

# **Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A und die Bedeutung für die Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

**DISSERTATION**

von

**Irene Andrea Kieß  
aus Karlsruhe**

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse  
Referentin: PD Dr. Christine Blattner  
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Graeve, Universität Hohenheim

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 2010



---

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Mdm2 Protein reguliert die Menge von p53, eines der wichtigsten Tumorsuppressor Proteine in eukaryotischen Zellen. Die Phosphorylierung von Mdm2 an mehreren Serinen in seiner zentralen Domäne ist dabei für den effektiven Abbau von p53 notwendig.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Aurora A Mdm2 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert. Außerdem wurde durch *in vitro* und *in vivo* Experimente nachgewiesen, dass Aurora A mit Mdm2 interagiert. Darüber hinaus verhinderte die Inhibition von Aurora A durch siRNA den effektiven Abbau des p53 Proteins. Entsprechend führte die Mengenzunahme von Aurora A zur vermehrten Degradation von p53. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Aurora A die Ubiquitinierung von p53 induziert, was vermutlich die beobachtete Reduktion von p53 verursachte. Das p53 Protein, das nach Aurora A siRNA Behandlung akkumulierte, war funktionsfähig und aktivierte als Transkriptionsfaktor die Expression seiner Zielgene.

Die Aktivität, sowie die Proteinmenge von Aurora A waren nach Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung nicht verändert.

Da Mdm2 neben seiner Funktion als negativer Regulator von p53 auch am Abbau des Tumorsuppressor Proteins Rb beteiligt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit gleichfalls untersucht, ob Aurora A über die Phosphorylierung von Mdm2 auch an der Regulation von Rb beteiligt ist. Aurora A zeigte dabei keinen Einfluss auf die Menge des Rb Proteins, allerdings wurde Rb durch Aurora A, in Anwesenheit von Mdm2, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hatte physiologische Bedeutung für Rb, wobei Aurora A die Assoziation von Rb mit dem Transkriptionsfaktor E2F-1 inhibierte.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Aurora A die beiden wichtigsten Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb reguliert.



---

## ABSTRACT

### Phosphorylation of Mdm2 by Aurora A and the impact on the tumor suppressor proteins p53 and Rb

Mdm2 is the main negative regulator of p53. For the proper function of Mdm2, p53 has to be phosphorylated on several serines within its central domain.

In this work, it has been shown, that the mitotic kinase Aurora A is capable of phosphorylating Mdm2 *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* the central domain of Mdm2 was the only domain, which was phosphorylated by Aurora A.

In addition Mdm2 and Aurora A interacted *in vitro* and *in vivo*. Moreover Aurora A had an impact on the level of p53. The inhibition of Aurora A by siRNA treatment resulted in accumulation of p53, while overexpression of the kinase caused an increase in p53 degradation. This observation might be due to the ubiquitination of p53, which was also influenced by Aurora A. The p53 protein, which accumulated after Aurora A siRNA treatment was functional and activated the expression of certain target genes.

The activity of Aurora A as well as the protein level was not altered upon treatment of cells with ionizing radiation.

Mdm2 is not only the negative regulator of p53, but it has been also implicated in the degradation of Rb.

Therefore it was investigated, if Aurora A can also have an influence on the level of Rb, similar to that of p53. The results have shown, that Aurora A did not affect the level of Rb; moreover it has been elucidated, that Rb itself is a substrate of the Aurora A kinase. Aurora A phosphorylated Rb *in vitro*, but only in the presence of Mdm2.

This phosphorylation had also physiological consequences, because it kept Rb inactive and interfered with its binding to the transcription factor E2F-1.

Taken together, these data suggest that Aurora A regulates the two most important tumor suppressor proteins p53 and Rb.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	I
ABSTRACT .....	III
INHALTSVERZEICHNIS .....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Aurora Kinasen.....	3
1.1.1 Die Familie der Aurora Proteinkinasen .....	3
1.1.2 Struktur der Aurora Kinasen .....	4
1.1.3 Regulation der Aurora Kinasen.....	5
1.1.4 Aurora Kinasen sind wichtige Regulatoren der Zellteilung .....	8
1.1.5 Aurora Kinasen und ihre Bedeutung für die Tumorigenese.....	9
1.2 Das Onkoprotein Mdm2.....	12
1.2.1 Struktur des Mdm2 Proteins .....	12
1.2.2 Das Mdm2 Protein - der negative Regulator von p53.....	13
1.2.3 Die Regulation des Mdm2 Proteins und die Bedeutung seiner .....	
zentralen Domäne.....	14
1.2.4 Mdm2 und Krebs.....	15
1.3 Das Tumorsuppressor Protein p53.....	16
1.3.1 Funktionen des Tumorsuppressor Proteins p53 .....	17
1.4 Das Tumorsuppressor Protein Rb .....	18
1.4.1 Funktionen des Rb Proteins.....	18
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor E2F .....	20
1.4.3 Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des Rb Proteins.....	20
1.4.4 Fehlregulation des Rb Proteins und die Bedeutung für die .....	
Tumorigenese.....	21
1.5 Zielsetzung .....	23

# INHALTSVERZEICHNIS

---

2	MATERIAL UND METHODEN .....	25
2.1	MATERIAL .....	25
2.1.1	Chemikalien .....	25
2.1.2	Zell-Linien .....	27
2.1.3	Bakterien.....	28
2.1.4	Plasmide .....	28
2.1.5	Oligonukleotide .....	30
2.1.6	Proteine.....	32
2.1.7	Kits und Transfektions-Reagenzien .....	32
2.1.8	Enzyme .....	33
2.1.9	Bindungs-Matrices .....	33
2.1.10	Größenstandards .....	34
2.1.11	Antikörper.....	34
2.1.12	Verbrauchsmaterialien .....	35
2.1.13	Geräte und Hilfsmittel .....	36
2.1.14	Software.....	37
2.2	METHODEN .....	38
2.2.1	Klonierung und DNA Analyse .....	38
2.2.2	Zellkultur und Transfektion eukaryotischer Zellen .....	43
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	46
3	ERGEBNISSE .....	55
3.1	Aurora A phosphoryliert das Mdm2 Protein <i>in vitro</i> .....	55
3.2	Physiologische Relevanz der Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A .....	63
3.3	Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch die Aurora Proteinkinase Familie .....	72
3.4	Aurora A beeinflusst die Stabilität des p53 Proteins.....	73



# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.5	p53 ist nach Aurora A Inhibition aktiv .....	75
3.6	Die Halbwertszeiten der Mdm2 und p53 Proteine sind in der Mitose verkürzt.....	77
3.7	Aurora A induziert die Ubiquitinierung des p53 Proteins .....	79
3.8	Einfluss von Aurora A auf das Retinoblastom Protein - einem Bindungspartner von Mdm2.....	82
3.9	Aurora A phosphoryliert das Rb Protein <i>in vitro</i> bei Anwesenheit des Mdm2 Proteins .....	83
3.10	Aurora A und das Rb Protein kolokalisieren <i>in vivo</i> .....	86
3.11	Aurora A beeinflusst <i>in vivo</i> die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 .....	87
3.12	Aurora A reduziert die Assoziation des Rb Proteins mit dem E2F-1 Protein.	90
3.13	Aurora A wird nach ionisierender Strahlung nicht inhibiert.....	92
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
4.1	Aurora A ist eine physiologische Kinase von Mdm2.....	95
4.2	Aurora A reguliert die Menge des p53 Proteins.....	98
4.3	Aurora A phosphoryliert das Rb Protein .....	101
4.4	Aurora A wird durch ionisierende Strahlung nicht beeinflusst .....	102
4.5	Aurora A reguliert die beiden Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb.....	103
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>105</b>
5.1	Abkürzungsverzeichnis.....	105
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	108
5.3	Tabellenverzeichnis.....	110
5.4	Literaturverzeichnis .....	111



# EINLEITUNG

---

## 1 EINLEITUNG

### ***Krebs***

Pro Jahr erkranken weltweit mehr als 11 Millionen Menschen an Krebs und im Jahr 2004 starben 7.9 Millionen daran (WHO fact sheet No. 297). Damit steht Krebs weltweit, wie auch bundesweit, an zweiter Stelle der Todesursachen. Experten schätzen, dass die Fälle der Neuerkrankungen bis 2030 noch um 50% steigen werden.

Da es sich bei Krebs nicht um ein einfaches Krankheitsbild, sondern um ein multifaktorielles, heterogenes und komplexes Ereignis mit unterschiedlichsten Ausprägungen handelt, ist es der Wissenschaft bis heute nicht gelungen, die zugrunde liegenden Mechanismen vollständig aufzuklären.

Hauptkennzeichen der Krebserkrankung ist unkontrolliertes Zellwachstum, dessen Ursprung in Mutationen der DNA liegt. In den weiteren Stadien der Kanzerogenese kommt es zur Invasion der Krebszellen in gesundes Gewebe, zu Funktionseinbußen des entsprechenden Gewebes und zur Bildung von Metastasen. Bei der Metastasierung löst sich eine einzelne Krebszelle aus dem Ursprungstumor und gelangt über das Blut- und Lymphgefäßsystem an entfernte Organe, wo sie einen Tochtertumor bildet. Die Metastasierung ist die gefährlichste Stufe der Krebserkrankung, da es so zu multiplen Organschäden kommen kann.

Die Ursachen, welche Mutationen der DNA auslösen können, sind vielfältig. Darunter sind sowohl chemische, als auch physikalische Faktoren zu finden, die zur Schädigung der DNA führen. Jeder Mensch ist im Laufe seines Lebens diesen Risikofaktoren ausgesetzt, entwickelt aber nicht zwangsläufig Tumore, weil die Zellen mit bestimmten Abwehrmechanismen ausgestattet sind. Mutationen und andere Arten von DNA Schäden werden dabei in begrenztem Umfang von Zellen erkannt und repariert. Wenn Mutationen in Genen auftreten, die an der Zellteilung beteiligt sind und diese nicht effektiv repariert werden, kann es zur Entwicklung von Krebs kommen.

### ***Der Zellzyklus***

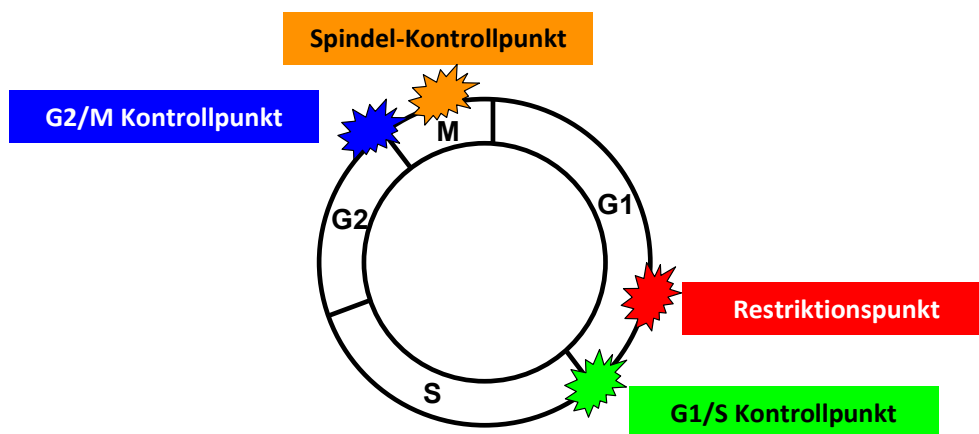
Der Zellzyklus ist eine geordnete Abfolge von Ereignissen, die zur Zellteilung führen. Die chromosomale DNA wird dabei in eukaryotischen Zellen, während der S-Phase (Synthese) des Zellzyklus repliziert. Die G1-Phase ist die erste sogenannte „gap“-Phase (*engl.: Lücke*), die ein Intervall zwischen der Mitose und der S-Phase bildet. Während dieser Phase wächst die Zelle, um nach der Zell-Teilung ihr ursprüngliches Volumen wieder zu erhalten. Außerdem werden Proteine und Nukleotide synthetisiert, die in der S-Phase benötigt

# EINLEITUNG

---

werden. Hier findet die Replikation der DNA statt, wobei aus Einchromatidenchromosomen Zweichromatidenchromosomen entstehen. Es folgt die zweite „gap“-Phase (G2), die zur Vorbereitung der Mitose dient.

Die Mitose selbst, wird in 5 Phasen unterteilt, die sich jeweils durch charakteristische Strukturen in der Zelle unterscheiden. In der Prophase findet die Trennung der Zentriolen, die Kondensation der Chromosomen und der Abbau der Kernmembran statt. In der Prometaphase bildet sich der Spindelapparat und die Mikrotubuli der Spindel werden an die Kinetochore der Chromosomen geheftet. Die beiden Schwesterchromatiden werden dabei von Mikrotubuli, aus entgegengesetzten Spindelpolen gebunden. In der Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorial-Ebene an, um dann in der Anaphase an die beiden entgegengesetzten Pole zu wandern. In der Telophase kondensieren die Chromosomen und die Kernmembran wird um die beiden neuen Zellkerne gebildet. Am Ende der Mitose findet die Zytokinese statt. Dabei teilt sich die Zelle und es entstehen zwei neue Tochterzellen.



**Abbildung 1: Zellzyklus und Kontrollpunkte**

In der G1-Phase findet hauptsächlich das Wachstum der Zelle statt und es werden Proteine und Nukleotide synthetisiert um die nächste Phase vorzubereiten. Während der S-Phase wird die DNA repliziert, wodurch es zur Verdopplung der Chromatiden kommt. In der G2-Phase wird die Zelle auf die Mitose vorbereitet. In der M-Phase erfolgt die Trennung der Chromatiden und anschließend die Zytokinese. Im Zellzyklus befinden sich Kontrollpunkte, an denen überprüft wird, ob die Zelle bereit ist in die jeweils nächste Phase einzutreten.

Die Vorgänge im Zellzyklus sind strikt organisiert und werden durch Kontrollpunkte reguliert. An diesen Kontrollpunkten wird ermittelt, ob die Zelle die jeweilige Phase abgeschlossen hat und ob alle Kriterien für den Eintritt in die nächste Phase erfüllt sind. Solche Kontrollpunkte befinden sich im Zellzyklus in der G1-Phase, auch Restriktionspunkt genannt, am G1/S-, am G2/M-Übergang und in der Mitose, der auch als Spindel-Kontrollpunkt bezeichnet wird. An diesen Kontrollpunkten besteht die Möglichkeit den Zellzyklus zu arretieren.

# EINLEITUNG

---

## 1.1 Aurora Kinasen

### 1.1.1 Die Familie der Aurora Proteinkinasen

Die Familie der Aurora Kinasen ist eine Familie von Serin/Threonin Kinasen, die von enormer Bedeutung für die Zellteilung sind (Gold et al., 2006). Die Proteinfamilie besteht bei Säugetieren aus Aurora A, B und C (Nigg, 2001). In menschlichen Zellen werden Aurora A und B ubiquitinär exprimiert. Die Expression von Aurora C ist hingegen auf das Hodengewebe beschränkt. Die Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Proteinfamilie ist durch die Konsensussequenz DFGWSVHxPxxxxRxT\*xCGTLDYLPPE definiert (Giet und Prigent, 1999). Alle Aurora Kinasen zeigen eine Zellzyklus-abhängige Regulation, wobei sie während der Mitose maximal exprimiert werden. Dabei lokalisieren die Mitglieder der Aurora Proteinfamilie typenspezifisch an unterschiedliche mitotische Substrukturen (Carmena und Earnshaw, 2003).

Das *Aurora* Gen wurde ursprünglich bei einer Untersuchung auf Chromosomen-Missegregation bei *Drosophila melanogaster* identifiziert. Dabei kam es bei Funktionsverlust eines bestimmten Proteins zur fehlgesteuerten Zentrosomen-Trennung, was eine monopolare Spindel zur Folge hatte. Das verantwortliche Protein erhielt die Bezeichnung Aurora, was an den Nordpol mit seinen Polarlichtern erinnern soll (Glover et al., 1995).

Alle einzelligen Eukaryoten, wie *Saccharomyces cerevisiae* (Ipl1, Increase in ploidy 1) oder *Schizosaccharomyces pombe* (Ark1, Aurora related Kinase) besitzen nur eine einzige Aurora Kinase, die jeweils funktionell mit Aurora B der höheren Organismen verwandt ist (Chan und Botstein, 1993; Francisco et al., 1994; Petersen et al., 2001).

In Metazoen, wie *Caenorhabditis elegans* (Schumacher et al., 1998a; Schumacher et al., 1998b), *Drosophila melanogaster* (Glover et al., 1995; Reich et al., 1999) und *Xenopus laevis* (Adams et al., 2000; Roghi et al., 1998) wurden zwei paraloge Proteine, Aurora A und B, nachgewiesen. Das Säuger genom besitzt zusätzlich eine dritte Kinase, Aurora C (Carmena und Earnshaw, 2003; Nigg, 2001).

Darüber hinaus sind homologe Proteine der Aurora Kinasen auch in Algen und höheren Pflanzen zu finden (Pan und Snell, 2000; Pan und Snell, 2003).

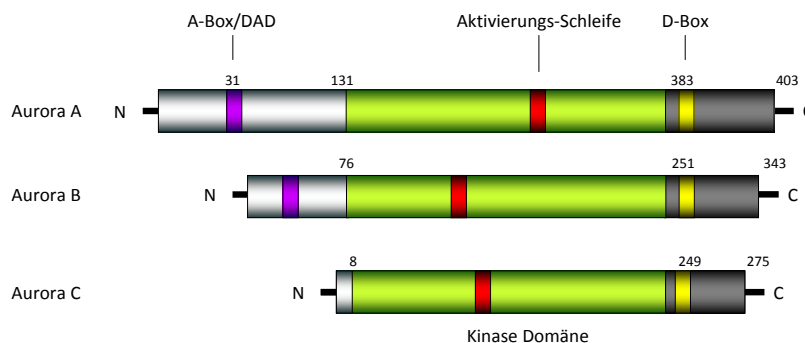
Die Beobachtung, dass von einzelligen Eukaryoten zu höheren Organismen die Zahl der *Aurora* Gene zunimmt, deutet darauf hin, dass die Funktion dieser Kinasen während der Evolution divergierte (Brown et al., 2004). Außerdem ist aufgrund der starken evolutionären Konservierung davon auszugehen, dass sie in den meisten Organismen essentiell sind.

# EINLEITUNG

---

## 1.1.2 Struktur der Aurora Kinasen

Alle Aurora Kinasen haben eine ähnliche Domänen-Struktur. Sie besitzen eine N-terminale Domäne, wo die Interaktion mit anderen Proteinen statt findet, eine zentrale Kinase-Domäne und einen C-terminalen regulatorischen Bereich. Die N-terminalen Domänen der einzelnen Kinasen zeigen geringe Sequenz-Homologien, was auf unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen hinweist und für die Substrat-Spezifität und die subzelluläre Lokalisierung der einzelnen Kinasen bedeutend ist (Carmena und Earnshaw, 2003). Die Kinase-Domäne hingegen ist stark konserviert und zeigt zwischen Aurora A und B eine Sequenzidentität von bis zu 70% (Bischoff et al., 1998; Giet und Prigent, 1999). Innerhalb der Kinase-Domäne befindet sich in der Aktivierungs-Schleife ein Threonin-Rest, an dem die aktivierende Autophosphorylierung statt findet.



**Abbildung 2: Strukturen der humanen Aurora Kinasen**

Die Strukturen von Aurora A, B und C sind mit den entsprechenden Längen und Positionen der unterschiedlichen Domänen dargestellt. Die Aurora Kinasen bestehen aus drei Domänen, der regulatorischen N-terminalen (hellblau) und C-terminalen Domäne (grau), sowie der zentralen Kinase Domäne (grün). Die Peptid-Motive A-Box/DAD (Aurora-Box/D-Box aktivierende Domäne; lila) und die D-Box (destruction Box; gelb) sind für die Degradation von Aurora A und B verantwortlich. Innerhalb der Kinase Domäne befindet sich die Aktivierungs-Schleife. Autophosphorylierung eines Threonins in diesem Bereich aktiviert die Kinasen (modifiziert nach: Bolanos-Garcia, 2005).

Des Weiteren beinhalten die Proteinsequenzen Degradations-Motive, die den Abbau von Aurora A und B vermitteln. Im Speziellen handelt es sich dabei um die D-Box (RxxLxxG) (Castro et al., 2002; Taguchi et al., 2002), die in allen drei Kinasen vorkommt und um die A-Box/DAD (Aurora Box/*destruction*-Box aktivierende Domäne) (RxLxPS), die nur bei Aurora A und B zu finden ist (Bischoff und Plowman, 1999; Katayama et al., 2003).

# EINLEITUNG

---

## 1.1.3 Regulation der Aurora Kinasen

Die Aurora Kinasen sind komplex reguliert. Protein-Expression, Protein-Degradation, Lokalisierung, Interaktion mit Modulatoren und posttranslationale Modifikationen spielen dabei eine wichtige Rolle.

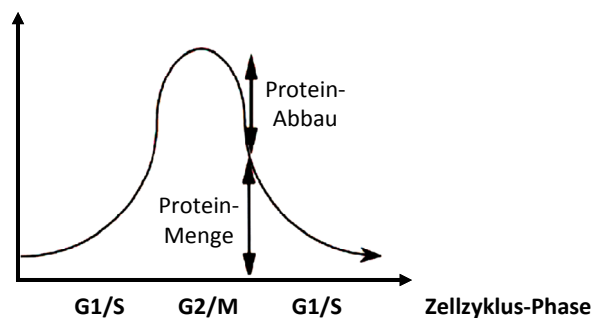
### **Regulation durch Expression**

Die Expression der Gene für die Aurora Kinasen wird Zellzyklus-abhängig reguliert. Die Transkription der *Aurora* Gene beginnt am Ende der G1/S-Phase und nimmt im Verlauf des Zellzyklus zu, bis in der Mitose ein Maximum erreicht wird (Kimura et al., 1997; Kimura et al., 2004).

Die Expression des *Aurora A* Gens wird in menschlichen Zellen über den Transkriptionsfaktor E4TF1 induziert. E4TF1 wird Zellzyklus-abhängig durch ein CDE/CHR Element (*cell cycle-dependent element/cell cycle gene homology region*) im Promotorbereich reprimiert (Tanaka et al., 2002).

Analog dazu enthält das Gen für *Aurora B* ebenfalls eine CDE/CHR Sequenz. Die Expression kann über die Transkriptionsfaktoren E2F-1, E2F-4, DP-2 und FoxM1 (*Forkhead Box M1*) induziert werden (Kimura et al., 1997; Kimura et al., 2004; Tanaka et al., 2002).

Das *Aurora C* Gen wird von einem hodenspezifischen Transkriptionsfaktor Tzfp (*Testis Zinc Finger protein*) reguliert (Tang et al., 2001).



**Abbildung 3: Die Proteinmenge von Aurora A in Abhängigkeit vom Zellzyklus**

Die Expression von *Aurora A* wird am G1/S Übergang induziert. Im Bereich des G2/M Übergangs erreicht die Proteinmenge ein Maximum und nimmt danach aufgrund des Abbaus der Kinase über das Proteasom/Ubiquitin System wieder ab (Fukuda et al., 2005).

# EINLEITUNG

---

## **Regulation durch Degradation**

Sowohl Aurora A, als auch Aurora B sind Substrate des APC/C-Komplexes (*Anaphase promoting complex/Cyclosome*). Der APC/C-Komplex ist ein Multiprotein-Komplex, mit E3 Ligase Aktivität, der in Verbindung mit seinem Kofaktor Cdh1 (Cadherin 1) am Ende der Mitose die Ubiquitin/Proteasom-abhängige Degradation von Aurora A und B einleitet (Crane et al., 2004; Littlepage und Ruderman, 2002; Stewart und Fang, 2005; Taguchi et al., 2002). Die Ubiquitinierung von Aurora A und B wird durch die so genannte A-Box/DAD und die D-Box vermittelt (Castro et al., 2002; Littlepage und Ruderman, 2002). Dabei aktiviert die A-Box/DAD die C-terminal gelegene D-Box, die dann von Adapter-Proteinen des APC/C Komplexes erkannt wird. Daraufhin werden Aurora A und B ubiquitiniert und schließlich dem Abbau im Proteasom zugeführt.

Phosphorylierung der A-Box von Aurora A an Serin 51 kann dabei autokatalytisch den Abbau inhibieren (Haydon et al., 2003; Littlepage und Ruderman, 2002; Littlepage et al., 2002).

## **Regulation durch Lokalisierung**

Von der Zentrosomen-Verdopplung bis zum Ende der Mitose ist Aurora A an den Zentrosomen lokalisiert. In der Mitose, nach Abbau der Kernmembran, weitet sich die Lokalisierung von Aurora A auf Bereiche der Mikrotubuli, die proximal zu den Zentrosomen liegen, aus (Carmena und Earnshaw, 2003). TPX2 (*targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2*) ist dabei ein wichtiger Kofaktor, der für die korrekte Lokalisierung von Aurora A sorgt (Kufer et al., 2002).

Aurora B ist zwischen Prophase und Metaphase an den Kinetochoren, während der Anaphase in der Midzone und während der Zytokinese an den mitotischen Midbody lokalisiert (Bischoff et al., 1998). Gemeinsam mit INCENP (*inner centromer protein*), Survivin und Borealin bildet Aurora B den sogenannten „chromosomal passenger“-Komplex. Dieser Multiprotein-Komplex stellt die korrekte Lokalisierung von Aurora B während der Mitose sicher (Vader et al., 2006).

Aurora C zeigt eine ähnliche Lokalisierung wie Aurora B (Bernard et al., 1998).

## **Regulation durch Phosphorylierung**

Neben der Proteinmenge und der Lokalisierung ist auch die enzymatische Aktivität der Aurora Kinasen Zellzyklus-abhängig reguliert.



# EINLEITUNG

---

## **Aurora A**

Phosphorylierung der humanen Aurora A Kinase an Threonin 288 in der Aktivierungsschleife stimuliert die Kinase-Aktivität (Walter et al., 2000). Serin 51 in der A-Box/DAD im N-terminalen Bereich wird während der Mitose phosphoryliert und spielt eine Rolle bei der Degradation. Eine dritte Phosphorylierungs-Stelle, Serin 349, im C-terminalen Bereich, reguliert die Interaktion mit Kofaktoren und nimmt so Einfluss auf die Aktivität der Kinase (Littlepage et al., 2002).

Der am besten charakterisierte Kofaktor für Aurora A ist TPX2. TPX2 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das für die bipolare Spindelausrichtung und für die Spindel-Stabilität benötigt wird (Wittmann et al., 2000).

Während der Interphase liegt TPX2 mit Importin  $\alpha/\beta$  in einem Komplex vor und wird so in einem inaktiven Stadium gehalten. Beim Eintritt in die Mitose bewirkt ein Gradient von Ran-GTP in der Nähe der Zentriolen die Freisetzung von TPX2 aus seinem Komplex (Tsai et al., 2003). TPX2 interagiert dann über seinen konservierten N-terminalen Bereich mit dem C-Terminus von Aurora A, wodurch eine Konformations-Änderung im Aurora A Protein ausgelöst wird. Dadurch kommt die Aktivierungsschleife sterisch in die Nähe des katalytischen Zentrums und die aktivierende Autophosphorylierung an Threonin 288 kann stattfinden (Bayliss et al., 2003; Eysers et al., 2003).

Durch die Bindung von TPX2 an Aurora A, und die damit verbundene Konformations-Änderung, wird die Kinase außerdem vor Dephosphorylierung an Threonin 288 durch PP1 (Proteinphosphatase 1), und damit vor Inaktivierung geschützt (Bayliss et al., 2003; Eysers et al., 2003).

Neben TPX2 ist Ajuba für die Autophosphorylierung von Aurora A notwendig, auch wenn dieses Protein nur einen verstärkenden Faktor darstellt (Hirota et al., 2003).

