzes in XL2-blue-Bakterien transformiert, die den “nick“ in der DNA reparieren und während ihres Wachstums die zirkuläre Plasmid-DNA amplifizieren.
Folgende Primer, die die gewünschte Mutation in der Mitte der Sequenz enthalten, werden für die Mutagenese von Lysin-111 zu Arginin eingesetzt. Das nicht zur Ausgangssequenz komplementäre, also das zu mutierende Nukleotid ist durch Farbe hervorgehoben:

Primer 1 (5´ Mutageneseprimer): GTC TAC GCC GCA A**G**A ATT ATT CCT CAC AGC
Primer 2 (3´ Mutageneseprimer): GCT GTG AGG AAT AAT T**C**T TGC GGC GTA GAC

Das QuikChange Kit wurde nach Anleitung des Herstellers angewandt.

5.2.12. Herstellung der Vektoren

Um den Nachweis von Proteinen zu erleichtern, können diese als Fusionsproteine mit einem Epitop, Hämagglutinin (HA; Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) oder einem Peptid (Aminosäuren 410-419) des p62-c-Myc-Proteins (Myc; Aminosäuresequenz: EQKLISEEEDL) exprimiert werden. Der Nachweis erfolgt durch spezifische Antikörper, die gegen das Epitop gerichtet sind.
Generell wird Plk2 über EcoRI-Schnittstellen in die Vektoren kloniert. Da die Plk2-cDNA eine interne EcoRI-Schnittstelle besitzt, wird Plk2 aus dem Ursprungsvektor durch partiellen Verdau mit EcoRI herausgeschnitten. Dazu wird 1 µg Vektor-DNA mit 8, 2, 0,5, 0,125 und 0,03 U EcoRI für 1 h bei 37°C verdaut und anschließend das 2,1 kbp große Plk2-Insert aus dem Agarosegel isoliert, aufgereinigt und in den gewünschten Vektor, der ebenfalls mit EcoRI linerarisiert wird, ligiert. Die Überprüfung, ob Plk2 in richtiger Orientierung vorliegt, erfolgt durch Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und durch Sequenzierung.

<u>pX-HA-Plk2</u>
Zuerst wird der pX-Vektor mit SpeI und SmaI geöffnet und das hybridisierte HA-Oligonukleotid (5'-Oligonukleotid: CTA GTA TGT ACC CAT ACG TGT TCC AGA TTA CGC TCC, 3'-Oligonukleotid: GGA GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAC ATA) im entsprechenden Leseraster eingefügt. Wenn das HA-Oligonukleotid in den Vektor ligiert ist, führt dies zur Deletion der SmaI-Schnittstelle, was im Restriktionsverdau überprüft werden kann. Dieser Vektor wird anschließend mit EcoRI geschnitten und zusammen mit dem ebenfalls mit EcoRI aus dem pRSET-Vektor geschnitteten Plk2-Insert, ligiert.

<u>pGBKT7-Myc- Plk2</u>
Plk2 wird durch EcoRI aus dem pX-HA-Plk2-Vektor herausgeschnitten und in den pGBKT7-Vektor kloniert. Vorher wurde ein Oligonukleotid über NdeI und SfiI eingefügt (durch Melanie Volkening, Dkfz Heidelberg), damit Plk2 im richtigen Leseraster vorliegt und als Fusionsprotein

mit dem Myc- Epitop exprimiert werden kann. Die richtige Orientierung wird durch SalI- und PstI-Verdau überprüft.

pUHD-10-3-HA-Plk2

Zum Nachweis der Überexpression von Plk2 in der stabilen Zelllinie wird Plk2 mit dem HA-Epitop am N-Terminus fusioniert. Plk2 wird über EcoRI in den pUHD-10-3-Vektor subkloniert und das hybridisierte Oligonukleotid in den Vektor ligiert (5'-Oligonukleotid: GGA TGT ACC CAT ACG ATG TTC CAG ATT ACG CTC CG, 3'-Oligonukleotid: AAT TCG GAG CGT AAT CTG GAA CAT CGT ATG GGT ACA TCC GC). Die richtige Orientierung wird durch SacII/PstI-Doppelverdau überprüft.

pX-Myc-c-Myb

Zuerst wird der pX-Myc-Vektor generiert. Zu diesem Zweck werden zwei Oligonukleotide (5'-Oligonuklotid: CTA GAT GGA GGA GCA GAA GCT GAT CTC AGA GGA GGA CCT GCC CCC, 3'-Oligonukleotid: GGG GGC AGG TCC TCC TCT GAG ATC AGC TTC TGC TCC TCC AT) hybridisiert und in den mit SpeI und SmaI geöffneten Vektor eingefügt. Anschließend wird ein Transfer von dem c-Myb-Insert über SalI und SmaI in den pX-Myc-Vektor durchgeführt. Dazu wird der pCIneo-c-Myb-Vektor (von B. Lüscher, RWTH Aachen) zuerst mit XhoI geöffnet und dann eine Klenow-Reaktion durchgeführt. Anschließend erfolgt ein SalI-Verdau um das Insert vollständig herauszuschneiden, um es dann in den pX-Myc-Vektor zu ligieren.

pEGFP-Plk2-K111R

Für die Lokalisation von Plk2 in Hs68-Zellen wurde die Mutante Plk2-K111R in den pEGFP-Vektor über EcoRI kloniert. Die richtige Orientierung wurde durch den PstI-Verdau überprüft.

5.2.13. *In vitro* Transkription und Translation

Eine Möglichkeit *in vitro* Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu studieren, ist die Ko-Immunpräzipitation. Es ist möglich, von der DNA ausgehend, die Proteine mit Hilfe von Kaninchen-Retikulozytenlysat zu synthetisieren, da alle notwendigen Faktoren, die für die Transkription und Translation von Proteinen gebraucht werden, vorhanden sind. Dabei wird das Protein ausgehend von SP6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase-Promotoren transkribiert [111]. Kommerziell ist eine Reihe von Systemen erhältlich, von denen das "TNT-gekoppelte Retikulozytenlysat-System" der Firma Promega zum Einsatz kommt.

Standardmäßig wird folgende Reaktion unter Benutzung von [^{35}S]-Methionin (Amersham) pipettiert:

Kaninchen Retikulozytenlysat	25	µl
Reaktionspuffer	2	µl
T7 RNA-Polymerase	1	µl
Aminosäuremix ohne Methionin (1mM)	1	µl
L-[^{35}S]-Methionin (15 mCi/ml)	2	µl
RNase Block (40 U/µl, Stratagene)	1	µ
DNA (0.5 µg/µl)	2	µl
DEPC-Wasser	16	µl

Die Reaktion wird für 90 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE analysiert. Das *in vitro*-translatierte Protein kann durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

5.2.14. In vitro Bindungsstudien

Um die *in vitro* Interaktion zwischen Plk2 und c-Myb zu studieren, werden zwei Methoden angewandt. Durch die *in vitro* Ko-Immunpräzipitation kann die Interaktion zwischen zwei *in vitro*-translatierten Proteinen, durch den „GST pull down“ dagegen die Interaktion zwischen rekombinanten GST-Fusionsproteinen und *in vitro*-translatierten Proteinen studiert werden.

in vitro Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP):

- Je 4 µl der *in vitro*-translatierten Proteine in ein Eppendorfgefäß pipettieren und vorsichtig mixen
- Inkubation für 1 h bei 30°C
- Antikörper, 100 µl Protein A- bzw. G-Sepharose dazugeben und mit Ko-IP-Puffer auf 500 µl auffüllen
- 2 h bei 4°C auf einem rotierenden Rad inkubieren
- Anschließend zentrifugieren bei 9000 x g und 4 °C
- Überstand abnehmen und Sepharose 3 x mit Ko-IP-Puffer waschen

- Nach dem letzten Waschschritt die Sepharose in 20 µl 2-fach Laemmli–Puffer aufnehmen und für 5 Minuten kochen
- Zur Analyse auf ein SDS-PAGE-Gel laden, Gel fixieren und trocknen
- Autoradiographie

GST pull-down:

- 4 µl *in vitro*-translatiertes HA-Plk2 und entsprechende Menge des GST-Fusionsproteins (vorher Abgleich der unterschiedlichen GST-c-Myb-Fragmente im SDS-Gel) in ein Eppendorfgefäß geben und vorsichtig mixen
- 2 h bei 4°C inkubieren
- Anschließend 100 µl Glutathion-Sepharose und 400 µl Waschpuffer zu den Proteinen pipettieren
- 1 h im Kühlraum auf einem rotierenden Rad inkubieren
- Zentrifugieren (9000 x g, 4°C) und 4 x mit Waschpuffer waschen
- Überstand verwerfen, Sepharose in Laemmli-Puffer resuspendieren und kochen für 5 Minuten
- Auf ein SDS-PAGE-Gel laden, anschließend das Gel mit Coomassie färben und trocknen
- Autoradiographie

Ko-IP-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	20	mM
NaCl	150	mM
DTT	1	mM
Aprotinin	5	µg/ml

Waschpuffer:

Tris-HCl pH7,5	50	mM
NaCl	400	mM
Na-Deoxycholat	0,1	mM
DTT	1	mM
Aprotinin	5	µg/ml
Triton X-100	0,5	%

5.3. Biochemische Methoden

5.3.1. Präparation von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellhomogenaten werden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend trypsiniert und bei 194 x g pelletiert. Zur Lyse der Zellen wird das Zellpellet in einem geeigneten Volumen Lysepuffer (s. 3.3.), der mit Proteaseinhibitoren (10 mg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen, 10 mg/ml TPCK, 5 mg/ml TLCK, 1 mg/ml Aprotinin) sowie dem Phosphataseinhibitor Na-Vanadat (1mM) und DTT (1mM) supplementiert ist, resuspendiert und unter mehrmaligem Mischen für 30 Minuten (oder 1 h, wenn der milde Lysepuffer verwendet wurde) auf Eis inkubiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wird der Extrakt bei 15 400 x g und 4°C zentrifugiert und der gereinigte Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration wird sofort gemessen, entsprechende Aliquote in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C gelagert.

5.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei diesem Verfahren zur Proteinbestimmung erfolgt der Nachweis durch die Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliant-Blue R 250 an die Argininreste der Proteine. Durch diese Bindung wird das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschoben [112]. Für die Proteinbestimmung wird das Protein-Assay-Kit von BioRad verwendet und folgender Ansatz pipettiert:

800-780	µl	H_2O
0-20	µl	der entsprechenden in H_2O verdünnten Probe bzw. BSA-Standard (BioRad)
200	µl	Bradford-Reagenz (BioRad)

Der Ansatz wird gemischt, für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595nm in 96-Multilochplatten im Elisa-Reader (Labsystems Multiscan) gemessen. Anhand der erstellten Eichkurve mit BSA wird die entsprechende Proteinkonzentration in den Proben durch Interpolation bestimmt. Es werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5.3.3. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (SDS-**P**oly**a**crylamid-**G**el**e**lektrophorese) ist ein Verfahren, bei dem die Matrix aus einem stark vernetzten Polyacrylamid-Gel aufgebaut ist, durch die Proteine im elektrischen Feld wandern. Dabei wird die Porengröße durch Variieren der Polyacrylamid-Konzentration so eingestellt, das die Wanderung der gesuchten Proteine verzögert wird. Durch Zugabe des anionischen Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS), welches an die hydrophoben Regionen der Proteinmoleküle bindet und dadurch die Tertiärstruktur der Proteine aufhebt, und ß-Mercaptoethanol, ein Schwefelbrücken-spaltendes Thiol-Reagenz, entfalten sich die Proteine zu gestreckten Polypeptidketten, die negativ geladen sind. Dadurch wird die intrinsische Ladung der Polypeptidketten unbedeutend, da sich jedes Protein-Molekül mit einer großen Anzahl negativ geladener Detergenz-Moleküle umgibt. Bei Anlegen einer Spannung wandern die Proteinmoleküle zur Kathode und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.
Für eine optimale Auftrennung der Proteine wird mit diskontinuierlichen Gelen nach der Methode von Laemmli [113] gearbeitet. Dabei wird zuerst das Trenngel bis ca. 1cm unter den Kammeinsatz gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Für die optimale Trennung zwischen 25-60 kDa werden 10%ige Gele, zwischen 10-30 kDa 12,5 %ige Gele und für 60-175 kDa 8 %ige Gele verwendet. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wird es mit dem Sammelgel überschichtet, welches sich im pH-Wert und in der Acrylamid-Konzentration unterscheidet und eine Aufkonzentrierung der Proteine bewirkt, was zur schärferen Bandenbildung im Trenngel führt. Der Kamm wird sofort in das Sammelgel eingesetzt und nach der Polymerisierung des Sammelgels entfernt. Die Taschen werden gespült und die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Nachdem die Proben mit 4-fach Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,05 mg/ml Bromphenolblau, 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % ß-Mercaptoethanol) für 5 Minuten bei 95°C erhitzt wurden, werden sie in die Taschen (30-80 µg Gesamtprotein pro Tasche) geladen. Die Elektrophorese wird bei konstanter Spannung von 80 V durchgeführt. Um die Molekulargewichte der Proteine zu überprüfen, werden Referenzproteine mit bekannten Molekulargewichten mit auf das Gel aufgetragen (s. Tabelle 4).

	Sammelgel	Trenngel		
	5 %	8 %	10 %	12 %
Acylamidlösung	2,9 ml	2,6 ml	3,3 ml	4,12 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua dest.	0,85 ml	4,9 ml	4,2 ml	3,38 ml
10 % APS-Lösung	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5µl	10 µl	10 µl	10 µl

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

0,4 % SDS

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,4 % SDS

Acrylamidlösung:

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylendiacrylamid

1 x Laufpuffer:

25 mM Tris

190 mM Glycin

0,1 % SDS

Protein	Molekulargewicht [kDa]
MBP-Galaktosidase	175
MBP-Paramyosin	83
Glutamatdehydrogenase	62
Aldolase	47.5
Triosephosphatisomerase	32.5
Lactoglobulin A	16.5
Lysozym	9
Aprotinin	6.5

Tabelle 4: Molekulargewichtsmarker für Proteingele.

5.3.4. Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für immunologische Nachweisverfahren zugänglich zu machen, werden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dicke: 0,45 µm) übertragen und immobilisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das „Semi-dry-Blotting" (halb-trocken)- Verfahren angewendet. Dabei ist die Puffermenge auf das in Transferpuffer getränkte Whatman-Papier zwischen den Elektroden beschränkt. Der Western-Blot wir wie folgt aufgebaut: auf die Anode werden drei Lagen auf die Größe des Gels zugeschnittnes Whatman-Papier (Schleicher und Schuell) gelegt, darauf die Membran, dann das Gel und anschließend nochmals drei Lagen Whatman-Papier. Die Luftblasen in dem Sandwich werden entfernt und die Proteine dann für 1 h bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm^2 transferiert. Zur Kontrolle des Transfers wird die Membran kurz in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt.

Transferpuffer:
39 mM Glycin
48 mM Tris
3,7 % SDS
20 % Methanol

5.3.5. Immunblot-Verfahren

Der Nachweis der Proteine auf der Trägermembran erfolgt durch spezifische Antikörper. Er erfolgt indirekt in zwei Stufen: Die primären Antikörper erkennen antigene Determinanten (Epitope) im Proteinmolekül und binden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen. An diese primären Antikörper binden dann enzymmarkierte sekundäre Antikörper, die gegen den konstanten Fc-Teil der ersten Antikörper gerichtet ist.
Zuerst wird die Membran für eine Stunde in Blocking-Lösung (5 % Magermilch, 0,05 % Tween 20, PBS) bei RT inkubiert, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Anschließend werden die Membran und der primäre, in Blocking-Lösung entsprechend verdünnte Antikörper in Folie luftblasenfrei eingeschweißt und 2 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert. Daran schließen sich drei Waschschritte von jeweils 10 Minuten mit PBS/0,05 % Tween-20 an. Der sekundäre Antikörper, an dem die Peroxidase des Meerrettichs (HRP=engl.: **h**orse **r**addish **p**eroxidase) gekoppelt ist, wird ebenfalls in Blocking-Lösung verdünnt und für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Abschließend wird die Membran nochmals 3 x mit PBS/0,05 % Tween-20 für jeweils 10 Minuten gewaschen.
Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt mit Hilfe des Chemilumineszenz Detektionssystems (Elmer Perkin). Das Prinzip beruht auf der oxidativen Spaltung von Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase, wodurch ein Fluoreszenzlicht abgestrahlt wird, welches mit einem blau-sensitiven Film detektiert werden kann.

5.3.6. Immunpräzipitation

Um die endogene Aktivität von Kinasen zu messen oder um Bindungspartner eines Proteins nachzuweisen, ist es notwendig die Kinase bzw. den Komplex aus dem Gesamtextrakt selektiv zu isolieren bzw. aufzureinigen. Dazu wird die entsprechende Proteinmenge entnommen und das Volumen auf 500 µl mit Lysepuffer aufgefüllt. Die Lysate werden vorgereinigt, indem

Sepharose (CL-4B, Pharmacia) mit dem Lysat für 30 Minuten auf einem Rad bei 4°C inkubiert wird. Anschließend wird die Probe bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert, der gereinigte Überstand abgenommen und mit dem entsprechenden primären Antikörper auf Eis für 3 h inkubiert. Um die Immunkomplexe aus Antigen und Antikörper zu präzipitieren, müssen diese an die mit den bakteriellen Immunglobulin-Rezeptoren Protein A - oder Protein G-beschichtete Sepharose (CL-4B, Amersham) gebunden werden. Dazu wird die Protein A - bzw. G -Sepharose mit Lysepuffer gewaschen und 150 µl der Sepharose zu der Probe pipettiert. Die Inkubation erfolgt im Kühlraum auf einem Rad für 1 h. Die Sedimentation der an die Sepharose gebundenen Immunkomplexe erfolgt durch Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C. Anschließend werden die Immunkomplexe 3 x mit Lysepuffer gewaschen. Für die Interaktionsstudien werden die zentrifugierten Beads in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, wenn notwendig für 10 Minuten erhitzt und anschließend zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenden Proteine werden durch SDS-PAGE (s. 3.3.) und anschließendem Immunblot-Verfahren (s. 3.5.) analysiert.

5.3.7 Messung der Kinaseaktivität

Proteinkinasen sind Enzyme, die durch Übertragung von Phosphatgruppen auf Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Reste andere Proteine kovalent modifizieren und so die Funktion der Proteine beeinflussen. Die Phosphorylierungsreaktion benötigt Phosphat, welches in der Zelle durch ATP bereitgestellt wird.
Bei der Bestimmung der Kinaseaktivität wird diese Kinase-Funktion genutzt, indem mit dem Isotop [^{32}P]-makiertes ATP von der Kinase umgesetzt wird, wobei das radioaktive Phosphat auf ein entsprechendes Substrat übertragen wird. Für die Messung der Cyclin E-assoziierten Cdk2-Aktivität wird Histon H1 und für die Plk2-Aktivität α-Casein als Substrat eingesetzt.

- Plk2 oder der Cyclin E/Cdk2-Komplex wird aus 2 mg bzw. 0,4 mg Zellextrakt mittels Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern an Protein A- bzw. G-Sepharose immobilisiert und einmal mit 1fach Kinasepuffer gewaschen.
- Für die Kinasereaktion werden der entsprechende Reaktionsmix zu dem Immunpräzipitat pipettiert.
- Inkubation für 10 min (Cyclin E/Cdk2) bzw. 30 min (Plk2) bei 30°C
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 µl 4-fach Laemmli-Puffer
- Auftragen auf ein großes 12,5 %iges SDS-PAGE Gel

- Nach dem Ende der Elektrophorese wird das Gel in Coomassie-Lösung gefärbt, entfärbt und getrocknet
- Autoradiographie des Geles (Scientific Imaging film, Biomax MR, Kodak)

Für die Kinasereaktion wird folgender Reaktionsmix zu dem Immunpräzipitat pipettiert:

Histon H1 – Kinase-Assay zur Messung der Cyclin E-assoziierten Cdk2-Aktivität

6 µl	5-fach Kinasepuffer
2,5 µCi	[^{32}P]-γ-ATP
10 µg	Histon H1
50 µM	ATP, pH 7,5
H_2O	ad 30 µl

Kinase-Assay zur Messung der Plk2-Kinase-Aktivität

6 µl	5-fach Kinasepuffer
2,5 µCi	[^{32}P]-γ-ATP
30 µg	α-Casein
50 µM	ATP, pH 7,5
H_2O	ad 30 µl

5-fach Kinasepuffer (Cdk2)

250 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	$MgCl_2$
5 mM	DTT

5-fach Kinasepuffer (Plk2)

250 Mm	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	$MgCl_2$
50 µM	$MnCl_2$
5 mM	DTT

Coomassie-Lösung:

Brilliant Blue R250	1	g
Methanol	40	%
Essigsäure	10	%
Wasser	ad 1	l

Entfärbelösung:

Ethanol	20	%
Essigsäure	10	%
Wasser	ad 1	l

5.3.8. Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Seren von immunisierten Kaninchen enthalten oft eine Vielzahl von Antikörpern, die nicht nur das gewünschte Protein sondern auch andere zelluläre Proteine erkennen können. Um die spezifischen Antikörper zu selektieren, ist es sinnvoll, dass Serum mit Hilfe einer Säule, an der das Antigen kovalent gebunden ist, aufzureinigen.

Präparation der Affinitäts-Säule:

CNBr-aktivierte Sepharose (1g, Amersham) wird in einem 50 ml Falcon Röhrchen 4 x mit 50 ml 1 mM HCl und anschließend 1 x mit 50 ml 100 mM Na-Borat (pH 8,3) gewaschen. Um die Sepharose nach den einzelnen Waschschritten zu pelletieren, wird sie für 1 Minute bei 1600 x g und 4°C zentrifugiert. Das aufgereinigte Plk2-Peptid (CDL-21) beziehungsweise das Gesamtprotein (GST-Plk2, produziert in *E. coli*) wird zu der Sepharose gegeben und für 2 h im Kühlraum auf einem rotierenden Rad inkubiert. Um die Bindungsreaktion zu stoppen, wird die Sepharose in 1 M Ethanolamine resuspendiert und für 2 h im Kühlraum gewaschen. Anschließend wird die Matrix hintereinander mit (1) 0,1 M NaAc pH 4; 0,5 M $NaCl_2$, (2) 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, (3) 0,1 M Glycin pH 2,3 und (4) PBS gewaschen. Die Säule kann bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert werden, unter dem Zusatz von 0,02% NaAzid.

Aufreinigung des spezifischen Antikörpers:

Die Matrix mit dem Antigen wird zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wird 2 ml des Antiserums auf die Säule gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Am nächsten Tag wird die Sepharose 2 x mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl, 0,1% NP-40) gewaschen, in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und auf eine BioRad-Säule gegeben. Die Kappe der Säule wird entfernt, so dass der Waschpuffer durch die Säule laufen kann. Die Matrix wird anschließend 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Um die Antikörper zu eluieren, wird 0,1 M Glycin, pH 2,3 auf die Säule gegeben. Die Eluate werden dann in 500µl Fraktionen in Eppendorfgefäße, die 50 µl 1 M Tri-HCl, pH 9,5 enthalten, gesammelt. Direkt nach der Elution wird das Eppendorfgefäß gevortext und auf Eis gelagert. Zur Analyse der eluierten Antikörper in den einzelnen Fraktionen werden 10 µl von jedem Eluat auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und das Gel anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die Fraktionen, die Antikörper enthalten, werden vereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Ist die Antikörperkonzentration unter 0,1 µg/µl werden die Fraktionen mit Hilfe von Centrikon 50-Säulen (Amicon) nach Anleitung des Herstellers einkonzentriert und die Proteinkonzentration erneut gemessen. Wenn die gewünschte Konzentration erreicht ist, werden die Antikörper bei 4°C gelagert, unter dem Zusatz von 0,02% Natriumazid.

5.3.9. Antikörper

Primäre Antikörper: Alle Antikörper sind gegen humane Proteine gerichtet.

Antikörper	Herkunft	Quelle	WB	IP	IF
Plk2-FL	Kaninchen	I. Hoffmann	1 : 3000 (Serum)	5µl pro 1 mg Protein	-
Plk2-CDL-21	Kaninchen	I. Hoffmann	0,5 µg/ml	-	-
Cyclin E (HE-111)	Maus	Santa Cruz	-	2 µg	-
CyclinE (HE-12)	Maus	Santa Cruz	1:1000	-	-
HA (3F10)	Ratte	Roche	-	2 µg	1:500
HA (16B12)	Maus	Babco	1 :1000	2 µg	1:1000
Myc (9E10)	Maus	Clontech	1 :1000	10 µg	
γ-Tubulin	Maus	Sigma	-	-	1:10000
β-Actin	Maus	ICN Biochemicals	1 :2000000	-	-
Lamin A/C	Maus	G. Krone	1:50	-	-
c-Myb (H-141)	Kaninchen	Santa Cruz	1 :2000	-	-
BrdU	Maus	Roche	-	-	6 µg/ml
Cdk2 (# 16)	Kaninchen	I. Hoffmann	1:1000	5 µl (Serum)	-
Plk1	Maus	Zymed	3 µg/ml	5 µg	-
Plk3	Kaninchen	W. Dai	1:1000	-	-
GT-335	Maus	B. Edde, Monpellier	-	-	1:5000

Plk2-FL: Antikörper gegen das Gesamtprotein (FL-Full Length)

PLK2-CDL-21: Peptid-Antikörper gegen C-terminale Sequenz in Plk2 (Aminosäuren 401-421)

Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Herkunft	Quelle	WB	IF
Anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	Dianova	1:5000	-
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Esel	Amersham	1:2500	-
Anti-Maus-IgG-Cy2	Esel	Dianova	-	1:500
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3	Esel	Dianova	-	1:500
Anti-Maus-IgG-Alexa488	Ziege	Molecular Probes	-	1:500
Anti-Maus-IgG-Texa Red	Ziege	Dianova	-	1:200

5.4. Zwei-Hybrid-Technik (Yeast-Two-Hybrid Screen)

Um Substrate von Plk2 zu identifizieren, wurde die Zwei-Hybrid-Technik angewendet. Dazu wird das MATCHMAKER GAL 4 Two-Hybrid-System von Clontech verwendet, das auf einem transkriptionellen Assay zur Detektion von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen in Hefe basiert. Das System enthält den Gal-Promotor, der an der Regulation des Galaktosestoffwechsels beteiligt ist und eine sog. UAS-Region (UAS steht für **u**pstream **a**ctivating **s**equence) aufweist. An dieser Sequenz bindet spezifisch der Transkriptionsfaktor Gal4 und stimuliert dadurch die Transkription. Das Gal4-Protein besteht aus zwei Domänen: einer DNA-Bindedomäne (DNA-BD), mit der es an der UAS bindet, und einer Aktivierungsdomäne (AD), die mit dem Transkriptionskomplex (der RNA-Polymerase) Kontakt aufnimmt, was zur Aktivierung der Transkription der entsprechenden Gene führt.
Um das Zwei-Hybrid-System zu etablieren, wird die DNA des sogenannten Köderproteins (engl.: bait), in diesem Fall Plk2-K111R, in ein Plasmid (pGBKT7) kloniert, in dem es mit dem Genabschnitt für die Bindungsdomäne fusioniert wird. In ein anderes Plasmid (pACT2) kloniert man jeweils die Inserts einer cDNA-Bibliothek, in diesem Fall eine HeLa-cDNA-Bibliothek (hergestellt von Clontech), deren Genprodukte auf Interaktionen hin überprüft werden sollen und die mit dem Genabschnitt für die Aktivierungsdomäne fusioniert sind. Wie das System funktioniert, geht aus der Abbildung 7 hervor.

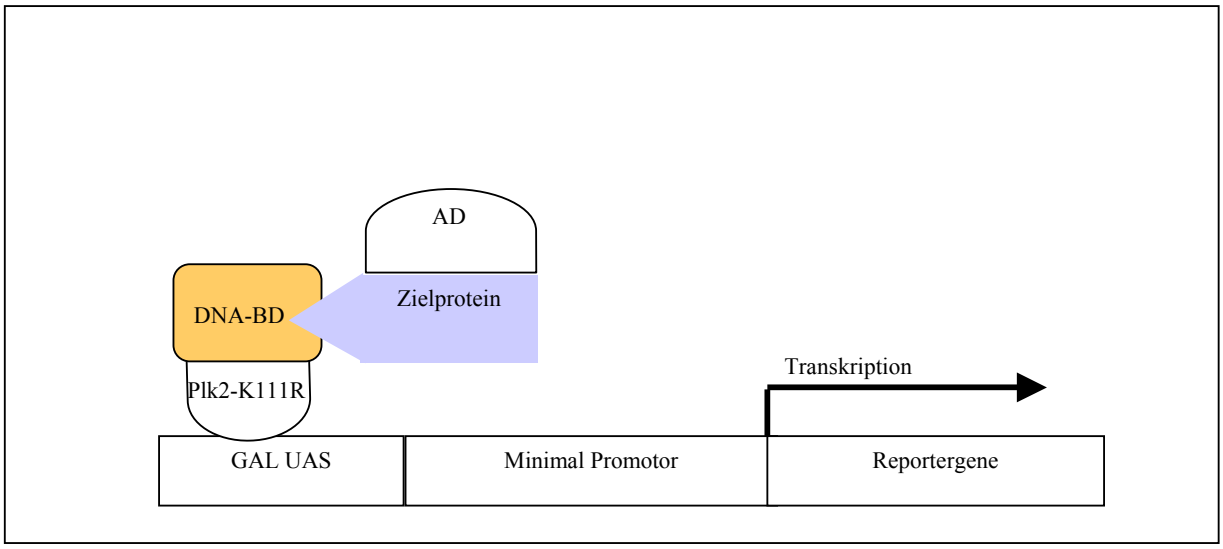

Abbildung 7 : Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems in Hefe.

Die DNA-Bindungsdomäne (BD), welche an die UAS-Region des Promotors bindet, wird als Fusion mit Plk2-K111R exprimiert, wohingegen die Gene der cDNA-Bibliothek mit der Aktivierungsdomäne von GAL4

fusioniert sind. Wenn das Köderprotein mit einem Zielprotein der HeLa-cDNA-Bibliothek interagiert, führt dies zur Transkription der Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1*. Durch den Nachweis der Expression dieser Reportergene, kann eine Interaktion zwischen zwei Proteinen detektiert werden.
Die Reportergene *ADE1* und *HIS3* kodieren Enzyme, die wichtig für die Synthese der Aminosäuren Adenin und Histidin sind, wodurch die Hefen auf Platten ohne Adenin und Histidin (Nährstoffselektion) wachsen können. Ein weiterer Nachweis erfolgt durch eine sichtbare Änderung des Phänotyps. Das *MEL1*-Gen kodiert für die α-Galaktosidase, ein Enzym, das in den periplasmatischen Raum abgegeben wird und durch Hydrolyse von X-α-Gal, die Hefekolonie von weiß nach blau umfärbt.