Des Weiteren bindet das Protein Bora an Aurora A. Bora kann die Aktivität von Aurora A verstärken und wird im Gegenzug als Substrat phosphoryliert (Hutterer et al., 2006).

## **Aurora B**

Aurora B wird analog zu Aurora A durch Autophosphorylierung an Threonin 232 in der Aktivierungsschleife aktiviert. Zur vollen Aktivierung von Aurora B ist die Bindung an INCENP nötig. Dabei interagiert Aurora B mit der konservierten C-terminalen IN-Box des INCENP Proteins. Die IN-Box induziert dabei allosterische Veränderungen in der Aktivierungsschleife von Aurora B, was letztlich zu dessen Autophosphorylierung führt (Sessa et al., 2005).

# EINLEITUNG

---

## Aurora C

Aurora C wird ähnlich wie Aurora B durch die Bindung an INCENP gesteuert (Li et al., 2004; Sasai et al., 2004). Bis heute ist aber noch nicht vollständig geklärt, welche Vorgänge zur Aktivierung von Aurora C beitragen.

### **1.1.4 Aurora Kinasen sind wichtige Regulatoren der Zellteilung**

Alle Aurora Kinasen lokalisieren typenspezifisch an unterschiedliche mitotische Substrukturen. Während Aurora A primär in der Regulation der Spindel involviert ist, ist Aurora B hauptsächlich an der Regulation der Kinetochor/Mikrotubuli Interaktion und der Zytokinese beteiligt. Da Aurora C hauptsächlich in den Hoden exprimiert wird, hat sich für diese Kinase eine Bedeutung in der Meiose gezeigt (Carmena und Earnshaw, 2003).

#### **1.1.4.1 Aurora A oder die Pol-Kinase**

Nach der Teilung und Trennung der Zentrosomen müssen verschiedene Proteine rekrutiert werden. Dies geschieht in einem Prozess, der als Zentrosomen-Reifung bezeichnet wird. Die unterschiedlichen Proteine, die dabei an den Zentrosomen akkumulieren bewirken das Wachstum des peri-zentrosomalen Bereichs. Aurora A ist während der G2-Phase und in der Mitose an den Zentrosomen lokalisiert. Damit die Kinase den Weg zu den Zentrosomen findet sind mehrere zentrosomale Protein-Kinasen wie Pak1 (Zhao et al., 2005), Plk-1 (De Luca et al., 2006) und Cdk11 (Terada et al., 2003) notwendig. Ein Mangel an Aurora A führt zu Defekten in der Zentrosomen-Reifung während der G2-Phase und der Mikrotubuli-Nukleierung während der Mitose. Des Weiteren ist Aurora A für die korrekte Lokalisierung von zentrosomalen Komponenten, wie Centrosomin (Terada et al., 2003), NDEL1 (Mori et al., 2007), LATS (Abe et al., 2006; Toji et al., 2004) und TACC verantwortlich (Barros et al., 2005; Giet et al., 2002).

Nach der Reifung wandern die Zentrosomen während der späten G2-Phase in entgegengesetzte Richtungen, wo sie die beiden Pole der mitotischen Spindel definieren. An diesem Prozess ist Aurora A maßgeblich beteiligt (Glover et al., 1995; Hannak et al., 2001; Liu und Ruderman, 2006; Roghi et al., 1998). Darüber hinaus wird Aurora A für die Bildung von astralen Mikrotubuli, die die Zentrosomen mit dem Zellkortex verbinden, benötigt (Giet et al., 2002).

Ferner spielt Aurora A eine Rolle im zeitlichen Ablauf der Mitose. Durch Aktivierung von ZyklinB/Cdk-1 (*Cyclin dependent kinase*) wird die Progression von der G2-Phase in die

# EINLEITUNG

---

Mitose kontrolliert (Hirota et al., 2003; Satinover et al., 2006). Die Aktivität von ZyklinB/Cdk1 wird durch Plk-1 (*Polo-like Kinase 1*) und Aurora A gesteuert. Aurora A phosphoryliert Plk-1 in der G2-Phase in deren Aktivierungsschleife und aktiviert diese Kinase dadurch (Macurek et al., 2008; Seki et al., 2008). Plk-1 phosphoryliert und aktiviert ihrerseits die Phosphatase Cdc25B, welche Cdk1 dephosphoryliert. Gleichzeitig steigert Plk-1 den Abbau der Kinase Wee1, welche Cdk1 inhibiert (van Vugt et al., 2004; van Vugt et al., 2005). Beide Vorgänge führen zur Aktivierung von ZyklinB/Cdk1. Außerdem kann Aurora A Cdc25B direkt phosphorylieren und dadurch aktivieren (Cazales et al., 2005). Auf diese Weise kann Aurora A den Eintritt in die Mitose beeinflussen und den Ablauf zeitlich steuern (Lindqvist et al., 2005).

## 1.1.4.2 Aurora B oder die äquatoriale Kinase

Aurora B nimmt an der Kondensation der Chromosomen teil, verhindert fehlerhafte Kinetochor-Mikrotubuli-Anheftungen und ist wichtig für die korrekte Anordnung der Chromosomen in der Äquatorial-Ebene (Lens und Medema, 2003). Damit hat diese Kinase eine wichtige Funktion im Spindel-Kontrollpunkt. Darüber hinaus ist Aurora B ein essentieller Regulator der Zytokinese, wo sie an der Regulation der Trennungsfurche zwischen den beiden neu gebildeten Zellkernen beteiligt ist (Zeitlin et al., 2001).

## 1.1.4.3 Aurora C

Aurora C konnte auf Protein-Ebene ausschließlich in Hoden-Gewebe nachgewiesen werden (Tang et al., 2006). Aurora C spielt eine wichtige Rolle während der Spermatogenese und ist wichtig für die männliche Fruchtbarkeit, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (Kimmins et al., 2007). Ob diese Isoform der Aurora Kinasen auch eine Rolle in somatischen Zellen spielt ist bislang noch unklar.

## 1.1.5 Aurora Kinasen und ihre Bedeutung für die Tumorigenese

Die Proteinmenge der Aurora Kinasen ist in diversen Tumoren erhöht. Die abnormale Expression der Aurora Kinasen in Tumorzellen führt zu Zentrosomen-Amplifikationen, Spindel-Missbildungen, fehlerhafter Chromosomen-Trennung und dadurch letztlich zu Aneuploidie (Bischoff et al., 1998; Meraldi et al., 2002; Zhou et al., 1998). Außerdem kann die fehlregulierte Expression oder Aktivität der Aurora Kinasen zum Verlust des Spindel-Kontrollpunkts führen und damit zu genetischer Instabilität beitragen (Anand et al., 2003).

# EINLEITUNG

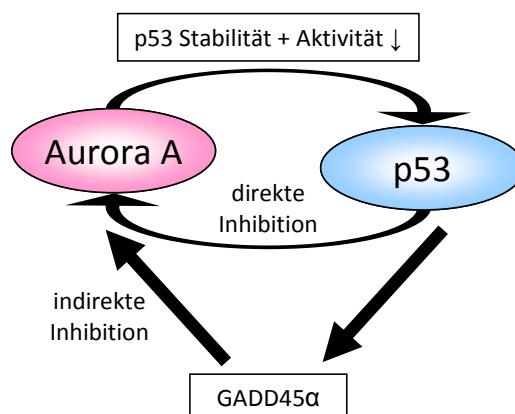
---

## **Aurora A**

Die in Tumorzellen erhöhte Proteinmenge von Aurora A konnte in primären Zellen aber keine Transformation auslösen, was dafür spricht, dass für die Tumorentstehung die Aktivierung weiterer Onkogene benötigt wird (Tatsuka et al., 2005; Zhou et al., 1998). Interessanterweise konnten für Aurora A auch Eigenschaften eines Tumorsuppressor Proteins nachgewiesen werden (Lee et al., 2006; Wang et al., 2006).

## **Aurora A und p53**

Es wurde ein Zusammenhang zwischen Aurora A und p53 beschrieben. Der Phänotyp, der durch eine Mengenzunahme von Aurora A zustande kommt ähnelt dem, der durch Verlust des p53 Proteins entsteht (Meraldi et al., 2002). Dabei korreliert die Mengenzunahme von Aurora A mit der p53 Funktion (Mao et al., 2007). So scheinen Aurora A und p53 wechselseitigen Einfluss auszuüben. Aurora A phosphoryliert das p53 Protein direkt an Serin 215 und 315 und beeinflusst dessen transkriptionelle Aktivität, sowie die Proteininstabilität (Katayama et al., 2004; Liu et al., 2004). Im Gegensatz dazu hemmt das p53 Protein die Aktivität von Aurora A, möglicherweise durch direkte Bindung an die Kinase-Domäne (Chen et al., 2002; Eysers und Maller, 2004).



**Abbildung 4: Wechselseitige Wirkung von Aurora A und p53**

Aurora A phosphoryliert das p53 Protein. Im Gegenzug beeinflusst p53 Aurora A, entweder direkt durch Bindung an die Kinase-Domäne, oder indirekt über die transkriptionelle Aktivierung von GADD45α, welches seinerseits mit Aurora A interagiert und die Aktivität der Kinase inhibiert (modifiziert nach Vader und Lens, 2008).

Zusätzlich kann p53 über sein Zielgen *Gadd45α* (*growth arrest und DNA damage*) in die Inhibition von Aurora A eingreifen. Das GADD45α Protein interagiert mit Aurora A und inhibiert dadurch die Kinase Aktivität (Shao et al., 2006). Das Auftreten von polyploiden humanen Zellen mit überzähligen Zentrosomen nach Mengenzunahme von Aurora A hängt vom p53 Status der Zelle ab (Meraldi et al., 2002). Zellen mit funktionellem p53 Protein

# EINLEITUNG

---

arretieren am G1-Kontrollpunkt oder werden der Apoptose zugeführt (Cross et al., 1995). Bei fehlendem p53 Protein können die Zellen nach Zytokinese-Defekten hingegen im Zellzyklus fortfahren. Diese Zellen treten in die S-Phase ein und verdoppeln ihren Zentrosomensatz, was schließlich zu supernumerischen Zentrosomen und in der Folge zu Aneuploidie führt (Borel et al., 2002; Meraldi et al., 2002).

## ***Aurora B***

Die Rolle von Aurora B bei der Krebsentstehung ist weniger detailliert untersucht. Es wurde zwar eine Zunahme der Aurora B Proteinmenge in bestimmten Tumoren beschrieben, aber es gibt keine direkten Nachweise, dass Aurora B tatsächlich zur Transformation von Zellen beitragen kann (Katayama et al., 2003).

# EINLEITUNG

---

## 1.2 Das Onkoprotein Mdm2

Das amplifizierte Gen für *mdm2* (*murine double minute protein 2*) wurde erstmals auf dem double minute Chromosom einer spontan transformierten Mauszell-Linie (BALB/c 3T3) identifiziert (Cahilly-Snyder et al., 1987). Das menschliche Homolog wurde später entdeckt und wird häufig als *hdm2* (*human double minute protein 2*) bezeichnet.

Das Mdm2 Protein ist ein wichtiger Regulator der Tumorsuppressor Proteine p53 und Retinoblastom Protein (Rb) und gilt damit als Onkogen (Sdek et al., 2005; Yap et al., 1999). Mdm2 zählt zu der Familie der RING-Finger (*really interesting new gene*) E3 Ligasen (Honda et al., 1997), dessen wichtigstes Substrat das p53 Protein darstellt (Oliner et al., 1992).

### 1.2.1 Struktur des Mdm2 Proteins

Im N-Terminus des Mdm2 Proteins liegt eine Bindestelle für p53. Neben dieser hoch affinen p53 Bindestelle ist eine weitere Interaktionsstelle im zentralen Bereich von Mdm2 vorhanden (Kulikov et al., 2006; Yu et al., 2006a).

Im zentralen Bereich befindet sich die sogenannte saure Domäne, die zu 40% aus den Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure besteht.

Des Weiteren besitzt Mdm2 eine RING-Finger Domäne am C-Terminus, welche die E3 Ligase Aktivität trägt (Dobbelstein und Roth, 1998; Freedman und Levine, 1998; Lohrum et al., 2000).

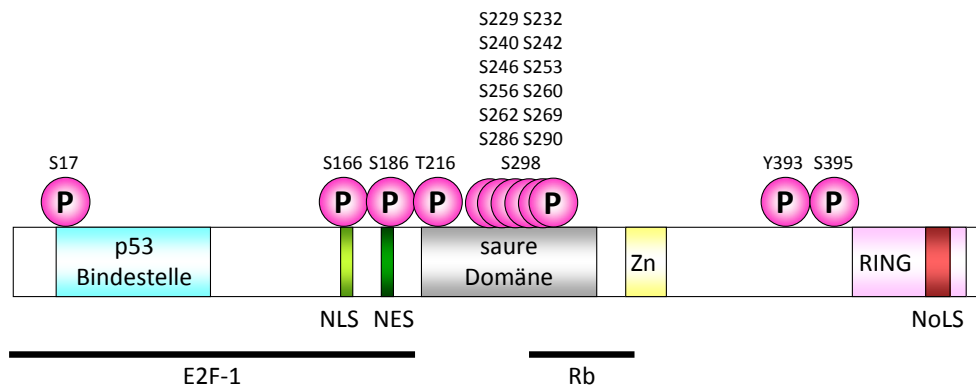
Für die Lokalisierung des Mdm2 Proteins sind die Sequenz-Motive NLS (*nuclear localization sequence*), NES (*nuclear export sequence*) und NoLS (*nucleolar localization sequence*) verantwortlich. Außerdem trägt Mdm2 einen „Zink-Finger“ der C4 Klasse. Bei Zink Finger Domänen handelt es sich normalerweise um DNA-bindende Motive, welche Funktion diesem Bereich im Mdm2 Protein zukommt, ist aber noch nicht endgültig geklärt (Chen et al., 1993; Honda et al., 1997; Momand et al., 2000; Oliner et al., 1993).

Mdm2 ist ein Phosphoprotein, welches vor allem im zentralen Bereich konstitutiv phosphoryliert ist (Blattner et al., 2002; Hay und Meek, 2000).

Seit seiner Identifizierung wurden eine Vielzahl von Protein-Protein Wechselwirkungen charakterisiert. In Abbildung 5 sind die Bindestellen für Rb, E2F-1 und p53 dargestellt.

# EINLEITUNG

---



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mdm2 Proteins mit Phosphorylierungs- und Protein-Interaktionsstellen**

Im N-terminalen Bereich befindet sich die hoch affine p53 Bindungs-Domäne (blau). Die zentrale Domäne (saure Domäne) zeichnet sich durch eine große Anzahl an Phosphorylierungs-Stellen aus (grau). Die E3 Ligase Aktivität befindet sich im C-Terminus des Mdm2 Proteins und schließt die RING Finger Domäne ein (lila). An der Lokalisierung von Mdm2 sind die Motive NLS (grün; nuclear localization sequence), NES (dunkelgrün; nuclear export sequence) und NoLS (rot; nucleolar localization sequence) beteiligt. Die Funktion des Zink Fingers (gelb) ist noch unklar (modifiziert nach Lozano und Montes de Oca Luna, 1998).

## 1.2.2 Das Mdm2 Protein - der negative Regulator von p53

Mdm2 und p53 sind durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus verbunden. Dabei ist *mdm2* ein Zielgen von p53, während das Mdm2 Protein p53 dem Abbau zuführt (Wu et al., 1993).

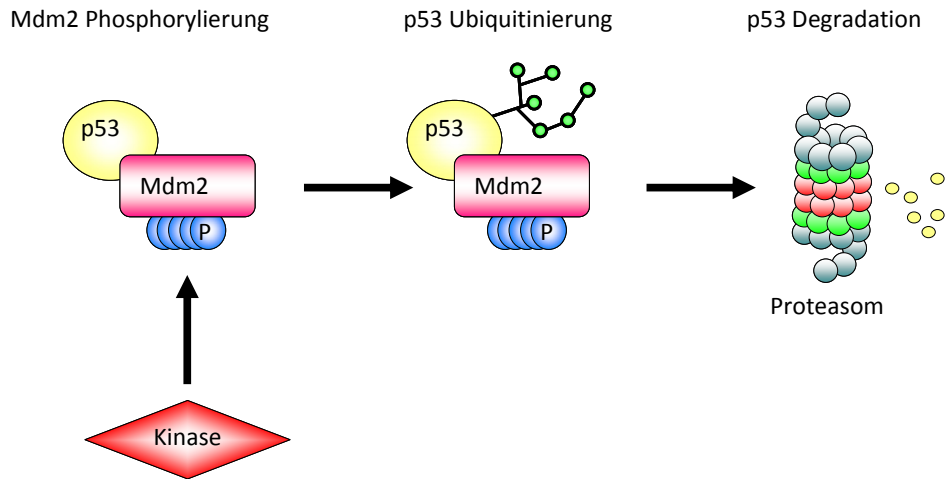
Die Bedeutung von Mdm2 für die Regulation des p53 Proteins wird besonders deutlich nach Deletion des *mdm2* Gens. Mäuse-Embryos ohne *mdm2* (*mdm2*<sup>-/-</sup>) sterben in der Embryonalentwicklung während der Gestation, aufgrund massiver p53-abhängiger Apoptose. Bei zusätzlicher Deletion von *p53* (*mdm2*<sup>-/-</sup>/*p53*<sup>-/-</sup>) waren die Tiere überlebensfähig (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995).

Bei der Regulation des p53 Proteins bindet Mdm2 an die N-terminale Transaktivierungs-Domäne von p53 und verhindert die Transkription von Zielgenen, indem es den Zugang von p53 zur Transkriptionsmaschinerie, sowie die Interaktion mit Kofaktoren blockiert (Bond et al., 2005; Kussie et al., 1996).

Außerdem steuert das Mdm2 Protein den Abbau von p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Mdm2 bindet dabei mit seiner RING Finger Domäne an E2 Ligasen, wie Ubch5/c (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und leitet somit die Ubiquitinierung seiner Substrate ein, die an den N-terminalen Bereich assoziiert sind (Sun, 2003).

# EINLEITUNG

Mdm2 scheint darüber hinaus aber auch den Transport des polyubiquitinierten p53 Proteins zum Ort seines Abbaus, nämlich dem 26S Proteasom, zu vermitteln (Kulikov et al., in Revision).



**Abbildung 6: Negative Regulation des p53 Proteins durch Mdm2**

Mdm2 bindet an das p53 Protein und maskiert so die Transaktivierungs-Domäne von p53. Des Weiteren ubiquitiniert Mdm2 p53 an dessen C-Terminus. Schließlich vermittelt das Mdm2 Protein den Transport von p53 zum Proteasom, wo letztlich dessen Abbau stattfindet. Wichtig für die korrekte Funktion von Mdm2 ist die Phosphorylierung im zentralen Bereich der E3 Ligase durch zelluläre Kinasen.

## 1.2.3 Die Regulation des Mdm2 Proteins und die Bedeutung seiner zentralen Domäne

Die Stabilisierung des p53 Proteins nach Stress-Einwirkung ist ein entscheidendes Ereignis beim Erhalt der genomischen Stabilität (Bottger et al., 1997). Die Regulation der Stabilisierung von p53 wurde lange Zeit auf die posttranslationalen Modifikationen von p53 selbst beschränkt (Ashcroft und Vousden, 1999; Meek, 1999). Tatsächlich weiß man heute, dass die Regulation von p53 hauptsächlich durch posttranslationale Modifikation seines negativen Regulators, dem Mdm2 Protein, erreicht wird (Meek und Knippschild, 2003).

Unter normalen Wachstumsbedingungen liegt Mdm2 als Phosphoprotein vor und kann so den Abbau des p53 Proteins vermitteln. Insbesondere die Serine 240, 242, 246, 253, 260 und 262 der zentralen Domäne sind konstitutiv phosphoryliert. Dabei können die einzelnen Serine unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivität des Mdm2 Proteins haben. Die Serine in der zentralen Region der sauren Domäne sind für den Abbau des p53 Proteins wichtiger als Serine im Randbereich der sauren Domäne (Blattner et al., 2002).

Nach ionisierender Strahlung sind diese Serine hypophosphoryliert (Blattner et al., 2002; Hay und Meek, 2000). Dies kann entweder durch Inaktivierung der entsprechenden Kinasen oder



# EINLEITUNG

---

durch Aktivierung von Phosphatasen bewirkt werden. Kinasen, die die Fähigkeit haben Mdm2 in seiner zentralen Domäne zu phosphorylieren haben daher eine entscheidende Bedeutung in der Regulation des Mdm2 Proteins und stellen einen Angriffspunkt für die Krebstherapie dar. Deshalb ist es enorm wichtig, Kinasen zu identifizieren, die zur Mdm2 Phosphorylierung beitragen. In der Vergangenheit wurden schon einige dieser Kinasen beschrieben, wie CK1 $\delta$ , (Casein Kinase 1 $\delta$ ; Winter et al., 2004), GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ; Kulikov et al., 2005) und CKII (Casein Kinase II; Allende-Vega et al., 2005).

Einen Hinweis, wie die Phosphorylierung der zentralen Domäne am Abbau des p53 Proteins beteiligt sein könnte, ist in Interaktionsstudien zu finden. Für die p53-Bindestelle im zentralen Bereich des Mdm2 Proteins konnte gezeigt werden, dass die Bindung von p53 durch Phosphorylierung der zentralen Domäne verstärkt wurde (Kulikov et al., 2006; Yu et al., 2006a).

## 1.2.4 Mdm2 und Krebs

In mehreren Zellkultur-Studien konnte gezeigt werden, dass die Mengenzunahme von Mdm2 zur Transformation oder zur Immortalisierung von Zellen führt (Finlay, 1993; Kondo et al., 1996). Des Weiteren war die Zunahme des Mdm2 Proteins im Brustgewebe transgener Mäuse für die Tumorentwicklung verantwortlich (Lundgren et al., 1997). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es sich bei *mdm2* um ein Onkogen handelt.

Das humane *mdm2* Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert, einer Region, die in Sarkomen oft amplifiziert ist. Tatsächlich ist das *mdm2* Gen in über 30% aller Sarkome amplifiziert (Oliner et al., 1992). Darüber hinaus wurde die Amplifikation des *mdm2* Gens aber auch in vielen anderen Tumorarten nachgewiesen (Momand und Zambetti, 1997).

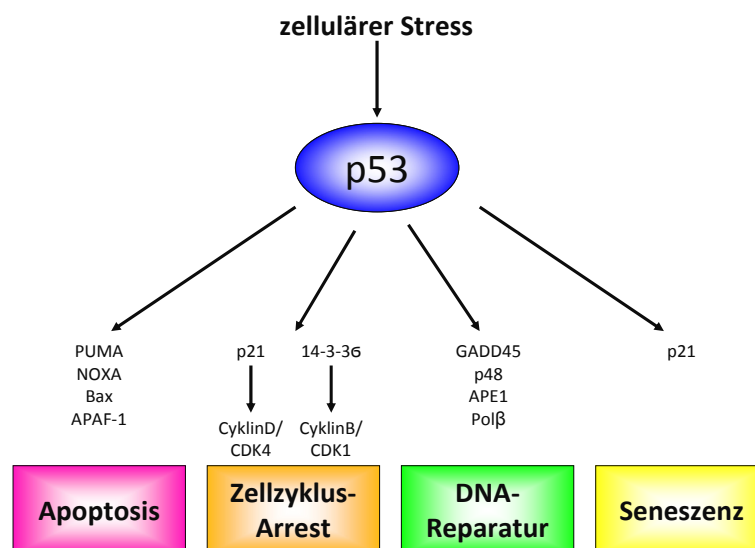
In der Krebstherapie wurden in der Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, um das p53 Protein in Tumorzellen zu aktivieren. Ein Zielprotein ist hierbei Mdm2. Aufgrund der Beobachtung, dass die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 essentiell für den effizienten Abbau von p53 ist, könnten in der Krebstherapie Kinase-Inhibitoren zum Einsatz kommen, die der Phosphorylierung des Mdm2 Proteins entgegenwirken. Die Folge davon wäre eine Mengenzunahme von p53 und damit die Expression seiner Zielgene, die in Tumorzellen Apoptose auslösen könnten.

# EINLEITUNG

## 1.3 Das Tumorsuppressor Protein p53

Das p53 Protein, erstmals 1979 beschrieben, wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet (DeLeo et al., 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Diese Bezeichnung verdankt es seiner Rolle im Erhalt der genomischen Integrität. Nach seiner Entdeckung wurde zunächst angenommen, dass p53 ein Onkogen ist. Zehn Jahre später realisierten die Forscher aber, dass sie mit einem mutierten *p53* Gen gearbeitet hatten und konnten dann anhand von genetischen und funktionellen Untersuchungen zeigen, dass es sich bei p53 um ein Tumorsuppressor Protein handelt (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989).

Menschen mit Keimbahn-Mutation des *p53* Gens leiden am Li-Fraumeni Syndrom und erkranken besonders früh an Krebs. Ferner kommt es häufig zur Entwicklung mehrerer Tumore (Fakharzadeh et al., 1991). Mutationen des *p53* Gens findet man in vielen Tumorarten, wobei die meisten dieser Mutationen die Funktion des p53 Proteins beeinträchtigen. In 50% aller Tumore ist das p53 Protein aufgrund von Mutationen inaktiviert. In anderen Tumoren ist es über die Bindung an virale oder andere Proteine, die p53 negativ regulieren, indirekt inaktiviert (Soussi und Beroud, 2001; Vogelstein et al., 2000).



**Abbildung 7: Aktivierung des p53 Proteins nach zellulärem Stress**

Nach Einwirkung von zellulärem Stress kommt es zur Stabilisierung des p53 Proteins. Das Tumorsuppressor Protein p53 aktiviert daraufhin die Transkription von Zielgenen, die zu Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur, Apoptose oder Seneszenz führen (modifiziert nach Hofseth et al., 2004).

Die Konzentration des p53 Proteins wird in der Zelle unter physiologischen Bedingungen auf niedrigem Niveau gehalten. Durch DNA-Schädigung und eine Reihe weiterer Stress-

# EINLEITUNG

---

Faktoren kommt es zur Zunahme der p53 Proteinmenge (siehe Abbildung 7). Der Anstieg des p53 Proteins nach zellulärem Stress löst in erster Linie Zellzyklus-Arrest aus. Damit erhält die Zelle die Möglichkeit den entstandenen Schaden zu reparieren und somit zu verhindern, dass Mutationen während der Zellteilung an die Tochtergeneration weiter gegeben werden. Falls der Schaden zu groß ist und die Zelle die DNA-Reparatur nicht mehr bewerkstelligen kann, leitet p53 den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, ein und entfernt so defekte Zellen aus dem Organismus. Außerdem kann Seneszenz auftreten, die sogenannte Zellalterung, bei der die Zellen den Zellzyklus verlassen und keine Zellteilung mehr statt findet.

## **1.3.1 Funktionen des Tumorsuppressor Proteins p53**

Bei p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der als Homotetramer an die Promotorbereiche seiner Zielgene bindet und deren Transkription aktiviert (Levine, 1997; Riley et al., 2008). Abhängig von Art und Dauer der Stress-Einwirkung reguliert p53 die Expression von Genen, deren Produkte an verschiedenen biologischen Aktivitäten beteiligt sind, wie Zellzyklus-Arrest (Kastan et al., 1992), DNA Reparatur (Helton und Chen, 2007), Apoptose (Murray-Zmijewski et al., 2008; Vousden, 2006) und Seneszenz (Garbe et al., 2007). Neben diesen zentralen Mechanismen, die wichtig sind für den Erhalt der genomischen Stabilität kann p53 aber auch in Vorgänge wie Energie Metabolismus (Green und Chipuk, 2006; Matoba et al., 2006), Angiogenese (Menendez et al., 2006; Pal et al., 2001; Teodoro et al., 2006; Zhang et al., 2000), Immunreaktion (Taura et al., 2008), Zelldifferenzierung, Migration von Zellen (Molchadsky et al., 2008; Qin et al., 2009; Roger et al., 2006; Singh et al., 2007; Tedeschi und Di Giovanni, 2009) und Zell-Zell Kommunikation (Yu et al., 2006b) eingreifen. Die Fähigkeit des p53 Proteins diese Mechanismen zu koordinieren macht es zu einem Schlüsselprotein der zellulären Stressantwort.