5.4.1. Durchführung des Zwei-Hybrid-Screens in Hefe

Die Vorversuche und der Zwei-Hybrid-Screen wurde mit dem Matchmaker Gal 4 Two-Hybrid-System 3 von Clontech nach Vorschrift (s. Matchmaker Gal 4 Two-Hybrid System 3 User Manual von Clontech) durchgeführt.
Um die DNA in Hefe einzuschleusen, wurde die Lithiumacetat-vermittelte Transformations-methode nach Vorschrift von Clontech (Yeast Protocols Handbook) angewandt. Für die Kontrollen bzw. zur Überprüfung der Effizienz und zum wiederholten des Phänotyps können die Transformationen im kleinen Maßstab, für die Ko-Transformation mit Plk2-K111R und der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab durchgeführt werden.
Bevor die cDNA-Bibliothek auf Interaktion mit Plk2-K111R hin überprüft wird, wurde getestet, ob Plk2-K111R im verwendeten Hefestamm AH109 (Clontech) exprimiert wird, sowie das keine autonome Aktivierung der Reportergene durch Plk2-K111R alleine stattfindet. Anschließend wurde der Titer der cDNA-Bibliothek bestimmt und diese dann in *E. coli* amplifiziert. Um die Genprodukte der cDNA-Biobliothek auf Interaktionen mit Plk2-K111R hin zu überprüfen, wurden die entsprechenden Plasmide pGBKT7-Plk2-K111R und pACT2-cDNA in Hefe simultan ko-transformiert. Die ko-transformierten Hefezellen wurden erst auf gering stringenten Platten selektioniert und dann auf hoch stringente Platten ausplattiert, um blaue Klone zu isolieren. Aus diesen blauen Klonen wurden die pACT2-Plasmide isoliert und durch Verdau mit HindIII und HaeIII analysiert, um gleiche Inserts zu identifizieren. Anschließend werden die Inserts mit Hilfe des T7-Primer sequenziert und die Protein-Protein-Interaktionen durch *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien verifiziert.

6. Ergebnisse

6.1. Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen die humane Plk2-Kinase

6.1.1. Western-Blot-Analyse der Plk2-Antikörper

Ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der Funktion eines Proteins sind spezifische Antikörper. Durch sie können zum Beispiel die Expression und die Aktivität des Proteins in Zellen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden mehrere polyklonale Antikörper gegen das Gesamtprotein sowie gegen 3 Peptidsequenzen des Plk2-Proteins in Kaninchen hergestellt.

Für die Produktion der Antikörper (Anti-Plk2-FL) gegen das Gesamtprotein wurde rekombinantes GST-Plk2, dass in *E. coli* produziert wurde, in Kaninchen injiziert. Das gewonnene Antiserum (Kaninchen #1) kann direkt in der Verdünnung 1:3000 im Western-Blot eingesetzt werden und erkennt spezifisch endogenes (Spur 9) sowie überexprimiertes Plk2–Protein (Spur 10, Extrakte von mit pX-Plk2 transfizierten HeLa-Zellen) in Extrakten von exponentiell wachsenden HeLa-Zellen auf der Höhe des rechnerischen Molekulargewichtes von 78 kDa (Abb. 8). Dagegen detektiert das Präimmunserum bei einer Verdünnung von 1:3000 keine spezifische Bande in dieser Höhe (Spur 2). Der Anti-Plk2-FL-Antikörper erkennt außerdem ein Abbauprodukt (*) des Plk2-Proteins bei einem Molekulargewicht um 45 kDa. Dieses Abbauprodukt wird ebenfalls in der stabilen Zelllinie durch den Anti-HA-Antikörper detektiert (Abb. 22), wenn man die Expression von HA-Plk2-WT induziert.

Da die vom Anti-Plk2-FL-Antikörper detektierte Bande relativ schwach ist und auch schwächere Hintergrund-Banden im Western-Blot sichtbar sind, wurden Antikörper gegen verschiedene Peptidsequenzen von Plk2 hergestellt. Dazu wurden zwei Sequenzen des carboxy-terminalen Endes (CDL21 und CSQ19) und eine Sequenz am amino-terminalen Ende (N-term.) des Plk2-Proteins, die nicht homolog zu Plk1 und Plk3 sind, ausgewählt. Die Peptide wurden von Perkin-Elmer (Weiterstadt, Deutschland) synthetisiert und an KLH (engl.: keyhole limpet hemacyanine) gekoppelt, um die Immunität zu verbessern. Anschließend wurden die Antikörper in Kaninchen von Elevage Scientifique des Dombes (Chatillon sur Chalaronne, Frankreich) produziert. Die Seren aller Kaninchen wurden im Western-Blot getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei erkennt nur der Anti-CDL21-Antikörper (Kaninchen #1) eine Bande auf der korrekten Höhe im Western-Blot. Um die Spezifität des Anti-Serums zu erhöhen, wurde es mit CNBr-aktivierter Sepharose, an die kovalent das CDL21-Peptid gebunden ist, affinitätsgereinigt. Die Western-Blot-Analyse unter Verwendung

des gereinigten Anti-CDL21-Antikörpers zeigt, dass der Antikörper eine Bande auf der Höhe des gleichen Molekulargewichtes wie der Anti-Plk2-FL-Antikörper in Extrakten aus verschiedenen Zelllinien (Abb.8, Spur 3-8) erkennt. Auch exogenes Plk2 (Spur 6-7) wird vom Antikörper erkannt. Darüber hinaus wird Plk2 sowohl in transformierten Zelllinen (U2OS, HeLa) als auch in nicht-transformierten humanen Fibroblasten (Hs68) stark exprimiert, jedoch nur in geringem Maße in 293T-Zellen. Das Präimmunserum enthält keine spezifischen Antikörper, die das Plk2-Protein erkennen (Spur 1).

Zusätzlich detektiert der Antikörper aber auch eine zweite, niedriger laufende Bande, deren Stärke abhängig von der Zelllinie und von der jeweiligen Affinitätsreinigung des Antikörpers variiert. Vergleicht man die untransfizierten Zellen mit den transfizierten Zellen nimmt nur die Stärke der oberen Bande zu. Auch im Western-Blot mit dem Anti-HA-Antikörper wird die Bande mit geringerem Molekulargewicht nicht detektiert (Abb. 10). Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Bande unspezifisch, eine alternative Spleißform oder eine posttranslational-modifizierte Form von Plk2 ist. Weiterhin erkennt der Antikörper in den Hs68-Zellen auf der Höhe von 90 kDa eine weitere unspezifische Bande.

Um eine Kreuzreaktivtät der Anti-Plk2-Antikörper mit Plk1 und Plk3 auszuschließen, wurde gleichzeitig eine Western-Blot-Analyse mit Anti-Plk1- und Anti-Plk3-Antikörpern durchgeführt. Beide Anti-Plk2-Antikörper detektieren keine Bande in der Höhe von Plk1 und Plk3.

Da der affinitätsgereinigte Anti-Plk2-CDL21-Antikörper spezifisch das Plk2-Protein in Zellextrakten erkennt, wurden in dieser Arbeit alle Western-Blot-Analysen mit dem affinitätsgereinigten Anti-Plk2-CDL21-Antikörper durchgeführt.

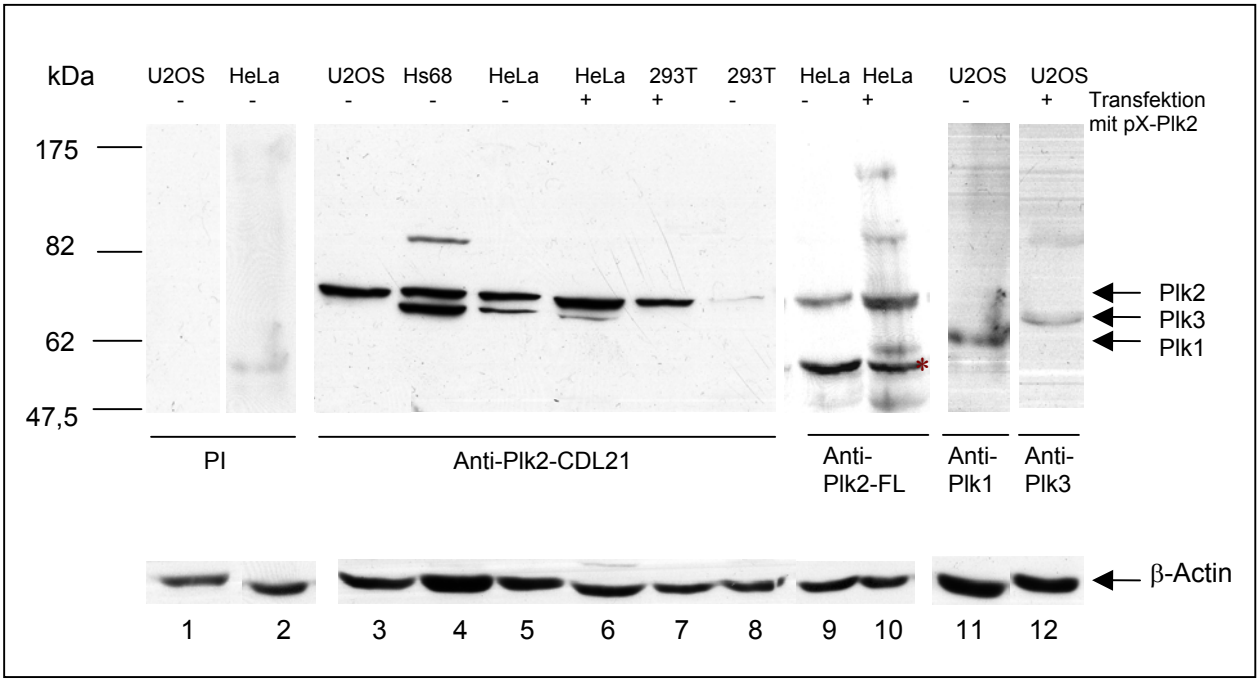

Abbildung 8: Charakterisierung der spezifischen Plk2-Antikörper im Western-Blot (Legende umseitig).

Abbildung 8: Gleiche Mengen an Proteinextrakten, hergestellt aus U2OS-, Hs68-, HeLa- und 293T-Zellen, wurden im 8%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit polyklonalen, affinitätsgereinigten Anti-Plk2-Antikörpern (Anti-Plk2-CDL-21, Kaninchen #1 und Anti-Plk2-FL, Kaninchen #1) sowie spezifischen Anti-Plk1- und Anti-Plk3-Antikörpern analysiert. Das Präimmunserum (PI, Spuren 1 und 2) und transient transfiziertes Plk2 (Spuren 6, 7 und 10) dienten als Kontrolle. Die Migration von Plk1, Plk2 und Plk3 ist rechts, der Molekulargewichts-Marker links gekennzeichnet. Der Stern (*) zeigt eine typische Degradationsbande von Plk2.

6.1.2. Immunpräzipitation der Plk2-Kinaseaktivität

Um die Kinaseaktivität von Plk2 im Zellzyklus zu bestimmen, werden Antikörper benötigt, die Plk2 spezifisch aus Zellextrakten immunpräzipitieren. Deshalb wurden alle hergestellten Antiköper in der Immunpräzipitation sowie im anschließenden Kinase-Assay getestet. Es zeigte sich jedoch, dass nur der Anti-Plk2-FL-Antikörper (Kaninchen #1 und Kaninchen #2) die aktive Kinase aus HeLa-und Hs68-Zellextrakten immunpräzipitiert, was durch Einbau von radioaktivem [^{32}P] in das Substrat α-Casein nachgewiesen wurde (Abb. 9). Zur Kontrolle wurde die Immunpräzipitation auch mit dem Präimmunserum durchgeführt und ebenfalls die Phosphorylierung von α-Casein gemessen. In beiden Fällen immunpräzipitiert das Präimmunserum eine deutlich geringere Kinaseaktivität als in den Immunpräzipitationen mit den Anti-Plk2-FL-Serum.

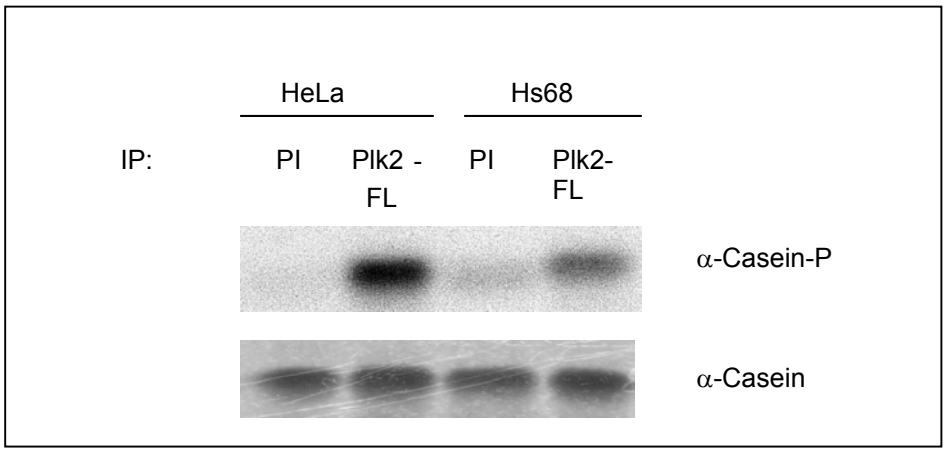

Abbildung 9: Charakterisierung der spezifischen Plk2-Antikörper nach Immunpräzipitation.

Die Plk2-Kinase wurde mit 5 µl des Anti-Plk2-FL-Serum aus Extrakten von exponentiell wachsenden HeLa- bzw. Hs68-Zellen (je 2 mg) immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation auch mit dem Präimmunserum (PI) durchgeführt. Die Kinaseaktivität von Plk2 wurde in der anschließenden Kinase-Reaktion bei 30°C für 30 Minuten unter der Verwendung von α-Casein als Substrat gemessen. Der Einbau von [^{32}P] in das Substrat α-Casein wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht (α-Casein-P). Als Kontrolle für die eingesetzten α-Casein-Mengen wurde das SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Lösung angefärbt (α-Casein).

6.2. Konstruktion einer inaktiven Mutante der Plk2-Kinase

Eine wichtige Negativkontrolle zur Bestimmung der exogenen Plk2-Kinaseaktivität und zur Durchführung von Phosphorylierungstudien ist eine inaktive Mutante dieser Kinase. Die Mutante könnte auch nach Transfektion und Expression in Zellen durch Verdrängung der endogenen Kinase oder durch Bildung inaktiver Komplexe mit dem Substrat dominant-negative Effekte auslösen.

In der Literatur wurden verschiedene kinase-inaktive Mutanten für Polo-Kinasen beschrieben. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Mutanten generiert. Für Plx1 aus *X. laevis* wurde eine kinase-inaktive Mutante, N172A, beschrieben [114]. Hier wurde die konservierte Aminosäure Asparagin (N) an Position 172, welche für die exakte Ausrichtung der katalytischen Seite wichtig ist und sich in der katalytischen Schleife der Kinasedomäne befindet, zu Alanin (A) mutiert [115]. Diese Aminosäure ist innerhalb der Plk-Familie konserviert und entspricht dem N142 im Plk2-Protein. Eine N142A-Mutante von Plk2 lag bereits vor, bei der die Aminosäure Asn-142 nach Alanin mutiert wurde. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung kinase-inaktiver Mutanten ist die Mutation der ATP-Bindungsstelle von Kinasen. Anhand der in der Literatur veröffentlichten kinase-inaktiven Mutante von Plk1 [116], K82R, wurde eine entsprechende Mutante von Plk2 mit einer defekten ATP-Bindungsstelle konstruiert. Dazu wurde das erste Lysin (Lys-111) nach dem katalytischen Zentrum durch ortsspezifische Mutagenese (s. 5.2.11.) gegen Arginin ausgetauscht. Nach Überprüfung der Mutagenese durch Sequenzierung wurde Plk2-K111R in den eukaryontischen Expressionsvektor pX-HA kloniert. Um die Kinaseaktivität von Plk2-K111R mit der des Plk2-WT-Proteins zu vergleichen, wurden beide pX-HA Konstrukte in U2OS-Zellen transient transfiziert. Die Expression wurde im Western-Blot mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert und die Kinaseaktivität nach Immunpräzipitation mit dem Anti-HA-Antikörper bestimmt. Aus Abbildung 10A geht hervor, dass beide Proteine als Fusion mit dem HA-Epitop in U2OS-Zellen exprimiert werden. Dabei ist die Proteinmenge von Plk2-K111R im Vergleich zum Plk2-WT-Protein 5fach höher. Dies könnte entweder auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz oder auf eine erhöhte Stabilität des Plk2-K111R-Proteins beruhen. Vergleicht man nun die Kinaseaktivitäten von Plk2-WT und Plk2-K111R (Abb. 10B), so führt die Substitution des Lysins der ATP-Bindungsstelle durch Arginin zu einer reduzierten Kinaseaktivität.

Um *in vitro* Studien durchzuführen, wird in der Regel rekombinantes Protein eingesetzt. Die Produktion von rekombinantem aktiven Plk2-WT-Protein in *E. coli* sowie die Herstellung eines Baculoviruses zur Expression von rekombinantem Plk2-WT-Protein in Insektenzellen, war auf Grund der Toxizität des Plk2-Proteins nicht möglich. Deshalb wurden 293T-Zellen, in welchen hohe Mengen an Protein exprimiert werden können, mit den jeweiligen pX-HA-Plk2-

WT, -N142A und -K111R-Konstrukten transfiziert. Nach Überprüfung der Expression im Western-Blot (Abb. 10C) wurden die HA-Fusionsproteine mit dem Anti-HA-Antikörper (Roche) immunpräzipitiert und mittels Protein-G-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurde die Kinaseaktivität durch Phosphorylierung des Substrates α-Casein gemessen (Abb. 10D). Beide kinase-inaktive Mutanten zeigen eine verringerte Aktivität im Vergleich zum Plk2-WT-Protein, wobei die N142A-Mutante eine noch geringere Proteinkinaseaktivität aufweist als die K111R-Mutante. Beide Mutanten können somit als Negativkontrolle verwendet werden.

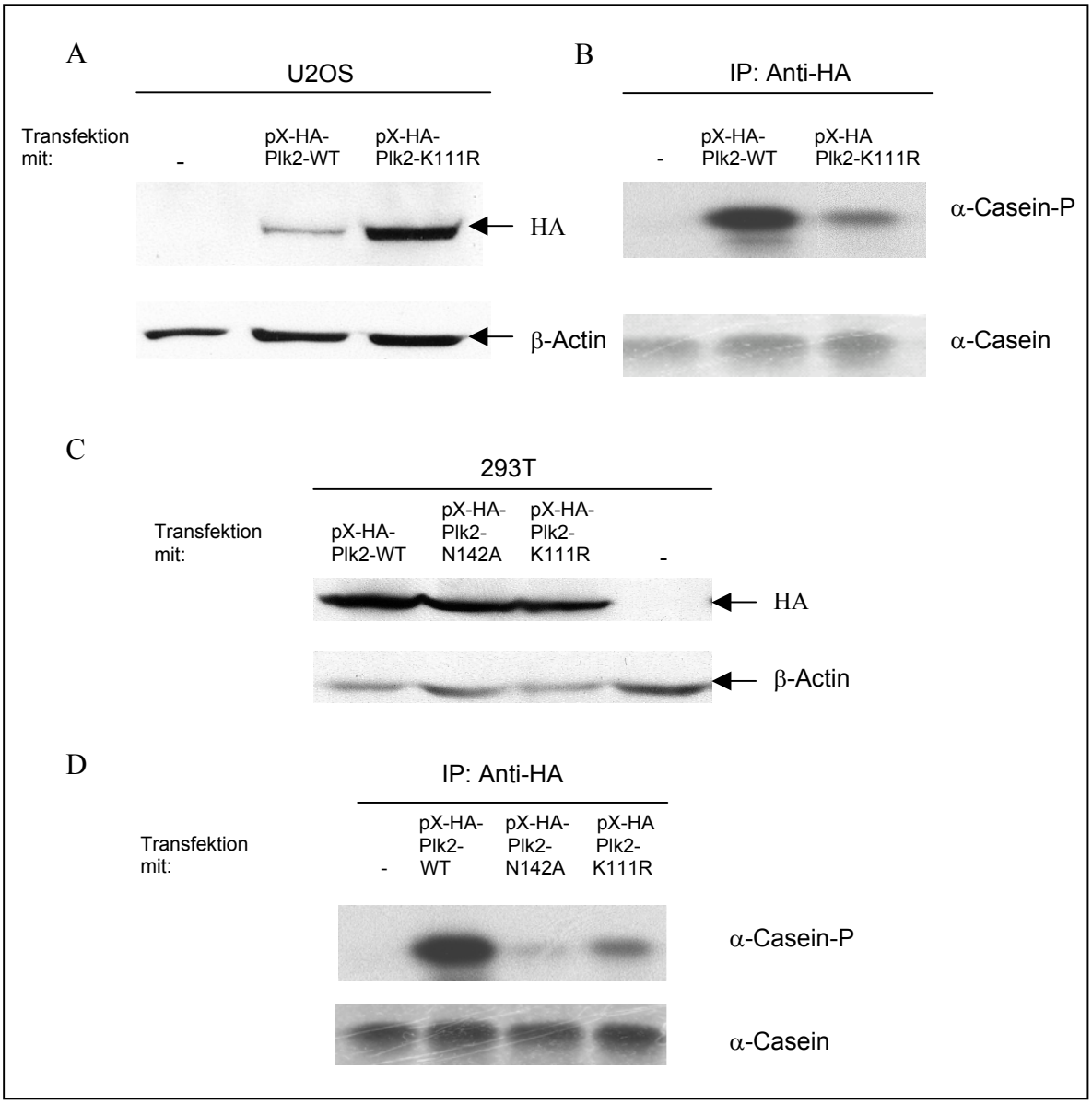

Abbildung 10: Vergleich der Kinaseaktivitäten von Plk2-WT und den Mutanten Plk2-K111R und Plk2-N142A.

U2OS- oder 293T-Zellen wurden transient mit pX-HA-Plk2-WT oder pX-HA-Plk2-K111R transfiziert. Zum Vergleich der Kinaseaktivität der kinase-inaktiven Mutanten Plk2-K111R und Plk2-N142A, wurden die 293T-Zellen auch mit pX-HA-Plk2-N142A transfiziert. **(A)** Expression des Plk2-WT- und Plk2-K111R-Proteins in U2OS-Zellen. Zellextrakte wurden hergestellt und die Expression im Western-Blot mit Anti-HA-Antikörpern (Babco) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde der β-Actin-Gehalt

bestimmt. **(B)** Kinaseaktivitäten von Plk2-WT und PLK2-K111R. Gleiche Mengen an HA-Plk2-WT und HA-Plk2-K111R wurden aus den Extrakten von U2OS-Zellen mit dem Anti-HA-Antikörper (Roche) immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität gemessen. Expression **(C)** und Vergleich der Kinase-aktivitäten **(D)** von Plk2-WT, Plk2-N142A und Plk2-K111R in 293T-Zellen. Die Expression und die Kinaseaktivitäten wurden, wie unter (A) und (B) beschrieben, analysiert.

6.3. Expression und Aktivität von endogenen Plk2

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivität und die Proteinmengen von Plk1 während des Zellzyklus reguliert werden [77]. Die Aktivierung bzw. die Expression von Plk2 zu einem bestimmtem Zeitpunkt im Zellzyklus könnte Aufschluss über mögliche Funktionen und Substrate geben. Zuerst wurden deshalb die Proteinmengen und Aktivitäten von Plk2 in Extrakten von G1-, S-, G2- und M-Phase arretierten HeLa-Zellen bestimmt. Es wurde kein Unterschied in den Proteinmengen während der verschieden Phasen des Zellzyklus festgestellt (Abb. 11A). Eine erhöhte Kinaseaktivität ist hingegen nur in G1-Phase-Zellen

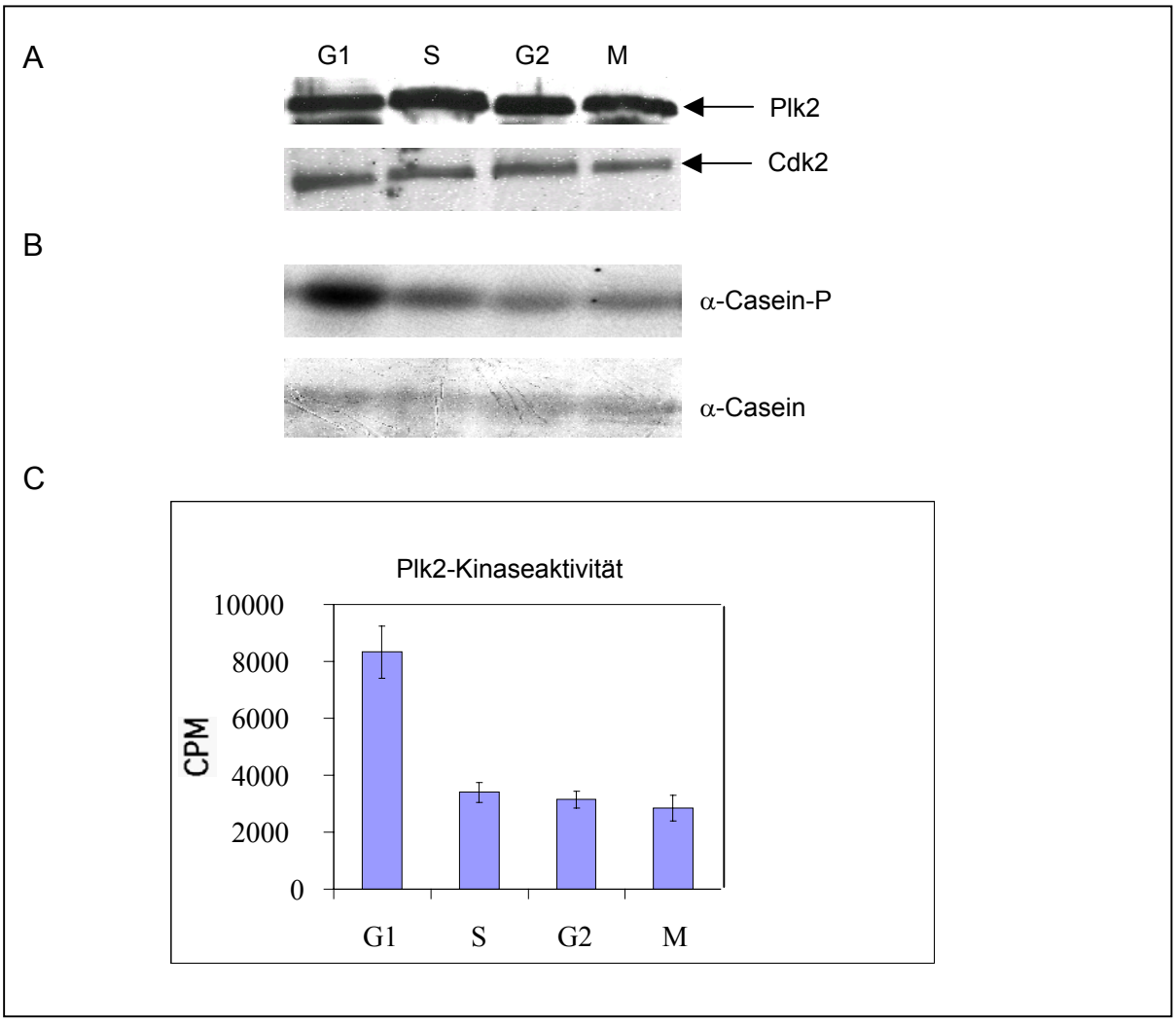

Abbildung 11: Die Plk2-Kinase ist in der G1-Phase aktiv (Legende umseitig).

Abbildung 11: Um G1-, G2- bzw. M-Phase-Zellen herzustellen, wurden HeLa-Zellen, wie unter 5.1.4.2. beschrieben, behandelt und Zellextrakte hergestellt. Für die Herstellung der S-Phase-Zellen wurden die Zellen 24 h lang mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt und dann geerntet, um ebenfalls Proteinextrakte herzustellen. Die Plk2-Kinase wird aus den Extrakten (2 mg) immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität gemessen. **(A)** Plk2-Proteinmengen. Plk2-Expression wurde mit dem Plk2-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Cdk2 verwendet, da sich der Cdk2-Proteingehalt während des Zellzyklus nicht ändert. **(B)** Plk2-Kinaseaktivität. Gezeigt ist ein Autoradiogramm als repräsentatives Beispiel. **(C)** Quantifizierung von drei parallel durchgeführten Kinase-Assays nach Messung der ausgeschnittenen α-Casein-Banden im Szintillationsmessgerät. Um die α-Casein-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

messbar (Abb. 11B). Um einen Einblick über den genauen Zeitpunkt der Aktivierung von Plk2 während der G1-Phase bzw. am G1/S-Übergang im Vergleich zu der Cyclin E-assoziierten Cdk2-Aktivität zu erhalten, wurde die Expression und Aktivität von Plk2 in Zeitkurven untersucht.

6.3.1. Vergleich der Aktivitäten von Plk2 und Cyclin E/Cdk2 in HeLa-Zellen

Um den Zeitpunkt der Aktivierung von Plk2 im Zellzyklus zu bestimmen, wurde eine Zeitkurve mit HeLa-Zellen erstellt. Diese Zelllinie lässt sich leicht mit Hilfe des Inhibitors Nocodazol in der Metaphase arretieren (s. 5.1.4.2.). Außerdem ist der Anteil der Zellen hoch, welche nach Entlassung aus dem Zellzyklusarrest weiterlaufen. Es lassen sich außerdem große Mengen an Proteinextrakten herstellen.

Um den mitotischen Arrest und den Zellzyklusverlauf zu kontrollieren, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen zu den entsprechenden Zeitpunkten durch die FACS-Analyse bestimmt (Abb. 12A). Die FACS-Analyse zeigt, dass nach Entfernung des Hemmstoffes rund 90 % der Zellen in der Metaphase arretiert sind (Zeitpunkt 0 h) und die Zellen synchron durch den Zellzyklus laufen. Fünf Stunden nach der Rekultivierung befinden sich die Zellen in der G1-Phase und treten nach 12 Stunden in die S-Phase ein. 16 Stunden nach der Rekultivierung beginnen die Zellen dann in die G2-Phase einzutreten. Zu den selben Zeitpunkten wurden von den gleichen Zellen auch Proteinextrakte hergestellt, und die Expression von Plk2 im Western-Blot mit dem Anti-Plk2-CDL21-Antikörper bestimmt (Abb. 12B). Als Kontrolle wurden ebenfalls exponentielle Zellen (Exp.) analysiert. Es zeigt sich, dass das Plk2-Protein im Gegensatz zum Cyclin E-Protein zu jedem Zeitpunkt im Zellzyklus detektierbar ist. Es unterliegt also keiner zellzyklus-abhängigen Regulation wie Cyclin E, welches in der späten G1-Phase in den Zellen akkumuliert und anschließend in der S-Phase degradiert wird.

Die Aktivität von Plk2 wurde nach Immunpräzipitation mit Anti-Plk2-FL Antikörpern durch den Einbau von [^{32}P] in das Substrat α-Casein gemessen (Abb. 12C). Die Plk2-Kinaseaktivität steigt nach 12 Stunden, etwa zum gleichen Zeitpunkt wie die Cyclin E-assoziierte Cdk2-Aktivität, am G1/S-Übergang an und ist nach 14 h am höchsten. Beide Aktivitäten nehmen in

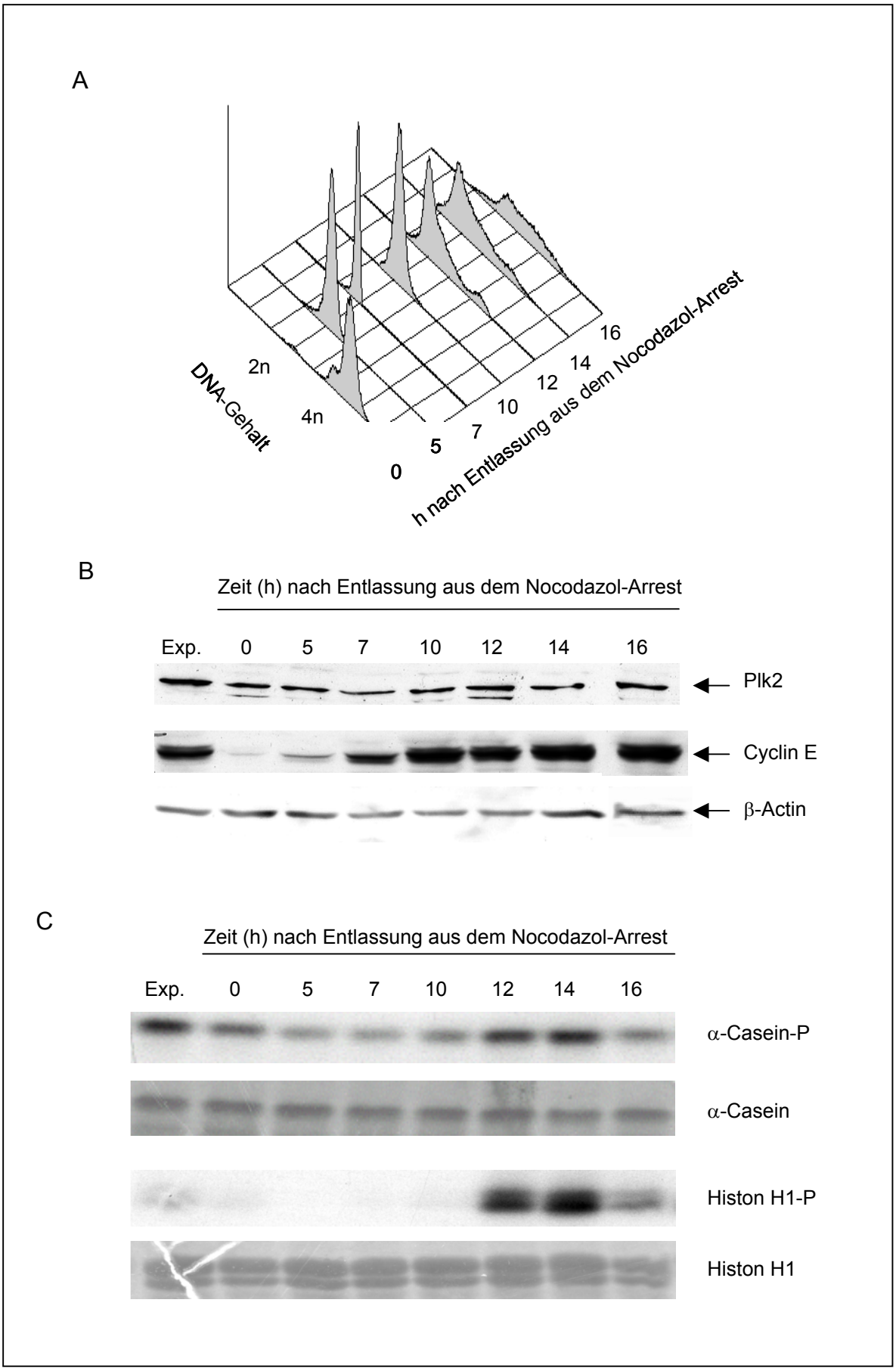

Abbildung 12: Regulation der Plk2-Proteinmenge und der Plk2-Kinaseaktivität in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus von HeLa-Zellen (Legende umseitig).

Abbildung12: HeLa-Zellen wurden mit Nocodazol in der Metaphase synchronisiert, anschließend aus den Arrest entlassen und dann weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet oder für die FACS-Analyse fixiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls exponentielle Zellen (Exp.) analysiert. **(A)** Das Histogramm zeigt die Zellzyklusphasen-verteilung zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Synchronisation. **(B)** Plk2-Protein-Expression. Extrakte wurden von jedem Zeitpunkt hergestellt und auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Die Expression von Plk2, Cyclin E und β-Actin zu den einzelnen Zeitpunkten wurde anschließend im Western-Blot mit Antikörpern analysiert. **(C)** Plk2-Kinaseaktivität. Plk2 wurde aus den oben beschriebenen Extrakten (2 mg) immunpräzipitiert und die Plk2-Kinaseaktivität für jeden Zeitpunkt gemessen. Dargestellt ist ein Autoradiogramm als repräsentatives Beispiel von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Zum Vergleich wurde ebenfalls der Cyclin E/Cdk2-Komplex aus den Extrakten (400 µg) mit einem Anti-Cyclin E-Antikörper immunpräzipitiert und die Cyclin E-assoziierte Cdk2-Kinaseaktivität durch den Histon H1-Assay gemessen.

der Mitte der S-Phase wieder ab. Da nur die Kinaseaktivität ansteigt, nicht aber die Proteinmenge, lässt dies vermuten, dass Plk2 durch einen post-translationalen Mechanismus in jeder G1-Phase aktiviert wird und damit sehr wahrscheinlich eine Funktion am G1/S-Übergang ausübt.

6.3.2. Aktivität und Expression von Plk2 in humanen Fibroblasten (Hs68)

Die Messung der Kinaseaktivität in nicht-immortalisierten humanen Fibroblasten der Vorhaut, den Hs68-Zellen, war notwenig, da diese für die Mikroinjektionsexperimente zur Untersuchung der Plk2-Funktion am G1/S-Übergang, verwendet wurden. Außerdem geben die Ergebnisse Informationen über die Funktion von Plk2 in normalen nicht-tumorigenen Zellen, wo die "Checkpoint“-Mechanismen nicht verändert sind.

Die Hs68-Zellen wurden, wie unter 5.1.4.1. beschrieben, durch Entfernen des Serums aus dem Medium in G0 arretiert und durch erneute Serumzugabe zum Wiedereintritt in die G1-Phase stimuliert. Alle drei Stunden wurden Zellen geerntet und entweder für die FACS-Analyse fixiert oder zur Herstellung von Extrakten verwendet. Die FACS-Analyse zeigt, dass die Zellen sich nach 15 h in der S-Phase befinden und nach 21 h beginnen in die G2-Phase überzutreten (Abb. 13A). Im Western-Blot ist erkennbar, dass Plk2 in Hs68-Zellen sowohl in der G0-Phase als auch in den anderen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird (Abb. 13B). Auffällig ist, dass in den exponentiellen Zellen (Exp.) die untere Bande, die ebenfalls durch den CDL21-Antikörper erkannt wird und vermutlich eine posttranslational-modifizierte Form von Plk2 darstellt, schwächer exprimiert wird. Analysiert man dagegen die Plk2-Kinaseaktivität, ist diese nach 3 h in G1 am höchsten und sinkt nach 6 h ab (Abb. 13B). Die Cyclin E-assoziierte Cdk2-Aktivität ist dagegen nach 12 Stunden am höchsten wenn die Zellen sich am G1/S-Übergang befinden. Im Unterschied zu HeLa-Zellen ist Plk2 in Hs68-Zellen nicht am G1/S-Übergang aktiv. Dies könnte darin begründet liegen, dass die Zellen durch den Serumentzug aus einem Ruhezustand (G0) wieder in den Zellzyklus eintreten und

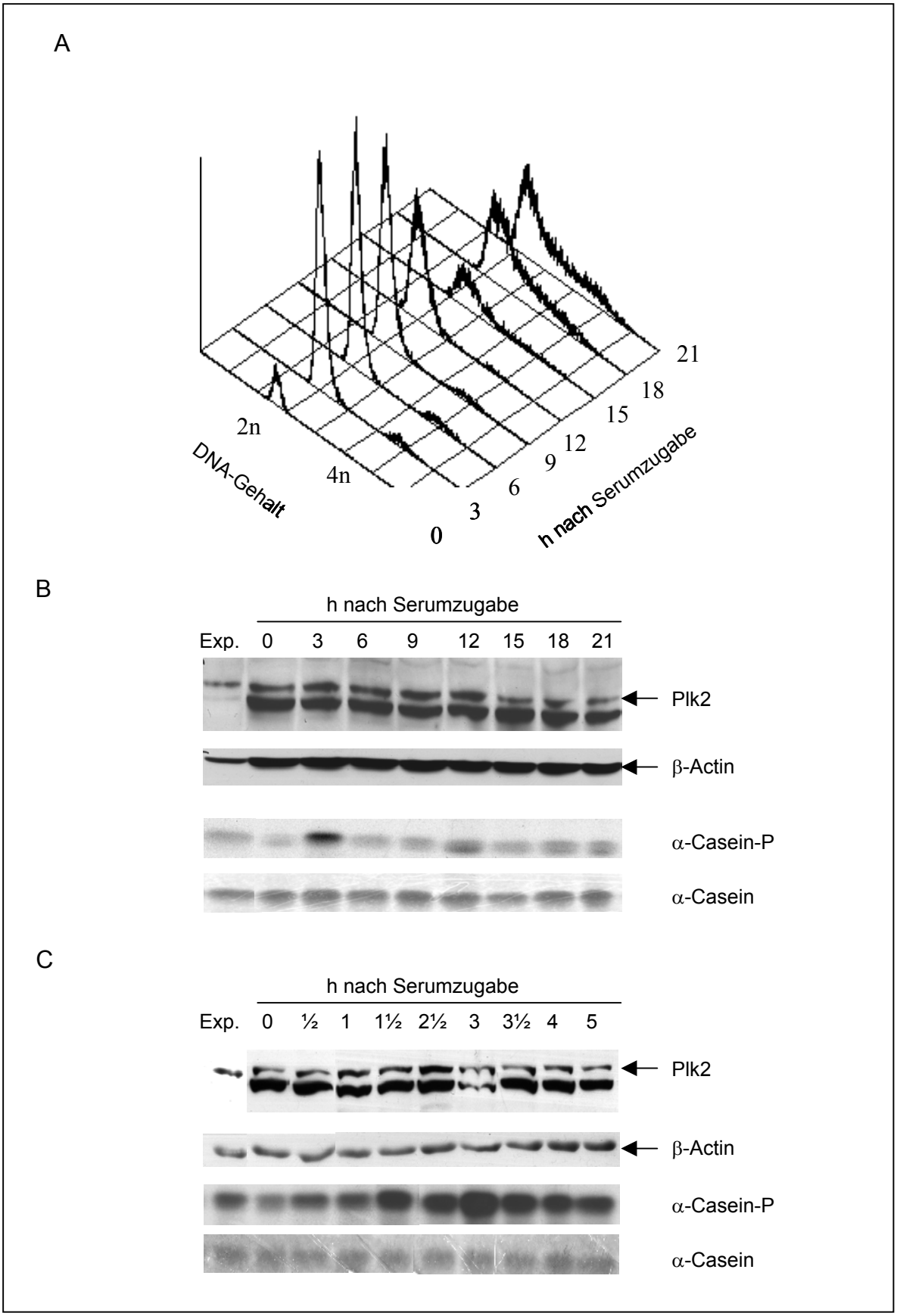

Abbildung 13: Zeitkurve von in der G0-Phase synchronisierten und in die G1-Phase entlassenen Hs68-Zellen (Legende umseitig).

Abbildung 13: Die humanen Fibroblasten Hs68 wurden durch Serumentzug in G0 arretiert und dann durch Zugabe von Serum stimuliert, wieder in die G1-Phase des Zellzyklus einzutreten. Anschließend wurden die Zellen zu den oben beschriebenen Zeitpunkten geerntet und Zellen für die FACS-Analyse fixiert bzw. Extrakte hergestellt. Parallel wurden auch exponentielle Zellen (Exp.) als Kontrolle geerntet und analysiert. **(A)** Wiedereintritt in den Zellzyklus. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und der DNA-Gehalt im FACS gemessen. Die Histogramme zeigen die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zu dem entsprechenden Zeitpunkt. **(B)** Proteingehalt und Aktivität von Plk2 am G1/S-Übergang. Zur Analyse der Proteinmengen von Plk2, wurden je 75 µg Proteinextrakt auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und in einem Western-Blot mit einem Anti-Plk2-Antikörper detektiert. Aus den gleichen Extrakten (2 mg) wurde Plk2 immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität durch Phosphorylierung von α-Casein gemessen. **(C)** Proteingehalt und Aktivität von Plk2 nach dem Wiedereintritt in den Zellzyklus. Die Proben wurden, wie oben beschrieben, analysiert.

dies eine andere Regulation erfordert. Ein weiteres Indiz für die Funktion von Plk2 beim Wiedereintritt in den Zellzyklus ist, dass Plk2 ursprünglich als frühes Gen identifiziert wurde, was bedeutet, dass die mRNA von Plk2 sofort nach Serumzugabe induziert wird [85]. Aus diesem Grund wurde eine kurze Zeitkurve erstellt und die Expression bzw. die Aktivität von Plk2 kurz nach der Serumzugabe zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteinmengen beim Wiedereintritt in den Zellzyklus konstant sind (Abb13C). Die Aktivität dagegen steigt schon ½ h nach Serumzugabe an, ist 3 h nach Serumzugabe am höchsten und nimmt dann wieder ab (Abb. 13C). Dies lässt vermuten, dass Plk2 an der Regulation des Wiedereintritts von humanen Fibroblasten von der G0-Phase in den Zellzyklus nach Serumentzug beteiligt ist.

6.4. Funktionelle Analyse der Plk2-Kinase

Ziel der weiteren Untersuchungen war es nun, die *in vivo* Funktion von Plk2, insbesondere die Rolle von Plk2 am G1/S-Übergang, zu klären. Deshalb wurde die Funktion von Plk2 durch (1) die Mikroinjektion von spezifischen Antikörpern gegen Plk2 sowie (2) die Herunterregulation des Plk2-Proteins durch RNA-Interferenz und (3) durch Transfektion der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R, ausgeschaltet.

6.4.1. Untersuchungen zur Rolle von Plk2 im Zellzyklus

6.4.1.1. Die Mikroinjektion spezifischer Antikörper gegen Plk2 verhindert den Eintritt von Fibroblasten in die S-Phase

Um die Funktion von Plk2 am G0/S-Übergang in humanen Fibroblasten (Hs68) zu erforschen, wurde affinitätsgereinigter Anti-Plk2-FL-Antikörper während der G1-Phase in das Zytoplasma der Zellen injiziert. Dazu wurden die Zellen durch Serumentzug in G0 arretiert und durch Serumzugabe synchron in die frühe G1-Phase entlassen, um 3 h später den

Antikörper zu injizieren. Anschließend wurde die Fähigkeit der mikroinjizierten Zellen untersucht, in die S-Phase einzutreten und die DNA-Replikation einzuleiten. Aus diesem Grund wurde direkt nach der Mikroinjektion Bromdesoxyuridin (BrdU), ein Thymidin-Analogon, zum Medium dazugegeben. Der Einbau von BrdU in die DNA kann nach Fixierung der Zellen durch Färbung mit einem Anti-BrdU-Antikörper in der Immunfluoreszenz detektiert werden. Als Kontrolle dienten unspezifische Immunglobuline aus Kaninchen (Kontroll-IgG), die in der gleichen Konzentration wie der Anti-Plk2-FL Antikörper in die Zelle injiziert wurden. Ein Schema des Versuchsaufbau ist in Abbildung 14 dargestellt.

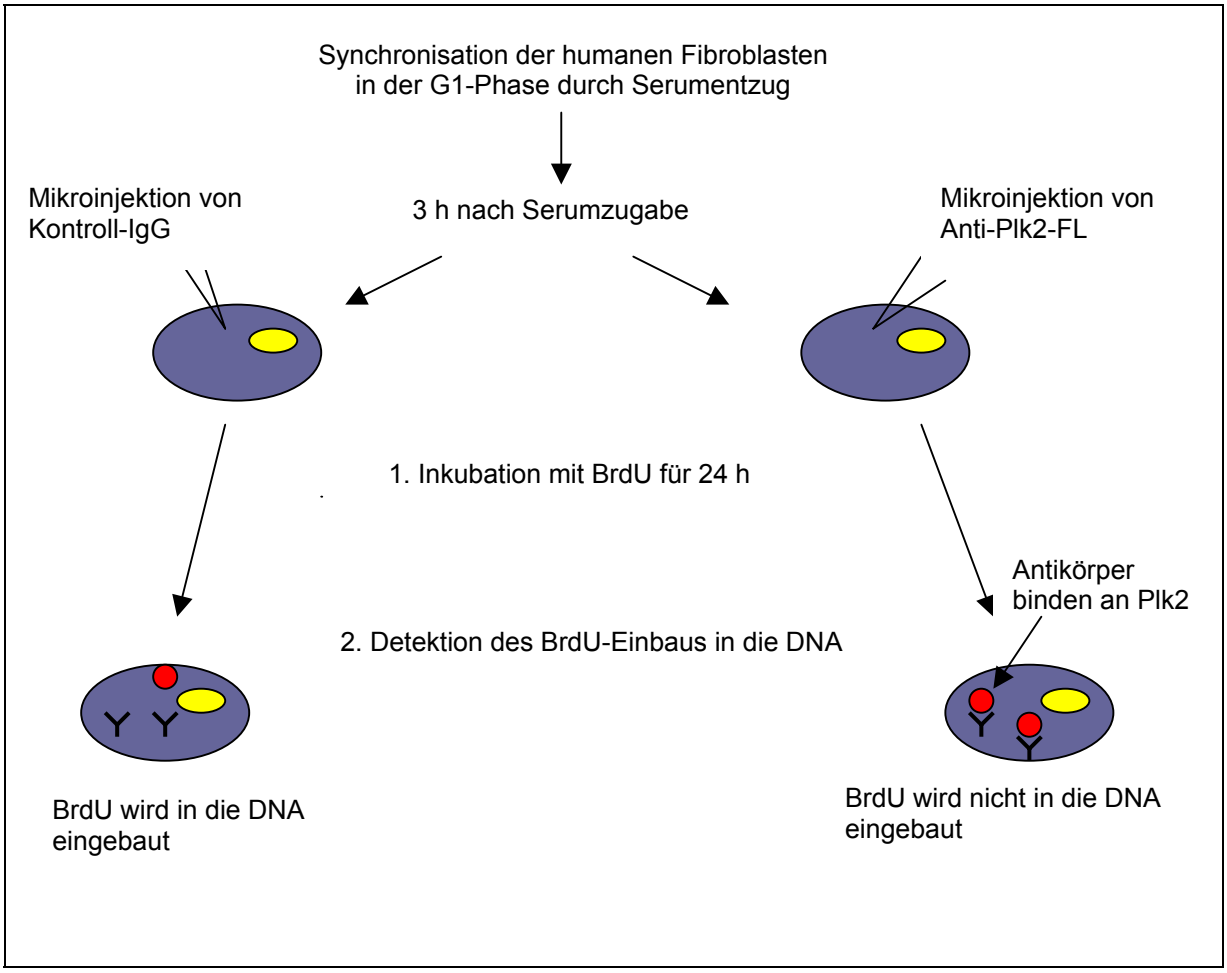

Abbildung 14: Übersicht über den experimentellen Ablauf der Mikroinjektion von Antikörpern.

Humane Fibroblasten (Hs68) wurden durch Serumentzug für 60 h in G0 arretiert und durch Serumzugabe zum Wiedereintritt in die G1-Phase stimuliert. 3h nach Serumzugabe wurden entweder unspezifisches Kaninchen IgG (4 µg/µl) oder der affinitätsgereinigte Anti-Plk2-Antikörper (4 µg/µl) injiziert. Direkt nach der Mikroinjektion wurde zu dem Medium BrdU (50 µg/ml) gegeben, um die DNA-Replikation zu verfolgen. 24 h später wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert und der BrdU-Einbau der mikroinjizierten Zellen durch Immunfluoreszenz analysiert.

Die Abbildung 15A zeigt ein typisches Mikroinjektionsexperiment. Die Ergebnisse, die in Abbildung 15B zusammengefasst sind, zeigen deutlich, dass die Mikroinjektion von Anti-

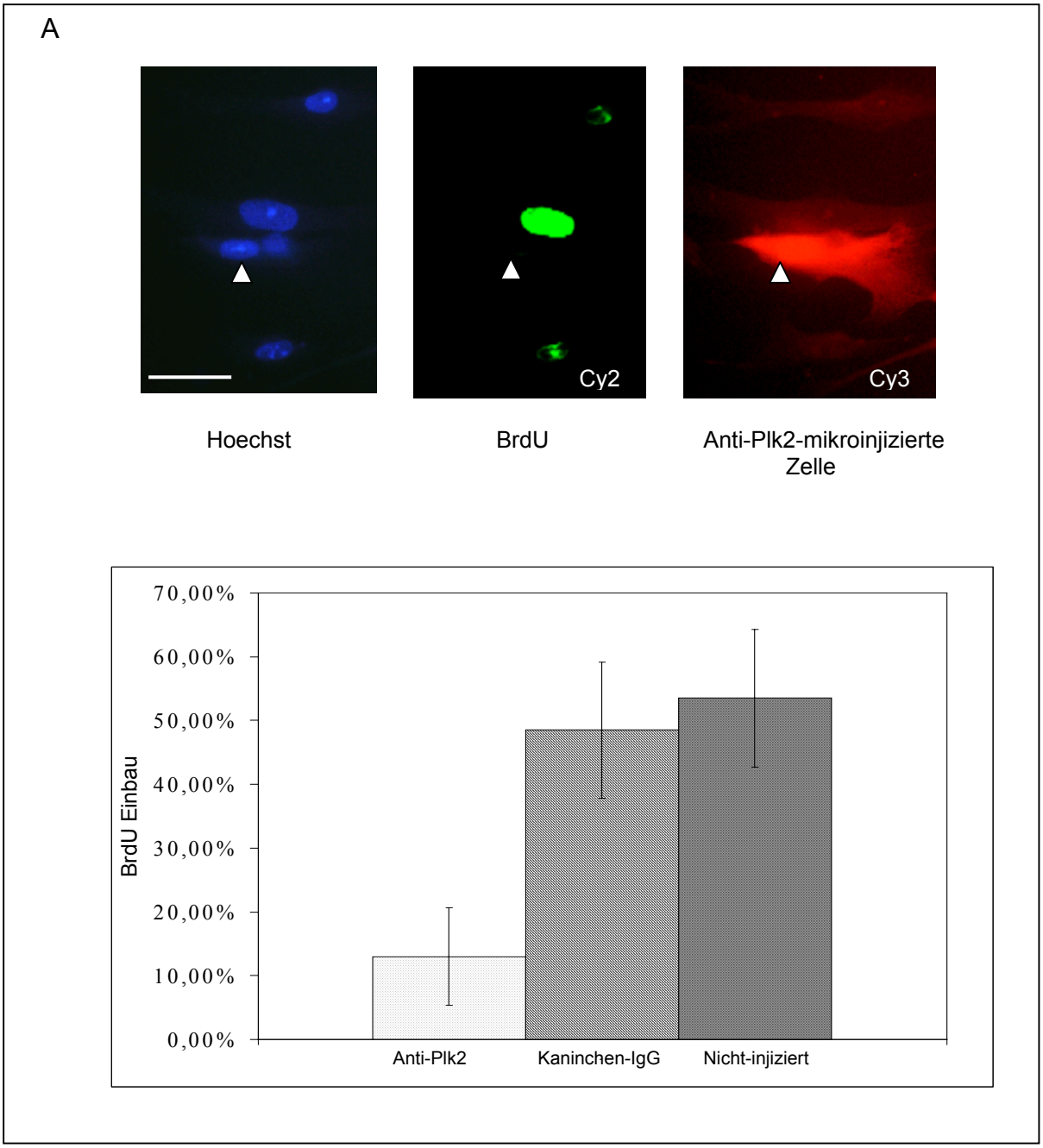

Abbildung 15: Mikroinjektion von Anti-Plk2-Antikörpern in humane Fibroblasten (Hs68) blockiert den Eintritt in die S-Phase.

(A) Typisches Mikroinjektionsexperiment. Der Pfeil kennzeichnet eine mikroinjizierte Zelle. Mikroinjizierte Zellen wurden durch Färbung mit einem Cy3-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (rechtes Bild) detektiert, BrdU-positive Zellen mit einem primären Anti-BrdU-Antikörper und anschließender Färbung mit einem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper (mittleres Bild) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde die DNA des Zellkerns durch Hoechst angefärbt (linkes Bild). (Skalierung: 10 µm) **(B)** Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Dabei wurden pro Versuch 300 Zellen ausgezählt. Das Diagramm zeigt die mit Anti-Plk2 oder Kaninchen-IgG mikroinjizierten sowie die nicht-injizierten BrdU-positiven Zellen.

Plk2-Antikörpern die Fähigkeit der Hs68-Zellen, in die S-Phase einzutreten, um die DNA zu replizieren, blockiert. Der Anteil der BrdU-positiven Zellen ist im Vergleich zu den kontroll-

injizierten Zellen signifikant reduziert. Zwischen den nicht-injizierten umliegenden Zellen und den kontroll-injizierten Zellen ist dagegen kein Unterschied im BrdU-Einbau festzustellen.
Da die Mikroinjektion mit Antikörpern gegen Plk2 den Eintritt in die S-Phase blockieren, ist anzunehmen, dass die Plk2-Kinase vermutlich am G0/S-Übergang beteiligt sein könnte.

6.4.1.2. Auswirkung der Herunterregulation des Plk2-Proteins auf die Verteilung der Zellzyklusphasen

Es konnte gezeigt werden, dass das endogene Plk2-Protein nach Transfektion des pSUPER-Plk2-(1)-Konstrukts (Tabelle 2) in HeLa-Zellen herunterreguliert ist (S. Kemmler, DKFZ Heidelberg, Diplomarbeit 2003). Von den gleichen Zellen wurde ein Teil für die FACS-Analyse fixiert und auf eventuelle Veränderung in der Zellzyklusphasenverteilung hin untersucht. Betrachtet man die exponentiell wachsende Zellpopulation, stellt man fest, dass der Anteil an G2/M-Phase-Zellen erhöht ist. Um diesen Effekt auf den Zellzyklus von exponentiell wachsenden HeLa-Zellen zu bestätigen, wurde das pSUPER-Plk2-(2)-Konstrukt (Tabelle 2) ebenfalls in HeLa-Zellen transfiziert und der Gehalt an endogenem Plk2-Protein im Western-Blot bestimmt (Abb. 16A). Mit diesem Konstrukt konnte ebenfalls die Herunteregulation des endogenen Plk2-Proteins nachgewiesen werden. Dagegen ist der Plk2-Proteingehalt in den Kontrollzellen, welche mit dem pSUPER-Vektor alleine (Mock) oder mit dem pSUPER-Lamin-Vektor transfiziert wurden, nachweisbar. Auch die Effekte auf den Zellzyklus von exponentiell wachsenden Zellen, wie die schwache Erhöhung des Anteils an G2/M-Phase-Zellen, konnte bestätigt werden (Abb. 16B). Es wurde aber auch nach der Transfektion mit dem pSUPER-Lamin-Vektor ein verändertes Zellzyklusprofil im Vergleich zu den mock-transfizierten HeLa-Zellen beobachtet.
Oft werden geringe Effekte auf den Zellzyklus in exponentiell wachsenden Zellen nicht erkannt, da es sich um keine homogene Zellpopulation handelt und es dadurch zur Überlagerung der Effekte kommt. Um zu zeigen, dass Plk2 doch einen Effekt auf den Verlauf der G1-Phase hat, wurden die transfizierten Zellen mit Nocodazol für 14 h behandelt, um den Eintritt in die nächste G1-Phase zu verhindern und dann fixiert. Nach der Auswertung der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Transfektion von pSUPER-Plk2-(1) in der G1-Phase arretieren (S. Kemmler, DKFZ Heidelberg, Diplomarbeit 2003). Der gleiche Effekt konnte nach Transfektion von pSUPER-Plk2-(2) in HeLa-Zellen beobachtet werden (Abb. 16C). Ungefähr 30 % der Zellpopulation sind G1-Phase-Zellen. Dagegen sind die Zellen der Kontrollen (Mock und sh-Lamin) nicht in G1 arretiert, sondern sind in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten.

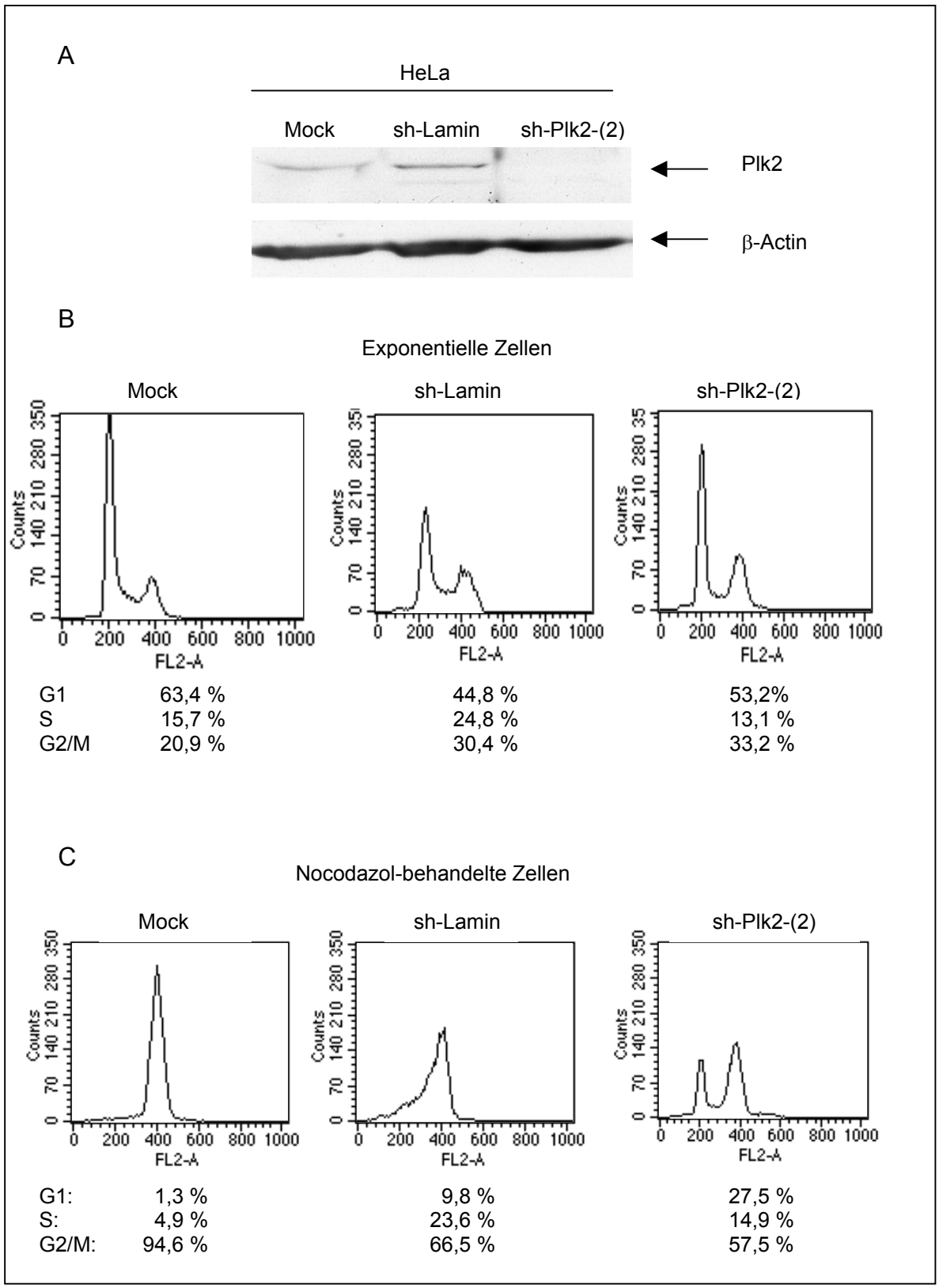

Abbildung 16: Effekte auf den Zellzyklus von HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Plk2.