# EINLEITUNG

---

## 1.4 Das Tumorsuppressor Protein Rb

Das Retinoblastom Protein (Rb) ist nach seiner Beteiligung am Retinoblastom, einem frühkindlichen Augentumor benannt. Das entsprechende Gen wurde schon 1971 als Ursache postuliert, konnte aber erst 15 Jahre später kloniert werden (Weinberg, 1995). Das Rb Protein ist das erste Tumorsuppressor Protein, das beschrieben wurde (Friend et al., 1986; Fung et al., 1987; Lee et al., 1987). Später konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Rb Funktion an über 70% aller Neoplasien beteiligt ist (Bartek et al., 1997; Cobrinik, 2005; Nevins, 2001; Palmero und Peters, 1996; Sherr, 2000).

Das Retinoblastom Protein gehört zu der Familie der „Pocket“-Proteine, die sich durch eine konservierte Pocket-Domäne auszeichnen. Diese Domäne vermittelt die Wechselwirkung mit zellulären oder viralen Proteinen (Dyson et al., 1989; Felsani et al., 2006; Ludlow et al., 1989). Die Familie der Pocket-Proteine besitzt drei Mitglieder, Rb, p107 und p130.

Das Rb Gen ist auf Chromosom 13q14.2 lokalisiert und kodiert für ein Protein, welches aus 929 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa besitzt. Das Rb Protein ist ein Kernprotein, das die Transkription von Genen unterdrückt, die für den G1/S Übergang benötigt werden. Damit kann das Rb Protein den Zellzyklus in der G1-Phase arretieren. Rb wird daher auch häufig als negativer Regulator der Zellproliferation bezeichnet (Giacinti und Giordano, 2006; Weinberg, 1995).

### 1.4.1 Funktionen des Rb Proteins

Das Rb Protein ist an vielen Prozessen beteiligt, wie der zellulären Reaktion auf DNA-Schädigung, DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Daneben kann Rb aber auch an der Differenzierung (Lipinski und Jacks, 1999) und der Seneszenz teilnehmen (Hahn und Weinberg, 2002) oder anti-apoptotisch wirken (Chau und Wang, 2003; Hickman et al., 2002). So inhibiert Rb zum Beispiel die Expression von pro-apoptotischen Proteinen, wie Apaf-1, Caspase-3 und Caspase-7 (Moroni et al., 2001; Nahle et al., 2002).

Die Schlüsselrolle des Rb Proteins liegt allerdings in der Regulation des Zellzyklus. Das Rb Protein bindet an den Transkriptionsfaktor E2F, welcher die Expression zahlreicher Gene reguliert, die für den Übergang von der G1 in die S-Phase notwendig sind (Nevins, 1998; Weinberg, 1995).

Durch die Assoziation von Rb an die E2F Proteine wird dieser Transkriptionsfaktor inaktiviert (Hamel et al., 1992; Weintraub et al., 1995). Dabei kann das Rb Protein direkt an die Transaktivierungs-Domäne der E2F Proteine binden (Helin et al., 1993). Zusätzlich bindet

# EINLEITUNG

---

das Rb Protein im Komplex mit den E2F Proteinen an Promotoren von Zielgenen und hemmt hier aktiv die Transkription, in dem es Ko-Repressoren an diese Promotorbereiche rekrutiert (Adnane et al., 1995; Stevaux und Dyson, 2002; Weintraub et al., 1995).

Ein wichtiger Mechanismus um die Transkription eines Gens generell zu regulieren ist die Modifikation der Chromatinstruktur. Diese Veränderung wird zum Beispiel durch die Azetylierung von Histonen erreicht (Felsenfeld, 1992; Parra und Wyrick, 2007). Viele Transkriptionsfaktoren assoziieren mit Histon-Azetyltransferasen, welche dann als Ko-Aktivatoren wirken können. Im Gegensatz dazu sind Histon Deazetylasen (HDAC) häufig mit reprimierenden Proteinen assoziiert. Durch die Deazetylierung von Histonen kommt es zur dichteren Packung der DNA und damit zur Hemmung der Transkription (Pazin und Kadonaga, 1997; Siddiqui et al., 2003). Auch für das Rb Protein wurde eine Assoziation mit HDACs gezeigt (Brehm et al., 1998), die zur Repression der Promotorbereiche von E2F Zielgenen beiträgt (Luo et al., 1998). Zusätzlich ist das Rb Protein für die Rekrutierung weiterer chromatinmodulierenden Faktoren, wie den SWI/SNF Komplex, die Polycomb Proteine und Methyltransferasen, verantwortlich (Dahiya et al., 2001; Nielsen et al., 2001; Vandel et al., 2001).

Das Rb Protein kann allerdings auch als Ko-Aktivator bei der Transkription von Genen wirken, vor allem bei Genen, die für die Differenzierung notwendig sind (Lipinski und Jacks, 1999; Thomas et al., 2001).

Die vereinfachte Darstellung, dass Rb alleine am G1-Kontrollpunkt beteiligt ist, wurde durch den Nachweis widerlegt, dass E2F Proteine auch die Expression von Genen mit mitotischer Funktion regulieren können. Dazu zählen zum Beispiel *ZyklinB*, *BubR1*, *Plk-1*, *Cdc20* und *Mad2* (Ishida et al., 2001; Markey et al., 2002; Vernell et al., 2003). Außerdem wird *RanBMP*, ein Gen das in der Zentrosomen-Duplikation eine Rolle spielt, durch E2F reguliert (Muller et al., 2001). Auch Gene wie *Smc2* und *Smc4*, die an der Chromosomen-Kondensation beteiligt sind, *Bub3* und *Mad2*, die eine Funktionen beim Spindel-Checkpoint haben und die *Centromer* und *Securin* Gene, die für die Chromosomen-Segregation wichtig sind, besitzen E2F Bindestellen in ihren Promotoren (Ishida et al., 2001; Ren et al., 2002). Des Weiteren ist das Rb Protein am G2/M Kontrollpunkt beteiligt, indem es die Transkription von *Cdk1* und *ZyklinB* reprimiert (Flatt et al., 2000; Jackson et al., 2005).

# EINLEITUNG

---

## 1.4.2 Der Transkriptionsfaktor E2F

E2F ist ein Heterodimer aus einer E2F-Untereinheit und einer DP-Untereinheit. Das menschliche Genom kodiert für mindestens sechs E2F Proteine, die anhand ihrer Funktionen und Interaktionen mit unterschiedlichen Pocket-Proteinen in drei Untergruppen eingeteilt werden können. Jede E2F Untereinheit trägt eine DNA-bindende und eine Dimerisierungs-Domäne. E2F-1, -2, und -3 binden über die N-terminale Region an ZyklinA/Cdk2. Wie alle Mitglieder der E2F Familie besitzen sie eine C-terminale Transaktivierungs-Domäne (TAD), mit welcher die Wechselwirkung mit den Proteinen Rb, p107 und p130 statt findet. Das Rb Protein bindet an E2F-1, -2, und -3 und reguliert die Expression der zugehörigen Zielgene. E2F-4 und -5 können mit allen drei Mitgliedern der Pocket-Protein Familie interagieren, zeigen aber eine geringe Transkriptions-Aktivität (Trimarchi und Lees, 2002). Die Expression der E2F-6 gesteuerten Gene wird durch die Interaktion mit Proteinen der Polycomb Familie reguliert (Trimarchi et al., 2001).

## 1.4.3 Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des Rb Proteins

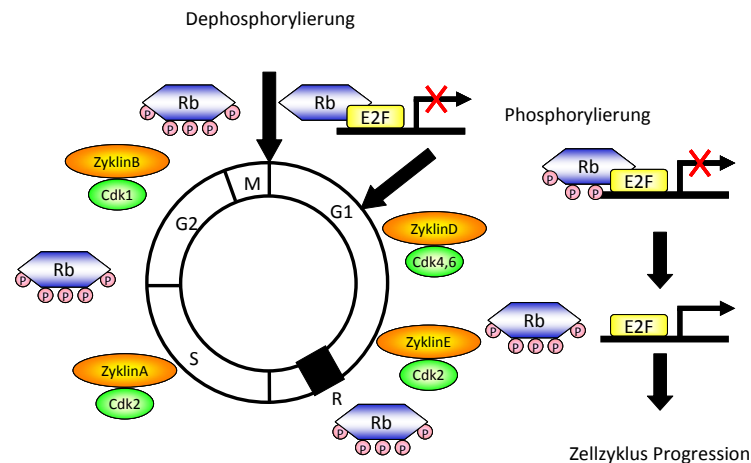
Das Rb Protein wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus durch Phosphorylierung reguliert (Rubin et al., 2001). In ruhenden Zellen und in Zellen die sich in der frühen G1-Phase des Zellzyklus befinden ist das Rb Protein hypophosphoryliert. In diesem Zustand ist Rb aktiv, bindet an E2F Proteine und reprimiert die Transkription ihrer Zielgene (Buchkovich et al., 1989; Knudsen und Wang, 1996; Knudsen und Wang, 1997).

Die beiden Kinase-Komplexe der G1-Phase ZyklinD/Cdk4,6 und ZyklinE/Cdk2 phosphorylieren das Rb Protein als Antwort auf Signale aus der Umgebung (Deshpande et al., 2005; Reed, 1997; Sherr und Roberts, 1999). Mitogene Signale aktivieren die ZyklinD/Cdk4,6 und ZyklinE/Cdk2 Komplexe, die dann das Rb Protein phosphorylieren (Lundberg und Weinberg, 1998). Das phosphorylierte Rb Protein ist inaktiv, da es nicht mehr an die E2F Proteine binden kann. Dadurch entfällt die Repression der Transkription und es kommt zur Expression der E2F Zielgene und zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Mittnacht, 1998; Sherr, 1996; Wong und Weber, 2007). Das Rb Protein ist während S, G2 und M-Phase des Zellzyklus phosphoryliert und damit inaktiv (Mittnacht, 1998). In der S- und G2-Phase wird das Rb Protein durch ZyklinA/Cdk2 und während der Mitose durch ZyklinB/Cdk1 phosphoryliert (Lin und Wang, 1992). Am Ende der Mitose wird das Rb Protein durch Protein-Phosphatasen dephosphoryliert und somit wieder aktiviert (Ludlow et al., 1993; Nelson et al., 1997; Tamrakar et al., 2000).

Wachstumsfaktoren können die Expression von ZyklinD induzieren, was seinerseits zur

# EINLEITUNG

Phosphorylierung und Aktivierung von Rb führt. Das zytostatisch wirkende TGF $\beta$  hingegen kann Zellen im Zyklus arretiert, indem es durch vermehrte Expression von Cdk Inhibitoren wie p21 und p27 die Cdk-vermittelte Phosphorylierung des Rb Proteins verhindert (Sherr und Roberts, 1999).



**Abbildung 8: Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des Rb Proteins**

Am Ende der Mitose wird das Rb Protein durch Phosphatasen dephosphoryliert und somit aktiviert. Dadurch kommt es zur Bindung der E2F Transkriptionsfaktoren und damit zur Repression der E2F Zielgene. Im Verlauf des Zellzyklus wird Rb zunehmend phosphoryliert. Dabei wird Rb in der G1-Phase durch ZyklinD/Cdk4,6, ZyklinE/Cdk2, während der S-Phase durch ZyklinA/Cdk2 und während der Mitose durch ZyklinB/Cdk1 phosphoryliert. Durch Phosphorylierung wird das Rb Protein inaktiviert und kann nicht mehr an E2F Proteine binden. Damit kommt es zur Expression der Zielgene der E2F Transkriptionsfaktoren, welche das Fortschreiten des Zellzyklus ermöglichen.

## 1.4.4 Fehlregulation des Rb Proteins und die Bedeutung für die Tumorigenese

Das Tumorsuppressor Protein Rb ist in den meisten Neoplasien inaktiviert. Dabei kann eine Mutation oder Deletion im *rb* Gen vorliegen, wie dies beim Retinoblastom, beim Osteosarkom oder beim kleinzelligen Lungenkrebs der Fall ist. Häufiger kommt es aber zur Fehlregulation durch Störungen der Expression oder durch angestiegene Aktivität übergeordneter Regulatoren (Horowitz et al., 1990; Weinberg, 1995).

Eine der am häufigsten auftretenden Fehlregulationen des Rb Proteins ist auf Mutationen oder Deletionen des *p16<sup>INK4a</sup>* Gens zurückzuführen (Sherr und McCormick, 2002). Das *p16<sup>INK4a</sup>* Protein ist ein endogener Inhibitor von ZyklinD/Cdk4 und kann das Rb Protein in einem hypophosphorylierten Zustand halten und damit zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase beitragen (Shapiro et al., 1995; Sherr, 1996).

Ferner führt die Amplifikation der *Cdk4*, *Cdk6* und *ZyklinD* Gene zur Fehlregulation des Rb

## **EINLEITUNG**

---

Proteins (Khatib et al., 1993; Reissmann et al., 1999). Aber

Aber auch Onkoproteine wie das humane Papillom Virus (HPV) E7 Protein führt zur Fehlregulation des Rb Proteins, indem es an das Tumorsuppressor Protein bindet und so die Assoziation mit E2F verhindert (Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989).



# EINLEITUNG

---

## 1.5 Zielsetzung

Mdm2 fungiert als negativer Regulator von p53. Es wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 wichtig ist für den Abbau von p53. In Vorversuchen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Aurora A die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins *in vitro* phosphorylieren kann.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung der Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A. Dabei sollte zunächst die Phosphorylierungs-Stelle kartiert und anschließend die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierung für die Regulation von Substraten und Interaktionspartnern des Mdm2 Proteins untersucht werden.

Die zentrale Domäne von Mdm2 ist nach ionisierender Strahlung hypophosphoryliert. Daher sollte des Weiteren untersucht werden, ob Aurora A durch ionisierende Strahlung reguliert wird.



# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe verwendet. Für wässrige Lösungen wurde Wasser verwendet, das über ein Milli-Q-Reinstwasser System (Millipore) entsalzt wurde.

<b>Chemikalien</b>	<b>Vertrieb</b>
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (10 mCi/mL, 5 000 Ci/mmol)	Hartmann Analytik, Braunschweig
Acrylamid Rotiphorese® 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Otto Nordwald, Hamburg
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Rinderserum-Albumin)	PAA, Pasching (Österreich)
Coelenterazin, nativ	Biosynth, Staad (Schweiz)
Coomassie Brilliant Blau G250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Gibco™ Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Buchs (Schweiz)
DNP-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP (desoxy-Nukleotidtriphosphat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Draq5™	Biostatus Ltd., Leicestershire (UK)
DTT (Dithiotreitol)	Roche, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe

## MATERIAL UND METHODEN

---

EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entwickler und Fixierer-Lösungen	Kodak, Stuttgart
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (Fötales Kälber Serum)	PAA, Pasching (Österreich)
GlyGly	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Guanidium Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Suprapur 30% (Wasserstoffperoxid)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Hydromount	National Diagnostics, Atlanta (USA)
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Peqlab, Erlangen
Isobutylsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalium-Azetat	Roth, Karlsruhe
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Kumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Luminol (2-Aminophthalhydrazid)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Luziferase Lysispuffer (passive Lysisbuffer 5X)	Promega, Mannheim
Luziferin	Biosynth, Staad (Schweiz)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Azetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

---

# MATERIAL UND METHODEN

Natrium-Dihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n-Butanol	Roth, Karlsruhe
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40 (Nonident-P40, Igepal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (Dulbecco´s Phophat buffered saline)	Gibco™ Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Gibco™ Invitrogen, Karlsruhe
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PhosStop (Phosphatase-Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pyridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rubidiumchlorid (RbCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tinte	Pelikan, Hannover
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstad
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Biorad, München
Ziegenserum	DakoCytomation, Glsotrup (Dänemark)
Zykloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Glyzerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

## 2.1.2 Zell-Linien

**U2OS:** humane, epitheliale Osteosarkomzell-Linie (ATCC-No. HTB-96TM)

**H1299:** humane, epitheliale Lungenkarzinomzell-Linie (ATCC-No. CRL-5803TM)  
Diese Zell-Linie trägt eine Deletion des p53 Gens und zeigt daher keine p53 Expression.

# MATERIAL UND METHODEN

---

**Hek293T:** humane, epitheliale Nierenzell-Linie (ATCC-No. CRL-11268TM)  
Im Genom befindet sich eine Insertion des SV40 T-Antigens.

## 2.1.3 Bakterien

**E. coli BL21:** Genotyp: F<sup>-</sup>, ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm  
(Amersham) GE Healthcare, Freiburg

**E. coli DH5α:** Genotyp: F<sup>-</sup>, ϕ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1

**E. coli XL-1 Blue:** Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]

## 2.1.4 Plasmide

### Vektoren

**pcDNA3.1** eukaryotischer Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor  
Invitrogen, Karlsruhe

**pGEX4T-2** prokaryotischer Expressionsvektor mit einem Tac-Promotor, enthält die cDNA des Gens, das für die Glutathion-S-Transferase kodiert  
(Pharmacia) GE Healthcare, Freiburg

Die gekennzeichneten (\*) Plasmide waren schon in der Sammlung des Labors vorhanden und wurden frisch präpariert, bevor die DNA in den entsprechenden Experimenten verwendet wurde. Die übrigen Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt.

### **Plasmide zur Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien**

\*pGEX4T-2 Hdm2

\*pGEX4T-2 Hdm2; N-Terminus (1-206)

\*pGEX4T-2 Hdm2; AD (220-300)

\*pGEX4T-2 Hdm2; C-Terminus (296-491)

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305)

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-260)

# MATERIAL UND METHODEN

---

pGEX4T-2 Hdm2; AD (221-305)

pGEX4T-2 Hdm2; AD (230-305)

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305)  $\Delta$ 236-254

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305) S229A;S232A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305) S229A;S232A;S240A;S242A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305) S229A;S232A;S240A;S242A;S246A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305) S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305) S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A;S260A;S262A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305)

S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A;S260A;S262A;S269A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305)

S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A;S260A;S262A;S269A;S286A; S290A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (190-305)

S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A;S260A;S262A;S269A;S286A; S290A;S298A

pGEX4T-2 Hdm2; AD (221-305)

S229A;S232A;S240A;S242A;S246A;S253A;S256A;S260A;S262A;S269A;S286A; S290A;S298A

\*pGEX4T-2 Mdm2

\*pGEX4T-2 Mdm2; AD (200-300)

pGEX4T-2 Rb

## ***Plasmide zur Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen***

pcDNA3.1 V5-Aurora A

pcDNA3.1 V5-Aurora A; K162R

\*pcDNA3.1 Mdm2

\*pcDNA3.1 Mdm2;  $\Delta$  200-299

\*pcDNA3.1 Mdm2;  $\Delta$  200-235

\*pcDNA3.1 Mdm2;  $\Delta$  225-259

\*pcDNA3.1 Mdm2;  $\Delta$  260-299

\*pcDNA3.1 Mdm2;  $\Delta$  300-399

\*pDwm659 6X-N-myc-Mdm2

\*pcDNA3.1 p53

\*pcDNA3.1 N-His<sub>6</sub>-Ubiquitin

\*pcDNA3.1 Rb

\*pcDNA3.1 E2F-1

# MATERIAL UND METHODEN

---

## *Firefly-Luziferase Reporter-Konstrukte*

### **\*pGL2-PG13-TK/luc**

Dieses Reporterkonstrukt besitzt einen künstlichen Promotor mit 13 Wiederholungen der p53 Bindestellen am 5' Ende des Luziferase Gens. Dieses Reporterkonstrukt diente als positive Kontrolle.

### **\*pGL2-MG15-TK/luc**

Dieses Reporterkonstrukt besitzt einen künstlichen Promotor mit 15 Wiederholungen einer mutierten p53 Bindestelle am 5' Ende des Luziferase Gens. Dieses Reporterkonstrukt diente als negative Kontrolle.

### **\*pGL2-Mdm2-TK/luc**

Dieses Reporterkonstrukt besitzt den Mdm2 Promotor am 5' Ende des Luziferase Gens.

### **\*pGL2-p21-TK/luc**

Dieses Reporterkonstrukt besitzt den p21 Promotor am 5' Ende des Luziferase Gens.

## *Renilla-Luziferase Reporter-Konstrukte*

### **\*pRL-TK/ren Kontroll Vektor**

Der Promotor in diesem Konstrukt ist konstitutiv aktiv und steuert die Expression der Luziferase. Dieses Reporterkonstrukt diente als interne Kontrolle.

## **2.1.5 Oligonukleotide**

Alle Nukleotide wurden lyophilisiert geliefert und in den entsprechenden Puffern rekonstituiert. Primer wurden von Metabion International (Planegg-Martinsried), siRNA von Eurofins MWG (Ebersberg) oder Dharmacon Inc. (Lafayette, USA) bezogen.

### **Primer**

#### ***Primer für die Klonierung von Fragmenten der zentralen Domäne von Hdm2 in den pGEX4T-2 Vektor***

Hdm2 aa190-305\_fw      5'-TCCCCAGGAATTCCCTCCCTTTCCTTTGATGAAAGCCTG-3'

Hdm2 aa190-305\_rev    5'-GGGCGGCCGCTAGCATTTC AATAGTCAGCTAAGGAAATTC-3'



# MATERIAL UND METHODEN

---

Hdm2 aa190-260\_fw 5'-TCCCCAGGAATTCCCTCCCTTTCCTTTGATGAAAGCCTG-3'  
Hdm2 aa190-260\_rev 5'-CGATGCGGCCGCTCGGCTATAATCTTCTGAGTCGAGAGA-3'

Hdm2 aa230-305\_fw 5'-TCCCCAGGAATTCCCGAACATTCAGGTGATTGGTTGGAT-3'  
Hdm2 aa230-305\_rev 5'-GGGCGGCCGCTAGCATTTCGAATAGTCAGCTAAGGAAATTC-3'

Hdm2 aa221-305\_fw 5'-CCAGGAATCCCAATCCGGATCTTGATGCTGG-3'  
Hdm2 aa221-305\_rev 5'-GATGCGGCCGCTCGCTAGCATTTCGAATAGTCAGCTAA-3'

## ***Primer für die Klonierung von Aurora A mit N-terminalem V5-Tag in den pcDNA3.1 Vektor***

Aurora A\_fw 5'-GACGCCGGGATCCTGAAAATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCT  
CTCCTCGGTCTCGATTCTACGGACCGATCTAAAGAAAAGT-3'  
Aurora A\_rev 5'-GATACGGGCGGCCGCTAAGACTGTTTGCTAGCTG-3'

Für die Klonierung wurde Aurora A aus einer humanen cDNA Bibliothek (Invitrogen, Karlsruhe) mittels PCR amplifiziert.

## ***Primer für die Klonierung von Rb in den pGEX4T-2 Vektor***

Rb\_fw 5'-CGCGTGGATCCCAATGCCGCCAAAACC-3'  
Rb\_rev 5'-GATGCGGCCGCTCGTCATTCTCTTCCTTGTTGAGG-3'

## ***Primer für ortsggerichtete Mutationen***

### Hdm2 Deletionsmutanten

Hdm2 Δ236-254\_fw 5'-GAACATTCAGGTGATTGGGACTCAGAAGATTATAGCCTTAGT-3'  
Hdm2 Δ236-254\_rev 5'-ACTAAGGCTATAATCTTCTGAGTCCCAATCACCTGAATGTTC-3'

### Hdm2 Punktmutanten

S229A/S232A Hdm2\_fw 5'-GGATCTTGATGCTGGTGTAGCTGAACATGCAGGTGATTGGTTG-3'  
S229A/S232A Hdm2\_rev 5'-CCAACCAATCACCTGCATGTTTCAGCTACACCAGCATCAAGATC-3'

S240A/S242A Hdm2\_fw 5'-GTTGGATCAGGATGCAGTTGCAGATCAGTTTAGTG-3'  
S240A/S242A Hdm2\_rev 5'-CACTAAACTGATCTGCAACTGCATCCTGATCCAAC-3'

S246A Hdm2\_fw 5'-GGATGCAGTTGCAGATCAGTTTGCTGTAGAATTTGAAGTTGAAT-3'  
S246A Hdm2\_rev 5'-GATTCAACTTCAAATTCTACAGCAAAGTATCTGCAACTGCATC-3'

# MATERIAL UND METHODEN

---

S253A/S256A Hdm2\_fw 5'-GAATTTGAAGTTGAAGCTCTCGACGCAGAAGATTAT-3'

S253A/S256A Hdm2\_rev 5'-ATAATCTTCTGCGTCGAGAGCTTCAACTTCAAATTC-3'

S260A/S262A Hdm2\_fw 5'-CTCGACGCAGAAGATTATGCCCTTGCTGAAGAAGGACAAGAAC-3'

S260A/S262A Hdm2\_rev 5'-GAGTTCTTGTCTTCTTCAGCAAGGGCATAATCTTCTGCGTCGA-3'

S269A Hdm2\_fw 5'-GAAGAAGGACAAGAAGCTCGCAGATGAAGATGATGAGGTATAT-3'

S269A Hdm2\_rev 5'-GATATACCTCATCATCTTCATCTGCGAGGTCTTGTCTTCTT-3'

S286A/S290A Hdm2\_fw 5'-CAGGCAGGGGAGGCTGATACAGATGCATTTGAAGAAGATCC-3'

S286A/S290A Hdm2\_rev 5'-GGATCTTCTTCAAATGCATCTGTATCAGCCTCCCCTGCCTG-3'

S298A Hdm2\_fw 5'-GAAGAAGATCCTGAAATTGCCTTAGCTGACTATTGGAAATGCTA-3'

S298A Hdm2\_rev 5'-CTAGCATTTCCAATAGTCAGCTAAGGCAATTCAGGATCTTCTT-3'

## Aurora A Punktmutante

K162R Aurora A\_fw 5'-GCAAGTTTATTCTGGCTCTTAGAGTGTTATTTAAAGCTCA  
GCTGG-3'

K162R Aurora A\_rev 5'-CCAGCTGAGCTTTAAATAACACTCTAAGAGCCAGAATAAA  
CTTGC-3'

## **siRNA**

Kontroll siRNA 5'-AACCCCUUUUAAAAGGGGCC-3' Eurofins MWG GmbH

Aurora A siRNA 5'-AUGCCCUUGUCUACUGUCAUU-3' Dharmacon Inc.

## **2.1.6 Proteine**

His-Hdm2 in High5 Zellen exprimiertes humanes Hdm2 Protein mit His6-Tag

FLAG-Hdm2 in High5 Zellen exprimiertes humanes Hdm2 Protein mit FLAG-Tag

Die Proteine wurden von M. Gauß zur Verfügung gestellt.