(A) Herunterregulation von Plk2 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen werden mit 20 µg der entsprechenden pSUPER-Konstrukte transfiziert, die Zellen 120 h nach der Transfektion geerntet, 75 µg Proteinextrakt auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und der Plk2-Proteingehalt im Western-Blot analysiert. Als Gelladekontrolle wird ebenfalls der β-Actin-Gehalt in den Proben detektiert. **(B)** Die HeLa-Zellen wurden, wie in (A) beschrieben, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 120 h nach der

Transfektion (exponentiell) für die FACS-Analsye fixiert oder **(C)** 96 h nach der Transfektion für 14 h mit 50 ng/ml Nocodazol behandelt, um den Wiedereintritt in die G1-Phase zu blockieren, und dann fixiert. Nach Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurde die Zellzyklusphasenverteilung in der Zellpopulation mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse (FACS) bestimmt.

Vergleicht man die FACS-Analysen der beiden Kontrollen nach Nocodazol-Behandlung, stellt man fest, dass die Herunterregulation von Lamin A/C zu einem verlangsamten Zellzyklus führt, da die mit pSUPER-Lamin-transfizierten Zellen sich noch in der S-Phase befinden, im Gegensatz zu den Mock-behandelten Zellen, die in der G2/M-Phase eingetreten sind. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass es in den Nocodazol-behandelten Zellen zu keinem Arrest in G1 kommt. Aufgrund der Beeinflussung des Zellzyklus durch Herunterregulation von Lamin könnte es zu den beobachteten Veränderungen im Zellzyklusprofil der expotentiellen Zellen kommen (Abb. 16B).

Die gleichen Beobachtungen auf den Verlauf des Zellzyklus von U2OS-Zellen konnten nach Transfektion von pSUPER-Plk2-(1) gemacht werden (S. Kemmler, Diplomarbeit 2003). Nur war es hier nicht möglich, die Herunterregulation des endogenen Plk2-Proteins nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden die U2OS-Zellen mit den entsprechenden pSUPER-Konstrukten und dem Puromycin-Resistenz-Vektor (pBabe-Puro) ko-transfiziert. Die transfizierten Zellen konnten dadurch durch Zugabe von Puromycin selektiert werden. Hierdurch war es möglich, die Herunterregulation von Plk2 im Western-Blot mit dem CDL21-Antikörper nach Transfektion von pSUPER-Plk2-(1 und 2) zu zeigen (Abb. 17 A). Auffällig ist, dass die untere Bande nach Transfektion mit pSUPER-Plk2 (1 und 2), die untere Bande auch nicht mehr nachweisbar ist. Da diese aber abhängig von der Affinitätsreinigung des Antikörpers mal stärker und mal schwächer erkannt wird (s. auch Abb. 18A), ist davon auszugehen, dass diese Bande unspezifisch ist und keine alternative Spleißform. Weiterhin wurden ebenfalls die gleichen Effekte auf die Zellzyklusphasenverteilung der U2OS-Zellen nach Herunterregulation von Plk2 durch sh-Plk1-(1) (Abb. 17 B und C) sowie sh-Plk2-(2) (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Sie sind jedoch nicht so ausgeprägt wie in HeLa-Zellen. Dies könnte auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen zurückzuführen sein, wodurch es zu einer geringeren Herunterregulation des endogenen Plk2 kommen könnte, sowie auf die zusätzliche Selektion mit Puromycin.

Der beobachtete Effekt ist spezifisch für Plk2, da die Proteinmengen von Plk1 und Plk3 nach Transfektion mit pSUPER-Plk2 nicht verändert sind und dass keine der beobachteten Effekte in den Kontrollzellen auftreten.

Zusammenfassend betrachtet, konnte gezeigt werden, dass die Plk2-Kinase G1/S-Übergang beteiligt ist. Die Erhöhung des Anteils an G2- bzw. M-Phase-Zellen in exponentiellen Zellen könnte auf eine mögliche weitere Funktion von Plk2 im Zellzyklus hindeuten. Es ist auch

möglich, dass dies ein sekundärer Effekt ist, der durch Deregulation eines Ereignisses in einer früheren Zellzyklusphase verursacht wurde.

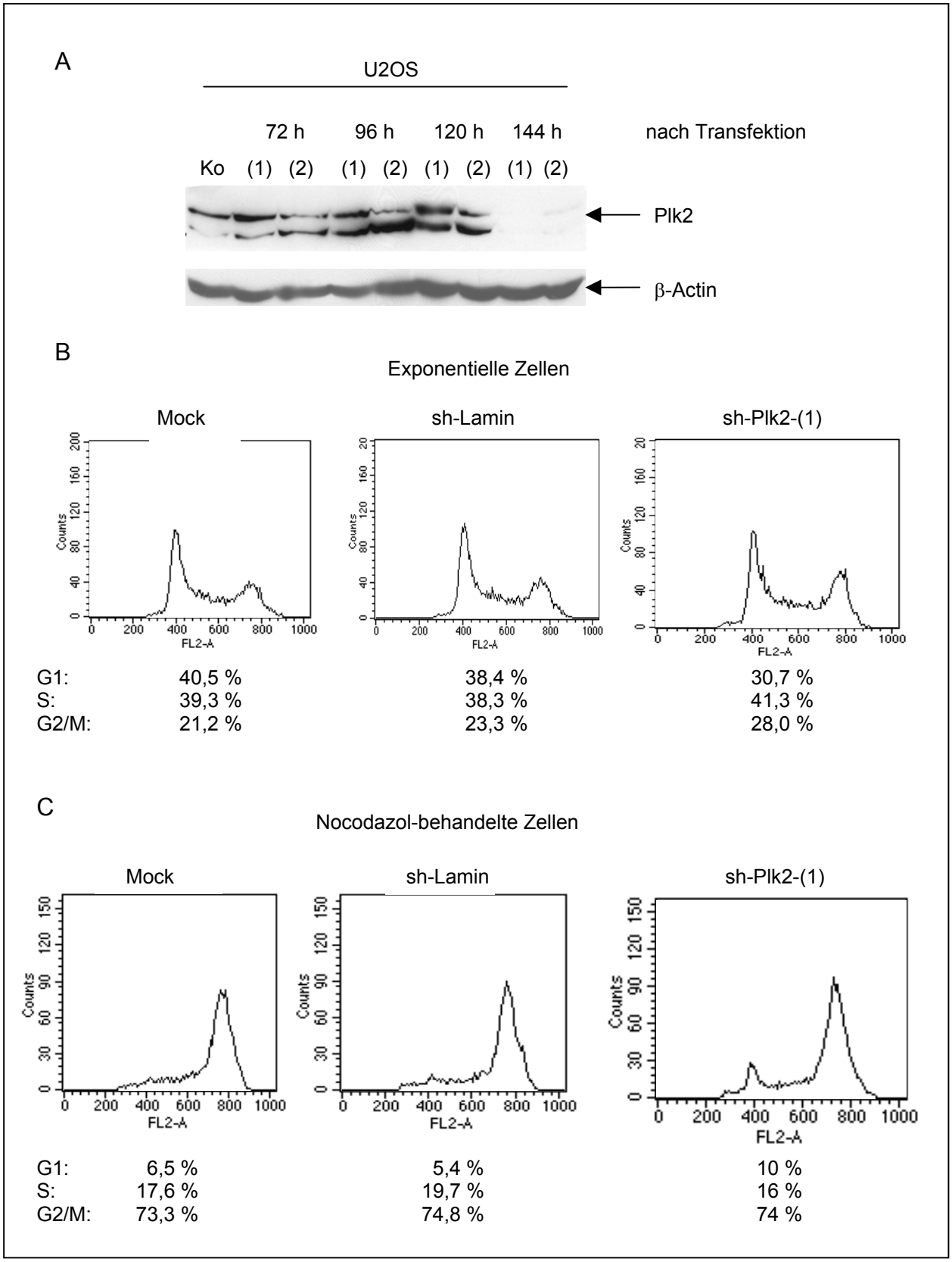

Abbildung 17: Herunterregulation des Plk2-Proteins durch RNAi beeinflusst den G1/S-Übergang sowie die G2- und M-Phase des Zellzyklus in U2OS-Zellen (Legende umseitig).

Abbildung 17: (A) Inaktivierung des Plk2-Genes durch RNA-Interferenz in U2OS-Zellen. U2OS-Zellen wurden mit 18 µg leeren pSUPER-Vektor (Mock) oder mit pSUPER-Plk2-(1) bzw. -(2) und 2 µg pBabe-Puro ko-transfiziert. 24 h später wurden die transfizierten Zellen durch Zugabe von Puromycin (2µg) für weitere 24h selektioniert. Anschließend wurden die Zellen 72, 96, 120 und 140 h lang nach der Transfektion geerntet und die Expression von Plk2 und β-Actin im Western-Blot analysiert. **(B)** Die U2OS-Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, transfiziert und selektioniert. Anschließend wurden sie entweder 140 h später fixiert oder ebenfalls nach 132 h für 12 h mit Nocodazol **(C)** arretiert und dann für die FACS-Analyse fixiert. Die Histogramme zeigen die Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus.

6.4.2. Die Rolle von Plk2 im Centrosomenzyklus

Plk1 spielt eine zentrale Rolle im Centrosomenzyklus und ist auch wie Plk3 an den Centrosomen lokalisiert [60, 80, 93, 117]. Deshalb lag es nahe, die Lokalisation von Plk2 am Centrosom sowie eine mögliche Funktion von Plk2 im Centrosomenzyklus zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl exogenes HA-Plk2-Protein als auch endogenes Plk2-Protein an den Centrosomen mit γ-Tubulin, einem Marker für das pericentriolare Material, in U2OS- und CHO-Zellen ko-lokalisiert (S. Kemmler, Diplomarbeit DKFZ Heidelberg, 2003). Auch in Präparationen von isolierten Centrosomen konnte die Anreicherung von endogenem Plk2 im Western-Blot mit dem Anti-Plk2-FL- sowie auch mit dem Anti-Plk2-CDL21-Antikörpern nachgewiesen werden (in Zusammenarbeit mit R. S. Hames und A. Fry, Universität in Leicester, England).
Die Tatsache, dass Plk2 am G1/S-Übergang aktiv ist, lässt vermuten, dass Plk2 direkt an der Regulation der Centrosomen-Verdopplung am G1/S-Übergang beteiligt sein könnte. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die RNAi-vermittelte Herunterregulation des endogenen Plk2-Proteins sowie die Überexpression der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R einen Effekt auf die Centrosomen-Verdopplung hat. Dazu wurde der von Meraldi et al. beschriebene Centrosomen-Duplikations-Assay [46] durchgeführt (s. 5.1.4.3.). Dazu werden die Zellen mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt, einem DNA-Synthese-Inhibitor, wodurch in der S-Phase die Centrosomen-Verdopplung experimentell von der DNA-Replikation entkoppelt werden kann [118]. Dies führt zu einer vermehrten Duplikation der Centrosomen in den S-Phase arretierten Zellen, die durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können.

6.4.2.1. Plk2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Centrosomen-Duplikation

Der Effekt auf die Centrosomen-Überduplikation nach der Herunterregulation des endogenen Plk2-Proteins durch RNA-Interferenz in U2OS-Zellen wurde untersucht. Dazu wurden die

Zellen mit den pSUPER-Plk2-(1)- und pSUPER-Plk2–(2)-Konstrukten transfiziert, was zu einer Reduzierung des Plk2-Proteingehaltes in mit HU-behandelten U2OS-Zellen 6 Tage nach der Transfektion (Abb. 18A) führt. Zur Bestätigung der Spezifität der Herunterregulation von Plk2, wurden die U2OS-Zellen auch mit dem pSUPER-Lamin- oder dem pSUPER-Konstrukt (Mock) alleine transfiziert. Die Herunterregulation von Lamin sowie die Transfektion des Leervektors hat keinen Einfluss auf die Plk2-Proteinmengen nach Behandlung mit HU. Als nächstes wurde der Effekt nach Suppression der endogenen Plk2-Expression auf die Centrosomen-Verdopplung untersucht. Sechs Tage nach der Transfektion wurden die mit HU-behandelten U2OS-Zellen auf Deckgläschen fixiert und die Centrosomen durch Färbung mit dem Anti-γ-Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht (Abb.18C). Anschließend wurden die Centrosomen pro Zelle ausgezählt. Wie aus Abbildung 18B ersichtlich, verhindert die Hemmung der Synthese des Plk2-Proteins durch sh-Plk2-(1) und –(2) die vermehrte Duplikation der Centrosomen. Über 70 % der Zellen haben die normale Anzahl von 2 Centrosomen. Dagegen hat die Transfektion von pSUPER-Leer und pSUPER-Lamin keinen Effekt auf die Centrosomen-Verdopplung, dass heißt über 60 % der Zellen haben mehr als 2 Centrosomen, zeigen also eine Überduplikation der Centrosomen. Auf die Centrosomen-Duplikation in nicht-arretierten Zellen (-HU) hat die Herrunterregulation von Plk2 keinen Einfluss.

Um zu zeigen, dass die Transfektion mit sh-Plk2-(1 und 2) vor der HU-Behandlung keinen G1- bzw. Zellzyklus-Arrest in den Zellen auslöst und es dadurch zur Inhibition der Centrosomen-Überduplikation kommt, wurde mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse die Zellzylusphasenverteilung untersucht. Die FACS-Analyse sowie die mikroskopische Betrachtung der Zellen zeigt, dass die mit sh-Plk2 behandelten Zellen wie die Kontrollzellen in der frühen S-Phase arretiert sind (Abb. 18D). Der Block der Centrosomen-Überduplikation wird also nicht durch einen Zellzyklus-Arrest verursacht, sondern ist auf die Herunterregulation des Plk2-Proteins zurückzuführen.

Damit wurde gezeigt, dass Plk2 eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Centrosomen-Verdopplung am G1/S-Übergang spielt. Findet keine ordnungsgemäße Verdopplung der Centrosomen statt, kann die Ausrichtung der bipolaren Spindel in der Mitose nicht korrekt ablaufen, was zum Arrest in der Mitose führen kann. Dies könnte den vorhergesehenen Effekt erklären, dass einige Zellen nach Herunterregulation von Plk2 in der Mitose arretieren.

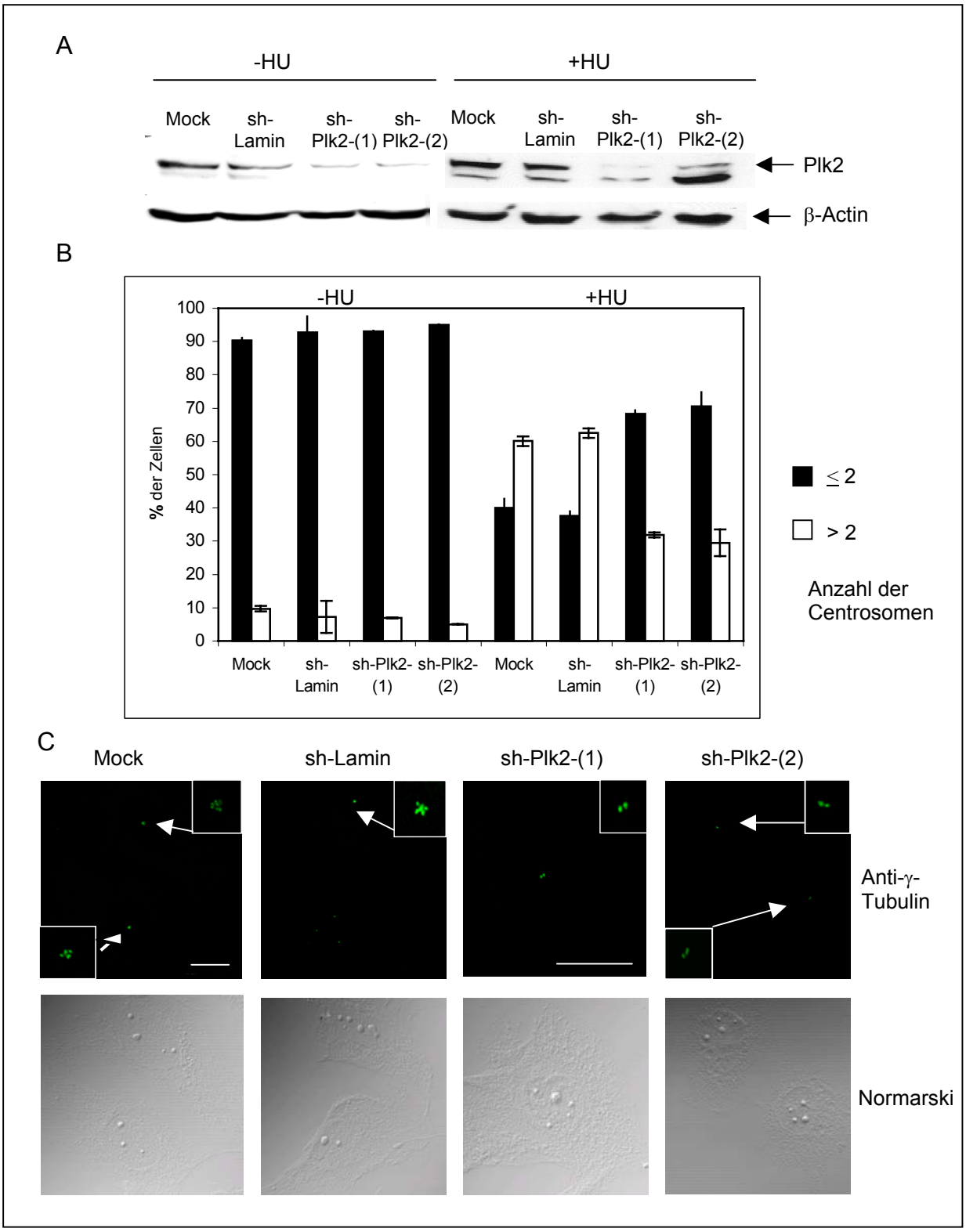

Abbildung 18: Die Centrosomen-Verdopplung ist blockiert durch RNAi-vermittelte Suppression der Plk2-Funktion.
Die U2OS-Zellen wurden mit 18 µg leeren pSUPER-Vektor (Mock), pSUPER-Lamin (sh-Lamin) oder pSUPER-Plk2-(1 und 2) und 2 µg pBabe-Puro ko-transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen durch Zugabe von Puromyin (2µg/µl) für 24 h selektioniert. Anschließend wurden die Puromycin-selektionierten Zellen mit Hydroxyharnstoff (15 mM) für 72 h behandelt und Zellen für Proteinextrakte oder für die FACS-Analyse geerntet sowie Deckgläschen für die Immunfluoreszenz fixiert. **(A)** Die Western-Blot-Analyse mit dem Anti-Plk2-CDL21-Antikörper zeigt die Mengen an Plk2-Protein in U2OS-Zellen nach Transfektion mit den pSUPER-Plk2-(1)- bzw. -(2)-Vektoren. Dazu wurden gleiche Mengen an Proteinextrakt durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem Anti-Plk2-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle für die Proteine diente β-Actin, welches mit einem

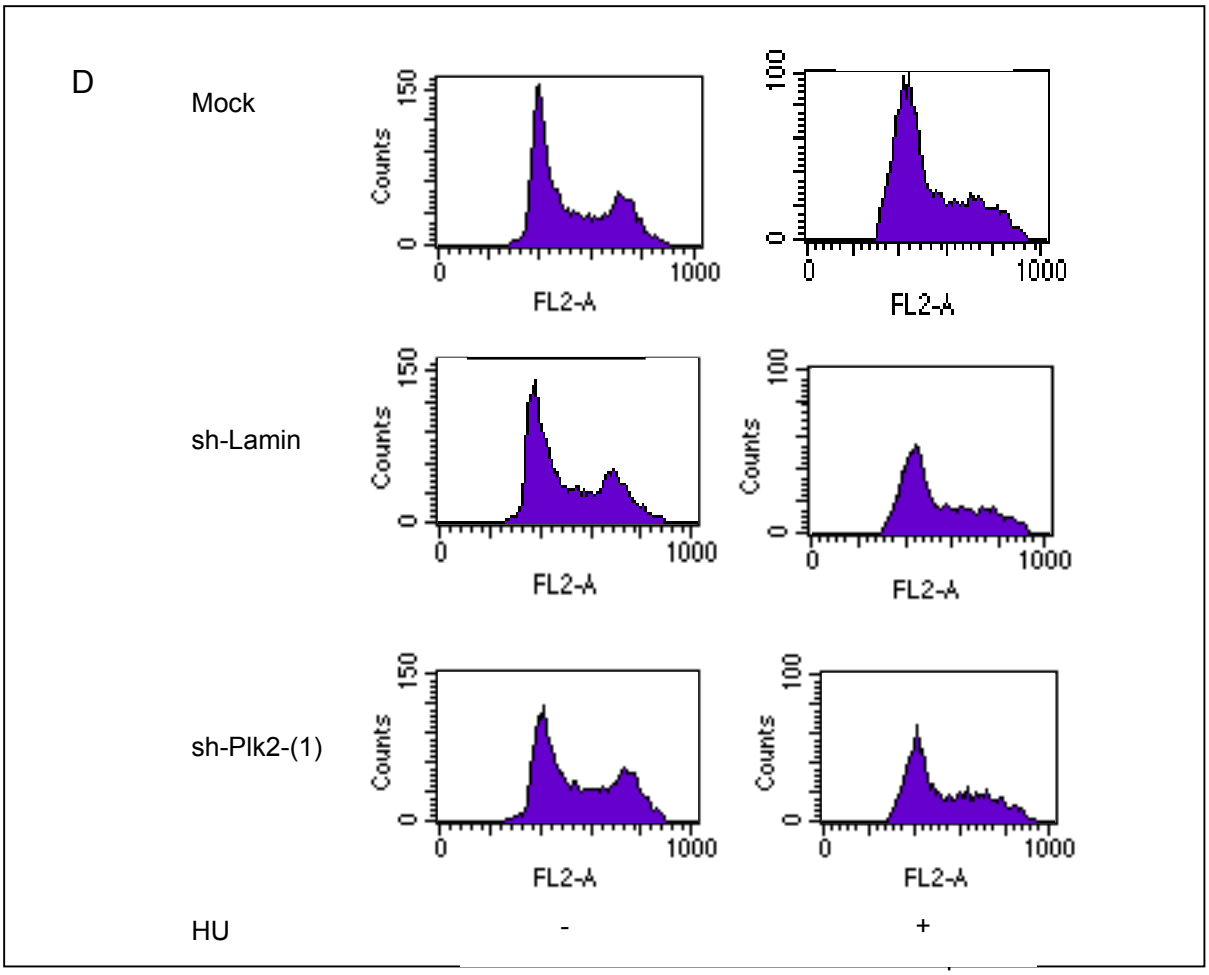

Abb.18D
Anti-β-Actin-Antikörper nachgewiesen wurde. **(B)** Das Diagramm stellt die Quantifizierung der in (C) gezeigten Ergebnisse dar. Die schwarzen Balken stehen für die Zellen mit einer normalen Anzahl an Centrosomen (1-2), die weißen Balken für Zellen mit mehreren Centrosomen (> 2). Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, wobei die Centrosomen pro Zelle ausgezählt wurden (200 Zellen pro Experiment). **(C)** Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigt die Re-Duplikation der Centrosomen nach Hydroxyharnstoff-Behandlung und Färbung mit einem Anti-γ-Tubulin-Antikörper in den Kontroll-Zellen (Ko, sh-Lamin), aber nicht in den mit pSUPER-Plk2-(1 und 2) transfizierten Zellen.(Skalierung: 20 µm) **(D)** FACS-Analyse der oben beschriebenen Proben. Das Ausschalten der Plk2-Funktion verändert nicht die Zellzyklusphasenverteilung nach Hydroxyharnstoff-Zugabe.

6.4.2.2. Plk2-K111R bindet an die Centriolen und hemmt deren Überduplikation in CHO-Zellen

Um die Ergebnisse in den U2OS-Zellen zu bestätigen, wurde der Duplikations-Assay in CHO-Zellen nach Überexpression der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R durchgeführt. Eine Voraussetzung für die Durchführung des Centrosomen-Duplikations-Assays mit Plk2-K111R ist, dass die Mutante dominant-negative Effekte in der Zelle auslöst. Es wurde beobachtet, dass die Überexpression von Plk2-K111R in S-Phase arretierten CHO-Zellen im gleichen Maße wie die Überexpression der dominant-negativen Mutante von CDK2, für Cdk2 wurde eine Funktion bei der Centrosomen-Verdopplung beschrieben [46], die

Überduplikation der Centrosomen hemmt (Ingrid Hofmann, unveröffentlichte Daten). Dabei wurden die Centrosomen durch Färbung mit dem Anti-γ-Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht. γ-Tubulin ist ein centrosomen-spezifischer Marker und Bestandteil des pericentriolaren Materials. Da eine Überduplikation der Centrosomen auch durch andere Mechanismen entstehen kann, wie zum Beispiel durch Trennung eines unduplizierten Centriolen-Paares sowie durch Fragmentierung des pericentriolaren Materials oder durch zytokinetische Defekte, wurde der Duplikations-Assay wiederholt. Die Centriolen wurden direkt durch Färbung mit dem GT335-Antikörper sichtbar gemacht. Dieser Antikörper erkennt speziell das glytamylierte α-Tubulin, welches nur an den Centriolen vorkommt [119].

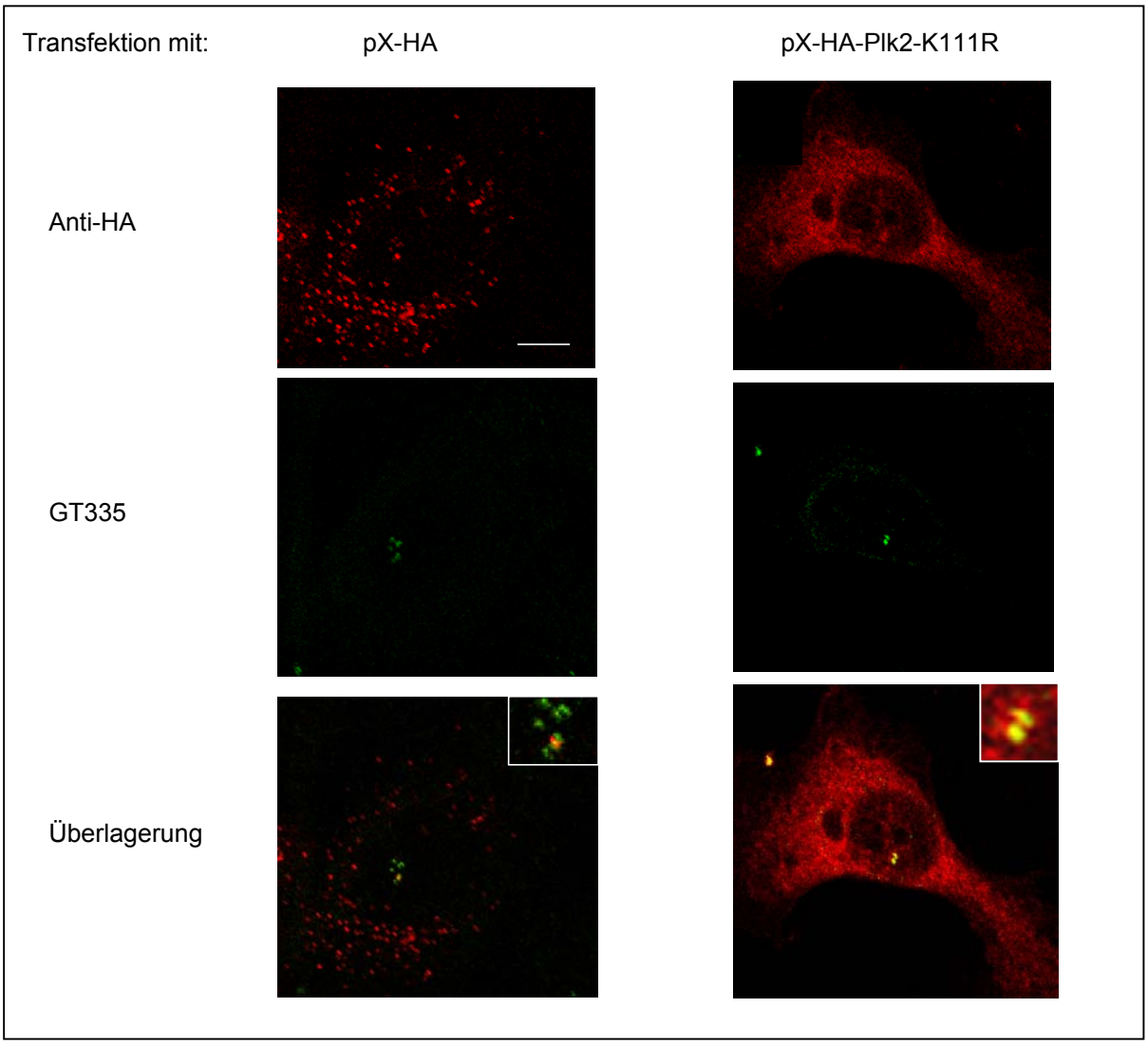

Abbildung 19: Plk2-K111R ko-lokalisiert mit den centriolaren Marker GT335 und hemmt die Überduplikation der Centriolen nach Hydroxyharnstoff-Behandlung in CHO-Zellen.

Die CHO-Zellen wurden dem pX-HA-Vektor als Kontrolle oder mit dem pX-HA-Plk2-K111R-Vektor transfiziert. 12 h später wurden die Zellen für 48 h mit Hydroxyharnstoff (4 mM) behandelt. Nach Fixierung der Zellen mit Methanol wurden die transfizierten Zellen mit dem Anti-HA-Antikörper und die Centriolen mit dem Anti-GT335-Antikörper angefärbt. Die Analyse erfolgte anschließend durch die konfokale Miroskopie (Skalierung:10 µm).

Nach der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung wurden die Centriolen in der Zelle mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops ausgewertet, um auszuschließen, dass die Signale von Plk2 und die des GT335-Antikörpers in verschiedenen Ebenen der Zelle liegen (Abb. 19). Wie aus den Überlagerungen der Plk2- (rot) und GT335-Signale (grün) ersichtlich, ko-lokalisiert Plk2-K111R mit den Centriolen (Überlagerung, gelb).
Weiterhin ist die Verdopplung der Centriolen in den CHO-Zellen, welche in der S-Phase arretiert waren, durch die Überexpression von Plk2-K111R gehemmt. In 80 % der mit pX-HA-Plk2-K111R transfizierten Zellen sind nur 1-2 Centriolen erkennbar. Dagegen besitzen über 80 % der Kontrollzellen, die mit dem pX-HA-Vektor transfiziert wurden, 4 oder mehr Centriolen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Effekte in S-Phase arretierten CHO-Zellen nach Überexpression von Plk2-K111R durch die Hemmung der Duplikation der Centriolen verursacht wird und bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse des Centrosomen-Verdopplung-Assays.
Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivität der Plk2-Kinase für die Duplikation der Centriolen am G1/S-Übergang essentiell ist.