## **2.1.7 Kits und Transfektions-Reagenzien**

Easy Pure<sup>®</sup> DNA Purification Kit

Biozym, Oldendorf

Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Maxi Purification Kit

Qiagen, Hilden

QuikChange<sup>®</sup> II site-directed mutagenesis Kit

Stratagene, La Jolla (USA)

BCA Protein Assay Kit

Pierce, Thermo Scientific, La Jolla (USA)

jetPei<sup>™</sup>

Polyplus, Illkirch (Frankreich)

Lipofectamin<sup>™</sup> 2000

Invitrogen, Karlsruhe

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.1.8 Enzyme

$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aurora A, aktiv (rekombinant, human, His <sub>6</sub> -tagged)	Upstate/Millipore, Zug (Schweiz)
Aurora B (rekombinant, human, His-tagged)	Invitrogen, Karlsruhe
Aurora C (rekombinant, human, GST-tagged)	Invitrogen, Karlsruhe
Benzonase	Merck, Darmstadt
Trypsin	Difco, Lawrence (USA)
Long PCR Enzym Mix und 10X Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
Pfu-Polymerase und 5X Puffer	Promega, Mannheim
Pfu-Polymerase und 10X Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase und 5X Puffer	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase und 10X Puffer	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase und 10X Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot

## **Restriktionsenzyme**

BamHI	Promega, Mannheim
EcoRI	Promega, Mannheim
NotI	Promega, Mannheim
Puffer D 10X	Promega, Mannheim
BamHI	Fermentas, St.Leon-Rot
NotI	Fermentas, St.Leon-Rot
BamHI 10X Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
Fast Digest <sup>®</sup> EcoRI	Fermentas, St.Leon-Rot
Fast Digest <sup>®</sup> NotI	Fermentas, St.Leon-Rot
Fast Digest <sup>®</sup> 10X Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot

## 2.1.9 Bindungs-Matrices

Protein A Sepharose	Pierce, Thermo Scientific, La Jolla (USA)
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg
Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose	Qiagen, Hilden

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.1.10 Größenstandards

Gene Ruler™ 1 kb DNA Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

Page Ruler™ Protein Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.1.11 Antikörper

### *primäre Antikörper*

Aurora A	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Aurora A/AIK	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston (USA)
E2F-1 (C-20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
GST	Ziege, polyklonal	Rockland, Gilbertsville (USA)
Mdm2 (2A10)	Maus, monoklonal	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Mdm2 (4B2)	Maus, monoklonal	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Mdm2 (N20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Mdm2 (SMP14)	Maus, monoklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
myc (9E10)	Maus, monoklonal	Oncogene, Bad Soden
p53 (DO-1)	Maus, monoklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
PCNA (PC10)	Maus, monoklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Phospho-Rb (Ser780)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Boston (USA)
Rb (IF8)	Maus, monoklonal	Oncogene, Bad Soden
V5	Maus, monoklonal	Serotec, Martinsried
α-Tubulin (TU-02)	Maus, monoklonal	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)

### *sekundäre Antikörper*

anti-Maus HRP konjugiert	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
anti-Kaninchen HRP konjugiert	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
anti-Ziege HRP konjugiert	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
Anti-Kaninchen Alexa®546 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus Alexa®488 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.1.12 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Vertrieb</b>
24 Lochplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen
96 Loch-Mikrotiterplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Dünnschicht-Chromatografie Platte (Cellulose)	Merck, Darmstadt
Eppendorf Reaktionsröhrchen (1.5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Reaktionsröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Filterpapier	Whatman, Opfikon (Schweiz)
Gewebekulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio One, Frickenhausen
Gewebekulturschalen (Ø 60 mm, 100 mm)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Kanülen (21G, 27G)	B. Braun, Melsungen
Kryo-Röhrchen	Corning, Corning (USA)
Lumineszenz Messplatte	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Objekträger Super Frost Plus	Roth, Karlsruhe
PCR Reaktionsröhrchen	Corning, Corning (USA)
Pipettenspitzen (1 µL)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (20 µL, 200 µL 1 000 µL)	Corning, Corning (USA)
PVDF-Membran (Immobilon P <sup>®</sup> )	Millipore, Zug (Schweiz)
Röntgenfilm Fuji Medica X-Ray Film	Fujifilm, Düsseldorf
Röntgenfilm Hyperfilm ECL Amersham	GE Healthcare, Freiburg
Schlauchfolie	Audion Elektro, Kleve
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritzen (5 mL, 10 mL)	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter Steritop (0.22 µm)	Millipore, Zug (Schweiz)
Szintillations-Folie Fas Cal	Avery Denison, Eching

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.1.13 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Vertrieb
Bakterienschüttler	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Corex <sup>®</sup> Zentrifugenröhrchen	Krackeler Scientific, Albany (USA)
DNA-Gel Apparatur mit Zubehör	Biorad, München
Drehrad für Eppendorf Reaktionsröhrchen	Kisker, Steinfurt
Dünnschicht-Chromatografie Kammer	Desaga, Heidelberg
ELISA Spektrophotometer	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Entwickler Kodak X-omat 2000	Kodak, Stuttgart
Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Flachbett-Elektrophorese Apparatur	Lamag, Berlin
Folienschweißgerät	Audion Elektro, Kleve
Geltrockner	Biorad, München
Glaspipetten (5 mL, 10 mL, 20 mL)	Brand, Wertheim
Glaswaren Schott Duran <sup>®</sup>	Schott, Mainz
Hamilton Spritze	Hamilton, Martinsried
Homogenisator (Plastikstab)	Roth, Karlsruhe
Inkubator für Agarplatten	Heraeus, Fellbach
Inkubator für die Zellkultur	Thermo Scientific, La Jolla (USA)
Konfokalmikroskop Leica LSM 510	Leica, Wetzlar
Kryo-Einfrierbox	Nalgene, Rochester (USA)
Kühlwasserbad RC Lauda	Lauda-Dr.Wobser, Lauda-Königshofen
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Lumineszenz Messgerät Victor Light 1420	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen
Messzylinder	Brand, Wertheim
Nanodrop Spektrophotometer	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Gerät	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
pH Meter	Knick, Berlin
Pipette (0.1-1 µL)	Brand, Wertheim
Pipette (20 µL, 200 µL, 1 000 µL)	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Röntgenfilmkassette	Rego, Augsburg

# MATERIAL UND METHODEN

Röntgenverstärkungs-Folie	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Rotierplatte für Membranen	Heidolph, Schwabach
SDS-PAGE Gel- und Blotting-Apparatur	Biorad, München
Spannungsgerät	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Clean Air, Woerden (Niederlande)
Szintillations-Messgerät Mikrobeta	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer HLC	HLC Biotech, Bovenden
Ultraschallgerät (Sonifier)	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
UV Dokumentations-System Transilluminator	Peqlab, Erlangen
UV Transilluminator (TR-302)	Bacherhofer, Reutlingen
Vakuumtrockner Speed Vac	Savant, Famingdale (USA)
Vortexer	Bender & Hobein, Karlsruhe
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Beckmann Avanti J-20 (Corex)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Beckmann J2-HS (Bakterien)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Fellbach
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Fellbach
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Fellbach
$\gamma$ -Strahlungs-Quelle Cobalt-60	Atomic Energy Ltd., Ottawa (Canada)

## 2.1.14 Software

DNA Strider Version 2.0	DNA-Sequenzvergleich
Excel Office 2003	Statistische Auswertung
Endnote X1	Referenz-Manager
ImageJ 1.42	densitometrische Auswertung

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.2 METHODEN

Medien und sterile Lösungen wurden zur Sterilisation 20 min bei 120°C in einem Autoklaven (Varioklav, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim) autoklaviert.

### 2.2.1 Klonierung und DNA Analyse

#### 2.2.1.1 Plasmid-DNA Präparation

##### ***Minipräparation***

Am Vorabend wurden 2 mL LB-Medium (10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 L H<sub>2</sub>O), dem frisch Ampizillin in der Endkonzentration von 50µg/mL zugesetzt worden war, mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und ca. 180 rpm im Bakterienschüttler kultiviert.

Am nächsten Morgen wurden 1.5 mL der Bakteriensuspension in ein Reaktionsröhrchen überführt und 5 min bei 5 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µL TELT-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0; 62.5 mM EDTA; 2.5 M LiCl; 0.4% Triton® X-100 (v/v)) resuspendiert und die Bakterien in Gegenwart von Lysozym (1 µg/µL) für 3 min bei 96 °C lysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat 8 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit einer Pipettenspitze entfernt und die DNA durch Zugabe von 100 µL Isopropanol gefällt. Durch 1-minütige Zentrifugation bei 5 000 rpm wurde die DNA pelletiert, mit 100 µL 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die DNA wurde unmittelbar analysiert oder bei -20°C gelagert.

##### ***Maxipräparation***

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Qiagen® Plasmid Maxi Purification Kit verwendet. Am Vorabend wurden 200 mL LB-Medium, dem frisch Ampizillin in der Endkonzentration von 50µg/mL zugesetzt worden war, mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und ca. 180 rpm im Bakterienschüttler kultiviert.

Am nächsten Morgen wurden die Bakterien 10 min bei 4°C und 6 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL Puffer P1 (50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A, 0.1% Lyse-Blue) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch die Zugabe von 10 mL Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) lysiert und die Suspension durch Zugabe von 10 mL Puffer P3 (3 M Kalium-Acetat, pH 5.5) neutralisiert. Das Bakterien-Lysat wurde 20 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4°C und 4 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf



# MATERIAL UND METHODEN

---

eine mit 10 mL QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Isopropanol (v/v), 0.15% Triton<sup>®</sup> X-100 (v/v)) äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol (v/v)) gewaschen und die DNA mit 15 mL QF-Puffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8.5, 15% Isopropanol (v/v)) eluiert. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 10.5 mL Isopropanol gefällt und nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 9 000 rpm mit 5 mL Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde 10 min bei 4°C und 9 000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, in TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.2.1.2 Analyse von DNA

### ***Quantitative Analyse mittels Photometrie***

Zur Konzentrations-Bestimmung wurde die optische Dichte (OD) der DNA bei 260 nm spektrophotometrisch gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Menge von 50 µg/mL dsDNA. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte sich in einer proteinfreien DNA-Lösung zwischen einem Wert von 1.8 und 2.0 bewegen.

### ***Qualitative Analyse mittels Agarosegelelektrophorese***

Zur quantitativen Analyse wurde die DNA in 1 bis 1.5% Agarose-Gelen aufgetrennt. Hierzu wurden die entsprechenden Mengen Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7.2; 20 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA) aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0.5 µg/mL zugegeben. Die Gel-Lösung wurde in die Gießapparatur gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 20 min war das Gel polymerisiert und konnte in die Elektrophorese-Apparatur gelegt werden. Das Gel wurde mit TAE-Puffer bedeckt und der Kamm entnommen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6X DNA-Ladepuffer (1% Bromphenolblau (w/v), 1% Xylencyanol FF (w/v) in 30% Glycerin (v/v)) versetzt und in die Taschen geladen. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 100 Volt (10 Volt/cm DNA-Gel) in 1 bis 1.5 Stunden. Anschließend wurde die DNA im UV-Licht bei 320 nm visualisiert und fotografisch dokumentiert.

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.2.1.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

### ***Klonierung der Fragmente der zentralen Domäne von Hdm2 in den pGEX4T-2 Vektor***

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50  $\mu$ L durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 200 ng Template DNA, 150 ng 5' und 3' Primer, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM dNTP's, 1X Taq-Polymerase Puffer und 5U Taq-Polymerase (Promega, Mannheim). Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen: 5 min 95°C, 35 Zyklen: 30 sec 95°C; 30 sec 55°C; 1 min/kb DNA 72°C und 7 min 72°C. Die PCR-Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

### ***Klonierung von Aurora A aus einer humanen cDNA Bibliothek in den pcDNA3.1 Vektor mit N-terminalem V5-Tag***

Der Ansatz enthielt 2  $\mu$ L der cDNA Bibliothek, 250 ng 5' und 3' Primer, 0.2 mM dNTP's, 1X Pfu-Polymerase Puffer (+ $MgSO_4$ ) und 2 U Pfu-Polymerase (Promega, Mannheim).

Die PCR-Bedingungen waren: 3 min 95°C, 30 Zyklen: 30 sec 95°C; 30 sec 55°C; 2 min/kb DNA 72°C und 7 min 72°C.

### ***Klonierung von Hdm2 aa221-305 (wt und Punktmutanten) in den pGEX4T-2 Vektor***

Der Ansatz enthielt 1 ng Template DNA, 0.5  $\mu$ M 5' und 3' Primer, 0.2 mM dNTP's, 1X Pfu-Polymerase Puffer (- $MgSO_4$ ), 4 mM  $MgSO_4$  und 2.5 U Pfu-Polymerase (Fermentas, St.Leon-Rot). Die PCR-Bedingungen waren: 5 min 95°C, 30 Zyklen: 30 sec 95°C; 30 sec 55°C; 2 min/kb DNA 72°C und 10 min 72°C (bei Hdm2: 5 min 72°C).

### ***Klonierung von Rb in den pGEX4T-2 Vektor***

Der Ansatz enthielt 1 ng Template DNA, 0.5  $\mu$ M 5' und 3' Primer, 0.2 mM dNTP's, 1X Long PCR Puffer (- $MgCl_2$ ), 2 mM  $MgCl_2$ , 2% (v/v) DMSO und 2 U Long PCR Enzym-Mix. Die PCR-Bedingungen waren: 5 min 94°C, 30 Zyklen: für 30 sec 94°C; 30 sec 55°C; 2 min/kb DNA 68°C und 10 min 68°C.

## 2.2.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Punktmutationen und Deletionen wurden mit dem QuikChange®II site-directed mutagenesis Kit als Modifikation nach Wang und Malcolm (Wang und Malcolm, 2002) erzeugt. Hierzu wurden zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen in einem Volumen von je 25  $\mu$ L durchgeführt. Dabei enthielten die Ansätze 150 ng Template DNA, 250 ng 5' oder 250 ng 3' Primer, 0.5  $\mu$ L dNTP's, 1X Reaktions-Puffer und 1.25U PfuUltra HF DNA Polymerase. Die Reaktionen erfolgten nach folgendem Schema: 30 sec 95°C, 5 Zyklen; 30 sec 95°C; 1 min 55°C; 20 min 68°C und 20 min 68°C. Anschließend wurden die beiden PCR-Ansätze vereinigt und eine weitere PCR nach folgendem Schema durchgeführt: 30 sec 95°C, 30

# MATERIAL UND METHODEN

---

Zyklen; 30 sec 95°C; 1 min 55°C; 20 min 68°C und 20 min 68°C.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend eine Stunde bei 37°C einem DpnI Verdau unterzogen. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das selektiv methylierte DNA spalten kann und somit die Template DNA aus den Ansätzen entfernt. 1 µL des verdauten PCR-Produkts wurde zur Transformation verwendet. Positive Klone wurden mittels Sequenzierung identifiziert.

## 2.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Easy Pure<sup>®</sup> DNA Purification Kit aufgereinigt. Das Signal der DNA-Fragmente wurde auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht, die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und gewogen. Das Gelstück wurde bei 55°C in der dreifachen Menge SALT-Puffer geschmolzen. Inzwischen wurde BIND (DNA bindende Matrix) intensiv gemischt. Nachdem die Agarose gelöst war, wurden 10 µL BIND zu dem Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert und die Matrix mit der gebundenen DNA durch Zentrifugation 5 sec bei 13 000 rpm präzipitiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit WASH-Puffer gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O eluiert. Hierzu wurde die Matrix in 40 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert und 35 µL Überstand abgenommen. Um alle Matrix-Bestandteile zu entfernen, wurde der Überstand erneut zentrifugiert, 30 µL dieses Überstands abgenommen und bis zum weiteren Einsatz bei -20°C gelagert.

## 2.2.1.6 Restriktionsverdau

30 µL DNA wurden im zugehörigen Puffer und den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Bei Enzymen ohne Star-Aktivität, erfolgte die Reaktion bei 37°C über Nacht. Der Verdau mit „Fast Digest“-Enzymen erfolgte bei 37°C in einer Stunde. Der Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

# MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 1: Restriktions-Enzyme**

Plasmide (Vektor/Insert)	Restriktionsenzyme		Puffer
pGEX4T-2 Hdm2; AD (aa190-305, aa190-260, aa230-305)	24 U EcoRI	10 U NotI	Puffer D (Promega)
pcDNA3.1 V5-Aurora A	20 U BamHI	10 U NotI	Puffer D (Promega)
pGEX4T-2 Rb (aa1-929, aa1-475, aa450-929)	5 U BamHI	10 U NotI	BamHI Puffer (Fermentas)
pGEX4T-2 Hdm2 AD (aa221-305 wt und Punktmutanten)	10 U EcoRI	5 U NotI	Fast Digest Puffer (Fermentas)

## **Kontrollverdau**

Um zu testen, ob die Plasmide das Insert enthielten, wurden 15 µL DNA einer Plasmid Mini-Präparation mit 1 U der entsprechenden Restriktionsenzyme im zugehörigen Puffer bei 37°C für 1 bis 2 Stunden verdaut. Der Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

## **2.2.1.7 Ligation**

Die Ligation erfolgte in 20 µL Gesamtvolumen. Es wurden verdaute Vektor-DNA, verdautes PCR-Produkt (Insert) und 2 µL 10X T4 DNA Ligase Puffer mit 10 U T4 DNA Ligase versetzt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde dabei 1:4 gewählt. Die Ligation wurde 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

## **2.2.1.8 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien**

### ***Herstellung chemisch kompetenter Bakterien***

Am Vorabend wurden 2 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E.coli* Stamms inokuliert und über Nacht bei 37°C und ca. 180 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und ca. 2 Stunden im Bakterienschüttler bei 37°C und ca. 180 rpm inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte von 0.48 erreicht hatte ( $OD_{600}=0.48$ ).

Die Kultur wurde 10 min bei 4°C und 2 500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 16 mL kaltem RF1 Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kalium-Acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v)) resuspendiert und für 3 bis 4 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut 10 min bei 4°C und 2 500 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen, die Bakterien in 4 mL RF2 Puffer (10

# MATERIAL UND METHODEN

---

mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v); pH 6.8) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien in 100 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## ***Transformation chemisch kompetenter Bakterien***

Die Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, pro Ansatz 1 µL Plasmid-DNA oder der komplette Ligationsansatz zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 900 µL LB-Medium zugefügt und die Bakterien für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µL der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Ampizillin (Endkonzentration 50 µg/mL) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Transformation mit einem Ligationsansatz wurden die Bakterien 5 sec bei 6 000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt, die Bakterien in 100 µL LB-Medium resuspendiert und komplett ausplattiert.

## **2.2.1.9 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von den Firmen GATC (Konstanz), bzw. Qiagen (Hilden) durchgeführt. Der Sequenzvergleich erfolgte über die DNA Strider Software Version 2.0.

## **2.2.2 Zellkultur und Transfektion eukaryotischer Zellen**

### **2.2.2.1 Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern. Es wurden ausschließlich sterile Lösungen und sterile Materialien eingesetzt.

Alle Zell-Linien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, waren immortalisierte, adhärenente Zellen. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet, welches mit 10% FCS, 100 U/mL Penizillin und 100 µg/mL Streptomycin versetzt worden war. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und bei 95% Luftfeuchtigkeit.

Nach Erreichen einer Zelldichte von 80 bis 90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0.25% Trypsin bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkultur-Flasche gelöst hatten. Anschließend wurde das Trypsin auf den Zellen 1:5 mit frischem Kulturmedium verdünnt und die abgelösten Zellen 2 min bei 1 000 rpm zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mit frischem Kulturmedium resuspendiert und

# MATERIAL UND METHODEN

---

eine definierte Menge dieser Zellsuspension mit ausreichend frischem Kulturmedium in eine neue Zellkultur-Flasche gegeben.

## 2.2.2.2 Kryokonservierung und Anzucht von Zellen

Zur Konservierung wurden die Zellen trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in Einfriermedium (DMEM, 10% DMSO, 20% FCS) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden in einer Kryo-Einfrierbox langsam auf -80°C abgekühlt. Für die kurzzeitige Konservierung (Tage bis Wochen) ist diese Temperatur ausreichend, für eine langfristige Konservierung (Monate bis Jahre) wurden die Zellen nach ein bis zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zur Anzucht von Zellen wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff sofort im 37°C Wasserbad aufgetaut und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 2 min bei 1 000 rpm zentrifugiert, das Zell-Pellet mit ausreichend frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkultur-Flasche überführt. Am darauf folgenden Tag wurde das Kulturmedium erneuert.

## 2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet in einer definierten Menge Kulturmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer (30 x 80 x 5 mm, Gittertiefe 0.100 mm) gezählt. Dabei wurde der Spalt zwischen Deckglas und Zählkammer mit der Zellsuspension befüllt. Die Zellzahl wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop (10X Objektiv) bestimmt.

Bei der verwendeten Neubauer Zählkammer besteht das Zählgitter aus 4 Großquadraten mit jeweils 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup>. Jedes der 4 Großquadrate besteht wiederum aus 16 Kleinquadraten. Die Zellen innerhalb der 4 Großquadrate wurden gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Um zu vermeiden, dass Zellen doppelt gewertet wurden, wurden die 16 Kleinquadrate mäanderförmig ausgezählt und nur diejenigen Zellen berücksichtigt, welche sich auf der linken und auf der unteren Begrenzungslinie befanden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anschließend anhand der folgenden Formel:

$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen (pro Großquadrat)} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.2.2.4 Transfektion mittels Kalziumphosphat (Chen und Okayama, 1987)

Am Vortag wurden pro 100 mm Gewebekulturschale  $10^6$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen in Kulturmedium angesetzt. Am Tag der Transfektion wurden 10 bis 15  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 250 mM  $\text{CaCl}_2$  verdünnt und unter kontinuierlichem Mischen das gleiche Volumen 2X HBS Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.05) zugetropft. Die Kalziumphosphat-DNA Präzipitate wurden den Zellen, die in der zehnfachen Menge Medium kultiviert waren, zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 15% Glycerin/PBS 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Glycerin mit gleicher Menge PBS verdünnt und abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt. 40 bis 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen analysiert.

### 2.2.2.5 Transfektion von siRNA mittels Lipofectamine™2000

Am Vortag wurden pro 100 mm Gewebekulturschale bzw. pro Vertiefung einer 24 Lochplatte  $10^6$  bzw.  $0.04 \times 10^6$  U2OS Zellen in Kulturmedium angesetzt. Am Tag der Transfektion wurden pro 100 mm Gewebekulturschale (24 Lochplatte) 1.5 mL (50  $\mu\text{L}$ ) DMEM in ein Reaktionsröhrchen vorgelegt und 600 pmol (20 pmol) der entsprechenden siRNA zugegeben und kurz gevortext. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden ebenfalls 1.5 mL (50  $\mu\text{L}$ ) DMEM vorgelegt und 10  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{L}$ ) Lipofectamine™2000 Transfektions-Reagenz zugegeben, ebenfalls kurz gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der siRNA-Mix mit dem Lipofectamine-Mix gemischt, kurz gevortext und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und durch 12 mL (500  $\mu\text{L}$ ) DMEM ersetzt. Schließlich wurde der Transfektions-Ansatz zu den Zellen pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und die Zellen im Inkubator belassen. Nach 16 Stunden wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen 40 bis 48 Stunden nach der Transfektion analysiert.

### 2.2.2.6 Transfektion mittels jetPei™

Am Vortag wurden pro 60 mm Gewebekulturschale  $10^6$  H1299 Zellen in Kulturmedium angesetzt. Am Tag der Transfektion wurden pro 60 mm Gewebekulturschale 1.5  $\mu\text{L}$  4X jetPei Transfektions-Reagenz in 150  $\mu\text{L}$  150 mM NaCl verdünnt. Dieser Transfektions-Mix wurde zu 5  $\mu\text{g}$  Gesamt Plasmid-DNA in 150  $\mu\text{L}$  150 mM NaCl gegeben, kurz gevortext und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den Zellen

# MATERIAL UND METHODEN

---

entfernt und durch 2.7 mL frisches Kulturmedium ersetzt. Schließlich wurde der Transfektions-Ansatz zu den Zellen pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen 40 bis 48 Stunden nach der Transfektion analysiert.

## 2.2.2.7 Behandlung der Zellen

**Ionisierende Strahlung:** Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 7.5 Gray in einer  $\gamma$ -Quelle Cobalt-60 mit einer Dosis von 1 Gray/min bestrahlt.

**Nocodazol** wurde in einer Endkonzentration von 0.6  $\mu\text{g/mL}$  für die Dauer von 24 Stunden eingesetzt. Die Stocklösung wurde mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in DMSO angesetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Aphidicolin** wurde in einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Die Stocklösung wurde mit einer Konzentration von 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in DMSO angesetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Zykloheximid** wurde in einer Endkonzentration von 30  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Die Stocklösung wurde jeweils frisch in einer Konzentration von 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in DMSO angesetzt.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Präparation von Zell-Lysaten

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst, in ein Reaktionsröhrchen überführt und 10 sec bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1% NP-40 Lysispuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40 (v/v)), dem 1mM PMSF frisch zugesetzt worden war, lysiert. Die Lyse erfolgte in 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation in 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13 000 rpm präzipitiert. Der Überstand, der die zu analysierenden Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und direkt die Proteinkonzentration bestimmt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

### 2.2.3.2 Immunpräzipitation

Zunächst wurde der Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt. Dazu wurden pro Probe 20  $\mu\text{L}$  der Protein A Sepharose mit PBS gewaschen und eine Stunde mit dem entsprechenden Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert.



## MATERIAL UND METHODEN

---

Die Zellen wurden in 500  $\mu\text{L}$  0.5% NP-40 Lysispuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.5% NP-40 (v/v)), dem 1 mM PMSF und 1X PhosStop Phosphatase-Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt worden waren, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Immunpräzipitation wurden 500 bis 1000  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein eingesetzt und mit 0.5% NP-40 Lysispuffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, zentrifugiert und die Protein A Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexe dreimal mit 250  $\mu\text{L}$  0.5% NP-40 Lysispuffer gewaschen. Die Komplexe wurden anschließend in 15  $\mu\text{L}$  0.5% NP-40 Lysispuffer und 15  $\mu\text{L}$  2X SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C in 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Für eine Ko-Immunpräzipitation wurden die Zellen in 500  $\mu\text{L}$  Ko-IP Lysispuffer (10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% Triton<sup>®</sup> X-100 (w/v)), dem 1 mM PMSF, 1X PhosStop Phosphatase-Inhibitor Cocktail und 10 U/mL Benzonase frisch zugesetzt worden waren, lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA bestimmt. Die Protein A Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexe wurden dreimal mit 250  $\mu\text{L}$  Ko-IP Waschpuffer (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% Triton<sup>®</sup> X-100 (w/v), 5% Glycerol (w/v)) gewaschen.

### 2.2.3.3 Ubiquitinierungs-Analyse

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 6 mL PBS mit einem Gummischaber von der Gewebekulturschale abgelöst. 1 mL davon wurde für die Kontrolle abgenommen. Die restlichen 5 mL wurden 4 min bei 2 000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 7 mL Guanidium-Lysispuffer (6 M Guanidium-HCl, 0.01 M Tris pH 8.0, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.0), dem 5 mM Imidazol und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zugesetzt worden waren, aufgenommen. Zu dem Ansatz wurden 75  $\mu\text{L}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Die Zellen für die Kontrolle wurden in 40  $\mu\text{L}$  1% NP-40 Lysispuffer lysiert, mit 10  $\mu\text{L}$  5X SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Am nächsten Tag wurde die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose sukzessive mit 1 mL Guanidium Puffer mit 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mL Puffer A (8 M Harnstoff, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.3, 0.01 M Tris; pH 6.3) mit 0.2% Triton<sup>®</sup> X-100 und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mL Puffer A mit 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und schließlich mit 1 mL Puffer A mit 0.1 % Triton<sup>®</sup> X-100 und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gewaschen. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose wurde in 60  $\mu\text{L}$  Ubiquitin-Elutionspuffer (200 mM Imidazol, 5% SDS (w/v), 0.15 M Tris pH 6.7, 30% Glycerin (v/v), 0.72 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und die gebundenen Proteine in 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln eluiert. Abschließend wurden die Proben zentrifugiert, 48

# MATERIAL UND METHODEN

---

$\mu\text{L}$  jeder Probe mit 12  $\mu\text{L}$  5X SDS-Proben Puffer versetzt, die Proteine bei 95°C in 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

## 2.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

### *Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurden pro Probe 1 mL Bradford-Reagenz (5% Ethanol (v/v), 10% Phosphorsäure (v/v), 10% Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v)) vorgelegt und 2  $\mu\text{L}$  Lysat zu pipettiert.