6.4.2.3. Plk2 ist beteiligt bei der Duplikation der Centriolen in humanen Fibroblasten

Verschiedene Typen von Tumorzellen besitzen eine abnormale Anzahl von Centrosomen [120]. Weiterhin wurde gezeigt, dass humane primäre Zellen ihre Centrosomen-Anzahl sehr stark kontrollieren und dass dieser Kontrollmechanismus in transformierten Zellen, insbesondere bei Verlust des Tumorsuppressorproteins p53, aufgehoben ist [121]. Da U2OS-Zellen transformierte Zellen sind und der Duplikations-Assay eine abnormale Situation in den Zellen darstellt, wurde weiterhin die Funktion von Plk2 bei der Duplikation der Centriolen in normalen nicht-arretierten Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Hs68-Zellen mit pEGFP-Plk2-K111R transfiziert und nach 48 h mit Methanol auf den Deckgläschen fixiert. Um die Centriolen anzufärben wurde wiederum der Anti-GT335-Antikörper verwendet Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem pEGFP-Vektor alleine transfiziert.
Wie auch das endogene Plk2 und die HA-Fusionsproteine bindet das Fusionsprotein GFP-Plk2-K111R (grün) am Centrosom und ko-lokalisiert mit dem centriolen-spezifischen Marker GT335 (rot) in Hs68-Zellen (Abb. 20A). Dagegen bindet das GFP-Protein alleine nicht an die Centriolen. Weiterhin sind in der GFP exprimierenden Zelle zwei Centrosomen mit je zwei Centriolen zu sehen. Im Vergleich dazu besitzt die GFP-Plk2-K111R exprimierende Zelle ein Centrosom mit nur einem Centriol (Abb. 21). Die quantitative Analyse dieses Versuches zeigt

(Abb. 20), dass in 65 % der Interphase-Zellen die Expression von GFP-Plk2-K111R zu einer Reduzierung in der Anzahl der Centriolen nach zwei Zellteilungen führt. Sie haben nur noch ein Centriol beziehungsweise keine Centriolen mehr. Im Vergleich dazu besitzen 82 % der Kontrollzellen eine normale Anzahl an Centriolen (2-4) und nur 18 % weniger als 2 Centriolen. Dies bedeutet, dass die Verdopplung der Centriolen in den mit pEGFP-Plk2-K111R transfizierten Zellen nicht stattfindet. Plk2 spielt also eine essentielle Rolle bei der Duplikation der Centriolen in humanen Fibroblasten.

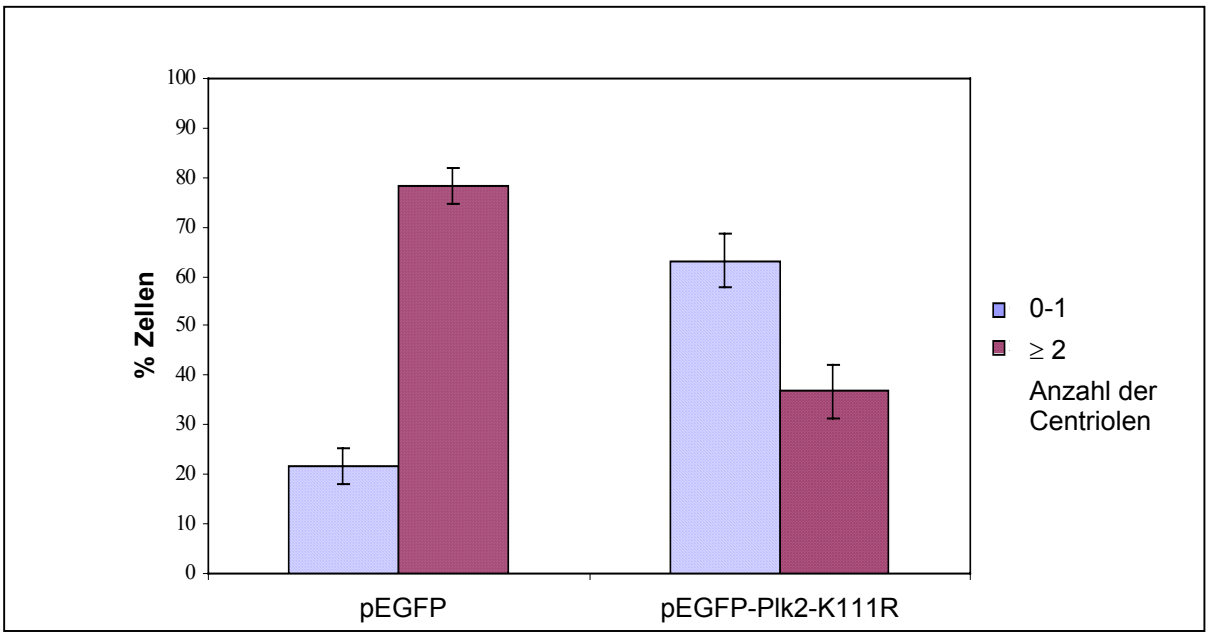

Abbildung 20: Die Überexpression von Plk2-K111R führt zu einem Verlust der Centriolen.

Das Diagramm stellt die Quantifizierung der in Abbildung 21 gezeigten Ergebnisse dar. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten, wobei die Centriolen pro Zelle ausgezählt wurden.

6.5. Identifizierung von Substraten der Plk2-Kinase

Um die Rolle der Plk2-Kinase am G1/S-Übergang zu analysieren, sollten Interaktionspartner von Plk2 identifiziert werden. Dazu wurde (1) eine Plk2-induzierbare Zelllinie generiert und (2) ein Zwei-Hybrid-Screen in der Hefe durchgeführt.

6.5.1. Etablierung einer Plk2-induzierbaren Zelllinie

Zur Analyse der *in vivo* Funktion von Plk2 sowie um mögliche Effekte auf Substate zu untersuchen, sollte eine Tetrazyklin-induzierbare das Plk2-WT-Protein überexprimierende

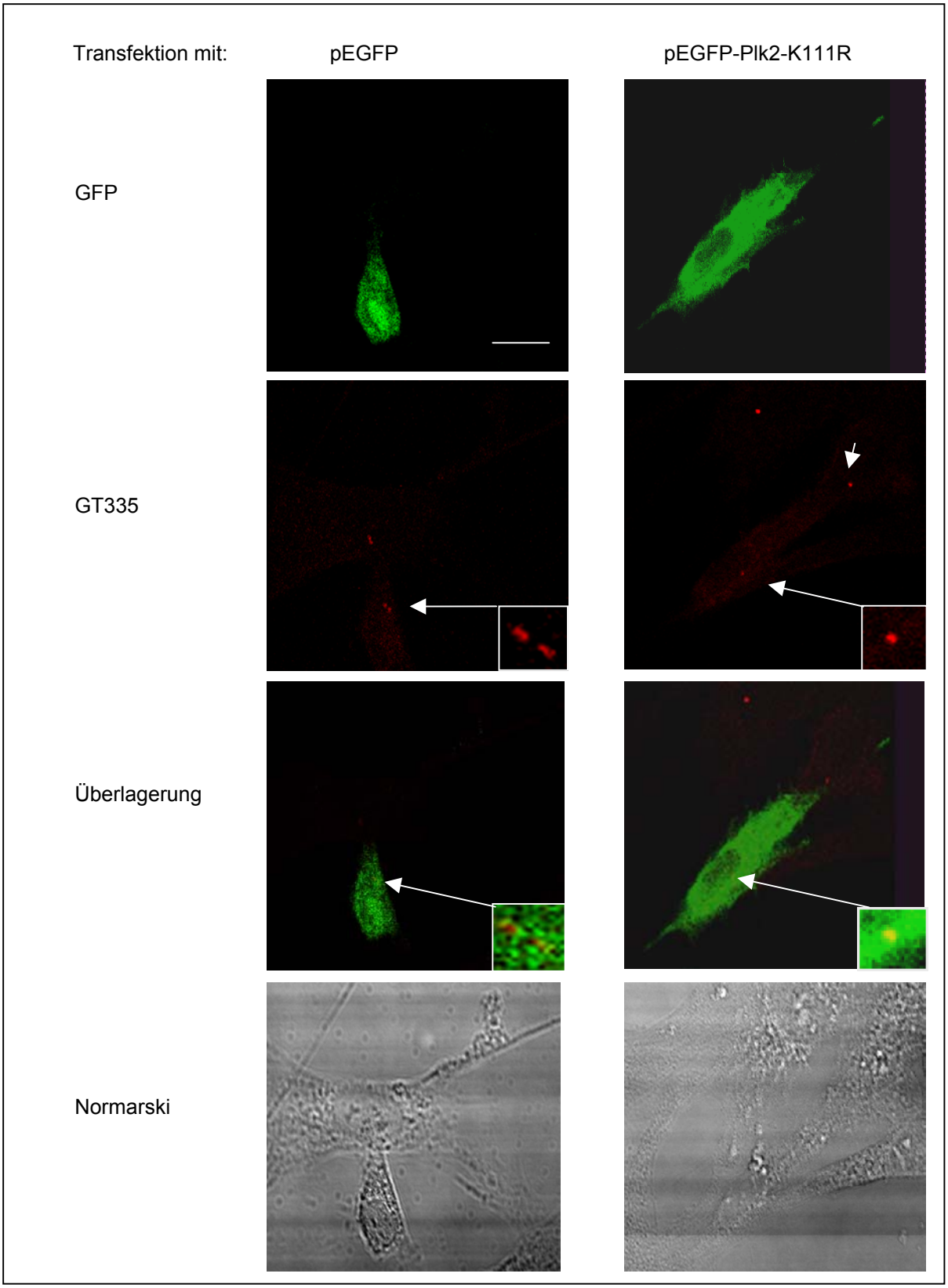

Abbildung 21: Die Expression von Plk2-K111R verursacht einen Verlust der Centriolen in humanen Fibroblasten.
Die Hs68-Zellen wurden mit dem pEGFP-Vektor (pEGFP) alleine oder mit dem pEGFP-Plk2-K111R-Vektor unter Verwendung von Effectene transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Centriolen mit dem Anti-GT335-Antikörper angefärbt. Als Sekundärantikörper wurde der mit Texas Red-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper verwendet. Dargestellt ist eine repräsentative Zelle die GFP oder GFP-Plk2-K111R exprimiert. (Skalierung: 10 µm)

stabile Zelllinie hergestellt werden. Das Tetrazyklin-induzierbare System, von Gossen und Bujard 1992 entwickelt [102], besteht aus regulatorischen Elementen des Tetrazyklin-Resistenz-Operon von *E. coli* (tetO), die vor einen humanen Cytomegalovirus-Minimal-Promotor (CMV) im pUHD-10-3-Vektor kloniert wurden. Durch Bindung eines Transaktivators (tTA) an diese regulatorischen Elemente wird die Transkription des Genes aktiviert. Dieser Transaktivator, wobei es sich um eine Fusion des Tetrazyklin-Repressor-Proteins mit dem viralen Protein 16 des Herpes simplex Virus handelt, wird in der verwendeten U2OS tet off-Zelllinie exprimiert und ist in Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium inaktiv. Erst durch Entfernen des Tetrazyklins aus dem Medium induziert der Transaktivator die Transkription des gewünschten Proteins.

Nach Klonierung von Plk2 in den pUHD-10-3-Vektor und der anschließenden Transfektion der U2OS tet off-Zellen (s. 5.1.6.3.), wurden in 1 bis 2 Wochen Einzelklone mit Hygromycin selektioniert (s. 5.1.7.). Dies ist insofern wichtig, da (1) eine homogene Expression von Plk2 in den Zellen stattfinden soll und (2) die Integration der transfizierten DNA überall im Genom stattfinden kann, was zu unterschiedlichen Effekten in der Zelle führen kann. Um die Effekte, verursacht durch Überexpression von Plk2, richtig zu interpretieren und sie von solchen durch die Integration des Vektors in die chromosomale DNA verursachte, zu unterscheiden, sind geeignete Kontrollen notwendig. Als Negativkontrolle werden deshalb nicht-induzierte Zellen des selben Klons analysiert.

Nach Selektion und Isolation der Hygromycin-resistenten Klone wurden diese solange kultiviert bis genügend Zellen vorhanden waren, um sie auf die Expression von HA-Plk2-WT hin zu testen. Ingesamt wurden über 100 Klone von mehreren Transfektionen getestet. Zellen von jedem Klon wurden dazu in Medium mit und ohne Tetrazyklin 48 h lang kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Deckgläschen fixiert und mit einem Anti-HA-Antikörper (Roche) durch Immunfluoreszenz analysiert. Drei dieser getesteten Klone (#2, #14, #10) überexprimieren HA-Plk2-WT in unterschiedlichen Mengen. Anschließend wurden Zellextrakte von diesen Klonen hergestellt und im Western-Blot analysiert. Da kein Gesamtprotein sondern nur ein Abbauprodukt in den Extrakten nach einer Induktionszeit von 48 h mit dem Anti-HA-Antikörper (Babco) nachgewiesen werden konnte, wurde der Klon #14 für 1, 3, 6, 9, 12 h induziert und nochmals im Western-Blot analysiert. Erst so konnte die Überexpression des Gesamtproteins detektiert werden. Die Abbildung 22A zeigt die Überexpression von HA-Plk2-WT 12 h nach der Induktion (-Tet). Sowohl mit dem Anti-HA als auch mit dem Anti-Plk2-CDL21-Antikörper konnte die Überexpression nachgewiesen werden. Dagegen konnte keine Überexpression von HA-Plk2-WT in den nicht-induzierten Zellen (+Tet) beobachtet werden.

Um festzustellen, ob das exogen induzierte Plk2-Protein katalytisch aktiv ist, wurde die Plk2-Kinase sowohl mit dem Anti-Plk2-FL- als auch mit dem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert

und die Kinaseaktivität gemessen. Aus den Extrakten der induzierten Zellen wird mit bei den Antikörpern eine 10-fach höhere Aktivität immunpräzipitiert als aus den Extrakten der nicht-induzierten Zellen des Klones #14 (Abb. 22B).
Aus der Literatur ist bekannt, das Plk1 unter anderem den G2/M-Übergang durch Phosphorylierung und Aktivierung der Cdc25 C-Phosphatase reguliert, wodurch der Cyclin B/Cdk1-Komplex aktiviert wird [73, 79]. Deshalb wurde zuerst mit Hilfe der stabilen Zelllinie der Effekt auf die Cdc25 A-Phosphatase sowie auf die in G1 aktiven Cyclin-abhängigen Kinasen nach Überexpression von Plk2-WT in der stabilen Zelllinie untersucht. Es wurde aber keine Veränderung in den Aktivitäten der Cdc25 A-Phosphatase (Ingo Hassepass, Dkfz Heidelberg, persönliche Mitteilung) und auf die Cdk2-Aktivität (Abb. 22C) festgestellt. Cdc25 A kann zwar *in vitro* durch Plk2 phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (I.Hoffmann, unveröffentlichte Ergebnisse), es wurde aber keine Interaktion *in vivo* gefunden. In *in vitro* Kinase-Assays konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Plk2 sowohl die Cdk2-Kinase als auch die assoziierten Cycline A und E nicht phosphoryliert. Auch im umgekehrten Fall wurde keine Phosphorylierung von Plk2 durch die Cdk2-Kinase festgestellt (Daten nicht gezeigt).
Es ist daher unwahrscheinlich, dass Cdc25 A und Cdk2 Substrate von Plk2 sind. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Plk2 in einem parallelen Signalweg zu Cdk2 am G1/S-Übergang agiert. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass Plk2 indirekt mit der Cdk2-Signalkaskade interagiert oder der Cdk2-Kinase im gleichen Signalweg nachgeschaltet ist. Um Substrate von Plk2 zu identifizieren, wurde deshalb ein Zwei-Hybrid-Screen in Hefe durchgeführt.

6.5.2. Zwei-Hybrid-Screen in Hefe mit Plk2-K111R als Köderprotein

Die Identifizierung von Substraten durch den Zwei-Hybrid-Screen in Hefe mit Proteinkinasen ist schwierig, da nur eine transiente Interaktion zwischen Enzym und Substrat erfolgt. Um gezielt Substrate der Plk2-Kinase zu finden, wurde deshalb der Zwei-Hybrid-Screen in Hefe mit der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R durchgeführt. Durch Mutation der ATP-Bindungsstelle wird die Katalyse verhindert (s. 6.2.), wodurch es zu einer stabileren Bindung des Substrates an die Plk2-Kinase kommt. Dabei wird die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum durch diese Mutation nicht beeinträchtigt [121a].

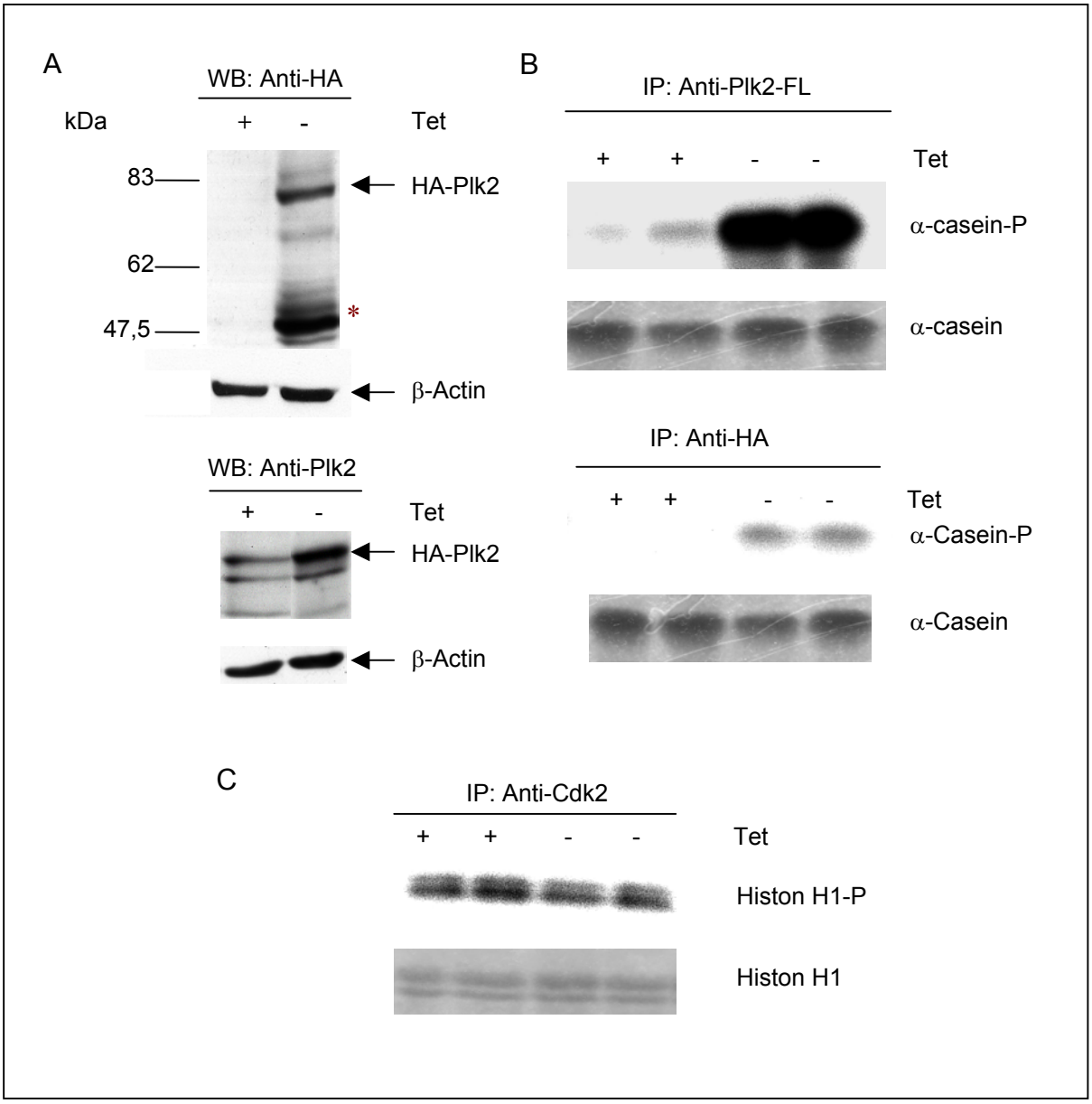

Abbildung 22: Induzierbare Expression des Plk2-Proteins und der Plk2-Kinaseaktivität.

Der mit dem HA-Plk2-WT-Protein stabil transfizierte Klon #14 wurde mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin für 12 h kultiviert. **(A)** Plk2-Protein-Expression. Extrakte wurden hergestellt und die Expressionsmenge von HA-Plk2 durch Western-Blot mit Anti-HA (Babco) oder Anti-Plk2-Antikörpern (CDL-21) detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Expression von β-Actin analysiert. (* Degradationsbande von Plk2) **(B)** Plk2-Kinaseaktivität. Plk2 wurde mit Anti-HA (Roche) bzw. Anti-Plk2-FL-Antikörpern aus Extrakten von Klon #14 immunpräzipitiert. Die Kinaseaktivität wurde anschließend durch die Phosphorylierung von α-Casein als Substrat unter Verwendung von [^{32}P]-γ-ATP im Kinase-Assay gemessen. **(C)** Cdk2-Kinaseaktivität. Die Cdk2-Kinase wurde mit Anti-Cdk2-Antikörpern aus den oben beschriebenen Extrakten immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität in Anwesenheit von [^{32}P]-γ-ATP im Histon H1-Assay bestimmt.

6.5.2.1. Die Plk2-K111R-Mutante verursacht keine autonome Aktivierung der Reportergene und wird in Hefe exprimiert

Einige Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren können an die DNA binden und die Transkription der Reportergene aktivieren, ohne dass eine Protein-Protein-Interaktion mit der Aktivierungsdomäne stattfindet. Deshalb ist es notwendig, die Plk2-K111R-Mutante allein in Hefe zu transformieren und (1) dessen Expression zu überprüfen und (2) die autonome Aktivierung der Reportergene durch Plk2-K111R auszuschließen. Dazu wurden die Hefe-Zellen mit dem pGBKT7-Plk2-K111R-Vektor transformiert und auf SD/-Trp/X-α-Gal-Agarplatten selektioniert. Einige der Hefekolonien wurden als Flüssigkultur weiterkultiviert, geerntet und zur Herstellung von Extrakten verwendet. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel wurde die Expression von Plk2-K111R als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne im Western-Blot mit dem Anti-Myc- sowie dem Anti-Plk2-CDL21-Antikörper nachgewiesen. Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, wird Plk2-K111R als Fusionsprotein exprimiert.

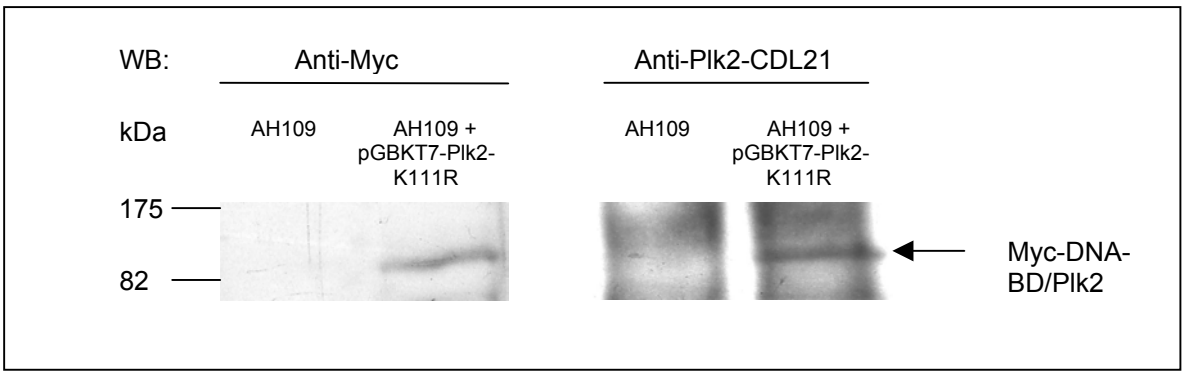

Abbildung 23: Plk2-K111R wird als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne in Hefe exprimiert.

Der Hefestamm AH109 wurde mit pGBKT7-Plk2-K111R transformiert, die Hefe-Zellen anschließend geerntet und Extrakte hergestellt. 20 µl des Proteinextraktes wurden auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und die Expression von Myc-DNA-BD/Plk2-K111R mit einem Anti-Myc-Antikörper und dem Anti-Plk2-CDL-21-Antiköper im Western-Blot nachgewiesen.

Der andere Teil der Hefekolonien wurde 7 Tage lang weiterkultiviert. Nach dieser Zeit wurden keine Hefe-Klone mit blauen Phänotyp gefunden. Das bedeutet, dass die Transkription des Reportergens α-Galaktosidase nicht durch Plk2-K111R induziert wird, was darauf hinweist, dass keine Aktivierung der Reportergene durch Plk2-K111R alleine stattfindet.

6.5.2.2. Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Screens in der Hefe mit Plk2-K111R

Nach der Ko-Transformation von Plk2-K111R und der HeLa-cDNA-Bibliothek in Hefe und anschließender Selektion auf hoch stringenten Platten, wurden 150 blaue Klone analysiert. Um die Interaktionspartner zu identifizieren, wurde das pACT2-Plasmid, in welches die Inserts der HeLa-cDNA-Bibliothek kloniert wurden, aus jedem Klon wieder isoliert. Durch den anschließenden Restriktionsverdau mit HindIII und HaeIII wurden Plasmide mit gleichem Insert eliminiert. Es wurden nur drei Plasmide mit unterschiedlichen Inserts identifiziert. Um auszuschließen, dass es sich um falsch-positive Klone handelt, wurde der Phänotyp wieder durch erneute Ko-Transformation überprüft. In allen drei Fällen konnte eine Interaktion mit Plk2-K111R wiederholt nachgewiesen werden. Anschließend wurden diese Klone sequenziert. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse nach Vergleich der Sequenzen mit denen der Datenbank (Husar, BlastX2-Pogramm).

Insert (1)	96 Klone	Mt2- humanes Metallothionin
Insert (2)	45 Klone	CAIF- humanes alpha 1 (XVI) Kollagen
Insert (3)	9 Klone	C-Terminus des c-Myb-Proto-Onkogen

Tabelle 5: Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Screens

Das Mt2-und das CAIF-Protein sind in der Liste der falsch positiven Interaktionspartner aufgeführt (Erica Golemis, Fox Chase Cancer Center, N.J.) und üben keine Funktion in der Regulation des Zellzyklus aus [122, 123]. Sie wurden deshalb von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Als dritter Interaktionspartner wurde das Proto-Onkogen c-Myb identifiziert. Das c-Myb-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der vermutlich eine Rolle beim G1/S-Übergang spielt [124]. Somit könnte c-Myb ein Substrat von Plk2 sein. Aus diesem Grund wurde in weiteren Studien versucht, die Interaktion von Plk2 und c-Myb durch *in vivo* und *in vitro* Studien zu bestätigen. Auch eine mögliche Phosphorylierung sowie Regulierung der transkriptionalen Aktivtät von c-Myb durch die Plk2-Kinase wurde analysiert. Da c-Myb ein Transkriptionsfaktor ist und sonst eine DNA-Bindungsdomäne besitzt, mit der es an die UAS-Region des Promotors der Reportergene binden könnte, wurde c-Myb alleine in Hefe transformiert. Anschließend wurde die transformierte Hefe auf entsprechendem Selektionsmedium mit X-α-Gal selektioniert, um eine autonome Aktivierung der Reportergene auszuschließen. Es wurde keine Aktivierung durch c-Myb alleine festgestellt. Dies liegt auch darin begründet, da die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb in dem isolierten Klon nicht vorhanden ist.

6.6. Analyse der Interaktion von Plk2 mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb

6.6.1. Plk2 bindet direkt an c-Myb *in vitro*

Um die im Zwei-Hybrid-Screen gefundene Interaktion zwischen Plk2 und c-Myb zu bestätigen, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit den Gesamtproteinen durchgeführt. Aus diesem Grund wurden HA-Plk2 und Myc-c-Myb in Anwesenheit von [^{35}S]-Methionin *in vitro* transkribiert, anschließend translatiert und dann mit Hilfe des Anti-HA- bzw. des Anti-Myc-Antikörpers immunpräzipitiert.

Die Abbildung 24B zeigt, dass Myc-c-Myb in den HA-Plk2-Immunkomplexen bzw. HA-Plk2 in Myc-c-Myb-Immunkomplexen detektierbar ist. Das c-Myb-Gesamtprotein bindet also direkt an Plk2-WT sowie an beide kinase-inaktiven Mutanten von Plk2.

Die Interaktion ist spezifisch, da die als Negativkontrolle verwendete Luciferase sowohl in HA-Plk2- als auch in Myc-c-Myb-Immunkomplexen nicht nachweisbar ist (Abb. 24A).

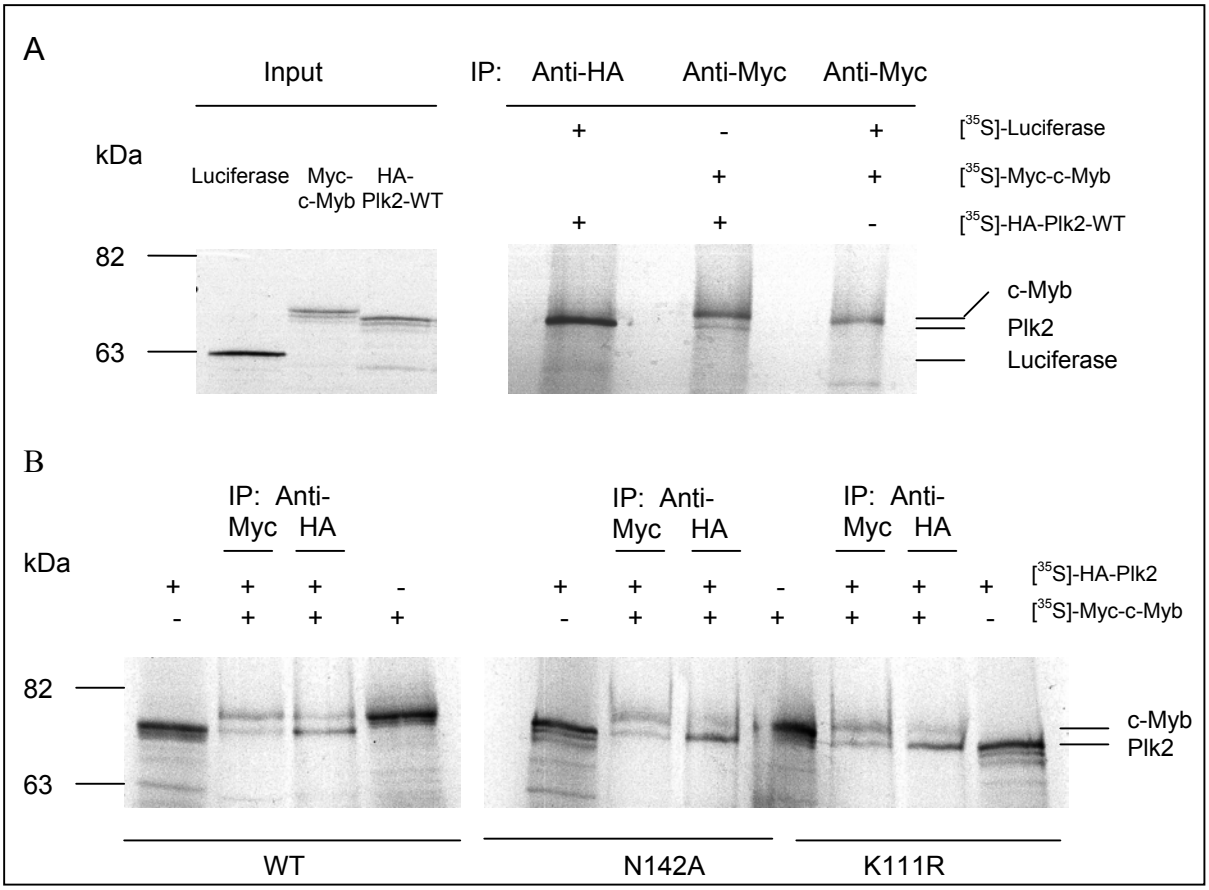

Abbildung 24: Plk2 interagiert mit c-Myb *in vitro*.

HA-Plk2-WT, HA-Plk2-N142A, HA-Plk2-K111R, Luciferase und Myc-c-Myb wurden in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. **(A)** Plk2-WT bindet spezifisch an c-Myb. Die mit [^{35}S]-Methionin-markierten Proteine HA-Plk2-WT, Luciferase, Myc-c-Myb wurden in der

entsprechenden Kombination bei 30°C für 30 Minuten miteinander inkubiert und mit Hilfe der Anti-HA- bzw. der Anti-c-Myc-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurden die immunpräzipitierten Proteine zusammen mit 20 % des Inputs auf ein SDS-PAGE Gel geladen und durch Autoradiographie analysiert. **(B)** Die kinase-inaktiven Mutanten von Plk2, N142A und K111R, binden an c-Myb *in vitro*. *In vitro* translatiertes HA-Plk2-WT, HA-Plk2-K111R oder HA-Plk2-N142A wurde mit [^{35}S]-markiertem Myc-c-Myb inkubiert und wie unter (A) beschrieben analysiert.