Für die Eichkurve wurde 1 mL Bradford-Reagenz vorgelegt, 2  $\mu\text{L}$  Lysispuffer (Hintergrund) und 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{L}$  BSA-Standard mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  zugegeben.

Anschließend wurden alle Ansätze gemischt, 150  $\mu\text{L}$  in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte überführt und bei 595 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve berechnet. Dabei wurde der Faktor nach folgender Formel berechnet:

$$m = \text{Extinktion [BSA-Eichkurve]} / \text{Konzentration [BSA-Eichkurve]}$$

Die Proteinkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration [Probe]} = m \times \text{Extinktion [Probe]}$$

### *Proteinbestimmung mittels BCA*

Die Proteinbestimmung mittels BCA erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA wurden pro Probe 2  $\mu\text{L}$  Lysat mit H<sub>2</sub>O auf 20  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

Für die Eichkurve wurden 2  $\mu\text{L}$  Lysispuffer (Hintergrund) und 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{L}$  BSA-Standard mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in 20  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O gemischt.

Nach Zugabe von 180  $\mu\text{L}$  BCA-Reagenz (Reagenz B/Reagenz A 1:50) wurden die Ansätze gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 150  $\mu\text{L}$  der Eichkurve und der Proben in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte überführt und bei 550 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve analog zur Proteinbestimmung nach Bradford berechnet.

# MATERIAL UND METHODEN

---

## ***Proteinbestimmung mittels SDS-PAGE***

Die Konzentration von GST-Fusionsproteinen nach bakterieller Expression wurde vergleichend mittels SDS-PAGE bestimmt. Dazu wurden 1, 1.5, 2, 2.5, 3  $\mu\text{L}$  BSA mit einer Konzentration von  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  als Standard und 2, 5, 10, 20  $\mu\text{L}$  der zu bestimmenden Probe mit 2X SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die Konzentration wurde anhand des Vergleichs der Proben mit dem BSA-Standard ermittelt.

## **2.2.3.5 SDS-PAGE**

Für die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese) wurden 8%, 10% und 12%-ige Trenngel, mit einer Breite von 1.5 mm und 5%-igen Sammelgelen verwendet. Zu Beginn wurden die mit 70% Ethanol gereinigten Glasplatten mit dem Fixierahmen zusammengebaut und in den Gießstand eingespannt. Dann wurde die Lösung für das Trenngel vorbereitet, gemischt, zwischen die Glasplatten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Isopropanolschicht entfernt und die Geloberfläche mit Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel direkt in einer SDS-PAGE eingesetzt oder in einem feuchten Tuch bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Tabelle 2: Pipettierschema für die Herstellung von Trenn- und Sammelgel**

Reagenzien	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
H <sub>2</sub> O	4.6 mL	4.0 mL	3.3 mL	6.8 mL
Acrylamid Rotiphorese® 30	2.7 mL	3.3 mL	4.0 mL	1.7 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	-
1 M Tris pH 6.8	-	-	-	1.25 mL
10% SDS (w/v)	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
10% APS (w/v)	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
TEMED	6 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, der Zwischenraum mit 1X Laufpuffer (25 mM Tris, 193 mM Glyzin, 0.1% SDS (w/v))

# MATERIAL UND METHODEN

---

aufgefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen.

Die Protein-Proben wurden in 1X SDS-Probenpuffer (75 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS (w/v), 10% Glycerin (v/v), 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v), eine Spatelspitze Bromphenolblau) 5 min bei 95°C hitzeinaktiviert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurden 3  $\mu$ L eines Protein-Molekulargewichts-Markers in eine Tasche geladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 140 Volt in 1.5 bis 2 Stunden bis die Bromphenol-Front das Ende der Gelplatten erreicht hatte. Das Gel wurde nach Beendigung der Gelelektrophorese aus der Apparatur entfernt und auf eine PVDF-Membran geblottet oder mit Coomassie gefärbt und getrocknet.

## 2.2.3.6 Western Blot

Für den Western Blot wurde eine PVDF-Membran (6x9 cm) mit 100% Methanol aktiviert und in Transfer-Puffer (25 mM Tris, 193 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)) äquilibriert. Eine Plastikwanne wurde mit Transfer-Puffer gefüllt, die Blot-Halterung hineingelegt und nacheinander Schwamm, Filterpapier, die vorbereitete PVDF-Membran und das Gel geschichtet. Zum Abschluss wurde nochmals ein Filterpapier und ein Schwamm aufgelegt, die Halterung verschlossen und in die Blotkammer gestellt, so dass sich die Proteine von der Anode zur Kathode aus dem Gel in Richtung Blotting Membran bewegen konnten. Der Transfer erfolgte in Transfer-Puffer über Nacht bei 30 Volt.

## 2.2.3.7 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel über Nacht in einer Coomassie-Färbelösung (40% Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v), 0.06% Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)) unter konstantem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Intensität in 40% Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v) entfärbt, auf zwei Whatman-Filterpapiere gelegt und im Geltrockner bei 80°C für 2 Stunden unter Vakuum getrocknet.

## 2.2.3.8 Immundetektion

Nach dem Western Blot wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit Tinte angefärbt (0.1% Tinte in PBS (v/v)), bevor die Membran in 5% Magermilchpulver (w/v) in PBS/T (0.2% Tween<sup>®</sup> 20 in PBS) für 30 min blockiert wurde. Anschließend wurde die Membran für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockierlösung inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 8 bis 10 min mit PBS/T gewaschen und dann für 1 bis 1.5 Stunden mit einem HRP-konjugierten sekundären

# MATERIAL UND METHODEN

---

Antikörper, der 1:1000 in Blockierlösung verdünnt worden war, inkubiert. Die Membran wurde am Ende dreimal 8 bis 10 min mit PBS/T und einmal 8 min mit PBS gewaschen. Für die Detektion der Proteine wurde ECLI (100 mM Tris pH 8.4, 2.5 mM Luminol, 400  $\mu$ M Kumarinsäure) 1:2 mit ECL II (100 mM Tris pH 8.5, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v)) gemischt, auf die Membran gegeben und 2 min inkubiert. Die Membran wurde dann in Folie eingepackt, in eine Röntgenfilmkassette geklebt und in der Dunkelkammer bei Rotlicht einem Röntgenfilm exponiert. Abschließend wurde der Film entwickelt.

## 2.2.3.9 Autoradiografie

Die Phosphorylierung von Mdm2 konnte aufgrund der emittierten  $\beta$ -Strahlung detektiert werden. Die PVDF-Membran wurde in einer Röntgenfilmkassette bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert. Um die Signale auf dem Röntgenfilm sichtbar zu machen, wurde dieser nach der Exposition entwickelt.

## 2.2.3.10 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur indirekten Immunfluoreszenz-Färbung wurden 10 000 U2OS Zellen pro Vertiefung in einer 24 Lochplatte in Kulturmedium angesetzt, wobei jede Vertiefung ein Glasdeckgläschen enthielt. Nach 2 bis 3 Tagen, als die Zellen ca. 60% Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA bei Raumtemperatur in 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen und 10 min in 0.5 % Triton<sup>®</sup> X-100 in PBS(v/v) permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal 5 min mit PBS gewaschen, 30 min in 1% BSA (w/v); 1% Ziegen Serum (v/v) in PBS blockiert und mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen des entsprechenden primären Antikörpers in Blockierlösung gelegt. Nach 1.5 Stunden wurden die Zellen dreimal 5 min gewaschen und mit einem sekundären Antikörper und dem DNA-Farbstoff Draq5, die jeweils 1:1000 in Blockierlösung verdünnt worden waren, inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 min mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Hydromount auf einem Objektträger eingebettet, über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt getrocknet und dann bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica LSM 510).

## 2.2.3.11 Messung der Luziferase-Aktivität

40 000 U2OS Zellen wurden am Vortag in einer 24 Lochplatte angesetzt und am nächsten Morgen mit 40 ng Renilla-Luziferase, 200 ng Firefly-Luziferase Reporterkonstrukten und Aurora A siRNA bzw. Kontroll siRNA (20 pmol) kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 15 min in 120  $\mu$ L 1X Luziferase-

## MATERIAL UND METHODEN

---

Lysispuffer (passive Lysisbuffer 5X, Promega) auf Eis lysiert. Danach wurden die Proben resuspendiert und für die Messung der Firefly-Luziferase 20  $\mu\text{L}$ , für die Messung der Renilla-Luziferase 10  $\mu\text{L}$  Lysat eingesetzt. Der Renilla-Messung wurden pro 10  $\mu\text{L}$  Probe 100  $\mu\text{L}$  Coelenterazin (100 nM) in Coelenterazin-Puffer (0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA; pH 7.6) hinzugefügt. Für die Firefly-Luziferase Messung wurden pro 20  $\mu\text{L}$  Probe zuerst 70  $\mu\text{L}$  GlyGly Puffer (25 mM GlyGly, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA; pH7.8, 1 mM DTT, 2 mM ATP) und danach 20  $\mu\text{L}$  Luziferin (40  $\mu\text{M}$ ) in GlyGly Puffer zugefügt. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte in einem Biolumineszenz-Messgerät.

### 2.2.3.12 Präparation von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Konstrukte in *E.coli* BL21 transformiert. 40 mL LB-Medium, dem frisch Ampizillin in der Endkonzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zugesetzt worden war, wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und ca. 180 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur 1:10 verdünnt und für 1.5 Stunden bei 37°C und ca. 180 rpm inkubiert. Durch Zugabe von 1mM IPTG, einem Laktose-Analogen, wurde die Expression der rekombinanten GST-Fusionsproteine induziert. Nach 6 bis 7 Stunden wurden die Bakterien 15 min bei 4°C und

6 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1/20 der Ausgangsmenge PBS resuspendiert und der Ansatz zweimal 15 sec sonifiziert. Anschließend wurden die Proben mit 1mM PMSF und 1% Triton® X-100 (v/v) versetzt und 30 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Während dessen wurde die Glutathion-Sepharose vorbereitet. Dazu wurden pro Probe 100  $\mu\text{L}$  Glutathion-Sepharose zweimal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen. Nach der Inkubation des Bakterien-Lysats wurden die Zelltrümmer 10 min bei 4°C und 9 000 rpm pelletiert, der Überstand mit der Glutathion-Sepharose versetzt und bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Glutathion-Sepharose mit dem gebundenen Protein zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zehnmal mit PBS gewaschen. Am Ende wurden die Proteine durch Zugabe von GST-Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris pH 8.0) 5 min auf Eis eluiert. Der Ansatz wurde 30 sec bei 4°C und 6 000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der das GST-Fusionsprotein enthielt in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Die Elution wurde einmal wiederholt, die Überstände vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

# MATERIAL UND METHODEN

---

## 2.2.3.13 Kinase-Analyse

250 ng aufgereinigtes Protein, bzw. immunpräzipitierte Proteine wurden mit 25 mU (aufgereinigtes Protein), mit 50 mU (immunpräzipitierte Proteine) oder mit 150 mU (Messung der inkorporierten Phosphatmenge) rekombinanter Aurora A oder Aurora A immunpräzipitiert aus Zellen in Gegenwart von 1X Aurora A Reaktionspuffer (8mM MOPS pH 7.0, 0.2 mM EDTA) und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (250  $\mu$ Ci/mL  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP, 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M ATP, 20 mM MOPS pH 7.2, 25 mM  $\beta$ -Glyzerophosphat, 5 mM EGTA, 1 mM Natrium-Orthovanadat, 1 mM DTT) 25 min bei 30°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5X SDS-Probenpuffer gestoppt, die Proteine 5 min bei 95°C denaturiert und der Ansatz mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden danach entweder auf eine PVDF-Membran geblottet, oder das Gel wurde gefärbt, getrocknet, das Mdm2 Protein ausgeschnitten und im Szintillations-Messgerät gemessen.

## 2.2.3.14 Zweidimensionale Phosphopeptid-Kartierung

1  $\mu$ g aufgereinigtes Protein (GST-Mdm2 aa190-305) wurde wie oben beschrieben in Gegenwart von 150 mU rekombinanter Aurora A und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP eine Stunde bei 30°C phosphoryliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend gefärbt, getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Das Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit 500  $\mu$ L Ammoniumbicarbonat (4 mg/mL NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) homogenisiert. Der Suspension wurden weitere 500  $\mu$ L Ammoniumbicarbonat-Lösung, 10  $\mu$ L 20% SDS und 20  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, die Probe intensiv gemischt und 5 min auf 95°C erhitzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Probe 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und die Zentrifugation wiederholt, um alle Gel-Bruchstücke zu entfernen. Um das GST-Mdm2 von Aurora A abzutrennen, wurde die Suspension für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur mit 20  $\mu$ L Glutathion-Sepharose inkubiert. Nach Elution des GST-Mdm2 Proteins von der Glutathion-Sepharose wurde das Protein durch Zugabe von 20  $\mu$ g RNase A und 250  $\mu$ L eiskalter 100% Trichloressigsäure (w/v) auf Eis gefällt. Nach der einstündigen Proteinfällung wurde das Pellet mit 100% eiskaltem Ethanol gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Um die schwefelhaltigen Aminosäuren zu oxidieren wurde dem GST-Mdm2 Protein 50  $\mu$ L Perameisensäure zugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Für die Herstellung der Perameisensäure wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:10 mit Ameisensäure verdünnt und eine Stunde auf einem Drehrad inkubiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Danach wurde dem Ansatz 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben und das Protein unter Vakuum getrocknet. Das Protein wurde in 50  $\mu\text{L}$  frischem Ammoniumbicarbonat resuspendiert und mit 10  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Chymotrypsin über Nacht bei 37°C verdaut.

Am nächsten Morgen wurden erneut 10  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Chymotrypsin zugegeben und weitere 2 Stunden bei 37°C verdaut. Durch wiederholtes Lösen in  $\text{H}_2\text{O}$  und Trocknen im Vakuumtrockner wurden Salze aus der Probe entfernt. Anschließend wurden die Peptide in 50  $\mu\text{L}$  pH 1.9 Puffer (580 mM Ameisensäure, 1.36 M Essigsäure) gelöst. Die Probe wurde 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und die Zentrifugation wiederholt, um alle unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Die Probe wurde ein letztes Mal im Vakuumtrockner lyophilisiert. Abschließend wurden die Peptide in 5  $\mu\text{L}$  pH 1.9 Puffer gelöst und auf eine Dünnschicht-Chromatografieplatte aufgetragen. Die Platte wurde gleichmäßig mit pH 1.9 Puffer äquilibriert, in eine Elektrophorese Apparatur gelegt und die Pufferkammern mit pH 1.9 Puffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung der Chromatografieplatte auf 4°C bei 500 Volt für 1.5 Stunden.

Die Chromatografieplatte wurde unter dem Abzug getrocknet und senkrecht zur Elektrophorese-Richtung, in eine Chromatografie-Kammer eingebracht, welche 2 cm hoch mit Chromatografie-Puffer (62.5% Isobutylsäure (v/v), 1.9% n-Butanol (v/v), 4.8 % Pyridin (v/v), 2.9% Eisessig) gefüllt war. Die Chromatografie erfolgte in gesättigter Atmosphäre für 7 Stunden. Abschließend wurde die Platte getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### 2.2.3.15 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Banden im Western Blot wurden die Röntgenfilme eingelese und die Intensität der Signale mit der Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) ermittelt.



# ERGEBNISSE

---

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Aurora A phosphoryliert das Mdm2 Protein *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinase Aurora A hinsichtlich ihres Potentials, die zentrale Domäne von Mdm2 zu phosphorylieren, untersucht. Das Mdm2 Protein wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Für den effektiven Abbau des p53 Proteins ist die Phosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins erforderlich (Blattner et al., 2002). Das Tumorsuppressor Protein p53 spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Stress-Antwort. Dabei akkumuliert p53 bei Stresseinwirkung und aktiviert dann in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor Zielgene, die zu Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur, Apoptose oder Seneszenz führen (Hofseth et al., 2004; Levine, 1997). Allerdings muss p53 in einer normalen Körperzelle, die keinem Stress-Stimulus ausgesetzt ist, auf niedrigem Niveau gehalten werden, damit die Proliferation und das Wachstum der Zelle überhaupt möglich ist. Dies wird vor allen Dingen durch das Mdm2 Protein, dem negativen Regulator von p53 erreicht (Fang et al., 2000; Momand et al., 1992).

Viele Tumore gehen mit einer Mengenzunahme von Aurora A und auffallend selten mit Mutationen in p53 einher. Dies deutet auf einen gemeinsamen Signalweg hin (Mao et al., 2007). Im Einklang mit dieser Hypothese wurde beschrieben, dass Aurora A p53 direkt an Serin 315 phosphoryliert und dadurch zum Abbau von p53 beiträgt (Katayama et al., 2004). Allerdings sind hier auch alternative und komplementäre Vorgänge möglich. Eine Aurora A-abhängige Phosphorylierung des zentralen Bereichs von Mdm2 könnte zum Beispiel Einfluss auf den Abbau des p53 Proteins nehmen. Damit würden dieselben Effekte hervorgerufen werden, wie sie für die Phosphorylierung von p53 an Serin 315 durch Aurora A beschrieben wurden.

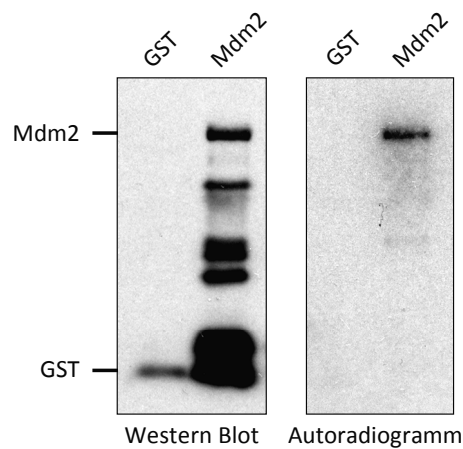
Um zu untersuchen, ob das Mdm2 Protein durch die Kinase Aurora A phosphoryliert werden kann, wurde Mdm2 (humanes Protein) in Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Bakteriell exprimierte Proteine zeigen keine posttranslationalen Modifikationen und sind daher ideal für den Einsatz in *in vitro* Kinase Experimenten. Hier sei erwähnt, dass die Bezeichnung Mdm2 (murines Protein) auch das humane Protein beinhalten soll.

Das aufgereinigte Mdm2 Protein wurde mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen

## ERGEBNISSE

---

von Mdm2 eingesetzt worden waren, wurde die PVDF-Membran vor der Autoradiografie mit einem GST-Antikörper hybridisiert und mit Hilfe von ECL entwickelt.



**Abbildung 9: Aurora A phosphoryliert das humane Mdm2 Protein *in vitro***

GST-Mdm2 (humanes Protein) wurde als Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon und 250 ng GST wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um die eingesetzte Menge des GST-Fusionsproteins nachzuweisen. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

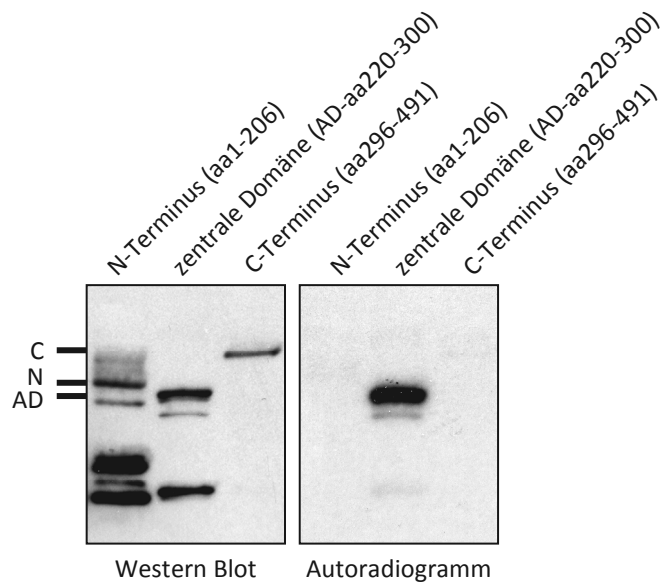
Da das verwendete Mdm2 Protein als „Tag“ das Glutathion-S-Transferase Protein (GST) enthielt, war es wichtig eine Kontrolle zu verwenden. Damit konnte überprüft werden, ob Aurora A die Fusionsproteine eventuell im Bereich des „GST-Tags“ phosphoryliert, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass Mdm2 eine deutliche Phosphorylierung durch Aurora A zeigt, wohingegen GST nicht phosphoryliert wurde.

Da vor allen Dingen die Phosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins für den Abbau von p53 wichtig ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Aurora A das Mdm2 Protein in diesem Bereich phosphorylieren kann. Dazu wurden Fragmente des Mdm2 Proteins und zwar N-Terminus (aa1-206), zentrale Domäne (aa220-300) und C-Terminus (aa296-491) als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt.

Diese Proteine wurden, wie oben beschrieben, mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem GST Antikörper nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 10: Aurora A phosphoryliert die zentrale Domäne von Mdm2 *in vitro***

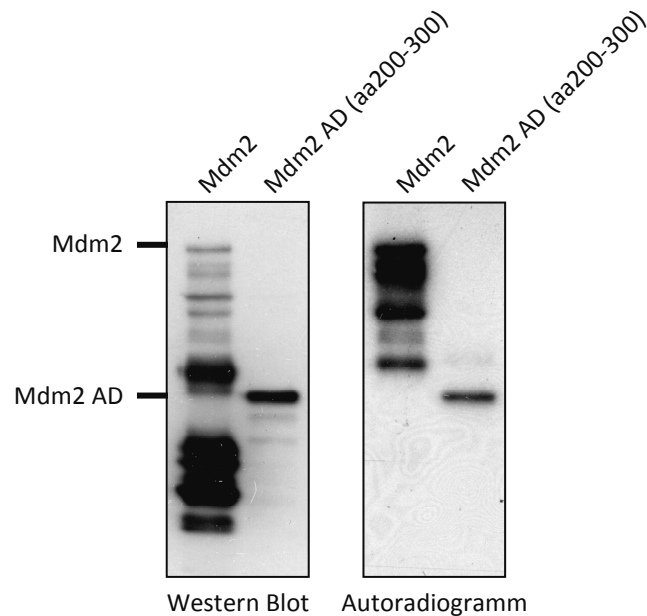
Die Deletionsmutanten des Mdm2 Proteins, wie folgt N-Terminus (aa1-206), zentrale Domäne (aa220-300) und C-Terminus (aa296-491) wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um die eingesetzten Proteine nachzuweisen. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

Aus Abbildung 10 geht deutlich hervor, dass Aurora A *in vitro* vor allem die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins phosphoryliert. Die anderen Bereiche zeigen hingegen keine Phosphorylierung im Autoradiogramm.

Da in weiterführenden Untersuchungen das murine Mdm2 Protein eingesetzt wurde, wurde überprüft, ob Aurora A auch die zentrale Domäne des murinen Mdm2 Proteins phosphorylieren kann. Dazu wurde analog zu den oben beschriebenen Experimenten das aufgereinigte Mdm2 Protein mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen eingesetzt worden waren, wurde die PVDF-Membran mit einem gegen GST gerichteten Antikörper hybridisiert. Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 11: Aurora A phosphoryliert das murine Mdm2 Protein *in vitro***

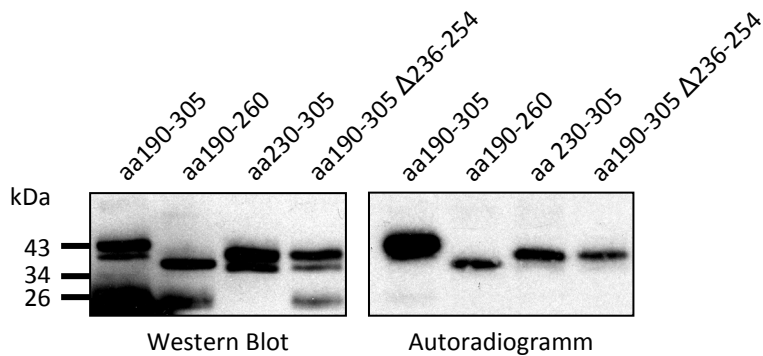
GST-Mdm2 und GST-Mdm2 AD (aa200-300) wurden als Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um die eingesetzten Proteine nachzuweisen. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

Aus diesem Experiment geht deutlich hervor, dass das murine Mdm2 Protein durch Aurora A phosphoryliert wird (siehe Abbildung 11). Es zeigte sich hier wie bei dem humanen Mdm2 Proteine eine Phosphorylierung in der zentralen Domäne. Die beiden Proteine Mdm2 und Hdm2 konnten somit in den folgenden Experimenten alternativ verwendet werden.

Um die durch Aurora A phosphorylierten Aminosäuren zu bestimmen, sollte zunächst die Position der durch Aurora A phosphorylierten Stelle eingeeengt werden. Dazu wurden kleinere Fragmente der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und mit Aurora A, wie beschrieben, inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem gegen GST gerichteten Antikörper sichtbar gemacht. Die Phosphorylierung wurde durch Exposition der Membran gegen einen Röntgenfilm visualisiert.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 12: Phosphorylierung von Fragmenten des zentralen Bereichs von Mdm2 durch Aurora A**

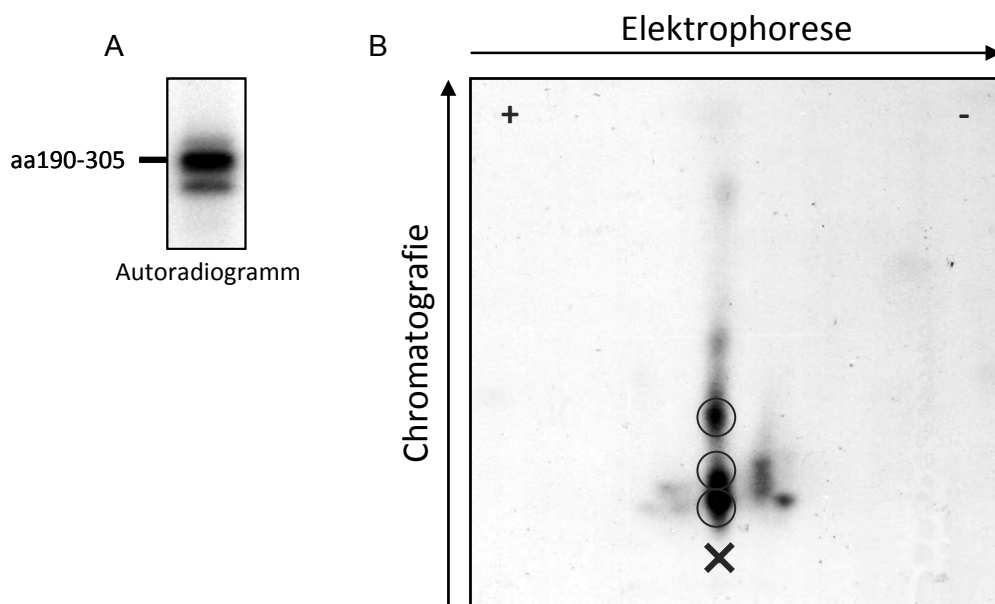
GST-Mdm2; aa190-305; aa190-260; aa221-305; aa230-305 und aa190-305 Δ236-254 wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um die eingesetzten Proteine nachzuweisen. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

In Abbildung 12 ist eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung in den kleineren Fragmente der zentralen Domäne (aa190-260, aa230-305, aa190-305 Δ236-254) im Vergleich zur gesamten zentralen Domäne (aa190-305) zu erkennen. Allerdings konnte in keinem Fragment ein vollständiger Verlust der Phosphorylierung beobachtet werden. Anhand dieses Ergebnisses ließ sich folglich kein Bereich der zentralen Domäne von Mdm2 identifizieren, wo die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A stattfindet. Aufgrund der beiden Überlappungsbereiche der verwendeten Fragmente, lässt dies aber den Schluss zu, dass Mdm2 mindestens zwei Phosphorylierungs-Stellen von Aurora A besitzt. Wenn die Phosphorylierung an diesen beiden Serinen stattfindet, dann würden alle drei Fragmente, wie in Abbildung 12 gezeigt phosphoryliert werden.