6.6.2. Die Plk2-Kinase phosphoryliert c-Myb *in vitro*

Generell Kinasen interagieren mit anderen Proteinen, um diese zu phosphorylieren und so die Funktion oder Aktivität des jeweiligen Proteins zu beeinflussen. In diesem Fall sollte die Fähigkeit von Plk2 untersucht werden, c-Myb *in vitro* zu phosphorylieren. Dazu wurden verschieden große GST-Fragmente (Abb. 25C) des c-Myb-Proteins mit HA-Plk2-WT oder der kinase-inaktiven Mutante HA-Plk2-K111R in Anwesenheit von [^{32}P]-γ-ATP phosphoryliert.

Um gleiche Proteinmengen an HA-Plk2-WT und HA-Plk2-K111R in der Kinase-Reaktion einzusetzten, wurden diese vorher im Western-Blot mit dem Anti-HA-Antikörper abgeglichen. Auch die GST-c-Myb-Fragmente wurden vorher im Coomassie-Gel abgeglichen, da eine genaue Proteinbestimmung aufgrund der Degradation der Fragmente schwierig war. In Abbildung 25A erkennt man, dass HA-Plk2-WT die Fähigkeit besitzt, c-Myb zu phosphorylieren. Dabei liegt das GST-Myb-743-Fragment (Spur 6) und ein Abbauprodukt des GST-Myb-677-Fragments (Spur 5,*) stärker phosphoryliert vor als die anderen beiden Fragmente (Spur 3 und 4), obwohl ungefähr gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden (Abb. 25B). GST alleine kann dagegen nicht phosphoryliert werden (Spur 2).

Vergleicht man die Aktivitäten von Plk2, gemessen an der Fähigkeit α-Casein sowie sich selbst zu phosphorylieren (Plk2-Autophosphorylierung), zeigt die Plk2-WT-Kinase (Spur 1) eine viel höhere Aktivität als die Mutante (Spur 7). Trotzdem ist eine Restaktivität detektierbar (Spur 7), die für die Phosphorylierung an dem GST-Myb-743 (Spur 12) verantwortlich sein könnte. Dies ist aber unwahrscheinlich, da die Stärke der Banden des mit Plk2-WT-phosphorylierten GST-c-Myb-743-Fragments (Spur 6) und des mit Plk2-K111R-phosphorylierten GST-c-Myb-743-Fragments (Spur 12) ungefähr gleich ist. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch eine kontaminierende Kinase nach Immunpräzipitation mit dem HA-Antikörper mit aufgereinigt wird, die speziell das GST-c-Myb-743-Fragment phosphoryliert. Das Abbauprodukt des GST-c-Myb-677-Fragments zeigt dagegen eine spezifische Phosphorylierung durch die Plk2-Kinase (Spur 5), da keine Phosphorylierung nach Inkubation mit Plk2-K111R (Spur 11) sichtbar ist.

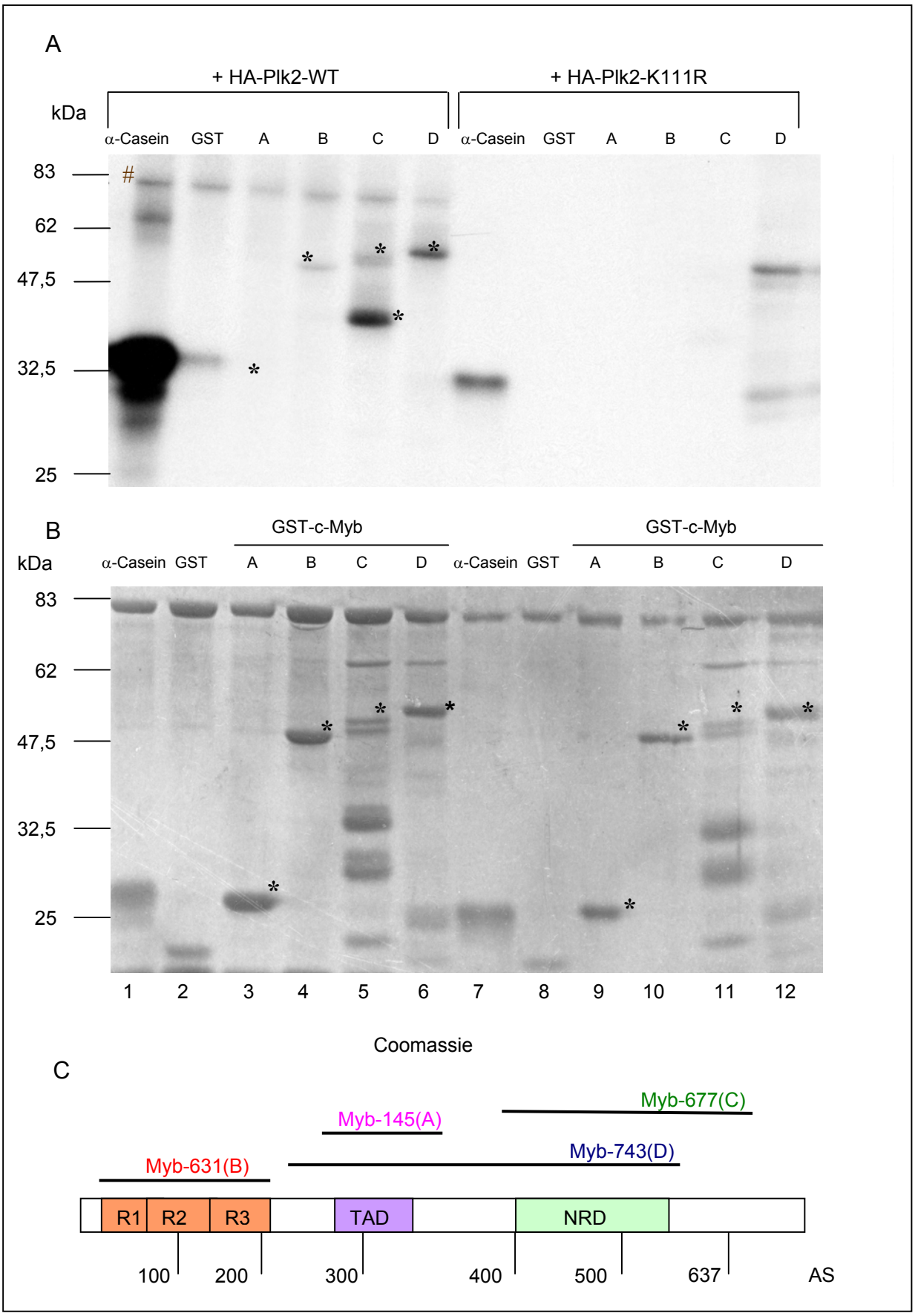

Abbildung 25: Plk2 phosphoryliert c-Myb *in vitro* (Legende umseitig).

Abbildung 25: (A) Autoradiographie der Phosphorylierung von c-Myb durch HA-Plk2. Identische Mengen der in (C) dargestellten GST-c-Myb-Fragmente wurden mit HA-Plk2-WT oder HA-Plk2-K111R, welche aus transfizierten 293T-Zellen immunpräzipitiert wurden, bei 30°C für 30 Minuten in Gegenwart von [32P]-γ-ATP inkubiert und auf ein SDS-PAGE Gel aufgeladen. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Die Phosphorylierung der GST-c-Myb-Fragmente wurde durch Autoradiographie detektiert. Als Positivkontrolle wurde α-Casein, als Negativkontrolle GST als Substrat verwendet. (# =Autophosphorylierung von HA-Plk2) **(B)** Die Coomassie-Färbung zeigt die eingesetzten Mengen an GST-c-Myb-Fragmenten in der Kinase-Reaktion. (Abbauprodukt von GST-c-Myb-677 *) **(C)** Schematische Darstellung der Domänen des humanen c-Myb-Proteins (R1, R2, R3 = DNA-Bindungungsdomänen; TAD = **T**rans**a**ktivierungs-**d**omäne; NRD = **N**egative **R**egulatorische **D**omäne) und der GST-c-Myb-Fragmente (Myb-6131, Myb-145, Myb-677, Myb-743).

Die Ergebnisse zeigen, dass Plk2 c-Myb spezifisch in der regulartorischen Domäne am C-terminalen Ende phosphoryliert. Keine Phosphorylierung konnte dagegen in der DNA-Bindungsdomäne sowie in der Transaktivierungsdomäne festgestellt werden.

6.6.3. Plk2 interagiert spezifisch mit der carboxyl-terminalen Domäne von c-Myb

Da Plk2 das c-Myb-Protein an dessen c-terminalen Ende phosphoryliert, wurde untersucht, ob Plk2 auch über die regulatorische Domäne an c-Myb bindet. HA-Plk2-WT wurde in Anwesenheit von [^{35}S]-Methionin *in vitro* transkribiert bzw. translatiert und mit GST alleine oder den entsprechenden GST-c-Myb-Fragmenten inkubiert (s. 5.2.13.). Nach Aufreinigung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose und Auftrennung im SDS-PAGE-Gel wurde die Bindung von HA-Plk2 durch Autoradiographie analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer niedrigen Salzkonzentration im Waschpuffer eine unspezifische Bindung von Plk2-WT an GST alleine erfolgt. Aus diesem Grund wurde der Versuch unter stringenten Bedingungen, dass heißt mit einer hohen Salzkonzentration im Waschpuffer, durchgeführt.
Wie aus Abbildung 26 ersichtlich, ist das Plk2-WT-Protein spezifisch mit dem GST-Myb-743-Fragment (Spur 6), welches sowohl die Transaktivierungsdomäne als auch die regulatorische Domäne enthält, assoziiert. Eine Bindung von [^{35}S]-markierten Plk2-WT an GST alleine (Spur 2) sowie an die anderen GST-Myb-Fragmente (Spur 3-5) ist nicht detektierbar, obwohl die Coomassie-Färbung zeigt, dass ungefähr gleiche Proteinmengen der GST-Fusionsproteine nach Aufbindung an die Glutathion-Sepharose vorhanden sind. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsstudien lassen darauf schließen, dass Plk2-WT auch an das GST-c-Myb-677-Fragment bindet, was aber unter den oben beschriebenen stringenten Bedingungen nicht der Fall ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Plk2 zur einer starken Interaktion mit c-Myb sowohl die regulatorische Domäne als auch die Transaktivierungsdomäne, benötigt.

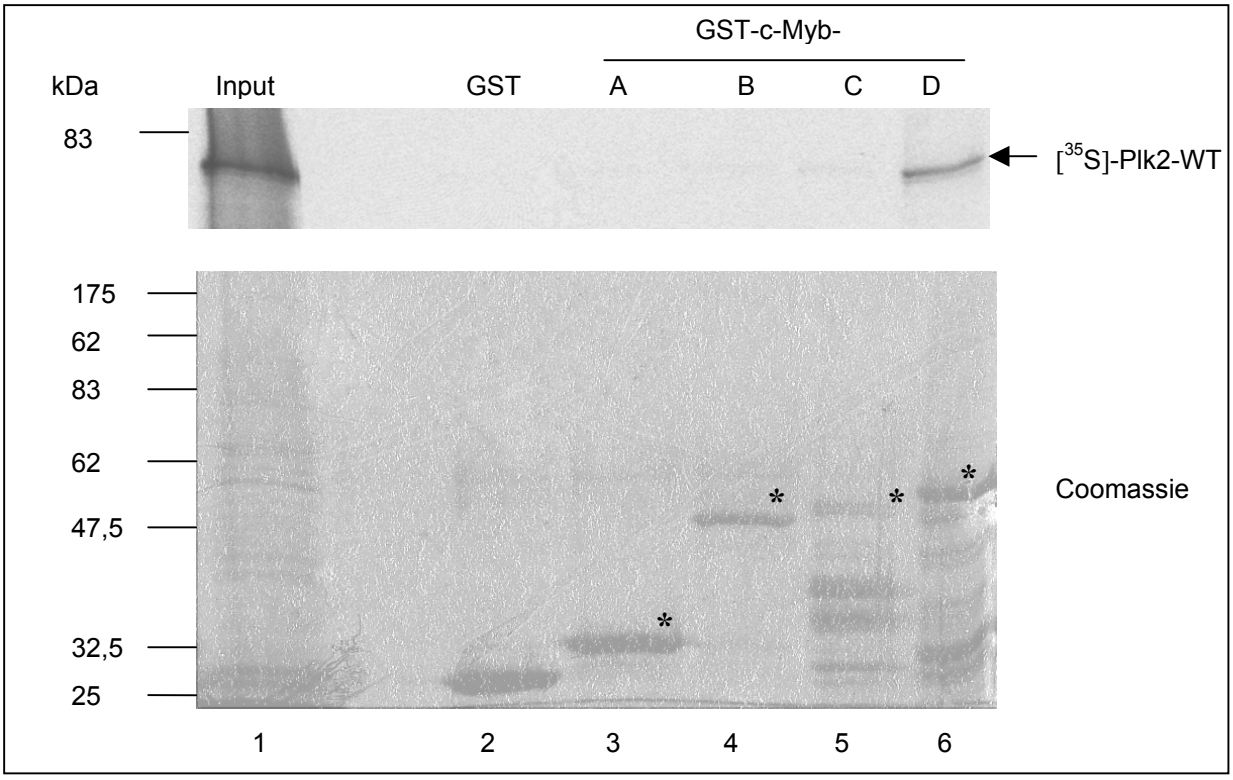

Abbildung 26: Plk2-WT bindet spezifisch an das GST-c-Myb-743-Fragment.

(A) Gleiche Proteinmengen von GST bzw. der GST-c-Myb-Fragmente wurden mit je 5 µl [^{35}S]-markiertem HA-Plk2-WT 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die GST-Fusionsproteine 1 h lang an 100 µl Glutathion-Sepharose gebunden, gewaschen und zusammen mit 20 % des Inputs (HA-Plk2-WT) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach dem Fixieren und Trocknen des Geles erfolgt die Analyse des gebundenen HA-Plk2-WT durch Autoradiographie. **(B)** Die Coomassie-Färbung zeigt die GST-c-Myb-Fragmente nach dem "GST pull down“. Dabei markieren die Sterne die GST-c-Myb-Fragmente mit richtigen Molekulargewicht. In Spur 5 und 6 sind in der Coomassie-Färbung außerdem Degradationsprodukte der Fragmente zu sehen.

6.6.4. Plk2 interagiert mit c-Myb *in vivo*

Nachdem die Interaktion *in vitro* bestätigt werden konnte, war es notwendig diese auch in Zellen nachzuweisen. Dazu wurden beide Proteine, HA-Plk2-WT und Myc-c-Myb, in 293T-Zellen überexprimiert und aus den Extrakten, die mit dem milden Lysepuffer hergestellt wurden, mit Anti-HA- oder Anti-Myc-Antikörpern immunpräzipitiert. Wie aus Abbildung 27 erkennbar ist, lassen sich sowohl mit dem Anti-HA- als auch mit dem Anti-Myc-Antikörper die Proteine HA-Plk2-WT bzw. Myc-c-Myb spezifisch aus den Extrakten der ko-transfizierten 293T-Zellen (Spur 3 bzw. 9), aber nicht aus Extrakten von nicht-transfizierten 293T-Zellen, immunpräzipitieren (Spur 6 bzw. 7). Es wird auch gezeigt, dass keine kontaminierenden Banden, hervorgerufen durch die Immunglobuline (IgG), auf der Höhe von HA-Plk2 und Myc-c-Myb durch den Sekundärantikörper im Western-Blot erkannt werden (Spur 6 und 7). Durch die hohe Konzentration an IgG in den Immunpräzipitaten, laufen die immunpräzipitierten

Proteine Myc-c-Myb und HA-Plk2-WT (Spur 3 bzw. 9) langsamer im Gel, als in den Spuren, in denen normale Zellextrakte aufgetragen wurden (Spur 2 und 5 bzw. 8 und 11). Dadurch sind die durch die Antikörper detektierten Banden im Western-Blot in den Immunpräzipitaten etwas höher als in den Zellextrakten.

Wird c-Myb mit dem Anti-c-Myc-Antikörper immunpräzipitiert, lässt sich HA-Plk2 in den Immunkomplexen mit dem Anti-HA-Antikörper im Western-Blot nachweisen (Spur 10). Im umgekehrten Fall konnte dagegen in den Immunkomplexen nach Immunpräzipitation mit dem HA-Antikörper kein c-Myb-Protein nachgewiesen werden (Spur 4). Dies könnte auf die unterschiedliche Affinität der Antikörper in der Immunpräzipitation oder auf geringere Sensitivität des c-Myc-Antikörpers im Western-Blot beruhen.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Plk2 und c-Myb nach Überexpression einen Komplex in der Zelle bilden können und dass c-Myb ein physiologisches Substrat von Plk2 sein könnte.

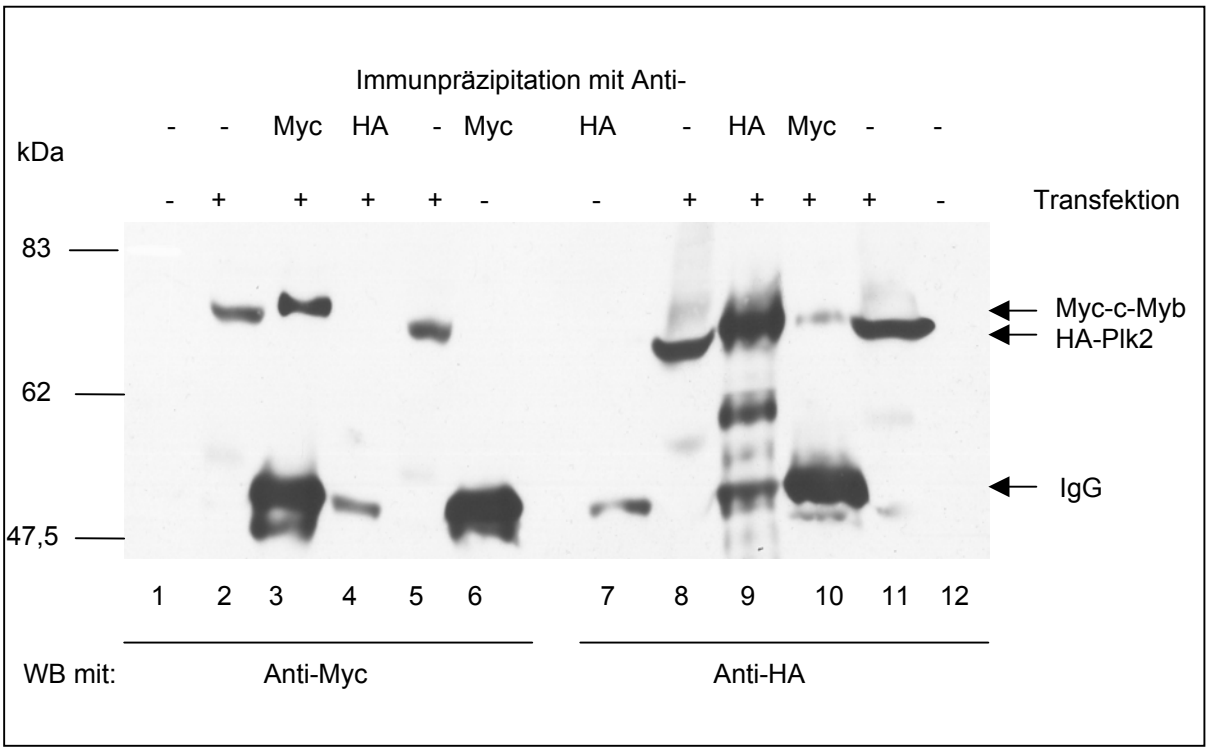

Abbildung 27: Plk2 interagiert mit c-Myb *in vivo*.

293T-Zellen wurden mit pX-HA-Plk2-WT und pX-Myc-c-Myb ko-transfiziert und 20 h später geerntet. Die Proteinextrakte wurden mit einem milden Lysepuffer (+ DNAse) hergestellt und die Immunpräzipitationen entweder mit dem Anti-Myc- oder mit dem Anti-HA-Antikörper (Roche) über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die immunpräzipitierten Proteine gewaschen und zusammen mit 150 µg Gesamtextrakt im 8 %igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran, wird diese mit dem Anti-Myc- bzw. dem Anti-HA-Antikörper (Babco) inkubiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte 293T-Zellen (Spur 1, 6, 7 und 12) verwendet.

6.6.5. Expression von Plk2 in Jurkat-Zellen

Das c-Myb-Protein wird in hohen Mengen in unreifen, proliferierenden hämatopoietischen Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen [125-128]. Es ist außerdem gezeigt worden, dass c-Myb in fast allen Zelllinien, die von hämatopoietischen Tumoren abstammen, detektierbar ist. Die Aktivierung und Expression von c-Myb ist damit ein wichtiger Schritt in der Entstehung von Leukämien [129-134]. Dagegen wird c-Myb in anderen Zellen nur in sehr geringen Mengen oder gar nicht exprimiert. Deshalb war es nicht möglich, die Interaktion von endogenem Plk2 und c-Myb in U2OS-Zellen oder anderen früher verwendeten Zelllinien zu studieren. Aus diesem Grund wurde die Expression von Plk2 in Jurkat-Zellen, einer Lymphoma-Zelllinie, überprüft.
Der Western-Blot in Abbildung 28 zeigt, dass beide Proteine in Jurkat-Zellen exprimiert werden, wobei in dieser Zelllinie verstärkt die zweite tiefer laufende Bande vom Antikörper

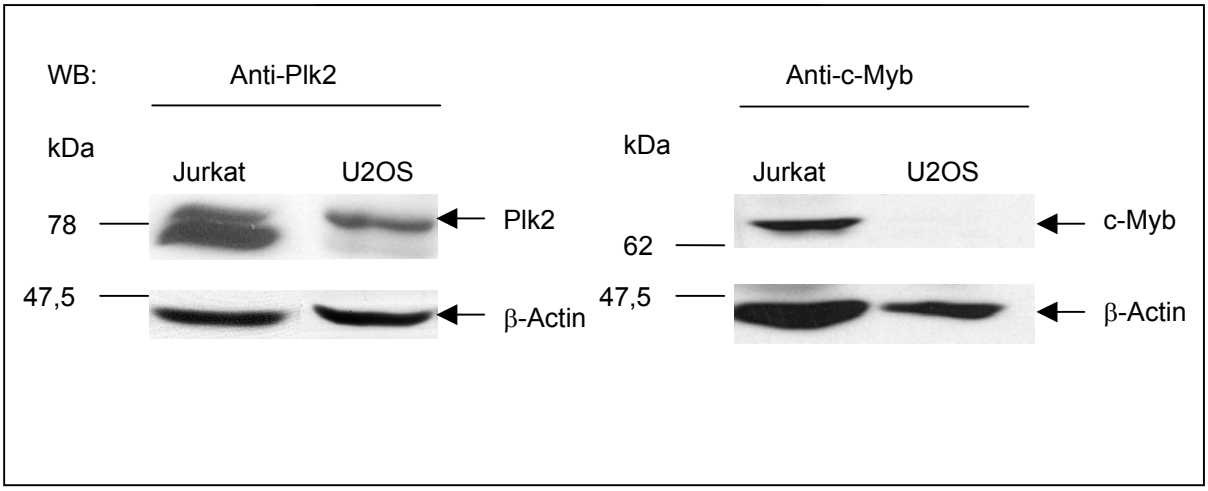

Abbildung 28: Expression von Plk2 und c-Myb in malignen T-Lymphocyten.

Exponentiell wachsende Jurkat-Zellen wurden geerntet, Zellextrakte hergestellt und zusammen mit Extrakten von U2OS-Zellen auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Anschließend wurde die Expression von Plk2 und c-Myb in den Zelllinien durch Western-Blot mit Anti-Plk2- und Anti-c-Myb-Antikörpern nachgewiesen.

erkannt wird (s. 6.1.1.), die entweder unspezifisch oder eine posttranslational-modifizierte Form der Plk2-Kinase darstellt. Außerdem wurde versucht, die Interaktion von endogenen Plk2 und c-Myb durch Immunpräzipitation mit Anti-Plk2- und Anti-c-Myb-Antikörpern in Jurkat-Zellen nachzuweisen. Dies gelang nicht, da die verwendeten Antikörper in der Immunpräzipitation mit anschließenden Western-Blot nicht sensitiv genug sind.
Da Plk2 in hämatopoitischen Zellen exprimiert wird, könnte es die transkriptionelle Aktivität von c-Myb regulieren. Dies könnte auf eine Rolle von Plk2 bei der Proliferation von hämatopoitischen Zellen sowie bei der Entstehung von Leukämien hindeuten.

7. Diskussion

7.1. Die Aktivierung der humanen Polo-Kinase Plk2 in der späten G1-Phase des Zellzyklus von HeLa-Zellen

Die Bestimmung der Plk2-Kinaseaktivität in HeLa-Zellextrakten in Zeitkurven nach Entlassung aus dem Nocodazol-Arrest zeigen, dass die Aktivität von Plk2 gering in mitotischen Zellen ist. Diese steigt dann in der späten G1-Phase an und nimmt in der S-Phase wieder ab (Abb. 12). Bestätigt wird dies durch die parallel gemessene Cyclin E-assoziierte Cdk2-Aktivität. Beide Kinasen zeigen die gleiche Zellzyklus-abhängige Aktivierung und Inaktivierung. Aus diesem Grund könnte die gemessene Plk2-Aktivität durch Kontamination der Plk2-Immunpräzipitate mit der Cdk2-Kinase zustande kommen, weil die Möglichkeit besteht, dass Cdk2 und Plk2 am G1/S-Übergang miteinander interagieren könnten. Da aber Cdk2 β-Casein und Polo-Kinasen dagegen α-Casein bevorzugt phosphorylieren [77], ist dies eher unwahrscheinlich. Die Charakterisierung des Anti-Plk2-FL-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse zeigt (Abb. 8), dass der Antikörper keine der anderen Polo-Kinasen (Plk1 und Plk3) im Western-Blot erkennt. Da Plk1 am G2/M-Übergang sowie während der M-Phase aktiv ist [77] und Plk3 nach DNA-Schädigungen durch einen "Checkpoint“-Mechanismus aktiviert wird [93], können Kontaminationen mit Plk1 und Plk3 ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie die Plk2-Aktivität in der G1-Phase reguliert wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Plk2-Proteinmengen konstant während des Zellzyklus sind und die gemessene Aktivität nicht auf eine erhöhte Plk2-Expression, zurückzuführen ist. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass Plk2 durch einen posttranslationalen Mechanismus, wie zum Beispiel durch reversible Phosphorylierungen, aktiviert wird. Verschiedene Studien über Plk1 demonstrieren, dass die Phosphorylierung an dem konservierten Aminosäurerest Threonin-210 in der Kinase-Subdomäne VIII (T-loop-Region) für die für die Aktivität von Plk1 notwendig ist [71]. Im Fall von Plk2 wurde Threonin-293 als kritischer Aminosäurerest identifiziert [88]. Ob diese Phosphorylierung durch Plk2 selber (Autophosphorylierung) oder durch andere Kinasen ausgeführt wird, bleibt zu klären. In Kinase-Assays in denen endogenes Plk2 aus Extrakten von G1-Phase-Zellen immunpräzipiert wurde, ist ein phosphoryliertes Protein bei 78 kDA detektierbar. Auch wenn exogenes HA-Plk2-WT immunpräzipitiert wird, ist diese Bande vorhanden, jedoch nicht in Kinase-Assays in denen die kinase-inaktive Mutante HA-Plk2-K111R verwendet wurde. Plk2 könnte sich also in der G1-Phase selbst phosphorylieren. Die Identifizierung der Autophosphorylierungsstellen in

Plk2 sowie der Phosphorylierungsstellen anderer Kinasen, die Plk2 *in vivo* phosphorylieren, würde dazu beitragen, die Aktivierung von Plk2 in G1 zu erklären.
Eine andere Möglichkeit für die Regulation der Aktivität von Kinasen ist die Bindung von regulatorischen Proteinen, welches sich sowohl inhibitorisch als auch aktivierend auf die Kinaseaktivität auswirken kann. Es ist gezeigt worden, dass die Cdk-Aktivität durch Bindung von Cdk-Inhibitoren (Cki, "Cdk-Inhibitor“) inhibiert wird [135]. Dagegen wird die Aurora A-Kinase, welche essentiell für den Eintritt in die Mitose und für die Rekrutierung des Cyclin B/Cdk1-Komplexes an die Centrosomen ist, durch Bindung des LIM-Proteins Ajuba aktiviert, indem die Autophosphorylierung von Aurora A induziert wird [136]. Die Studien von Ma et al. [86] und Kauselmann et al. [89] zeigten, dass Plk2 mit CIB interagiert. CIB ist ein Kalzium- und Integrin-bindendes Protein, welches Sequenzhomologien zu Calmodulin aufweist. Es ist beteiligt bei der Reorganisation des Actin-Zytoskelett während des Zellzyklus sowie an der Adhäsion von Zellen. Ähnlich wie Calmodulin die Aktivität der CaM-Kinasen moduliert [137], führt die Bindung von CIB an die nicht-katalytische Domäne von Plk2 zu einer Reduzierung der Plk2-Aktivität, da die Bindung des Substrates unterbunden oder die Autophosphorylierung von Plk2 inhibiert werden könnte. Ob die Bindung von CIB ein wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von Plk2 ist und ob diese Interaktion zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus stattfindet, ist noch genauer zu untersuchen. Der Mechanismus der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Plk2 ist insofern wichtig, um mögliche Verbindungen zu regulatorischen Signalwegen aufzudecken, die die G1-Phase kontrollieren.

7.2. Die Funktion von Plk2 am G0/S-Übergang in humanen Fibroblasten

Plk2 wurde ursprünglich als frühes Transkript identifiziert, dessen mRNA nach Serumzugabe in G0-arretierten nicht-tumorigenen Zellen induziert wird [85]. In dieser Arbeit wurde die Expression und die Aktivität von Plk2 in humanen Fibroblasten (Hs68-Zellen) nach Wiedereintritt in den Zellzyklus untersucht. Plk2 wird sowohl in der G0- sowie auch in der G1-Phase exprimiert, ohne das die Proteinmengen vom Zellzyklus abhängig reguliert wird (Abb. 13B). Die Plk2-Aktivität dagegen steigt eine halbe Stunde nach Serumzugabe an, erreicht ihr Maximum nach 3 h und ist nach 6 h nicht mehr detektierbar (Abb. 13C). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass Plk2 nach Serumzugabe aktiviert wird und eine Rolle beim Wiedereintritt in den Zellzyklus spielt. Ähnliche Resultate wurden in Mausfibroblasten (NIH 3T3-Zellen) beobachtet, wo die Aktivität von mPlk2 ebenfalls nach Serumzugabe induziert wird [86]. Dagegen wurde in dieser Studie auch gezeigt, dass die Expression von Plk2 nach Serumzugabe induziert wird und das Plk2 Protein nur 1 h später

detektierbar ist und anschließend abgebaut wird. Diese von der vorliegenden Arbeit abweichenden Resultate könnten darauf zurückgeführt werden, dass (1) Zellen unterschiedlicher Spezies und (2) unterschiedliche Antikörper gegen Plk2 in beiden Studien verwendet wurden. So wurden ebenfalls Unterschiede im Expressionsmuster von Plk3 in humanen Zellen und Zellen der Maus beschrieben [92, 95]. Die Proteinmengen der Plk3-Kinase in Mauszellen steigt kontinuierlich von der späten G1-Phase bis zur G2-Phase an und sinkt am Ende der Mitose wieder ab, während in humanen Zellen der Plk3-Gehalt konstant während des gesamten Zellzyklus ist.