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, wie viele Aminosäuren der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins tatsächlich durch Aurora A phosphoryliert werden, wurde im nächsten Schritt eine zweidimensionale Phosphopeptid-Kartierung der zentralen Domäne durchgeführt. Dazu wurde die zentrale Domäne von Mdm2 als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, aufgereinigt, mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Mdm2 Protein aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde dieses Mdm2 Protein mit der Protease  $\alpha$ -Chymotrypsin behandelt. Die dabei entstandenen Peptide wurden auf eine Dünnschicht-Chromatografieplatte aufgetragen und in der ersten Dimension nach

## ERGEBNISSE

ihrer Ladung elektrophoretisch getrennt. In der zweiten Dimension erfolgte eine Dünnschicht-Chromatografie in einem hochpolaren Puffer, wo die Trennung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität erfolgte. Die Dünnschicht-Chromatografieplatte wurde am Ende gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die entstandenen diskreten Signale gaben Auskunft, wie viele Peptide der zentralen Domäne von Mdm2 phosphoryliert wurden. Zwar können mehrere Phosphorylierungs-Stellen auf einem Peptid vorhanden sein, allerdings zeigt sich eine multiple Phosphorylierung des Peptids normalerweise durch ein verändertes Laufverhalten. Wenn man die Schnittstellen von  $\alpha$ -Chymotrypsin auf der Sequenz der zentralen Domäne von Mdm2 aufträgt, dann erhält man zehn Peptiden, die aus mindestens fünf Aminosäuren bestehen. Diese Peptide enthalten alle mindestens eine Aminosäure, die phosphoryliert werden kann.



**Abbildung 13: Zweidimensionale Phosphopeptid-Kartierung der zentralen Domäne von Mdm2**

**A)** Die zentrale Domäne von Mdm2 wurde als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und 1  $\mu$ g davon mit 150 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. **B)** Der Bereich mit dem phosphorylierten Protein-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Protein mit Ammoniumbicarbonat extrahiert und am nächsten Morgen mittels Glutathion-Sepharose von der Kinase abgetrennt. Das Protein wurde mittels TCA gefällt und über Nacht bei 37°C mit 10  $\mu$ g  $\alpha$ -Chymotrypsin gespalten. Am nächsten Morgen wurden erneut 10  $\mu$ g  $\alpha$ -Chymotrypsin zugegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die erzeugten Phosphopeptide wurden aufgereinigt und auf eine Dünnschicht-Chromatografieplatte aufgetragen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte in der ersten Dimension mittels Elektrophorese unter Kühlung bei 500 V in 1.5 Stunden. In der zweiten Dimension wurde die Chromatografieplatte senkrecht zur Laufrichtung der Peptide in der Elektrophorese in eine Chromatografie-Kammer eingebracht und in einem hochpolaren Puffer 7 Stunden entwickelt. Die Dünnschicht-Chromatografieplatte wurde nach dem Trocknen gegen einen Röntgenfilm exponiert.

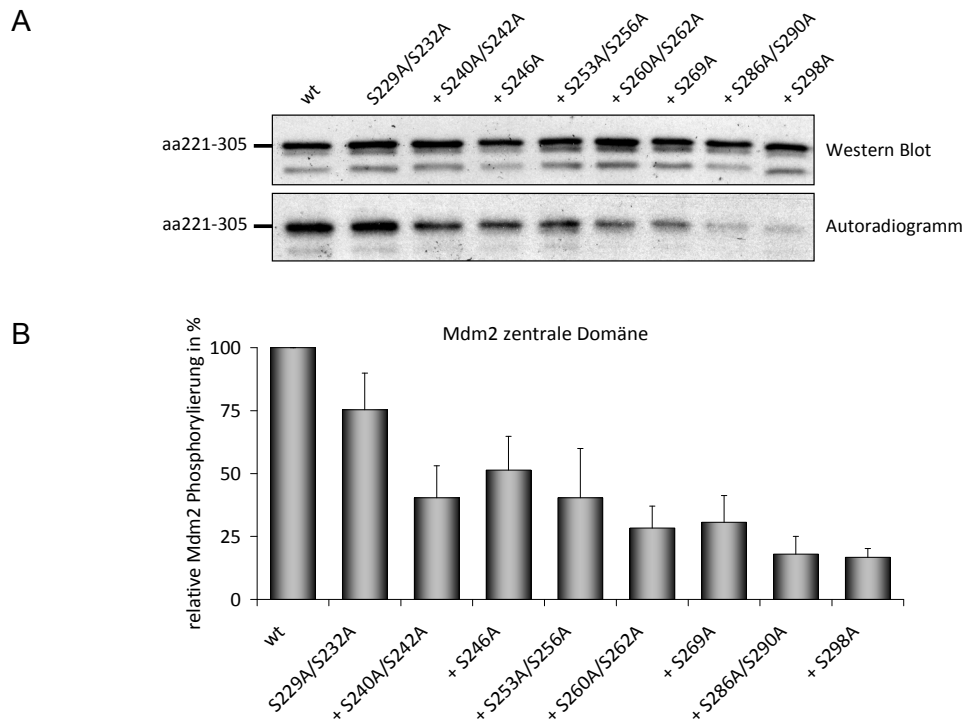
## ERGEBNISSE

---

In diesem Experiment konnten drei Phosphopeptide nachgewiesen werden, die durch Aurora A phosphoryliert werden (siehe Abbildung 13). Des Weiteren sind sechs schwächer phosphorylierte Mdm2-Peptide zu unterscheiden. Anhand dieses Experiments lässt sich darauf schließen, dass Mdm2 mindestens drei Aurora A Phosphorylierungs-Stellen besitzt.

Um die genaue Position der durch Aurora A phosphorylierten Serine in der zentralen Domäne von Mdm2 zu bestimmen, wurde dieser Bereich einer ortsgerichteten Mutagenese unterzogen. Dabei wurden nacheinander alle enthaltenen Serine durch Alanine ersetzt. Die Aminosäure Alanin hat im Gegensatz zu Serin keine OH-Gruppe und kann daher nicht phosphoryliert werden. Die so erzeugten Mutanten wurden wiederum als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurden diese Mutanten mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Um die eingesetzten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran mit einem GST-Antikörper hybridisiert und mit ECL visualisiert.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 14: Analyse der Aminosäuren im zentralen Bereich von Mdm2, die durch Aurora A phosphoryliert werden**

**A)** GST-Mdm2 (aa221-305) und die daraus abgeleiteten Punktmutanten wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um die eingesetzte Menge der GST-Fusionsproteine nachzuweisen. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm). **B)** Die Signale aus dem Autoradiogramm und dem Western Blot von A) wurden mit der Image J Software quantifiziert. Der Quotient aus phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein wurde grafisch als Mittelwert mit Standardabweichungen dargestellt. Der relative Wert für das Wildtyp Protein wurde 100% gesetzt.

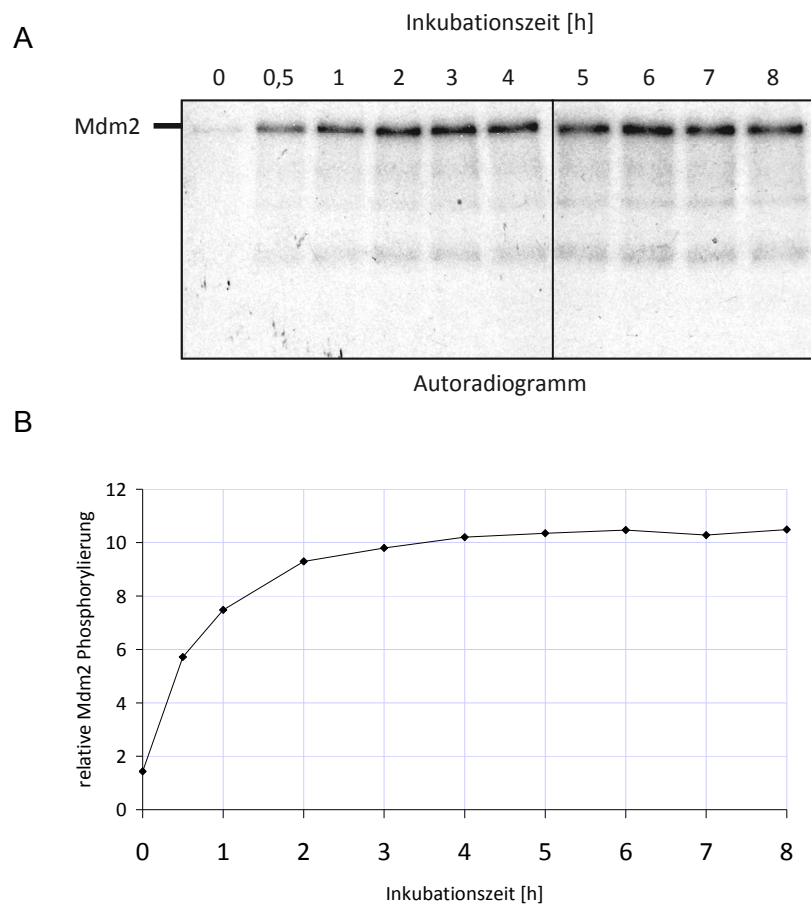
Im Western Blot in Abbildung 14 A) ist zu sehen, dass die Mengen der einzelnen Punktmutanten der zentralen Domäne von Mdm2 vergleichbar waren. Im Autoradiogramm nahm die Phosphorylierung der Punktmutanten kontinuierlich ab, je mehr Phosphorylierungsstellen mutiert waren. Bei der statistischen Auswertung (siehe Abbildung 14 B) ist die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 grafisch als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen dargestellt. In diesem Experiment wies aber keine der mutierten Stellen eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung auf. Entsprechend konnte kein spezifisches Serin im zentralen Bereich des Mdm2 Proteins als Phosphorylierungs-Stelle von Aurora A identifiziert werden.



## 3.2 Physiologische Relevanz der Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A

Es hat sich gezeigt, dass Experimente die *in vitro* durchgeführt werden, oftmals keine physiologische Bedeutung haben. Dabei wird ein Experiment *in vitro* unter optimalen Bedingungen durchgeführt, die nicht den Bedingungen, wie sie in einer Zelle vorliegen, entsprechen. Außerdem ist es möglich, dass *in vivo* Proteine vorhanden sind, die eine Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A inhibieren. Daher ist es wichtig zu untersuchen, ob die *in vitro* beobachtete Phosphorylierung auch eine Bedeutung *in vivo* in der Zelle hat. Aus diesem Grund wurde die Effizienz der *in vitro* Phosphorylierung bestimmt, die ein Maß für eine *in vivo* Relevanz darstellt. Dazu wurde GST-Mdm2 mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP mit unterschiedlicher Dauer Zeiten inkubiert. Die einzelnen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Signale wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert.

# ERGEBNISSE



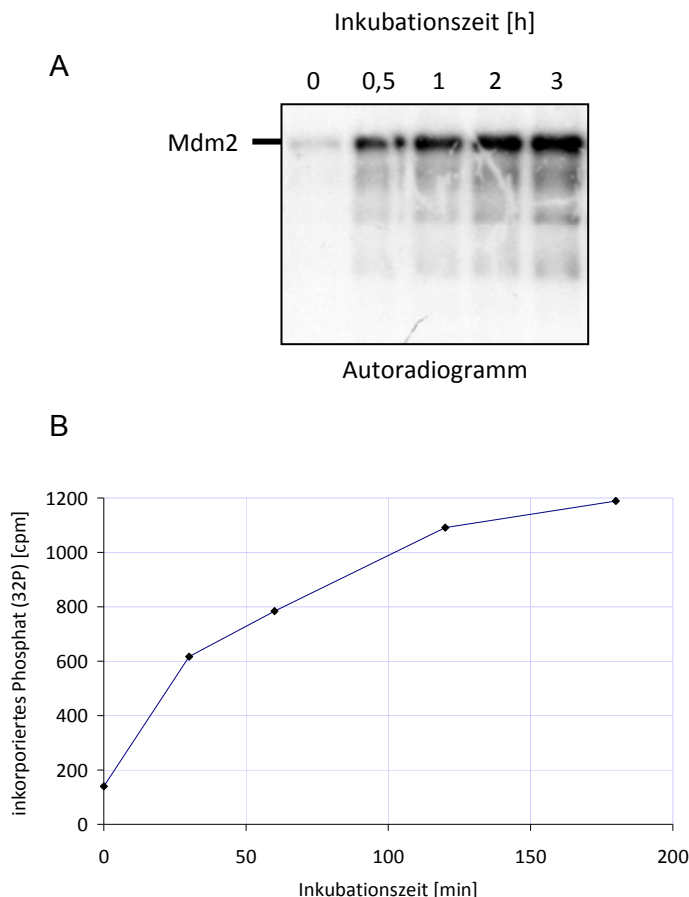
**Abbildung 15: Zeitabhängige Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A**

**A)** GST-Mdm2 wurde in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden für die angegebene Dauer mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. **B)** Die Signale wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert und die relative Mdm2 Phosphorylierung gegen die Zeit aufgetragen.

In diesem Experiment ist deutlich zu sehen (siehe Abbildung 15), dass die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 bis zur Dauer von 3 Stunden zunimmt und dann auf einem konstanten Niveau bleibt. Das bedeutet, dass unter den verwendeten Bedingungen nach 3 Stunden das Maximum der Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A erreicht wurde. Dies stellt eine hyperbolische Reaktionskurve dar, wie sie für Enzym-Substrat-Reaktionen charakteristisch ist.

# ERGEBNISSE

Das zuvor gezeigte Experiment wurde unter denselben Bedingungen wiederholt. Bei der Wiederholung wurde das Mdm2 Protein aus dem SDS-PAGE Gel ausgeschnitten und die Strahlungsmenge im Szintillations-Messgerät ermittelt. Die Auswertung der inkorporierten Phosphatmenge erfolgte anhand einer  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP Eichkurve.



## Abbildung 16: Messung der inkorporierten Phosphatmenge

**A)** GST-Mdm2 wurde in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng wurden für die angegebene Dauer mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. **B)** Das Mdm2 Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Szintillations-Messgerät gemessen. Die ermittelte Strahlung wurde gegen die Zeit aufgetragen und hier grafisch als inkorporiertes  $^{32}\text{P}$  dargestellt. Die Berechnung der inkorporierten Phosphatmenge erfolgte anhand einer  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP Eichkurve, die ebenfalls im Szintillations-Messgerät bestimmt wurde.

Das Autoradiogramm in Abbildung 16 A) war eine wichtige Kontrolle um sicher zu stellen, dass das Kinase Experiment erfolgreich war. Des Weiteren ist aus diesem Ergebnis ersichtlich, dass die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A mit der Zeit zunimmt. Die Messung des Mdm2 Proteins im Szintillations-Messgerät gibt dasselbe Bild

## ERGEBNISSE

---

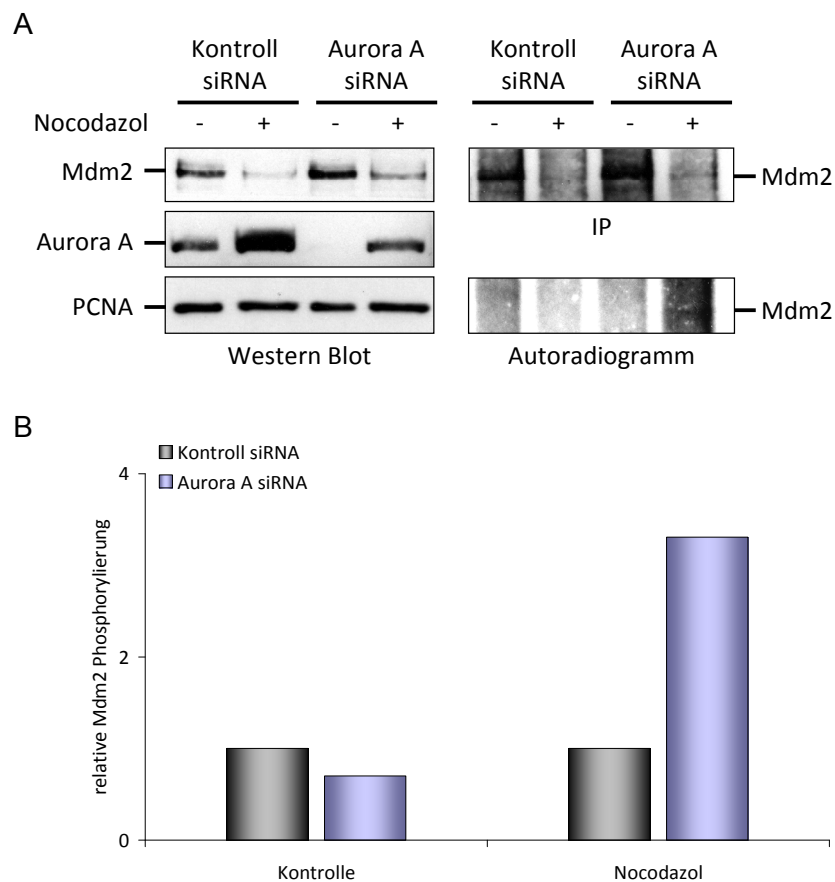
wider (siehe Abbildung 16B). Die inkorporierte Phosphatmenge wurde anhand des 3 Stunden Werts, wo die Phosphorylierung ein Maximum zeigt (siehe Abbildung 15), auf ca. 200% berechnet. Das bedeutet, wenn Aurora A alle Serine in der zentralen Domäne phosphoryliert, worauf das in Abbildung 14 dargestellte Experiment hinweist, dann geschieht dies *in vitro* mit einer Effizienz von 15% pro Serin.

Um zu überprüfen, ob Aurora A eine physiologisch relevante Kinase für Mdm2 ist, wurde ein Experiment durchgeführt, wo Aurora A mittels siRNA inhibiert wurde.

Dabei wurden Zellen mit siRNA behandelt, um spezifisch die Translation der Aurora A mRNA zu inhibieren. Im Vergleich dazu wurden Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA (Kontroll siRNA), die zu keiner mRNA komplementär war, transfiziert. Da Aurora A eine mitotische Kinase ist, die vor allem in der M-Phase exprimiert wird und aktiv ist, wurde ein Teil der Zellen in der Mitose-Phase des Zellzyklus arretiert. Dazu wurden die Zellen mit Nocodazol behandelt. Nocodazol führt zur Depolymerisierung der Mikrotubuli und arretiert die Zellen in der M-Phase.

Mdm2 wurde aus diesen Zellen präzipitiert und in einem *in vitro* Kinase Experiment mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm). Um das eingesetzte Mdm2 Protein sichtbar zu machen, wurde die Membran mit einem Mdm2-Antikörper hybridisiert und mit ECL visualisiert (IP). Zusätzlich wurde ein Teil des Zell-Lysats mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern, die gegen Mdm2, Aurora A und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) gerichtet waren, hybridisiert. Die Signale wurden mittels ECL visualisiert (Western Blot). Die relative Mdm2 Phosphorylierung wurde quantifiziert und gegen den Wert für die Kontroll siRNA normalisiert.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 17: Aurora A phosphoryliert Mdm2 *in vivo***

**A)** U2OS Zellen wurden mit Kontroll siRNA, bzw. spezifischer siRNA, die gegen Aurora A gerichtet war transfiziert und nach 24 Stunden mit Nocodazol (Endkonzentration 0.6  $\mu\text{g/mL}$ ) bzw. DMSO (Kontrolle) versetzt, um die Zellen in der M-Phase zu arretieren. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Stunden lysiert und 1 mg Gesamtprotein in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Dem Zell-Lysat wurden 20  $\mu\text{L}$  Protein A Sepharose zugegeben, an die ein Antikörper gegen Mdm2 gekoppelt worden war. Die IP wurde 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Komplexe wurden anschließend gewaschen und das an die Protein A Sepharose gebundene Mdm2 Protein mit 50 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  eine Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem gegen Mdm2 gerichteten Antikörper nachgewiesen (IP). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm). Zur Kontrolle wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein aus dem Zell-Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern, die gegen Mdm2, Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren hybridisiert und mit ECL detektiert (Western Blot). **B)** Die Ergebnisse von A) wurden mittels Image J Software quantifiziert und die Werte als relative Mdm2 Phosphorylierung gegen die Werte der Kontroll siRNA normalisiert, aufgetragen.

In Abbildung 17 A) ist anhand der Proteinmenge von Aurora A zu sehen, dass die siRNA Transfektion und die Behandlung mit Nocodazol erfolgreich waren. Die Menge an Aurora A in der M-Phase sollte bei erfolgreicher Arretierung der Zellen in der M-Phase deutlich größer als bei nicht arretierten Zellen. In der Immunpräzipitation (IP) ist zu sehen, dass das Mdm2 Protein präzipitiert werden konnte, dabei waren die unterschiedlichen Mengen auf die

## ERGEBNISSE

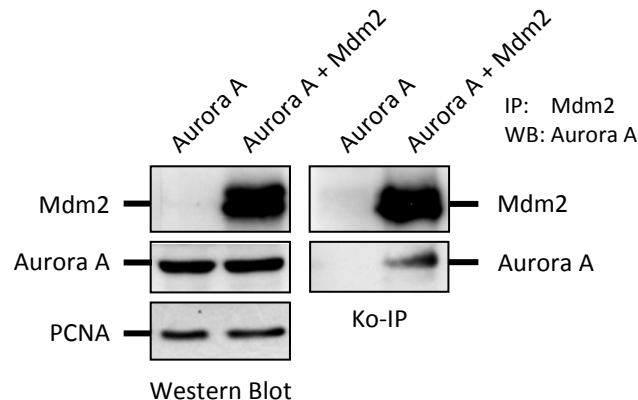
---

Behandlung mit Nocodazol zurückzuführen. Im Autoradiogramm ist zu sehen, dass ein diskretes Signal bei der Phosphorylierung von Mdm2 in Nocodazol behandelten und mit Aurora A siRNA transfizierten Zellen auftritt. Dies wird im Balkendiagramm in Abbildung 17 B) noch deutlicher. Dabei konnte nur das Mdm2 Protein *in vitro* phosphoryliert werden, das aufgrund der Inhibition von Aurora A mittels siRNA nicht schon *in vivo* durch diese Kinase phosphoryliert worden war.

Eine Voraussetzung für die direkte Phosphorylierung eines Substrats durch eine Kinase, ist die Assoziation dieser beiden Proteine. Die Interaktion von Kinasen mit ihren Substraten ist transient, da die Proteine sofort nach der enzymatischen Reaktion dissoziieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Experiment mit überexprimierten Proteinen gewählt, um die Anzahl der Kinase-Substrat Komplexe zum Zeitpunkt der Zellernte zu maximieren. Entsprechend wurde untersucht, ob Aurora A und Mdm2 assoziieren. Dafür wurden Hek293T Zellen mit einer cDNA, welche für Myc-markiertes Mdm2 Protein kodiert und mit einer cDNA, die für V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Das Mdm2 Protein wurde immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen das V5 Epitop hybridisiert, um kopräzipitierte Aurora A zu visualisieren. Ein Antikörper gegen das Myc Epitop wurde verwendet, um gleiche Mengen des Proteins nachzuweisen (Ko-IP). Zusätzlich wurde ein Teil des Zell-Lysats als Kontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern, die gegen Myc (Mdm2), V5 (Aurora A) und PCNA gerichtet waren, inkubiert (Western Blot).

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 18: Aurora A assoziiert mit dem Mdm2 Protein**

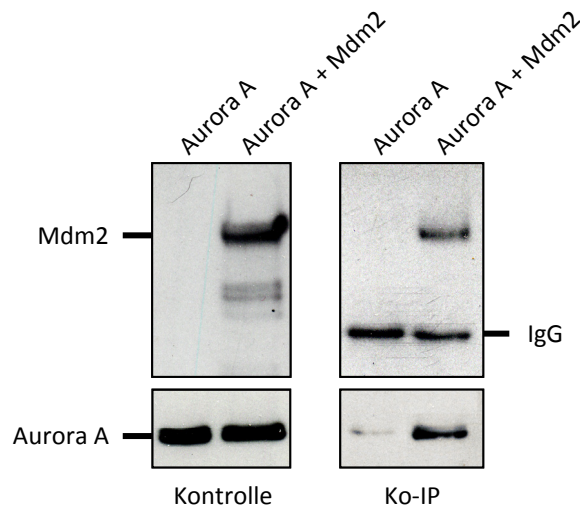
Hek293T Zellen wurden mit einer cDNA, welche für Myc-markiertes Mdm2 Protein kodiert und mit einer cDNA, die für V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach der Transfektion lysiert und 1 mg Gesamtprotein in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurden 20 µL Protein A Sepharose verwendet, an die ein Antikörper gegen das Myc-Tag, gekoppelt worden war. Die IP wurde 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Komplexe wurden anschließend gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem gegen das Myc-Tag gerichteten Antikörper hybridisiert, um immunpräzipitiertes Mdm2 Protein zu visualisieren. Das kopräzipitierte Aurora A Protein wurde mit einem gegen das V5-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen (Ko-IP). Zur Kontrolle wurden 50 µg Protein aus dem Zell-Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern, die gegen Myc (Mdm2), V5 (Aurora A) und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert und mit ECL visualisiert (Western Blot).

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird, konnte Aurora A gemeinsam mit Mdm2 kopräzipitiert werden. Im Western Blot ist zu sehen, dass Aurora A und Mdm2 überexprimiert waren. Dieses Ergebnis zeigt also die Interaktion von Aurora A mit dem Mdm2 Protein zeigen.

Um zu untersuchen, ob die gezeigte Interaktion von Aurora A mit dem Mdm2 Protein direkt ist, oder ob zusätzlich andere Proteine dafür benötigt werden, wurde ein *in vitro* Experiment durchgeführt. Dabei wurde Mdm2, welches in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt worden war mit Aurora A, ebenfalls in Insektenzellen exprimiert, inkubiert. Anhand eines FLAG Antikörpers wurde das Mdm2 Protein immunpräzipitiert. Dieser Antikörper erkennt das FLAG-Epitop, das an Mdm2 gekoppelt war. Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern, die gegen Mdm2 gerichtet waren hybridisiert. Das kopräzipitierte Aurora A Protein wurde durch Inkubation mit einem Aurora A-Antikörper nachgewiesen.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 19: Aurora A interagiert direkt mit dem Mdm2 Protein**

100 ng Aurora A und 1 µg FLAG-Mdm2, beide rekombinant in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt, wurden in PBS bis zu einem Endvolumen von 200 µL gemischt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz verwendet, der dieselben Bestandteile mit Ausnahme von FLAG-Mdm2 enthielt. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurde für die Kontrolle 40 µL aus den Proben entnommen. Der restliche Ansatz wurde nach Zugabe von 20 µL Protein A Sepharose, an die ein FLAG-Antikörper gekoppelt worden war, 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Der entstandene Komplex und die Kontroll-Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Mdm2 und gegen Aurora A hybridisiert und mit ECL-Reagenz visualisiert (Kontrolle + Ko-IP).

In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass Aurora A mit dem Mdm2 Protein *in vitro* kopräzipitiert. Die Interaktion des Mdm2 Proteins mit Aurora A ist daher direkt und ohne die Beteiligung anderer Kofaktoren möglich.

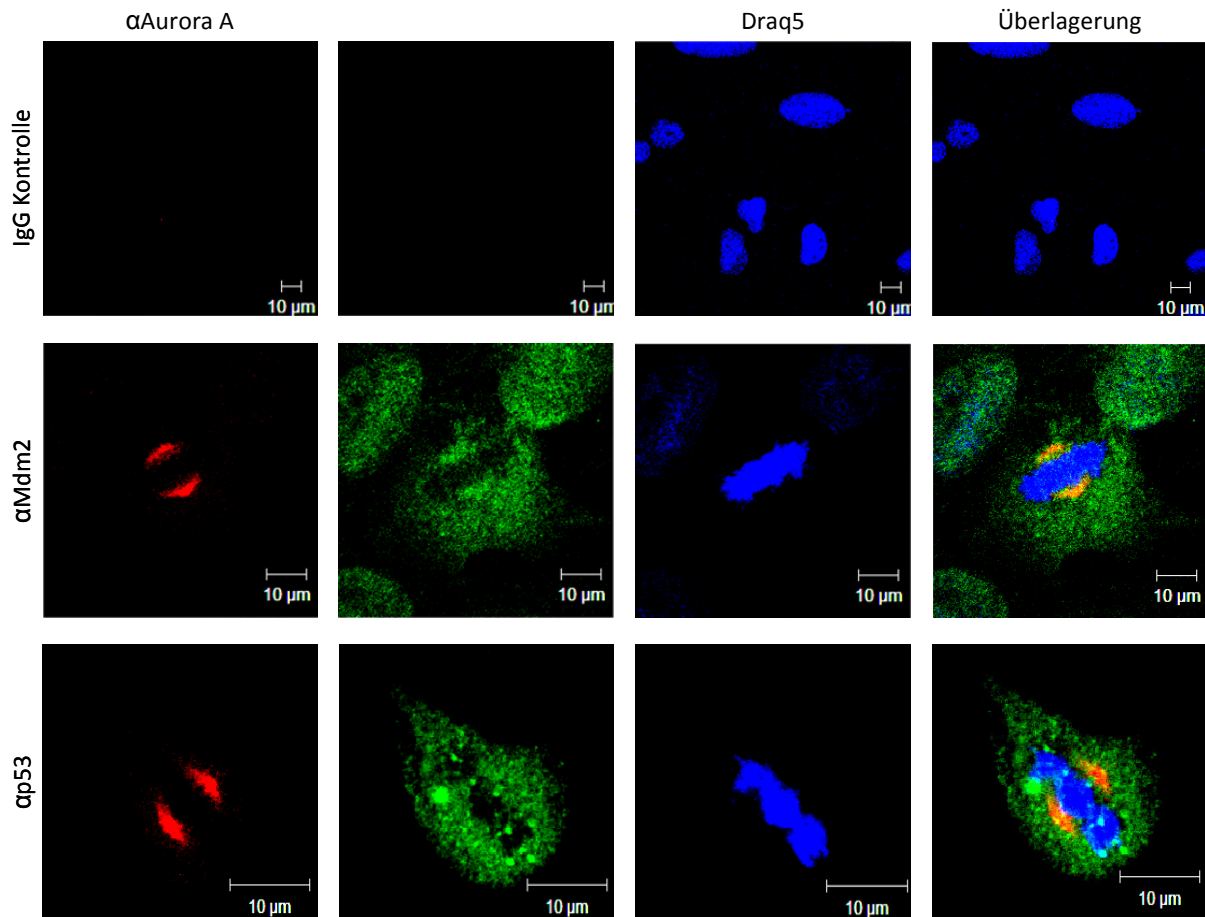
Die eingesetzten Mengen von Aurora A waren in beiden Ansätzen gleich. In der Ko-IP ist zu erkennen, dass Aurora A auch präzipitiert wird, wenn kein Mdm2 in der Probe war. Dieses Signal kommt durch Bindung des Aurora A Proteins an die Protein A Sepharose zustande und gibt den Hintergrund wider.

Wenn die beiden Proteine Mdm2 und Aurora A assoziieren, dann sollten sie in der Zelle kolokalisieren. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden U2OS Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert und nachdem sie ca. 60% Konfluenz erreicht hatten fixiert, permeabilisiert, und mit Antikörpern, die gegen Aurora A und Mdm2 gerichtet waren, inkubiert. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden die Ansätze mit einem zweiten Antikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, hybridisiert. Zusätzlich wurde das Chromatin mit einem in die DNA interkalierenden Farbstoff angefärbt (Draq5). Abschließend



# ERGEBNISSE

wurden die Zellen auf einem Objektträger eingebettet und an einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet. Bei diesem Experiment wurden nur Zellen beobachtet, die sich in der M-Phase befanden. Diese Zellen waren durch das kondensierte Chromatin und die intensive Anfärbung des Aurora A Proteins deutlich von nicht mitotischen Zellen zu unterscheiden.



**Abbildung 20: Aurora A und das Mdm2 Protein kolokalisieren an den Zentriolen**

U2OS Zellen wurden auf Glasdeckgläschen kultiviert und nachdem sie ca. 60% Konfluenz erreicht hatten mit 4% PFA 20 min fixiert, mit 0.5% Triton X-100 in PBS 10 min permeabilisiert und mit Blockierlösung (1% BSA (w/v); 1% Ziegen Serum (v/v) in PBS) 30 min blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern, die gegen Aurora A, Mdm2 und p53 gerichtet waren in Blockierlösung 1.5 Stunden bei Raumtemperatur hybridisiert. Danach folgte die Inkubation mit den zweiten Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren (Alexa-546, rot; Alexa-488, grün). Zur Kontrolle wurden Zellen eingesetzt, die nur mit dem zweiten Antikörper hybridisiert worden waren (IgG Kontrolle). Die sekundären Antikörper wurden 1:1000 in Blockierlösung für 1.5 Stunden eingesetzt. Gleichzeitig wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Draq5 (blau) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen in Hydromount auf einem Objektträger eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica, LSM 510).

# ERGEBNISSE

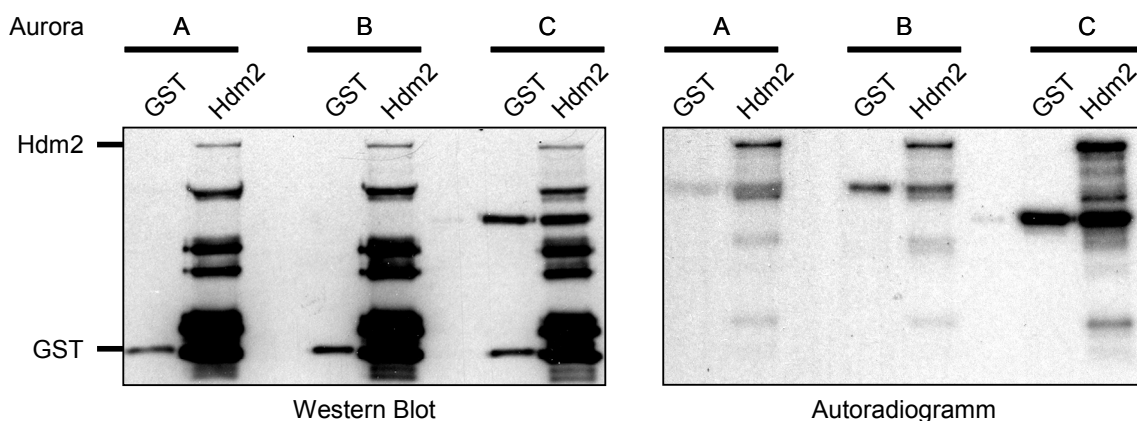
In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass Mdm2 und Aurora A an den Zentriolen der mitotischen Spindel kolokalisieren. Mdm2 zeigt hier eine stärkere Färbung, auch wenn das Mdm2 Protein zusätzlich außerhalb der Zentriolen auftritt.

Im Gegensatz dazu konnte keine Kolokalisation von Aurora A und dem p53 Protein beobachtet werden.

## 3.3 Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch die Aurora Proteinkinase Familie

Wegen der hohen Sequenzidentität zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Aurora Proteinfamilie wurde untersucht, ob das Mdm2 Protein neben Aurora A auch durch Aurora B und Aurora C phosphoryliert werden kann.

Dazu wurde GST-Mdm2 mit Aurora A, Aurora B oder Aurora C in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert, die Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran das eingesetzte GST-Mdm2 Protein durch einen Antikörper, der gegen GST gerichtet war visualisiert. Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert.



**Abbildung 21: Aurora A, Aurora B und Aurora C phosphorylieren das Mdm2 Protein**

GST-Mdm2 wurde als Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon sowie 250 ng GST wurden mit 25 mU Aurora A, Aurora B oder Aurora C in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem gegen GST gerichteten Antikörper hybridisiert und die Proteine mittels ECL visualisiert (Western Blot). Die Membran wurde anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

## ERGEBNISSE

---

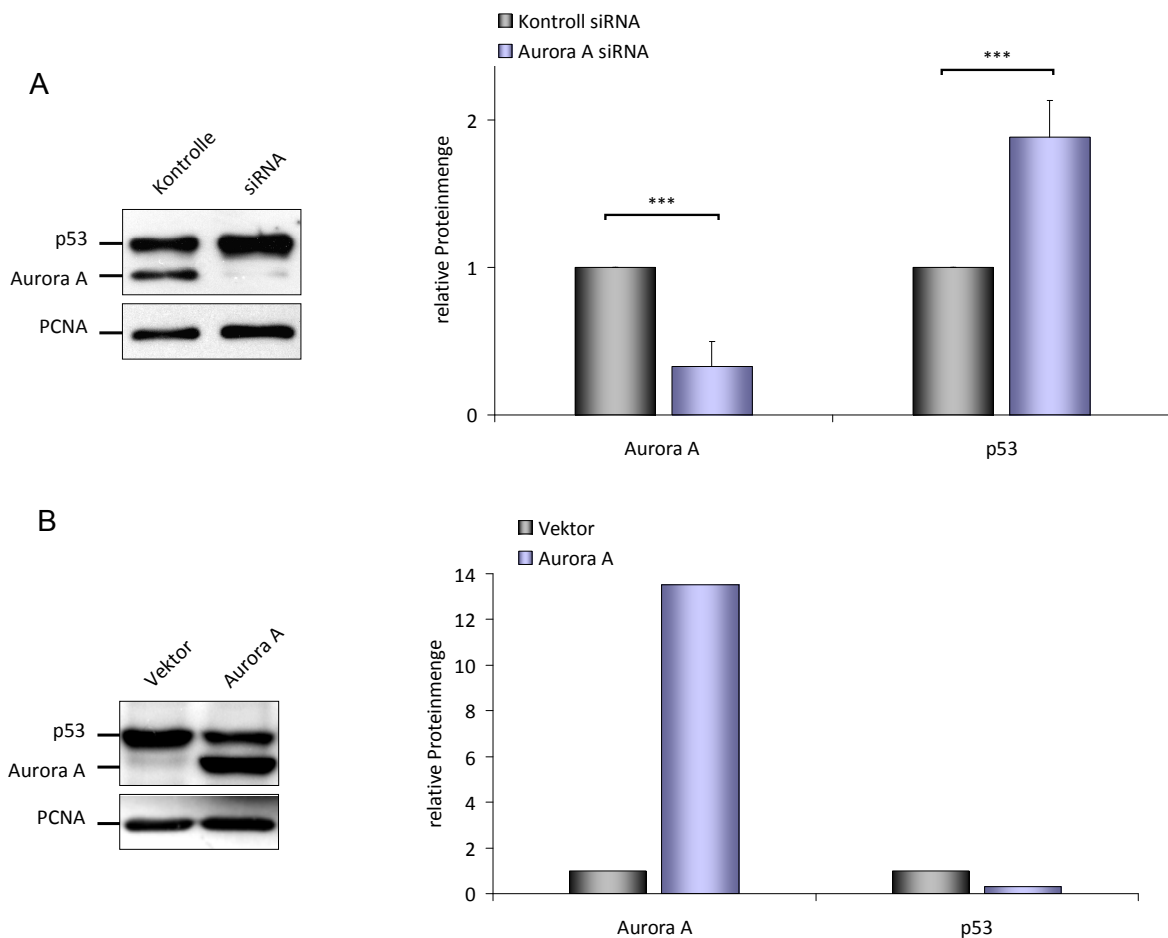
Aus Abbildung 21 geht hervor, dass neben Aurora A auch Aurora B und Aurora C das Mdm2 Protein phosphorylieren können. Dabei wurde das GST Protein durch keine der Kinasen phosphoryliert. Allerdings sind bei den Kinasen Aurora B und C in der Probe, wo nur GST vorhanden war Signale im Autoradiogramm zu sehen. Dabei handelt es sich um die autophosphorylierten Kinasen. Des Weiteren befindet sich im Western Blot in der GST-Kontrolle von Aurora C ein weiteres Signal. Dies ist dadurch zu erklären, dass Aurora C wie Mdm2 ebenfalls ein GST-Tag enthielt. Daher wird Aurora C von dem Antikörper, der gegen GST gerichtet ist, ebenfalls erkannt.

### 3.4 Aurora A beeinflusst die Stabilität des p53 Proteins

Die Phosphorylierung der Serine, die sich in der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins befinden, ist essentiell für die Degradation des p53 Proteins (Blattner et al., 2002). Falls Aurora A tatsächlich eine physiologische Kinase für diese Serine ist, sollte man erwarten, dass die Inhibition von Aurora A mit dem p53 Abbau interferiert. Um zu überprüfen, ob Aurora A die Degradation des p53 Proteins beeinflusst, wurden U2OS Zellen mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. Für dieses Experiment wurden U2OS Zellen ausgewählt, weil sie das p53 Gen exprimieren und keinerlei Fehlregulationen des p53 Proteins bekannt sind. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden schließlich mit Hilfe von Antikörpern, die gegen p53, Aurora A und PCNA gerichtet waren, sichtbar gemacht.

Um weitergehend zu überprüfen, ob Aurora A eine Funktion bei der Degradation des p53 Proteins besitzt, wurde ein gegensätzliches Experiment durchgeführt. Dabei wurden H1299 Zellen (p53<sup>-/-</sup>) mit einer cDNA, welche für das p53 Protein kodiert und mit einer cDNA, die für V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen V5 (Aurora A), p53 und PCNA hybridisiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte mit dem ECL Reagenz.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 22: Einfluss von Aurora A auf die Stabilität des p53 Proteins**

**A)** U2OS Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA, oder mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert, das Protein (50µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen p53, Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert und mit dem ECL Reagenz visualisiert. Die Signale wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert und ausgewertet. Dabei wurde die Proteinmenge jeweils zu der Ladekontrolle normalisiert. Die relative Proteinmenge ist als Mittelwert aus drei unabhängige Experimenten mit den Standardabweichungen und der Signifikanz angegeben (\*\*p<0.005). **B)** H1299 Zellen wurden mit einer cDNA, welche für das p53 Protein kodiert und mit einer cDNA, die für V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach der Transfektion lysiert und wie oben angegeben aufgetrennt und visualisiert. Die Signale wurden quantifiziert und die Proteinmenge zur Ladekontrolle normalisiert aufgetragen.

Entsprechend der Bedeutung der Phosphorylierung zentralen Domäne des Mdm2 Proteins für die Degradation von p53 führte eine Verminderung der Aurora A Proteinmenge zu einer Zunahme der p53 Proteinmenge (siehe Abbildung 22 A). Eine Mengenzunahme von Aurora A ging im Gegensatz dazu mit der Degradation von p53 einher (siehe Abbildung 22 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aurora A tatsächlich ein wichtiger Regulator des p53 Proteins ist.

## 3.5 p53 ist nach Aurora A Inhibition aktiv

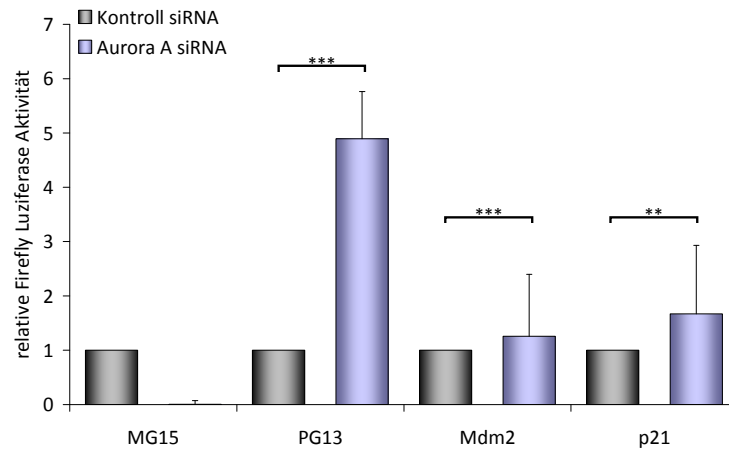
Die Beobachtung, dass Aurora A Einfluss auf die Stabilität des p53 Proteins nimmt, eröffnet einen neuen Ansatz für eine zielgerichtete Krebstherapie mit Aurora A Inhibitoren. Da bei einigen Tumorarten eine Amplifikation des Aurora Gens und dadurch eine Mengenzunahme des Proteins beobachtet wurde, werden seit einiger Zeit Aurora Inhibitoren entwickelt. Einige dieser Inhibitoren haben bereits die präklinische Phase erreicht (Agnese et al., 2007; Carvajal et al., 2006; Keen und Taylor, 2004). Für einen Einsatz dieser Inhibitoren in der Krebstherapie ist es aber von enormer Bedeutung, dass die Inhibition von Aurora A die Funktion des p53 Proteins als Transkriptionsfaktor nicht stört.

Um zu testen, ob eine siRNA-vermittelte Inhibition von Aurora A Einfluss auf die Funktion des p53 Proteins hat, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Luziferase gemessen. Die Expression des verwendeten Reporter-Gens steht unter der Kontrolle des p53 Proteins. Es wurden Reporter-Konstrukte verwendet, welche Teile der Promotoren der Mdm2 und p21 Gene enthielten, die die Bindestellen für das p53 Protein beinhalteten. Außerdem wurde ein synthetisches Reporter-Konstrukt eingesetzt, bei dem die Sequenz, an die das p53 Protein bindet, 13-Mal wiederholt war (PG13). Als Negativkontrolle wurde das Reporter-Konstrukt MG15 verwendet, bei dem im Promotorbereich die Binde-Sequenz für das p53 Protein 15-Mal wiederholt war. Allerdings war hier jede Binde-Stelle mutiert, so dass das p53 Protein nicht mehr binden konnte. Als interner Standard wurde das Reporter-Gen Renilla *Luziferase*, verwendet. Die Expression dieses Gens steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors.

U2OS Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten, Renilla-Luziferase und Firefly-Luziferase, sowie eine gegen Aurora A gerichtete siRNA bzw. Kontroll-siRNA kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Messung der Luziferase-Aktivität durchgeführt.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 23: p53 ist nach Aurora A Inhibition transkriptionell aktiv**

U2OS Zellen wurden mit 40 ng Renilla-, mit 200 ng Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukten und mit 20 pmol Kontroll- bzw. Aurora A siRNA kotransfiziert. Die Firefly Reporterkonstrukte enthielten den Promotor des p21 und des Mdm2 Gens. Außerdem wurde das PG13 Reporterkonstrukt, wo die p53 Bindestelle 13-Mal wiederholt im Promotor vorkommt und das MG15 Reporterkonstrukt, das 15-Mal eine mutierte p53 Bindestelle enthält, verwendet. Als interner Standard wurde ein Reporterkonstrukt der Renilla Luziferase verwendet, das einen konstitutiv aktiven Promoter enthält. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der exprimierten Luziferase anhand des Substrat-Umsatzes im Biolumineszenz-Messgerät bestimmt. Die Messdaten wurden jeweils gegen den internen Standard der Renilla Luziferase normalisiert und die Werte für die Zellen, die mit Kontroll siRNA behandelt worden waren gleich 1 gesetzt. Die Werte wurden im Diagramm als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt und deren Signifikanz angegeben (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

In Abbildung 23 ist die relative Luziferase-Aktivität standardisiert und normalisiert gegen die siRNA Kontrolle aufgetragen. Daraus geht hervor, dass das p53 Protein transkriptionell aktiv war. Dabei wurde das Reporterkonstrukt mit dem PG13 Promotor um das 5fache induziert. Beim Einsatz des MG15 Reporterkonstrukts als Negativkontrolle war keine Luziferase Aktivität messbar. Des Weiteren geht aus diesen Daten hervor, dass der p21 Promotor um das 1.6-fache und damit stärker induziert wurde als der Mdm2 Promotor, der um das 1.2-fache induziert worden war.

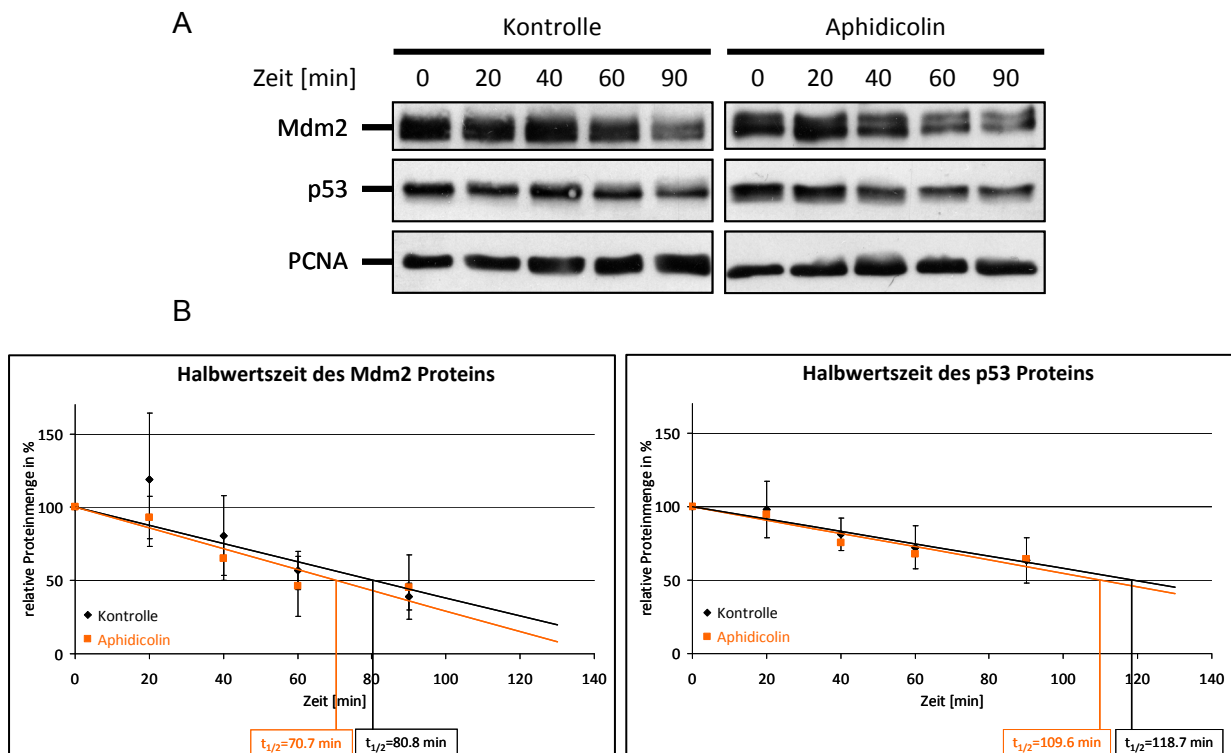
# ERGEBNISSE

---

## **3.6 Die Halbwertszeiten der Mdm2 und p53 Proteine sind in der Mitose verkürzt**

Da die Mengenzunahme des p53 Proteins häufig auf einer Störung im Abbau und weniger auf einer gesteigerten Transkriptions- oder Translations-Rate des Gens bzw. der RNA beruht (Bode und Dong, 2004), wurde die Halbwertszeit des p53 Proteins in der Mitose, wo Aurora A sowohl in der Proteinmenge, als auch in der Aktivität ein Maximum zeigt, bestimmt. Dazu wurden U2OS Zellen mit Aphidicolin in der frühen S-Phase arretiert. Aphidicolin ist ein Pilz-Toxin, welches die Replikation verhindert, indem es die Aktivität der DNA-Polymerase  $\alpha$  und der DNA-Polymerase  $\delta$  reversibel inhibiert. Nach der Behandlung der Zellen wurde Aphidicolin entfernt und die Zellen in den Zellzyklus entlassen. Nach 7 Stunden hatten die Zellen die Mitose-Phase erreicht. Hier wurde die Proteinsynthese durch Behandlung mit Zykloheximid blockiert. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit spezifischen Antikörpern, die gegen p53, Mdm2 und PCNA gerichtet waren, nachgewiesen.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 24: Die Halbwertszeiten der p53 und Mdm2 Proteine sind in der Mitose verkürzt**

**A)** U2OS Zellen wurden 24 Stunden mit DMSO als Kontrolle oder Aphidicolin behandelt (Endkonzentration 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), um die Zellen in der späten S-Phase zu arretieren. Durch Entfernen von Aphidicolin wurden die Zellen in den Zellzyklus entlassen. Nach 7 Stunden wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von Zykloheximid in einer Endkonzentration von 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  blockiert und die Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten lysiert. 50  $\mu\text{g}$  Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen die Mdm2, p53 und PCNA (Ladekontrolle) Proteine gerichtet waren hybridisiert und mit ECL Reagenz visualisiert. **B)** Die Proteinmenge wurde quantifiziert und zur Ladekontrolle normalisiert. Dabei wurde der Wert zum Zeitpunkt 0 (Zugabe von Zykloheximid) 100% gesetzt. Die Werte für die relative Proteinmenge in % sind als Mittelwerte mit Standardabweichung gegen die Zeit aufgetragen. Die Berechnung der Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) erfolgte anhand einer Regressionsgeraden.

Die Halbwertszeiten der Mdm2 und p53 Proteine waren in der Mitose-Phase verkürzt (siehe Abbildung 24 A). Die Signale wurden quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dabei konnte eine Verminderung der Halbwertszeiten um ca. 10 min berechnet werden. Bei Mdm2 verringerte sich die Halbwertszeit von 80.8 auf 70.7 min, bei p53 von 118.7 auf 109.6 min (siehe Abbildung 24 B).