Viele Prozesse die den G0/S-Übergang und das Überlaufen des Restriktionspunktes steuern, wie zum Beispiel die Aktivierung der Ras-Erk-Signalkaskade, sind auch in der Regulation des Eintritts in die S-Phase im normalen Zellzyklus involviert [138]. Dabei ist der Zeitpunkt der Aktivierung innerhalb der G1-Phase sowie auch die Dauer der Aktivität dieser Kinasen für den Wiedereintritt in den Zellzyklus im Vergleich zum normalen Zellzyklus unterschiedlich. Deshalb könnte die Aktivierung sowie die Funktion von Plk2 nach Arrest in G0 und anschließender Serum-Stimulation sich von der Situation im normalen Zellzyklus unterscheiden, wo Plk2 später am G1/S-Übergang aktiv ist. Dies könnte die unterschiedliche zeitliche Aktivierung von Plk2 in HeLa- und Hs68-Zellen erklären. Für Plk3-Kinase aus der Maus (mPlk3) wurde ebenfalls gezeigt, dass mPlk3 in G0-arretierten Zellen direkt nach Stimulation mit Mitogenen ebenfalls posttranslational modifiziert wird, was mit einer erhöhten Aktivität korreliert [92, 95]. Im normalen Zellzyklus dagegen wurde diese posttranslational-modifizierte Form nur am G2/M-Übergang und während der Mitose, aber nicht in der G1-Phase oder am G1/S-Übergang beobachtet. Auch hier ist es möglich, dass mPlk3 zwei Funktionen hat, eine beim Wiedereintritt in den Zellzyklus und eine zweite am G2/M-Übergang im normalen Zellzyklus.

Um zu klären ob die Aktivität der Plk2-Kinase notwendig für den Wiedereintritt beziehungsweise für das Überlaufen des Restriktionspunktes am G1/S-Übergang ist, wurde die Plk2-Funktion ausgeschaltet, indem spezifische Antikörper gegen Plk2 in Hs68-Zellen mikroinjiziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die aus dem G0-Arrest entlassenden Fibroblasten nicht mehr in der Lage sind, BrdU in ihre DNA einzubauen. Der Restriktionspunkt wird in diesen Zellen nicht überschritten, woraufhin die DNA-Replikation nicht eingeleitet werden kann. Es ist daher zu vermuten, dass Plk2 möglicherweise eine wichtige Funktion für das Überlaufen des Restriktionspunktes in der G1-Phase hat. Es ist noch aber unklar, in welchen Signaltransduktionsweg Plk2 involviert ist. So könnte untersucht werden, ob Plk2 durch den Ras-Erk-Signalweg sowie durch den MAP-Signalweg aktiviert werden kann, da diese Signalwege essentiell für den Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus sind [138].

Um zu zeigen, dass Plk2 in humanen Fibroblasten im normalen Zellzyklus auch am G1/S-Übergang aktiv ist, ist es deshalb erforderlich die Zellen in der Mitose zu arretieren, um sie dann synchron in die nächste G1-Phase zu entlassen. Dies ist aber insofern schwierig, da Nocodazol für die meisten Fibroblasten-Zelllinien toxisch wirkt.

7.3 Die Rolle von Plk2 bei der Regulation der Centriolen-Duplikation

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Plk1 als auch Plk3 an den Centrosomen lokalisiert sind [95, 117], wobei Plk1 eine wichtige Rolle bei der Reifung der Centrosomen am G2/M-Übergang einnimmt. Deshalb wurde untersucht, ob Plk2 an der Duplikation der Centriolen am G1/S-Übergang beteiligt ist. Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung liefert die Bestimmung der Kinaseaktivität von Plk2 am G1/S-Übergang. Plk2 ist zur gleichen Zeit aktiv wie die Cyclin E-assoziierte Cdk2-Kinase (Abb. 12). Der Cyclin E/Cdk2-Komplex steuert wichtige Ereignisse für die Initiierung der Centriolen-Duplikation [42]. Des weiteren ist Plk2 eine centrosomale Komponente und ko-lokalisiert mit γ-Tubulin, einem bekannten centrosomalen Protein (S. Kemmler, Diplomarbeit Dkfz Heidelberg 2003; R. S. Hames und A. Fry, 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RNAi-vermittelte Herunterregulation von endogenen Plk2 in U2OS-Zellen, die Re-Duplikation der Centrosomen von Zellen, die in der S-Phase arretiert sind, blockiert (Abb. 19). Der gleiche Effekte wurde beobachtet, wenn die kinase-inaktive Mutante Plk2-K111R in S-Phase-arretierten U2OS- und CHO-Zellen exprimiert wird (I. Hoffmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Verdopplung der Centrosomen wird hier durch Verdrängung der endogenen Plk2-Kinase durch Plk2-K111R und/oder durch Bildung von nicht-funktionalen Komplexen mit dem Substrat inhibiert. Die Centrosomen wurden in diesen Experimenten mit einem Anti-γ-Tubulin-Antikörper angefärbt. γ-Tubulin ist ein Bestandteil des pericentriolaren Materials [36]. Es ist möglich, dass multiple Centrosomen auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden können, wie zum Beispiel durch zytokinetische Defekte oder die Fragmentierung des percentriolaren Materials sowie durch die Trennung eines unduplizierten Centriolen-Paares. Um diese Möglichkeiten auszuschließen, wurde der Centriolen-Duplikations-Assay nach Transfektion der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R in CHO-Zellen wiederholt, indem die Centriolen direkt mit Antikörper angefärbt wurden, der glytamyliertes α-Tubulin erkennt. Diese posttranslational-modifizierte Form des α-Tubulin kommt nur in den Centriolen in humanen Zellen vor [119]. Auch in diesem Fall ist die Duplikation der Centriolen in den S-Phase arretierten Zellen

gehemmt (Abb. 18). Daraus lässt sich schließen, dass Plk2 direkt an der Regulation der Centriolen-Duplikation beteiligt ist.

Die Suppression von Plk2 reduziert die Re-Duplikation der Centrosomen von in der S-Phase-arretierten U2OS-Zellen, scheint aber keinen Effekt auf die Duplikation in nicht-arretierten Zellen zu haben, da diese Zellen noch zwei Centrosomen besitzen. Der Grund dafür könnte sein, dass Plk2 eine integrale Komponente der Centrosomen und der Plk2-Proteingehalt ein limitierender Faktor für die Centriolen-Duplikation ist. Da die Eliminierung des Plk2-Proteins nicht 100 %ig ist (Abb. 11A), reicht möglicherweise die vorhandene Restaktivität aus, um die Centriolen einmal zu duplizieren. Sie ist aber zu gering, um mehrere Centrosomen-Duplikationszyklen zu induzieren. Um zu zeigen, dass auch in nicht-arretierten sowie in nicht-transformierten Zellen Plk2 einen Einfluss auf die Verdopplung der Centriolen hat, wurde die kinase-inaktive Mutante Plk2-K111R in Hs68-Zellen überexprimiert. Hier zeigt sich, dass die Duplikation der Centriolen im Verlauf des Zellzyklus nicht stattfindet (Abb. 20). Das Ausschalten der Plk2-Funktion durch Überexpression der Mutante führt dazu, dass das ursprüngliche Centriolen-Paar getrennt wird, die Duplikation aber nicht stattgefunden hat, wodurch nach der nächsten Zellteilung Tochterzellen entstehen, die nur ein Centriol besitzen (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Plk2-Kinase-Aktivität für die Duplikation der Centriolen notwendig ist.

Nach Herunterregulation von Plk2 durch RNA-Interferenz ist sowohl ein Block in der G1-Phase als auch in der G2/M-Phase beobachtet worden [37, 139]. Es ist gezeigt worden, dass Centrosomen an dem Fortschreiten des Zellzyklus und an der Zytokinese beteiligt sind. In Abwesenheit der Centrosomen arretieren somatische Zellen in der G1-Phase, und es findet keine Initiierung der DNA-Replikation statt. Geklärt ist jedoch noch nicht, ob der Arrest durch Kontrollmechanismen, die den Austritt aus der Mitose bzw. der Zytokinese kontrollieren, ausgelöst wird. Alternativ könnten die Centrosomen bei der Initiierung der DNA-Replikation involviert sein, indem wichtige Proteine an ihnen binden, welche für die DNA-Replikation notwendig sind. Der Arrest in G1 nach RNA-Interferenz könnte also auf die fehlende Duplikation der Centriolen zurückzuführen sein.

Die Hemmung der Centriolen-Duplikation könnte auch den beobachteten G2/M-Arrest verursachen. Dadurch ist die korrekte bipolare Orientierung der mitotischen Spindel nicht möglich, was zu Aktivierung eines Checkpoints und einem Arrest in G2/M führt. Burns et al. haben gezeigt, dass nach Herunterregulation von Plk2 durch siRNA die Apoptoserate nach Taxol-Behandlung in U2OS-Zellen erhöht ist [88]. Centrosomen sind Organisationszentren für Signalmoleküle, die durch sogenannte Ankerproteine an den Centrosomen binden und dadurch mit anderen Proteinen interagieren können. Dadurch werden spezifische zelluläre Funktionen vermittelt, wie zum Beispiel auch die Etablierung eines Kontrollpunktes nach Taxol-Behandlung. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine (Mps1-Kinase, GAPcenA), die

bei der Aktivierung des Kontrollmechanismus involviert sind, an den Centrosomen binden können [38]. Durch die fehlende Duplikation der Centriolen könnte es auch zu einer fehlerhaften Aktivierung des Checkpoints kommen was schließlich zu der beobachteten erhöhten Apoptoserate führt.

Es ist bislang unklar, in welche Signalwege die Plk2-Kinase eingebunden ist und welcher Zusammenhang mit den bereits bekannten Regulatoren der Centriolen-Duplikation besteht (Abb. 29). Der Centrosomenzyklus ist eng an den Zellzyklus gekoppelt. So ist gezeigt worden, dass die Cyclin E- und die Cyclin A-assoziierte Cdk2-Aktivität indirekt eine entscheidende Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation sowie auch bei der Centriolen-Duplikation in Embryonen von Xenopus und somatischen Säugerzellen spielen [42, 46]. Die Cyclin E-assoziierte Cdk2-Aktivität koordiniert den G1/S-Übergang und erste morphologische Veränderungen der Centrosomen, wie der Verlust der orthogonalen Verbindung zwischen der Mutter- und Tochter-Centriole in der späten G1-Phase [140]. Dieses Phänomen wird auch als "Splitting“ der Centriolen bezeichnet wird. Als *in vivo* Substrate wurden die centrosomalen Proteine Nukleophosmin und CP110 gefunden, die in diese Prozesse involviert sind [44, 141]. Da die Plk2-Kinase zur gleichen Zeit wie die Cyclin E/Cdk2 aktiv ist, könnte es möglich sein, dass Plk2 eine ähnliche Rolle bei der Initiierung der Centriolen-Duplikation involviert ist. Die Frage ist, ob Cdk2 und Plk2 in dem gleichen Signalweg oder in verschiedenen parallelen Signalwegen interagieren. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Überexpression von Plk2 keinen Einfluss auf die Aktivität der Cdk2-Kinase hat (Abb. 22). Des weiteren wurde in *in vitro* Kinasestudien gezeigt, dass Plk2 kein Substrat von Cdk2 sowie Cdk2 kein Substrat von Plk2 ist. Dies könnte dafür sprechen, dass beide Kinasen in verschiedenen Signalwegen parallel die Centriolen–Duplikation regulieren oder dass Plk2 zwar nicht direkt durch Cdk2 reguliert wird, aber der Cdk2-Kinase im gleichen Signalweg nachgeschaltet sein könnte. Hinweise auf eine mögliche Kooperation von Cdk2 und Plk2 bei der Regulation der Centriolen-Duplikation liefert eine kürzlich erschienene Studie über die Struktur und Funktion der Polo-Box-Domäne (PBD) [73,74]. Die PDB stellt eine Phosphopetid-Bindungsdomäne dar, die für die Bindung von Polo-Kinasen an subzelluläre Strukturen oder Substrate, nach Phosphorylierung dieser durch eine primäre Kinase, verantwortlich ist. Dabei wird die inhibitorische Interaktion zwischen Kinase-Domäne und PBD durch die Bindung des Phosphopetid an die PDB aufgehoben. Die Polo-Kinase phosphoryliert dann entweder das gleiche Protein oder andere Proteine, die ebenfalls an der gleichen subzellularen Struktur, wie zum Beispiel an den Centrosomen, lokalisiert sind. Als primäre Kinase könnte dabei Cdk2 in Frage kommen. Als optimale Bindungsseite für Polo-Kinasen wurde die Sequenz S-pT/pS-P/x identifiziert [73]. Dieses Motiv wird bevorzugt von prolin-gerichteten-Kinasen, wie Cdks oder MAP-Kinasen am Serin- oder Threonin-Rest phosphoryliert. Nach vorangegangener Phosphorylierung von centrosomalen Proteinen

durch die Cyclin E/Cdk2-Kinase könnte Plk2 an diese centrosomalen Proteine binden und die entsprechenden Substrate phosphorylieren. Aufklärung darüber würde eine Untersuchung der Plk2-Aktivität bzw. der Lokalisation von Plk2 in Folge der Hemmung der Cdk2-Aktivität oder nach Überexpression von Cdk2 bringen. Auch eine mögliche Regulation von Cyclin E durch Plk2 könnte untersucht werden, da gezeigt wurde, dass Plk1 die Lokalisation von Cyclin B reguliert. In Abbildung 29 ist ein mögliches Modell zur Regulation der Centriolen-Duplikation in somatischen Zellen durch Plk2 dargestellt.

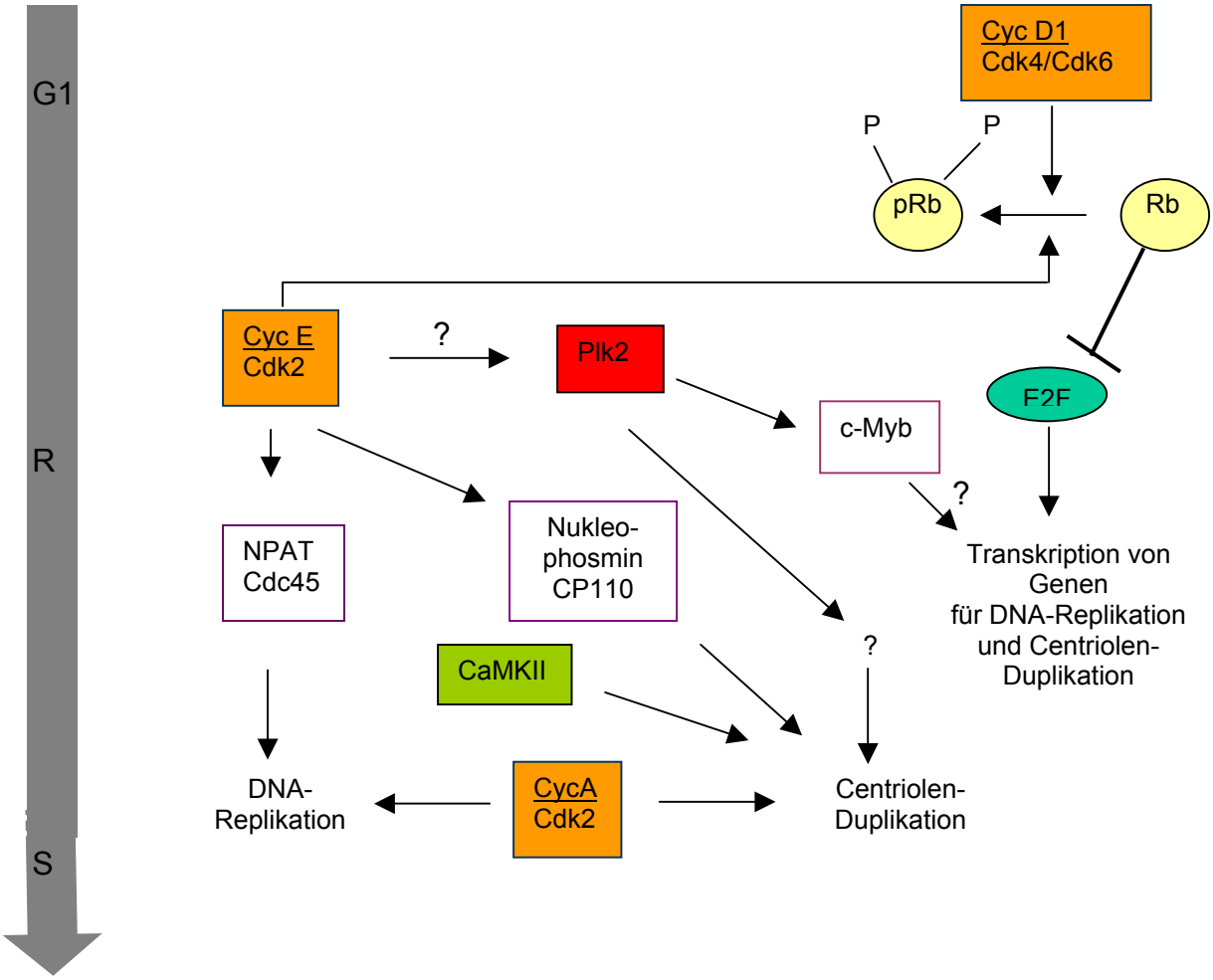

Abbildung 29: Modell zur Regulation der Centriolen-Duplikation in somatischen Zellen.

Am G1/S-Übergang (Restriktionspunkt = R) wird die Centriolen-Verdopplung durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex vorbereitet, indem Substrate wie Nukleophosmin und CP110 am Centrosom phosphoryliert werden. Weiterhin phosphoryliert der Cyclin E/Cdk2-Komplex das Rb-Protein, woraufhin der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. Dadurch wird die Transkription von Genen, welche wichtig für die DNA-Replikation sowie für die Centriolen-Duplikation sind, aktiviert. Plk2 ist zur gleichen Zeit wie Cyclin E/Cdk2 aktiv und ist für die Initiierung der Duplikation der Centriolen essentiell. Die Substrate von Plk2 sind bisher noch nicht identifiziert. Unklar ist auch ob der Transkriptionsfaktor c-Myb, welcher als Interaktionspartner von Plk2 identifiziert wurde, in die Transkription von Genen, die für die Centriolen-Duplikation wichtig sind, involviert ist. Das Signal für die Auslösung der Centriolen-Duplikation ist die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium-Ionen, wodurch die CaMKII-Kinase aktiviert wird, wobei Substrate dieser bisher auch noch nicht identifiziert wurden.

7.4. Ist die Plk2-Kinase essentiell für den G1/S-Übergang?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Plk2 im Gegensatz zu den anderen humanen Polo-Kinasen, wie Plk1 und Plk 3, am G1/S-Übergang aktiv ist (Abb. 11). Plk1 ist am Ende in der G2-Phase und in der Mitose aktiv und steuert so wichtige Ereignisse in der Mitose. Dagegen wird Plk3 nach Schädigungen der DNA oder der mitotischen Spindel durch die Kontrollpunkt-Kinase Chk2 phosphoryliert und damit aktiviert [96]. In welcher Phase die humane Plk3-Kinase im normalen Zellzyklus aktiv ist, wurde bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte aber in anderen Studien gezeigt werden, dass sowohl Plk1 als auch Plk3 die mitotischen Defekte in *S. cerevisiae*, verursacht durch Mutation von Cdc5 (Polo-kinase in der Bäckerhefe), komplementieren können [75, 76]. Dagegen konnte Plk2 die mitotische Funktion von Cdc5 in der temperatur-sensitiven Cdc5-Mutante nicht übernehmen (I. Hoffmann, R. Erikson, unveröffentlichte Daten). Diese und auch die Aktivitätsstudien, lassen vermuten, dass Plk2 keine mitotische Kinase ist sondern vielmehr eine Funktion am G1/S-Übergang ausübt.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung der Funktion eines Proteins ist das Ausschalten des entsprechenden Gens in einer sogenannten "Knock-out-Maus“. Kürzlich wurde in der Literatur beschrieben [87], dass die Plk2$^{-/-}$-Maus lebensfähig ist. Die Plk2$^{-/-}$-Maus ist kleiner als die Wild-Typ-Maus (Plk2$^{+/+}$), zeigt aber nach der histologischen Untersuchung der verschiedenen Gewebetypen keine Anomalien und ist fortpflanzungsfähig. Plk2 scheint also keine essentielle Funktion für die Embryonalentwicklung zu haben. Bei der Untersuchung der Embryonen wurde ein reduziertes Wachstum der Plazenta und ein geringerer mitotischer Index in diesem Gewebe festgestellt, was darauf schließen lässt, dass Plk2 an der Proliferation der Zellen beteiligt ist. Von diesen Embryonen wurden ebenfalls Fibroblasten isoliert und kultiviert. Die Analyse des Wachstums zeigt, dass der Zellzyklus länger dauert, was letztendlich auf eine verlängerte G1-Phase zurückzuführen ist. Effekte auf die G1-Phase des Zellzyklus wurde ebenfalls nach Ausschalten der Plk2-Funktion durch Mikroinjektion spezifischer Antikörper gegen Plk2 (s. 6.4.1.) sowie durch RNA-Interferenz (s. 6.4.2.1.) beobachtet. Durch die Mikroinjektionsstudien konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob das Ausschalten von Plk2 zu einem anhaltenden G1-Arrest führt.

Das Ausschalten des Plk2-Proteins durch RNA-Interferenz dagegen führt zu einem vollständigen Arrest der HeLa-Zellen in G1. In Zellen die mit pSUPER-Lamin transfiziert wurden, zeigen einen verzögerten Zellzyklus, der wahrscheinlich durch den Mechanismus der RNA-Interferenz oder durch das Herunterregulation von Lamin ausgelöst wird. Dagegen bleiben die mit pSUPER-Plk-1 und -2 transfizierten Zellen eindeutig in der G1-Phase arretiert (Abb. 16C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Plk2 essentiell für den G1/S-Übergang in somatischen Zellen ist.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von der Plk2$^{-/-}$-Maus und den RNAi-Daten könnte darauf zurückzuführen sein, dass eventuell andere Kinasen die Funktion von Plk2 in der Plk2$^{-/-}$-Maus übernehmen könnte. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis,* wird sowohl die mRNA von Plx2 als auch von Plx3 in den gleichen Stadien transkribiert [70]. Nach Mikroinjektion von *in vitro* transkribierten mRNAs beider Proteine wird die progesteron-induzierte Reifung der Oocyten induziert. Die Kinasen regulieren also ähnliche Mechanismen während der embryonalen Entwicklung. Es ist deshalb möglich, dass Plk3 die Funktionen von Plk2 während der embryonalen Entwicklung übernehmen könnte. Auch die humanen Proteine haben überlappende Expressionsprofile, da beide Proteine in jeder Phase des Zellzyklus exprimiert werden. Sie sind außerdem an den gleichen Kompartimenten (Centrosomen) in der Zelle lokalisiert. Ähnliche Effekte wurden auch für die Cdk2-Kinase beobachtet. Eine neure Studie zeigt, dass die Cdk2$^{-/-}$-Maus ebenfalls lebensfähig ist [27]. Auch die Analyse des Zellzyklus der isolierten Fibroblasten zeigt, dass diese zwar eine verlängerte G1-Phase haben, aber nicht in G1 arretieren. In somatischen Zellen ist Cdk2 dagegen eine essentielle Kinase für den G1/S-Übergang. Auch hier ist es möglich, dass die Rolle von Cdk2 in der Cdk2$^{-/-}$-Maus von anderen Proteinen, vermutlich von anderen Cyclin-abhängigen Kinasen, übernommen werden kann.
Sicher ist, dass Plk2 essentiell für die Duplikation der Centriolen am G1/S-Übergang ist. Ob der G1-Arrest nach RNA-Interferenz nur auf die Hemmung der Centrosomen-Duplikation zurückzuführen ist, bleibt zu klären. Die Ergebnisse der Mikroinjektionsexperimente deuten jedoch auf eine weitere Funktion in G1 hin. So könnte untersucht werden, ob Plk2 die Degradation von G1-Zellzyklus-Regulatoren durch den SCF-Komplex, die Etablierung der Pre-Initiations-Komplexe an den Ausgangspunkten der DNA-Replikation, S-Phase-spezifische Transkriptionsfaktoren oder die Histon-Synthese, alles Ereignisse die für den Eintritt in die S-Phase essentiell sind, reguliert.

7. 5. Der Transkriptionsfaktors c-Myb als mögliches *in vivo* Substrat der Plk2-Kinase

Das c-Myb Proto-Onkogen ist das zelluläre Homolog des Onkogen v-Myb des Myeloblastosis-Virus, welches Leukämie bei Hühnern verursacht. Es handelt sich um ein 75 kDa großes nukleäres Phosphoprotein, welches hauptsächlich in proliferierenen hämatopoietischen Geweben, im Dickdarm und in Epithelien exprimiert wird [124, 142]. Als Transkriptionsfaktor reguliert c-Myb die Proliferation, Differenzierung sowie Apoptose von Zellen. Erhöhte c-Myb-Proteinmengen sowie eine erhöhte transkriptionelle Aktivität wurden in verschiedenen Tumorarten, wie zum Beispiel in Leukämien, Neuroblastoma, Dickdarmtumoren, Lungentumoren und Brusttumoren nachgewiesen [129-134]. Des

weiteren wurden mehrere Kopien sowie Umlagerungen des c-Myb-Genes in verschieden Krebsarten gefunden, was für eine Rolle von c-Myb bei der Tumorgenese spricht. Generell wird das Wachstum von hämatopoitischen Zellen durch Zytokine stimuliert, was zu einer Induktion von c-Myb führt. Es wurde auch gezeigt, dass der Eintritt in die S-Phase durch Injektion von Oligonukleotiden gegen c-Myb blockiert wird [124]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass c-Myb vermutlich sowohl beim Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Arrest in G0 und auch in den nachfolgenden Zellzyklen von hämatopoietischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Welche Gene c-Myb in humanen Zellen aktiviert sowie die Regulation von c-Myb selber ist bislang noch unklar.

In der vorliegenden Studie konnte c-Myb als Interaktionspartner von Plk2 im Zwei-Hybrid-Screen identifiziert werden. Beide Proteine interagieren sowohl in *in vitro*-Bindungsstudien als auch nach Überexpression beider Proteine in Zellen miteinander (Abb. 24, 27). Die "GST pull down“-Experimente zeigen, dass für die Bindung an Plk2 die Transaktivierungsdomäne und die negativ regulatorische Domäne in c-Myb notwendig sind (Abb. 26). Außerdem phosphoryliert Plk2 das c-Myb-Protein in der regulatorischen Domäne am carboxyl-terminalen Ende (Abb. 25). Die Frage ist, ob Plk2 auch die transkriptionelle Aktivität von c-Myb reguliert. In Transaktivierungs-Studien konnte gezeigt werden, dass Plk2-WT die transkriptionelle Aktivität von c-Myb dosis-abhängig stimuliert (im Zusammenarbeit mit K. Jiang und B. Lüscher, RWTH Aachen). Der gleiche Effekt wurde jedoch auch mit der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R beobachtet, wobei die transkriptionelle Aktivität von c-Myb geringer stimuliert wird, als nach Transfektion mit der gleichen DNA-Menge des Plk2-WT-Plasmides. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Plk2-K111R nicht völlig inaktiv ist (Abb. 25) und die Restaktivität ausreicht, um c-Myb zu aktivieren. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass Plk2 in vivo zwar an c-Myb bindet und dabei einen Interaktionspartner von c-Myb phosphoryliert oder aber als Bindungsprotein für mögliche Interaktionspartner von c-Myb fungiert.

Um die Konsequenz der Interaktion zwischen c-Myb und Plk2 genauer zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen nötig. Ein Schritt könnte die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle von Plk2 im c-Myb-Protein sein. Für Plk1 wurde kürzlich die Konsensus-Phosphorylierungssequenz identifiziert [73]. Bei der Untersuchung der Aminosäuresequenz von c-Myb, sind im Bereich der Transaktivierungsdomäne sowie in der negativ-regulatorischen Domäne einige mögliche Plk2- Konsensus-Sequenzen zu finden. Die Mutation der Serin- beziehungsweise Threonin-Reste zu Alanin innerhalb dieser Sequenz und die Ko-Transfektion dieser Mutante mit dem Plk2-WT sowie die nachfolgende Durchführung eines Transaktivierungs-Assays könnte Klarheit darüber bringen, ob die Phosphorylierung einen direkten Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb ausübt.

Weiterhin könnte untersucht werden, ob Plk2 die Interaktion zwischen Transaktivatoren, wie p300, eine Histonacetyl-Transferase, und c-Myb reguliert. Es liegt eine Studie über Plk1 vor, die zeigt, dass Plk1 das BRCA2-Protein phosphoryliert, welches auch in die transkriptionelle Kontrolle von Genen durch Regulation der Chromatinstruktur involviert ist [143]. Die Phosphorylierung führt zu der Dissoziation des P/CAF-Komplex, wobei es sich auch um eine Histonacetyltransferase handelt, die mit BRCA2 interagiert. Dadurch kann BRCA2 im Komplex mit Rad51 das Chromatin modulieren, um so eine fehlerfreie Mitose zu gewährleisten. Es ist also möglich, dass Plk2 c-Myb in der G1-Phase phosphoryliert und dadurch die Interaktion mit Ko-Aktivatoren, wie p300, reguliert.
Dass beide Proteine in hämatopoietischen Zellen exprimiert werden (Abb. 28), deutet auf eine Signalkaskade zur Regulation des Wachstums von hämatopoietischen Zellen hin, bei der Plk2 und c-Myb involviert sein könnten. Da in verschiedenen Tumorarten die c-Myb-Aktivität erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dass auch die Plk2-Aktivität erhöht ist und es deshalb zu der beobachteten Steigerung der transkriptionellen Aktivität von c-Myb kommt. Dies könnte ein möglicher Mechanismus zur Entstehung von Leukämien sein. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass das Plk2-Gen auf dem Chromosom 5 (5q12.1-q13.2) lokalisiert ist, wo auch chromosomale Anomalien gefunden wurden, die mit der Entstehung von Leukämien assoziiert sind [144]. Weiterhin wurde beobachtet, dass in einigen Leukämiearten die Centrosomen-Anzahl erhöht ist [145]. Da Plk2 die Centriolen-Duplikation reguliert, ist es möglich, dass c-Myb die Transkription von Genen, die für die Duplikation der Centrosomen wichtig sind, stimuliert (Abb. 29). Durch die gesteigerte transkriptionelle Aktivität von c-Myb könnte es zu einer erhöhten Anzahl von Centrosomen in diesen Zellen kommen, was wiederum zu einer genomischen Instabilität führt und dadurch zu Entstehung von Krebs beitragen könnte.

7.6. Ausblick

In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf eine Funktion von Plk2 am G1/S-Übergang und bei der Regulation der Centriolen-Duplikation gefunden. Ein vorrangiges Ziel sollte die weitere Charakterisierung über die Stellung von Plk2 in den Signalwegen am G1/S-Übergang sein. Dazu könnte untersucht werden, ob Plk2 in dem gleichen Signalweg wie die Cdk2-Kinase oder in einen anderen parallelen Signalweg involviert ist. Mit Hilfe einer CDK2-induzierbaren Zelllinie oder nach Herunterregulation von Cdk2 durch RNA-Interferenz könnten die Effekte auf die Plk2-Kinase untersucht werden. Außerdem ist es sinnvoll weitere Substrate durch Ko-Immunpräzipitation und anschließender Massenspektroskopie zu identifizieren. Dabei sollte gezielt nach centrosomalen Proteinen gesucht werden, die möglicherweise bei der Duplikation der Centriolen eine Rolle spielen. Mögliche Kandidaten

wären AKAP450, Centrine, SAS-4, ε-tubulin, Nucleophosmin oder PARP-3 [146]. Die Rolle dieser Proteine bei der Centrosomen-Duplikation ist zwar bekannt, jedoch ist die Regulation noch nicht aufgeklärt.

Neben der Identifizierung von centrosomalen Substraten sollte auch die subzelluläre Lokalisation von Plk2 genauer untersucht werden. Nach Synchronisation der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen kann die Lokalisation des endogenen Proteins verfolgt werden, indem die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten fixiert werden und Plk2 durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wird. Eine weitere Möglichkeit wäre in der lebenden Zelle die Lokalisation des GFP-Plk2-Proteins durch Videomikroskopie zu untersuchen. Dadurch könnte geklärt werden, ob Plk2 nur transient am G1/S-Übergang oder kontinuierlich an den Centrosomen lokalisiert ist.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Regulation der Plk2-Aktivität durch andere Proteine. So könnten die möglichen posttranslationalen Modifikationen von Plk2 untersucht werden, um herauszufinden, wie Plk2 in jedem Zellzyklus aktiviert und inaktiviert wird. Es ist bekannt, dass die Aktivität von Polo-Kinasen speziell durch Phosphorylierungen reguliert wird. Die Identifizierung dieser Kinasen beziehungsweise Phosphatasen und deren Effekt auf die Plk2-Aktivität oder -Funktion wäre hilfreich, um klären, in welche Signalwege die Plk2-Kinase zur Kontrolle des G1/S-Überganges sowie der Centriolen-Duplikation eingebunden ist.

Nicht zuletzt könnte Plk2 aus therapeutischer Sicht interessant sein. Die Deregulation der Centrosomen-Duplikation führt zu centrosomalen Defekten, die das Potential haben, eine genetische Instabilität durch den Verlust der Zellpolarität und durch Chromosomen-Missegregation auszulösen. Eine erhöhte Centrosomen-Anzahl wurde in besonders aggressiven Brusttumoren nachgewiesen [147]. Diese Prozesse könnten dadurch bei der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielen und deren Aufklärung könnte wichtig für die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen zur Behandlung von Krebs sein.

8. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden viele neue Familien von Proteinkinasen beschrieben, die neben den Cyclin-abhängigen Kinasen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen. Die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine trägt entscheidend dazu bei, die komplexe Regulation des Zellzyklus sowie die Entstehung von Krebs zu verstehen. Polo-Kinasen sind eine kürzlich beschriebene, neue Proteinfamilie deren Mitglieder an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Die bislang am besten untersuchte humane Polo-Kinase ist Plk1, welche wichtige mitotische Prozesse reguliert. Dagegen sind die Funktionen der anderen Polo-Kinasen Plk2, Plk3 und Plk4 noch nicht ausreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher es, die Funktion der humanen Polo-Kinase Plk2 zu charakterisieren sowie Substrate von Plk2 zu identifizieren. Dazu wurde die Aktivität und die Expression von Plk2 in Zeitkurven mit HeLa-Zellextrakten nach Synchronisation in der Mitose bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Plk2-Aktivität in HeLa-Zellen in der späten G1-Phase ansteigt und ihr Maximum am G1/S-Übergang erreicht, etwa zum gleichen Zeitpunkt der Aktivierung der Cyclin E/Cdk2-Kinase. Da der Proteingehalt von Plk2 während der gesamten Zeit konstant ist, wird Plk2 wahrscheinlich in jeder G1-Phase durch einen post-translationalen Mechanismus aktiviert. Weiterhin wurde die Aktivität in humanen Fibroblasten am G0/S-Übergang untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Plk2 bereits nach dem Wiedereintritt in den Zellzyklus aktiviert wird und die Aktivität in der Mitte der G1-Phase wieder absinkt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Plk2 am G0/S-Übergang sowie auch am G1/S-Übergang hin.

Zur weiteren Untersuchung der *in vivo* Funktion von Plk2, wurde das Plk2-Protein durch Mikroinjektion mit spezifischen Antikörpern gegen Plk2 ausgeschaltet und durch RNA-Interferenz herunterreguliert. Sowohl die Mikroinjektion der Antikörper als auch die Herunter-regulation durch RNA-Interferenz führen zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Duplikation der Centriolen durch RNA-Interferenz sowie durch Überexpression der kinase-inaktiven Mutante Plk2-K111R in Zellen blockiert wird. Diese Resultate zeigen, dass Plk2 die erste Polo-Kinase ist, die sowohl am G1/S-Übergang als auch an der Centriolen-Duplikation beteiligt ist.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Screens in Hefe konnte c-Myb, ein Transkriptionsfaktor der hauptsächlich in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, als Substrat für Plk2 am G1/S-Übergang identifiziert werden. Da die Plk2-Kinase ebenfalls in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, könnte sie die transkriptionelle Aktivität von c-Myb nach Stimulation der Zellen mit Zytokinen regulieren. Plk2 interagiert sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit c-Myb. Dabei bindet Plk2 und phosphoryliert die regulatorische Domäne am carboxy-terminalen

Ende von c-Myb. Plk2 könnte somit die transkriptionelle Aktivität von c-Myb regulieren und dadurch das Wachstums von hämatopoietischen Zellen beeinflussen.

9. Summary

To ensure genomic stability the cell cycle needs to be tightly regulated. Polo-like kinases comprise a new family of Ser/Thr kinases that are structurally distinct from cyclin-dependent kinases (Cdk) and play important roles in cell cycle control mechanisms. Of these, Plk1 is the best characterised polo-like kinase family member and clearly functions during M phase. The function of Plk2, Plk3 and Plk4 remains less clear.

The aim of this work was to functionally characterize human Plk2 during cell cycle progression. Time course experiments in HeLa cells establish that Plk2 protein levels are constant during cell cycle progression but the kinase activity is activated by a post-translational mechanism in late G1 at the same time as Cyclin E/Cdk2 is activated. This suggests a role for Plk2 at the G1-to-S-phase transition. Furthermore, in serum starvation and release experiments Plk2 activity was activated directly after addition of serum in human fibroblasts (Hs68). These results also indicate that Plk2 functions during progression from G0 to S phase.

To further investigate the function of Plk2 the protein was ablated (1) by microinjection of specific antibodies against Plk2 into human fibroblasts synchronized in G1 and (2) by RNA interference. Suppression of the Plk2 function by microinjection as well as by RNA interference causes a delay in S-phase entry suggesting that Plk2 is essential for the G1-to-S-phase transition. The observed block in G1 might be a consequence of blocking the initiation of centrosome duplication in these cells because suppression of Plk2 funktion by RNA interference prevents centrosome reduplication. Furthermore, following inhibition of Plk2 function by overexpressing the kinase inactive mutant Plk2-K111R results in failure of centriole duplication during the cell cycle in human fibroblasts. Taken together, the results presented herein reveal that Plk2 (1) is rate-limiting for progression from quiescence to S-phase in human fibroblasts and (2) is required for G1-to-S-phase transition due to regulation of centriole duplication in cells.

Using a yeast two-hybrid screen, c-Myb was identified as a substrate of the Plk2 kinase. Since both Plk2 and c-Myb are expressed in hematopoietic cells, Plk2 may be a likely candidate to regulate c-Myb activity. The results further demonstrate that Plk2 can physically interact with c-Myb *in vivo* and *in vitro*. In addition, Plk2 phosphorylates the carboxy-terminal part of c-Myb *in vitro*. These results define a novel signal transduction cascade involving Plk2 and c-Myb, and suggest a role for both proteins in cytokine-regulated control of hematopoietic cell proliferation.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des eukarontischen Zellzyklus 3
Abbildung 2: Aufbau eines Centrosoms 9
Abbildung 3: Regulation des Centrosomenzyklus 11
Abbildung 4: Struktur der Polo-Kinasen 14
Abbildung 5: Die Regulation der Plk1-Funktion durch die PBD 15
Abbildung 6: Die mitotischen Funktionen von Plk1 17
Abbildung 7: Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems in Hefe 58
Abbildung 8: Charakterisierung der spezifischen Plk2-Antikörper im Western-Blot 61
Abbildung 9: Charakterisierung der spezifischen Plk2-Antikörper nach Immunpräzipitation 62
Abbildung 10: Vergleich der Kinaseaktivitäten von Plk2-WT und den Mutanten Plk2-K111R und Plk2-N142A 64
Abbildung 11: Die Plk2-Kinase ist in der G1-Phase aktiv 65
Abbildung 12: Regulation der Plk2-Proteinmenge und der Plk2-Kinaseaktivität in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus von HeLa-Zellen 67
Abbildung 13: Zeitkurve von in der G0-Phase synchronisierten und in die G1-Phase entlassenden Hs68-Zellen 69
Abbildung 14: Übersicht über den experimentellen Ablauf der Mikroinjektion von Antikörpern 71
Abbildung 15: Mikroinjektion von Anti-Plk2-Antikörpern in humane Firbroblasten (Hs68) blockiert den Eintritt in die S-Phase 72
Abbildung 16: Effekte auf den Zellzyklus von HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Plk2 74
Abbildung 17: Herunterregulation des Plk2-Proteins durch RNAi in U2OS-Zellen beeinflusst den G1/S-Übergang sowie die G2- und M-Phase des Zellzyklus 76
Abbildung 18: Die Centrosomen-Verdopplung ist blockiert durch RNAi-vermittelte Suppression der Plk2-Funktion 79
Abbildung 19: Plk2-K111R ko-lokalisiert mit den centriolaren Marker GT335 und hemmt die Überduplikation der Centriolen nach HU-Behandlung in CHO-Zellen 81
Abbildung 20: Die Überexpression von Plk2-K111R führt zu einem Verlust der Centriolen 82
Abbildung 21: Die Expression von Plk2-K111R verursacht einen Verlust der Centriolen in humanen Fibroblasten 84
Abbildung 22: Induzierbare Expression des Plk2-Proteins und der Plk2-Kinaseaktivität 87

Abbildung 23: Plk2-K111R wird als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne in Hefe exprimiert 88
Abbildung 24: Plk2 interagiert mit c-Myb *in vitro* 90
Abbildung 25: Plk2 phosphoryliert c-Myb *in vitro* 92
Abbildung 26: Plk2-WT bindet spezifisch an das GST-c-Myb-743-Fragment 94
Abbildung 27: Plk2 interagiert mit c-Myb *in vivo* 95
Abbildung 28: Expression von Plk2 und c-Myb in malignen T-Lymphocyten 96
Abbildung 29: Modell zur Regulation der Centriolen-Duplikation in somatischen Zellen 103

11. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
pBSK	Blueskript-Plasmid der Fa. Stratagene
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CAK	Cdk aktivierende Kinase
Cdc	"cell division cycle"
Cdk	"cyclin dependent kinase"
CKI	"Cdk kinase inhibitor"
Cy	Carbocyanin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	„Dulbecco´s modified Eagle´s Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	„enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	„enzyme linked immunoabsorbent assay"
EM	Emission
et al.	et alii
Ex	Extintion
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FKS	fötales Kälberserum
GC	Guanosin-Cytidin
Glu	Glutaminsäure
GST	Glutathionsulfonyl-Transferase
HA	Hämagglutinin Epitop
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	"horseradish peroxidase"

IgG	Immunglobulin G
kb	kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
LLnL	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, ein Calpain-I-Inhibitor
M	Molar
mCi	Millicurie
MCS	"multiple cloning site" = Polylinkerregion
mRNA	"messenger" Ribonukleinsäure
Myc	Epitop, Peptid des humanen p62-c-Myc Proteins (AS 410-419)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
Plk	„polo-like kinase“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
shRNA	„small hairpin“ Ribonukleinsäre
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TLCK	1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon
TPCK	1-Chloro-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Try	Tryptophan
U	"unit"
WT	Wildtyp

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Polo-Kinasen der verschiedenen Organismen und ihre Funktion im Zellzyklus.....3
Tabelle 2: Verwendete pSUPER-Konstrukte.....25
Tabelle 3: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.....38
Tabelle 4: Molekulargewichtsmarker für Proteingele.....53
Tabelle 5: Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Screens 89

13. Literaturverzeichnis

[1] Simanis V and Nurse P (1986) The cell cycle control gene cdc2+ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 45 :261-268

[2] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D and Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396

[3] Nasmyth KA, Reed SI (1980) Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2114-2123

[4] Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291

[5] Nigg EA (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17: 471-480

[6] King RW, Deshaies RJ, Peters JM and Kirschner MW (1996) How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science* 274: 1652-1659

[7] Hochstrasser M (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 7: 215-223

[8] Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Cell Biol* 2: 21-32

[9] Fisk HA, Mattison CP and Winey M (2003) Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14875-14880

[10] Woo RA and Poon RY (2003) Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2(4): 316-324

[11] Nilsson I and Hoffmann I (2000) Cell cycle regulation by Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4: 107-14

[12] Donzelli M and Draetta GF (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4: 671-677

[13] Trautmann S and McCollum D (2002) Cell cycle: new function for Cdc14 family phosphatases. *Curr Biol* 12: R733-735

[14] Helin K (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 8: 28-35

[15] Mittnacht S (1998) Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* 8: 21-27

[16] Dulic V, Lees E and Reed SI (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257: 1958-1961

[17] Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM and Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15: 2612-2624

[18] Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J and Draetta G (1993) Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 121: 101-111

[19] Blomberg I and Hoffmann,I (1999) Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 19: 6183-6194

[20] Hoffmann I, Draetta G and Karsenti E (1994) Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *Embo J* 13: 4302-4310

[21] Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H and Okayama H (1994) Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J* 13: 1549-1556

[22] Desai D, Wessling HC, Fisher RP and Morgan DO (1995) Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* 15: 345-350

[23] Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI and Weinberg RA (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70: 993-1006

[24] Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM and Clurman BE (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11: 1464-1478

[25] Ye X, Wei Y, Nalepa G and Harper JW (2003) The Cyclin E/Cdk2 substrate p220(NPAT) is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. *Mol Cell Biol* 23: 8586-8600

[26] Arata Y, Fujita M, Ohtani K, Kijima S and Kato JY (2000) Cdk2-dependent and independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem* 275: 6337-6345

[27] Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M (2003)Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35: 25-31

[28] Geng Y, Yu Q Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H and Sicinski P (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114: 431-443

[29] Elledge SJ (1996) Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science* 274: 1664-1672

[30] Donzelli M and Draetta GF (2003) Regulation of mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4:671-677

[30a] Hassepass I, Voit R and Hoffmann I (2003) Phosphorylation at serine 75 is required for UV-mediated degradation of human Cdc25A phosphatase at the S-phase checkpoint. *J Biol Chem* 278: 29824-29829

[31] El-Deiry WS (2003) The role of p53 in chemosensitity and radiosensity. *Oncogene* 22: 7486-7495

[32] Chow JPH, Siu WY, Fung TK, Chan WM, Lau A, Arooz T, Ng CP, Yamashita K and Poon RYC (2003) DNA Damage during the Spindle-Assembly Checkpoint Degrades Cdc25A, Inhibits Cyclin-CDC2 Complexes, and Reverses Cells to Interphase. *Mol Cell Biol* 14:3989-4002

[33] Gardner RD, Burke DJ (2000) The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* 10: 154-158

[34] Bardin AJ and Amon A (2001) Men and sin: what`s the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 815-826

[35] Nigg EA and Meraldi P (2002) The centrosome cycle. *FEBS Letters* 521: 9-13

[36] Rieder CL, Khodjakov A and Faruki S (2001) The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol* 11: 413-419

[37] Doxsey S (2001) Re-evatuating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 688-698

[38] Lange BMH (2002) Integration of the centrosome cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* 14: 35-43

[39] do Carmo Avides M, Tavares A and Glover DM (2001) Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nature Cell Biol* 3: 421-424

[40] Nigg EA (2002) Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2: 815 - 825

[41] Tarapore P, Horn HF, Tokuyama Y and Fukasawa K (2001) Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene* 20: 3173-3184

[42] Hinchcliffe EH and Sluder G (2002) Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene* 21: 6154-6160

[43] Chen Z, Indjeian VB, McManus M, Wang L and Dynlacht BD (2002) CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells.

[44] Okuda M, Horn HF, Taraporen P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K (2000) Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication. *Cell* 103: 127-140

[45] Fisk HA, Mattison CP and Winey M (2003) Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14875-14880

[46] Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J and Nigg EA (1999) Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1: 88-93

[47] Maller JL and Matsumoto Y (2002) Calcium, Calmodulin, and CaMKII Requirement for Initiation of Centrosome Duplication in Xenopus Egg Extracts. *Science* 295: 499-502

[48] Freed E (1999) Components of an SCF ubiquitin ligase localize to centrosomes and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes Dev* 13: 3173-3184

[49] Woicik EJ, Glover DM and Hays TS (2000) The SCF ubiquitin ligase protein slimb regulates centrosome duplication in *Drosophila*. Curr Biol 10: 1131-1134

[50] Quintyne NJ, Gill SR, Eckley DM, Crego CL, Compton DA and Schoer TA (1999) Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J Cell Biol* 147: 321-334

[51] Trieselmann N and Wilde A (2002) Ran localises around the mikrotubuli spindle in vivo during mitosis in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 12: 1124-1129

[52] Moore W, Zhang C and Clarke PR (2002) Targenting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells. *Curr Biol* 12: 1442-1447

[53] Merdes A, Ramyar K, Vechio DJ and Cleveland DW (1996) A complex of NuMa and cytoplasmatic dynein is essential for spindle assembly. *Cell* 87: 447-458

[54] Garett S, Auer K, Compton DA and Kapoor TM (2002) hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr Biol* 12: 2055-2095

[55] Wittmann T, Boleti H, Antony C, Karsenti E and Vernos I (2000) Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucin zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol* 143: 673-685

[56] Giet R (2002) Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol* 156: 437-451

[57] Faragher AJ and Fry AM (2003) Nek2A kinase stimulates centrosome disjunktion and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol Biol Cell* 14: 2876-2889

[58] Whitehead CM and Rattner JB (1998) Expanding thr role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *J Cell Sci* 111: 2551-2561

[59] Jackman M, Lindon C, Nigg EA and Pines J (2003) Active cyclin B-Cdk1 first appears on centrosome in prophase. *Nature Cell Biol* 5: 143-148

[60] Sunkel CE and Glovern DM (1988) polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 89: 25-38

[61] Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, Gonzales C, Karess RE, Glover DM and Sunkel CE (1991) polo encodes a potein kinase homolog required for mitosis in Drosophila. *Genes Dev* 5: 2153-2165

[62] Charles JF, Jaspersen SL, Tinker-Kulberg RL, Hwang L, Szidon A and Morgan DO (1998) The polo-related kinase cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8:497-507

[63] Hardy CF and Pautz A (1996) A novel role for Cdc5p in DNA replication. *Mol Cell Biol* 16: 6775-82

[64] Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K Poupart MA and Nasmyth K (2001) Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105: 459-472

[65] Park CJ, Song S, Lee PR, Shou W, Deshaies RJ and Lee KS (2003) Loss of CDC5 function in Saccharomyces cerevisiae leads to defect in Swe1p regulation and Bfa1p/Bub2p-independent cytokinesis. *Genetics* 163 (1): 21-33

[66] Ohkura H, Hagan IM and Glover DM (1995) The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev* 9: 1059-1073

[67] Mulvihill DP and Hyams JS (2002) Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. J Cell Sci 115: 3575-3586

[68] Chase D, Serafinas C, Ashcroft N, Kosinski M, Longo D, Ferris DK and Golden A (2000) The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis* 26: 26-41

[69] Qian YW, Erikson E and Maller JL (1999) Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *Mol Cell Biol* 19: 8625-8632

[70] Duncan PI, Pollet N, Niehrs C and Nigg EA (2001) Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 270: 78-87

[71] Lee KS and Erikson RL (1997) Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induced multiple septation structures. *Mol Cell Biol* 17: 3408-3417

[72] Elia AE, Cantley LC and Yaffe MB (2003) Proteomic screen finds pSer/pThr- binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299:1228-1231

[73] Elia AE, Rellos P, Haire LF, Chao JW, Ivins FJ, Hoepker K, Mohammad D, Cantley LC, Smerdon SJ and Yaffe MB (2003) The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the polo-box domain. *Cell* 115: 83-95

[74] Cheng KY, Lowe ED, Sinclair J, Nigg EA and Johnson LN (2003) The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-petide complex. *EMBO J* 22: 5757-5768

[75] Wind M, Kelm O, Nigg EA and Lehmann WD (2002) Identifiation of phosphorylation sites in the polo-like kinases Plx1 and Plk1 by a novel strategy based on element and electrospray high resolution mass spectrometry. *Proteomics* 2: 1516-1523

[76] Dai W, Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B and Dai W (1997) Human Prk Is a Conserved Protein Serine/Threonine Kinase Involved in Regulating M Phase Functions. *J Biol Chem* 272: 28646-28651

[77] Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, Nigg EA (1995) Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J Cell Biol* 129(6): 1617-1628

[78] Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A and Nishida E (2001) Polo-like Kinase1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410: 215-220

[79] Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G and Marshall LA (2000) the human Polo-like kinase, Plk, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 12(6): 405-411

[80] Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Korner R and Nigg EA (2003) Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosomal protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* 5(1): 113-125

[81] Kraft C, Herzog F, Giffers C, Mechtler K, Hagenting A, Pines J and Peters JM (2003) Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* 22: 6598-6609

[82] Hauf S, Waizenegger IC and Peters JM (2001) cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293: 1350-1353

[83] Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, NiggEA, Mayer TU and Barr FA (2003) Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 162: 863-875

[84] Zhou Taumis JP, Lui X, Yu-Lee LY and Erikson RL (2003) A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev Cell* 5:127-138

[85] Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G and Erikson RL (1992) Identification of an early-growth-respone gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol Cell Biol* 12(9): 4164-4169

[86] Ma S, Liu MA, Yuan YL and Erikson RL (2003) The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 polo-like kinase that inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB. *Mol Cancer Res* 1(5): 376-384

[87] Ma S, Charron J and Erikson RL (2003) Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 23: 6936-6943

[88] Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT and El-Deiry WS (2003) Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in palitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* 23: 5556-5571

[89] Kauselmann G, Weiler M, Wulff P, Jessberger S, Konietzko U, Scafidi U, Staubli U, Bereiter-Hahn J, Strebhardt K and Kuhl D (1999) The polo-like kinases Fnk and Snk associate with a Ca(2+)- and intergrin- binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *EMBO J* 18: 5528-5539

[90] Pak DT and Sheng M (2003) Target protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science* 302: 1368-1373

[91] Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y and Winkles JA(1995) Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 270:10351-7

[92] Chase D, Feng Y, Hanshew B, Winkles JA, Longo DL and Ferris DK (1998) Expression and phosphorylation of fibroblast-growth-factor-inducible kinase (Fnk) during cell-cycle progression. *Biochem J* 333: 655-660

[93] Wang Q, Xie S, Chen J, Fukasawa K, Naik U, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Jhanwar-Uniyal M and Wai D (2002) Cell cycle arrest and apoptosis induced by human Polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity. *Mol Cell Biol* 22: 3450-9

[94] Stambrook PJ, Conn CW, Hennigan RF, Dai W and Sanchez Y (2000) Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3. *Cancer Res* 60: 6826-31

[95] Dai W, Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B and Dai W (1997) Human Prk Is a Conserved Protein Serine/Threonine Kinase Involved in Regulating M Phase Functions. *J Biol Chem* 272: 28646-28651

[96] Herzog CR (2002) Chk2 meets Plk3 in damage control. *Cell Cycle* 1(6): 408-409

[97] Leung GC, Hudson JW, Kozarova A, Davidson A, Dennis JW and Sicheri F (2002) The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat Struct Biol* 9: 719 – 724

[98] Fode C, Motro B, Yousefi S, Heffernan Y and Dennis JW (1994) Sak, A Murine Protein-Serine/Threonine Kinase that is Related to the Drosophila Polo Kinase and Involved in Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 91: 6388-6392

[99] Dennis JW, Fode C and Binkert C (1996) Constitutive expression of murine Sak-a suppresses cell growth and induces multinucleation. *Mol Cell Biol* 16: 4665-4672

[100] Hudson JW, Kozarova A, Cheung P, Macmillan JC, Swallow CJ, Cross JC and Dennis JW (2001) Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr Biol* 11: 441-446

[101] Superti-Furga G, Bergers G, Picard D and Busslinger M (1991) Hormone-Dependent Transcriptional Regulation and Cellular Transformation by Fos--Steroid Receptor Fusion Proteins. *Proc Natl Acad Sci* 88: 5114-5118

[102] Gossen M and Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetrazykline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5547-51

[103] Agami R, Brummelkamp TR and Bernards R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553

[104] Pagano M (1995) Cell cycle - materials and methods. *1st edn Springer Verlag*

[105] Tuschl T, Elbashir SM and Lendeckel W (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. 2001 *Genes Dev* 15: 188-200

[106] Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251

[107] McManus MT and Sharp PA (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3: 737 – 747

[108] Zamore PD, Tuschl T, Sharp P and Bartel DP (2000) RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 101: 25–33

[109] Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA. *Prep Biochem* 13(2): 161-166

[110] Sambrook J and Gething MJ (1989) Protein structure. Chaperones, paperons. *Nature* 342: 224-5

[111] Krieg PA and Melton DA (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nuclei Acids Res* 12(18): 7057-7070

[112] Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pinciple of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

[113] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

[114] Kumagai A and Dunphy WG (1996) Purification and molekular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science* 273: 1377-1380

[115] Knigthon DR, Zheng JH, TenEyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor S and Sowadski JM (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253: 407-414

[116] Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA and Nigg EA (1997) On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (Plk1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 239(2): 377-385

[117] Lane HA and Nigg EA (1996) Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 135: 1701-1713

[118] Balczon R, Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP and Brinkley BR (1995) Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J of Cell Biol* 130: 105-115

[119] Kann M-L, Soues S, Levilliers N and Fouquet J-P (2003) Glutamylated Tubulin: Diversity of Expression and Distribution of Isoforms. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 14-25

[120] Lingle W and Salisbury JL (2000) The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol* 49:313-329

[121] Wong C and Stearns T (2003) Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat Cell Biol* 5(6):539-544

[121a] Smith DP, Rayter SI, Niederlander C, Spicer C, Jones CM and Ashword A (2001) Lip, a cytoplasmatic protein functionally linked to the Peutz-Jegger syndrome kinase LKB1. *Human Mol Gen* 10(25): 2869-2877

[122] Duguid JR, Bohmont CW, Liu NG and Tourtellotte WW (1989) Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7260

[123] Yamaguchi N, Kimura S, McBride OW, Hori H, Yamada Y, Kanamori T, Yamakoshi H, Nagai Y (1992) Molecular cloning and partial characterization of a novel collagen chain, alpha 1(XVI), consisting of repetitive collagenous domains and cysteine-containing non-collagenous segments. *J Biochem*112: 856

[124] Gerwirtz AM, Anfossi G, Venturelli D, Valpreda S, Sims R and Calabretta B (1989) G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoding by c-myb. *Science* 245: 180-183

[125] Anfossi G, Gerwirtz AM and Calabretta B (1989) An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3379-3383

[126] Craig RW and Bloch A (1984) Early decline in c-myb oncogene expression in the differentiation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells induced with with 12-0-tetradecanoylporphol-13-acetate. *Cancer Res* 44: 442-446

[127] Todokoro K, Watson RJ, Higo H, Amanuma H, Kuramochi S, Yanagisawa H and Ikawa Y (1988) Down-regulation of c-myb gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8900–8904

[128] Mucenski L, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pietryga D, Scott JWJ and Potter SS (1991) A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65: 677–689

[129] Clarke MF, Kukowska-Latallo JF, Westin E, Smith M and Prochownik EV (1988) Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol Cell Biol* 8: 884–892

[130] Rigaud G, Moore PS, Taruscio D, Scardoni M, Montresor M,Menestrina F and Scarpa A (2001) Alteration of chromosome arm 6p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma, as identified by genome-wide allelotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 31: 191–195

[131] Goldman J and McGuire WA (1992) Oncogene RNA expression in three human lymphoblastic leukemia cell lines lymphocytes. *Pediatr Hematol Oncol* 9: 57–63

[132] Blick M, Westin E, Gutterman J, Wong-Staal F, Gallo R, McCredie R, Keating M and Murphy E (1984) Oncogene expression in human leukemia. *Blood* 64: 1234–1239

[133] Mavilio F, Sposi NM, Petrini M, Bottero L, Marinucci M, De Rossi G, Amadori S, Mandelli F and Peschle E (1986) Expression of cellular oncogenes in primary cells from human acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4394–4398

[134] Beck Z, Bacsi A, Kovacs E, Kiss J, Kiss A, Balogh E, Telek E, Toth FD, Andirko I, Olah E, Udvardy M and Rak K (1998) Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration. *Leuk Lymphoma* 30: 293–306

[135] Sherr CJ and Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-1163

[136] Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K and Saya H (2003) Aurora-A and interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114: 585-598

[137] Naik UP, Patel PM and Parise LV (1997) Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with thr integrin α_{IIb} cytoplasmatic domain. *J Biol Chem* 272: 4651-4654

[138] Planas-Silva MD and Weinberg RA (1997) The restriction point and control of the cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 9(6): 768-772

[139] Hincliffe EH, Miller FJ, Cham M, Khodijakov A and Sluder G (2001) Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 291: 1547-1550

[140] Piel M, Meyer P, Khodjakov A, Rieder CL and Bornens M (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavier in vertebrate cells. *J Cell Biol* 149: 317-330

[141] Cheng Z, Indjeian VB, McManus M, Wang L and Dynlacht BD (2002) CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev Cell* 3:339-350

[142] Ness SA (2003) Myb protein specifity: evidence of a context-specific transcription factor code. *Blood Cells Mol Dis* 31(2): 192-200

[143] Lin HR, Ting NS, Quin J and Lee WH (2003) M-phase specific phosphorylation of BRCA 2 by Plk1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* 278:35979-35987

[144] Ankanthil R, Geetha N, Remani P, Gangadharan VP, Pillai GR and Nair MK (1996) Clinical implications of cytogenetic classification in adult acute lymphoblastic leukemia patients. *J Cancer Research Clin Onco*l 122: 370-373

[145] Neben K, Tews B, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, Giesecke C, Krause U, Ho AD, Kramer A and Lichter P (2004) Gene expression patterns in acute myeloid leukemia correlate with centrosome aberration and numerical chromosome changes. *Oncogene* 23(13): 2379-2384

[146] Delattre M and Gonczy P (2004) The arithmetic of centrosome biogenes. *J Cell Sci* 117:1619-1630

[147] D'Assaoro AB, Barret SL, Folk C, Negron VC, Boeneman K, Busby R, Whitehead C, Stivala F, Lingle WL and Salisbury JL (2002) Amplified centrosome in breast cancer : a potential indicator ot tumor aggressiveness. *Breast Cancer Res Treat*. 75(1): 25-34

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Priv.-Doz. Dr. Ingrid Hoffmann für die Bereitstellung des Themas und für die Unterstützung während der Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Christine E. Clayton danke ich für die Vertretung der Arbeit gegenüber dem Fachbereich Biologie der Universität Heidelberg.

Für das freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima danke ich meinen ehemaligen Laborkollegen Dr. Colette O´Grady, Dr. Ingo Hassepass, Berit Mirau, Stefan Kemmler, Renate Öttl sowie den jetzigen Melanie Volkening, Alexander Mion und Daniel Spengler.

Weiterhin danke ich den Mitgliedern des Forschungsschwerpunktes Angewandte Tumorvirologie für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegalität sowie Dr. A. Fry und Prof. B. Lüscher für die Zusammenarbeit.

Und nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden für Ihr Verständnis und ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und kein anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg, April 2004