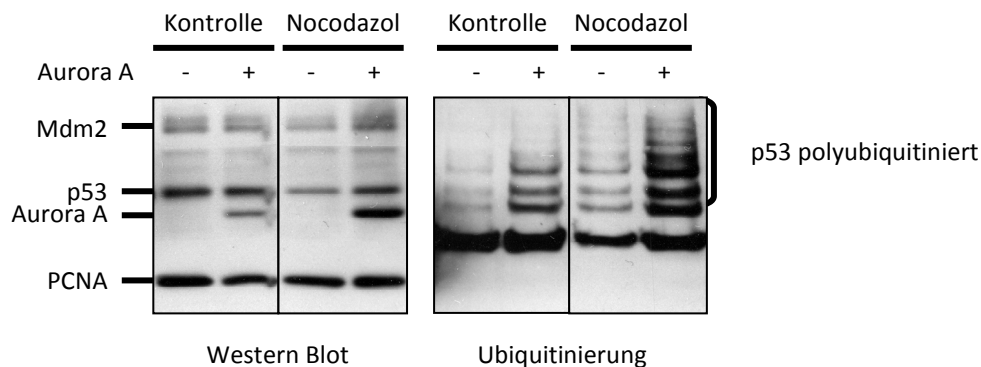


## 3.7 Aurora A induziert die Ubiquitinierung des p53 Proteins

Voraussetzung für den Abbau des p53 Proteins ist die Polyubiquitinierung mehrerer Lysine in seiner Tetramerisierungs-Domäne (Fang et al., 2000; Honda et al., 1997; Honda und Yasuda, 2000). Da eine ektopische Expression von Aurora A mit einer verstärkten Degradation des p53 Proteins einherging, lag die Vermutung nahe, dass unter diesen Bedingungen die Ubiquitinierung des p53 Proteins induziert wurde. Tatsächlich fiel bei Experimenten, in denen der Einfluss von Aurora A auf die p53 Proteinmenge untersucht worden war auf, dass bei längerer Exposition der Membran höhermolekulare Banden des p53 Proteins sichtbar wurden, die nach siRNA Behandlung nicht mehr vorhanden waren. Bei diesen Signalen könnte es sich um polyubiquitiniertes p53 Protein handeln.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurde eine Ubiquitinierungs-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden H1299 Zellen (p53<sup>-/-</sup>) mit cDNA, die für p53, Mdm2, His<sub>6</sub>Ubiquitin und V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Den Zellen wurde 16 Stunden nach der Transfektion Nocodazol zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen in PBS resuspendiert und ein Aliquot für die Kontrolle entnommen, welches mit NP-40 Puffer lysiert wurde (Western Blot). Die restliche Suspension wurde pelletiert, das Pellet in Guanidinium-Lysispuffer resuspendiert und die ubiquitinierten Proteine über das His-Tag mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose abgetrennt. Die Proteine wurden von der Agarose eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das V5 Epitop (Aurora A) und gegen die Mdm2, p53 und PCNA Proteine hybridisiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte mit dem ECL Reagenz.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 25: Aurora A induziert die Ubiquitinierung des p53 Proteins**

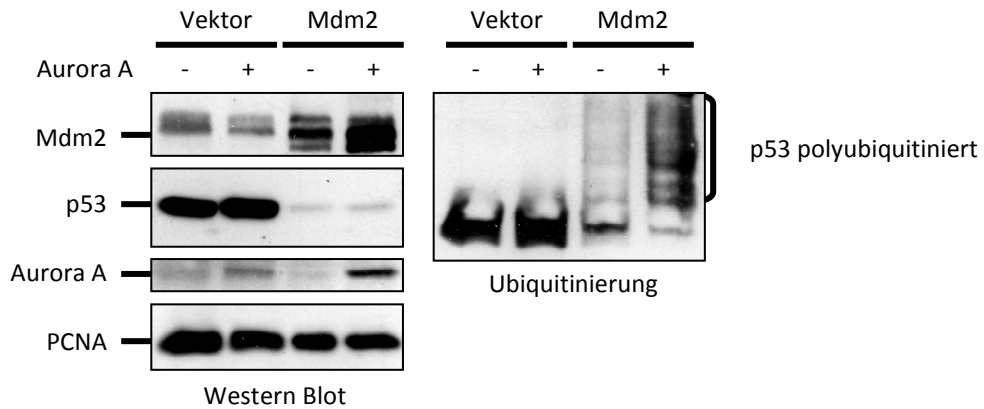
H1299 Zellen wurden mit einer cDNA, die für p53, Mdm2, His<sub>6</sub>Ubiquitin und V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Nach 16 Stunden wurde Nocodazol in einer Endkonzentration von 0.6 µg/mL zugegeben und 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach Transfektion geerntet und in 6 mL PBS resuspendiert. 1 mL davon wurde für die Kontrolle abgenommen und mit NP-40 Puffer lysiert. Die restlichen Zellen wurden in 7 mL Guanidium-Lysispuffer resuspendiert und mit 75 µL Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Agarose gewaschen und die Proteine in 60 µL Elutionspuffer eluiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Mdm2, p53, V5 (Aurora A) und PCNA gerichtet waren, hybridisiert und mit ECL Reagenz visualisiert.

Die Ubiquitinierung von Proteinen wird in dem gezeigten Experiment anhand der charakteristischen Protein-Leiter (siehe Abbildung 25), die nach Hybridisieren der Membran mit einem gegen p53 gerichteten Antikörper sichtbar wird, deutlich (Ubiquitinierung). Nach Transfektion von Mdm2 und Aurora A ist eine Zunahme der Ubiquitinierung des p53 Proteins zu erkennen, im Vergleich zur Transfektion von Mdm2 ohne Aurora A. Dadurch lässt sich bestätigen, dass Aurora A die Ubiquitinierung von p53 tatsächlich induziert.

Der proteasomale Abbau des p53 Proteins hängt von seiner Ubiquitinierung durch E3 Ligasen ab. Neben Mdm2 können auch andere E3 Ligasen, wie Pirh2 und COP1 das p53 Protein ubiquitinieren. Eine Inaktivierung dieser alternativen E3 Ligasen durch Aurora A könnte ebenfalls zur Stabilisierung des p53 Proteins beitragen. Wenn aber das Konzept stimmt, dass bei Inhibition von Aurora A die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins hypophosphoryliert ist, dann sollte die Zunahme der Ubiquitinierung des p53 Proteins Mdm2-abhängig sein. Um dies zu testen wurde die Ubiquitinierungs-Analyse mit und ohne ektoptisch exprimiertes Mdm2 Protein wiederholt. Dazu wurden H1299 Zellen mit cDNA, die

# ERGEBNISSE

für p53, Mdm2, His<sub>6</sub>Ubiquitin und V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Die Proben wurden anschließend wie oben beschrieben aufgearbeitet.



**Abbildung 26: Die Induktion der Ubiquitinierung des p53 Proteins durch Aurora A ist Mdm2 abhängig**

H1299 Zellen wurden mit einer cDNA, die für p53, Mdm2, His<sub>6</sub>Ubiquitin und V5-Aurora A kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach Transfektion geerntet und in 6 mL PBS resuspendiert. 1 mL davon wurde für die Kontrolle abgenommen und mit NP-40 Lysispuffer inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in 7 mL Guanidinium-Lysispuffer resuspendiert und mit 75 µL Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Agarose gewaschen und die Proteine in 60 µL Elutionspuffer eluiert. Diese Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Mdm2, p53, V5 (Aurora A) und PCNA gerichtet waren, hybridisiert und mit ECL Reagenz visualisiert.

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass die Ubiquitinierung des p53 Proteins, die durch Aurora A verstärkt wird, streng von Mdm2 abhängt. Es konnte das Ergebnis aus Abbildung 25 bestätigt werden, dass bei ansteigender Aurora A Menge bei Anwesenheit von Mdm2 die Ubiquitinierung von p53 zunimmt. Im Gegensatz dazu konnte bei den Proben, die nicht mit Mdm2 transfiziert worden waren, keine Ubiquitinierung nachgewiesen werden. Die Ubiquitinierung, die durch Aurora A induziert wird ist also Mdm2 abhängig.

# ERGEBNISSE

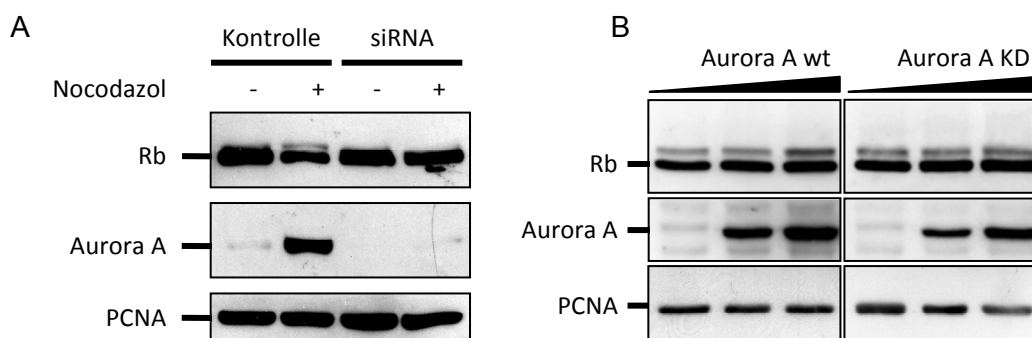
## 3.8 Einfluss von Aurora A auf das Retinoblastom Protein - einem Bindungspartner von Mdm2

Neben dem Abbau des p53 Proteins kann das Mdm2 Protein auch den Abbau des Rb Proteins steuern (Hsieh et al., 1999; Sdek et al., 2004).

Um zu untersuchen ob Aurora A auch in die Regulation des Rb Proteins eingreifen kann, wurden U2OS Zellen mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen Nocodazol zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen.

Außerdem wurde ein gegensätzliches Experiment durchgeführt, wo H1299 Zellen entweder mit einer cDNA, die für das V5-Aurora A Wildtyp Protein kodiert, oder mit einer cDNA, die die Kinase defiziente Form der V5-Aurora A (KD) kodiert, in ansteigenden Mengen transfiziert. Die Kinase-defiziente Aurora A trägt eine Punktmutation an Lysin 162 (K162R) und ist dadurch inaktiv. Die Zellen wurden 40 Stunden nach Transfektion lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die Membranen der beiden Experimente wurden mit Antikörpern, die gegen Rb, Aurora A und PCNA gerichtet waren, inkubiert und die Proteine mit Hilfe des ECL Reagenz sichtbar gemacht.



**Abbildung 27: Aurora A bewirkt keine Änderung der Proteinmenge von Rb**

**A)** U2OS Zellen wurden mit einer gegen das Aurora A Protein gerichteten siRNA bzw. mit einer Kontroll siRNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen Nocodazol in einer Endkonzentration von 0.6 µg/mL zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und 50 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Rb, Aurora A und PCNA gerichtet waren, inkubiert und mittels ECL sichtbar gemacht. **B)** H1299 Zellen wurden mit 0 µg, 10 µg und 15 µg einer cDNA, die für das Aurora A Wildtyp Protein kodiert transfiziert. Im Vergleich dazu erfolgte die Transfektion mit 0 µg, 10 µg und 15 µg einer cDNA, die für eine Kinase-defiziente Mutante von Aurora A (KD) kodiert, transfiziert. Die Zellen wurden 40 Stunden nach Transfektion geerntet und die Zellen lysiert. Die Proteine wurden wie unter A) beschrieben weiter verarbeitet und analysiert.

## ERGEBNISSE

---

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, hat sich nach Entfernung von Aurora A und nach der Mengenzunahme von Aurora A die Menge des Rb Proteins nicht wesentlich verändert. Auffällig ist aber, dass das Signal, welches oberhalb des Rb Proteins zu sehen ist, durch Aurora A beeinflusst wird (siehe Abbildung 27 A). Nach Arrest der Zellen in der Mitose nimmt die Menge an Aurora A stark zu. Hier tritt ein zusätzliches Signal oberhalb der Bande für Rb auf. Nach siRNA Behandlung verschwindet dieses Signal gemeinsam mit der Reduktion der Proteinmenge von Aurora A. In den Proben, in denen die Zellen nicht mit Nocodazol arretiert wurden, ist weder Aurora A noch eine zusätzliche Bande des Rb Proteins nachzuweisen.

Im zweiten Experiment, wo die Zellen mit ansteigender Aurora A transfiziert worden waren, ist deutlich eine zusätzliche Bande oberhalb des Rb Proteins zu sehen (siehe Abbildung 27 B). Bei Zunahme der Proteinmenge von Aurora A Wildtyp steigt dieses Signal an. Bei der Zunahme der Proteinmenge der Kinase-defiziente Form von Aurora A konnte ein solcher Anstieg hingegen nicht beobachtet werden.

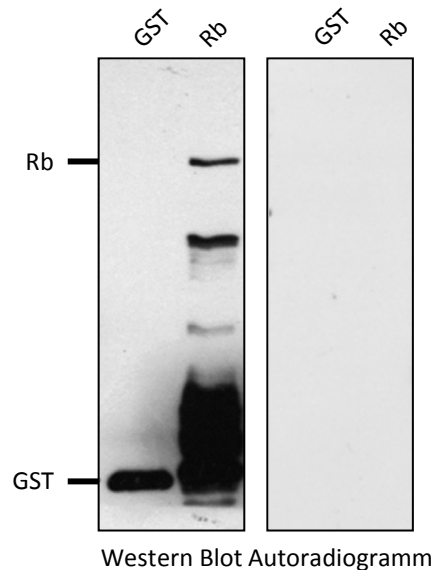
### **3.9 Aurora A phosphoryliert das Rb Protein *in vitro* bei Anwesenheit des Mdm2 Proteins**

In Zellen konnte gezeigt werden, dass Aurora A Einfluss auf ein Signal nimmt, welches ein geringfügig höheres Molekulargewicht zeigt, als das Rb Protein. Da diese Bande durch denselben Antikörper erkannt wird, wie das Rb Protein selbst, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um modifiziertes Rb Protein handelt. Möglicherweise handelte es sich dabei um die Phosphorylierung des Rb Proteins, die durch Aurora A beeinflusst wird.

Um zu untersuchen, ob das Rb Protein durch die Kinase Aurora A phosphoryliert werden kann, wurde das Rb Protein in Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Das Rb Protein wurde mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Um zu überprüfen, ob das Rb Protein in dem Ansatz enthalten war, wurde die PVDF-Membran vor der Autoradiografie mit einem GST-Antikörper hybridisiert und mit Hilfe von ECL entwickelt.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 28: Aurora A phosphoryliert das Rb Protein *in vitro* nicht direkt**

GST-Rb wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen GST hybridisiert, um das Rb Protein nachzuweisen (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert um die Phosphorylierung sichtbar zu machen (Autoradiogramm).

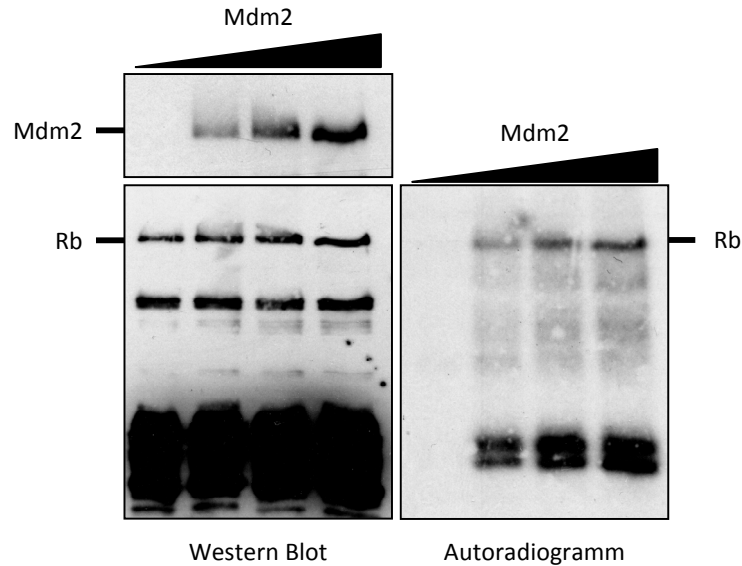
Aus Abbildung 28 wird deutlich, dass Aurora A das Rb Protein nicht direkt phosphorylieren kann. Während im Western Blot ein Signal für das Rb Protein vorhanden ist, konnte im Autoradiogramm keine Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Da das Mdm2 Protein an das Rb Protein binden kann und in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass Mdm2 mit Aurora A interagiert, könnte das Mdm2 Protein möglicherweise als Plattform dienen, wo die Aurora A und Rb in Kontakt treten. Dadurch könnte die Phosphorylierung des Rb Proteins durch Aurora A ermöglicht werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt, wobei den Ansätzen Mdm2, welches in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt worden war, in ansteigenden Konzentrationen zugegeben wurde. Das Rb Protein wurde mit diesem Mdm2 Protein versetzt und mit Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Um zu überprüfen, ob das Mdm2 Protein im Ansatz enthalten war, wurde die PVDF-Membran mit einem Antikörper, der gegen Mdm2 gerichtet

## ERGEBNISSE

war hybridisiert. Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen GST ermittelt, ob das Rb Protein in allen Proben mit gleicher Konzentration eingesetzt worden war. Die Signale wurden mit dem ECL Reagenz visualisiert.



**Abbildung 29: Aurora A phosphoryliert das Rb Protein *in vitro* bei Anwesenheit von Mdm2**

GST-Rb wurde in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. 250 ng davon wurden mit 25 mU Aurora A in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und von 0 ng, 5 ng, 10 ng, 15 ng aufgereinigtem Mdm2 Protein 25 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen GST und gegen Mdm2 gerichtet waren, hybridisiert. Der Western Blot wurde nach der ECL Methode entwickelt (Western Blot). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm).

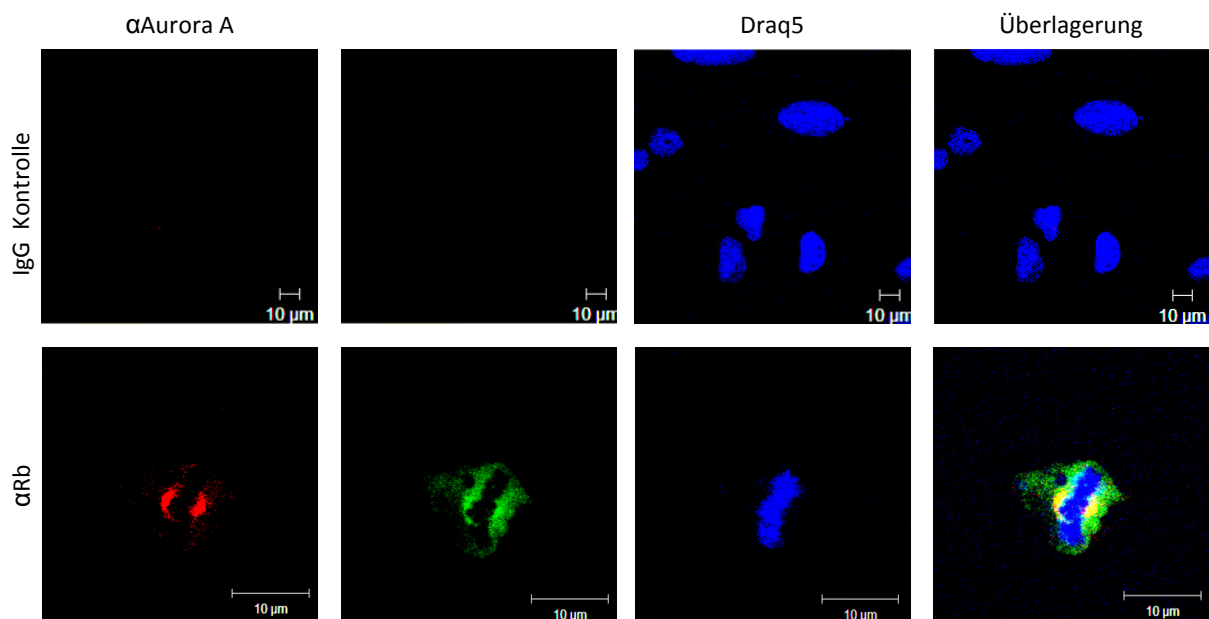
Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, konnte die Hypothese bestätigt werden. Das Rb Protein kann nicht direkt durch Aurora A phosphoryliert werden. Wenn aber Mdm2 anwesend war, konnte das Rb Protein durch Aurora A phosphoryliert werden. Dabei war mit zunehmender Menge des Mdm2 Proteins eine Zunahme der Phosphorylierung des Rb Proteins zu beobachten. Mdm2 kann also tatsächlich als Plattform dienen, wo die Phosphorylierung von Rb durch Aurora A möglich wird.

# ERGEBNISSE

## 3.10 Aurora A und das Rb Protein kolokalisieren *in vivo*

Wenn Aurora A tatsächlich eine physiologische Kinase des Rb Proteins ist, dann sollten diese beiden Proteine miteinander interagieren. Zwar ist hier eine transiente Interaktion zu erwarten, aber damit die Phosphorylierung des Rb Proteins durch Aurora A möglich wird, sollten die beiden Proteine in der Zelle kolokalisieren.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden U2OS Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert und nachdem sie ca. 60% Konfluenz erreicht hatten fixiert, permeabilisiert, und mit Antikörpern gegen Aurora A und Rb hybridisiert. Danach wurden die Zellen mit einem zweiten Antikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, inkubiert. Zusätzlich wurde das Chromatin mit einem in die DNA interkalierenden Farbstoff (Draq5) angefärbt und die Zellen auf einem Objektträger eingebettet. Für die Auswertung wurden ausschließlich Zellen in Betracht gezogen, die sich in der M-Phase befanden.



**Abbildung 30: Aurora A kolokalisiert mit dem Rb Protein an den Zentriolen**

U2OS Zellen wurden auf Glasdeckgläschen kultiviert und nachdem sie ca. 60% Konfluenz erreicht hatten mit 4% PFA 20 min fixiert, mit 0.5% Triton X-100 in PBS 10 min permeabilisiert und mit Blockierlösung (1% BSA (w/v); 1% Ziegen Serum (v/v) in PBS) 30 min blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern, die gegen Aurora A und Rb gerichtet waren in Blockierlösung 1.5 Stunden bei Raumtemperatur hybridisiert. Danach folgte die Inkubation mit den zweiten Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren (Alexa-546, rot; Alexa-488, grün). Zur Kontrolle wurden Zellen eingesetzt, die nur mit dem zweiten Antikörper hybridisiert worden waren (IgG Kontrolle). Zusätzlich wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Draq5 (blau) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen in Hydromount auf einem Objektträger eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica, LSM 510).



## ERGEBNISSE

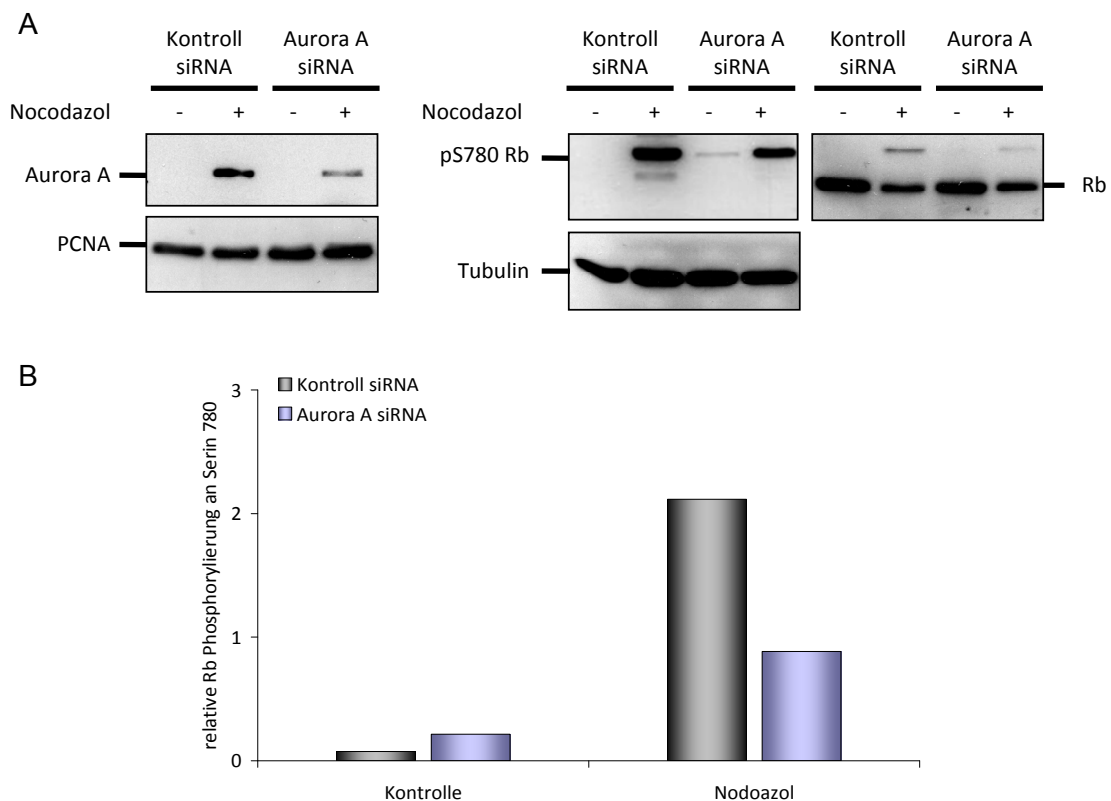
---

In Abbildung 30 ist zu sehen, dass Aurora A tatsächlich mit dem Rb Protein kolokalisiert. Aurora A ist, wie bereits beschrieben, an den Zentriolen der mitotischen Spindel lokalisiert. Die Färbung des Rb Proteins zeigt hier eine stärkere Intensität, auch wenn Rb noch außerhalb der Zentriolen auftritt.

### **3.11 Aurora A beeinflusst *in vivo* die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780**

Die Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des Rb Proteins durch Cdk Kinasen ist wichtig für die Progression des Zellzyklus und ermöglicht erst die Zellteilung (Lundberg und Weinberg, 1998). Für das Rb Protein wurde die Phosphorylierung an Serin 780 während der Mitose beschrieben (Jacobberger et al., 2008). Da Aurora A eine mitotische Kinase ist, liegt die Vermutung nahe, dass Aurora A das Rb Protein während der Mitose an Serin 780 phosphoryliert. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden U2OS Zellen mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Nocodazol behandelt, um die Zellen in der M-Phase zu arretieren. Die Proben wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert. Eine zweite Membran wurde mit Rb und Tubulin (Ladekontrolle) Antikörpern hybridisiert. Zusätzlich wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch das phosphorylierte Serin 780 auf dem Rb Protein als Epitop bindet. Die Proteine wurden mittels ECL Reagenz sichtbar gemacht.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 31: Die Rb Phosphorylierung an Serin 780 nimmt nach Aurora A siRNA Behandlung ab**

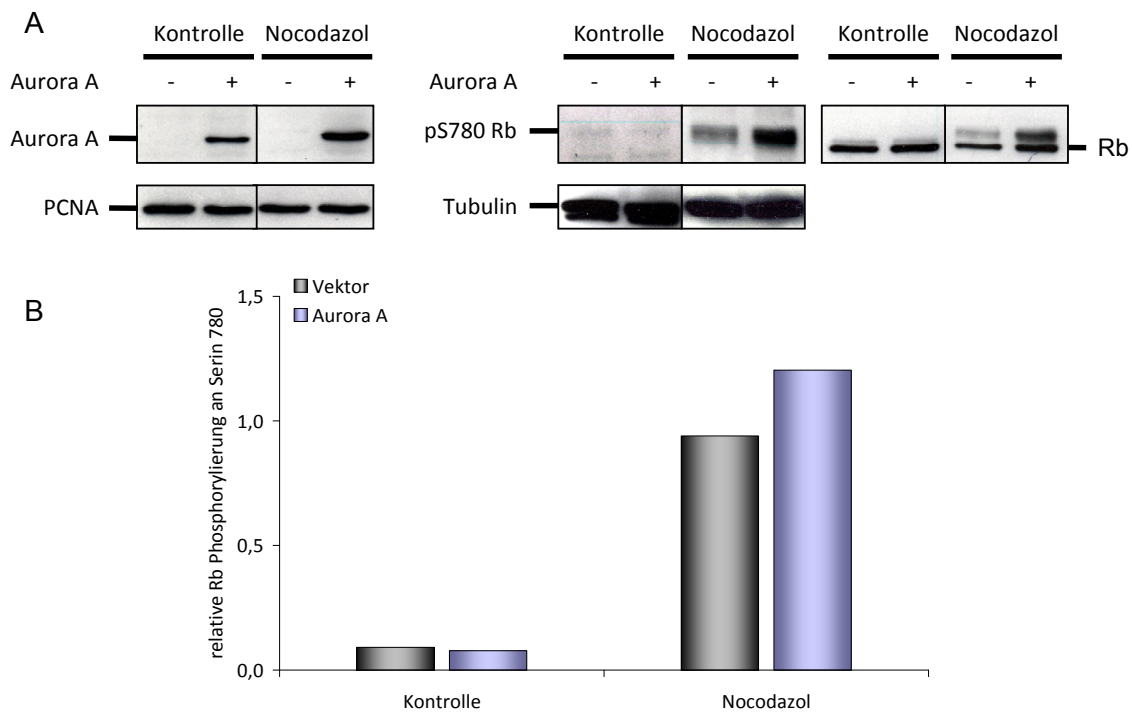
**A)** U2OS Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA, oder mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen Nocodazol in einer Endkonzentration von 0.6 µg/mL, oder als Kontrolle DMSO zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, 50 µg des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert. Eine zweite Membran wurde mit Antikörpern, die gegen phosphoSerin780 Rb und gegen Tubulin (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert. Die Proteine wurden mit dem ECL Reagenz visualisiert. Danach wurde die Membran, die mit dem phosphoSerin780 Rb Antikörper inkubiert worden war, mit dem Antikörper, der gegen das Rb Protein gerichtet war, rehybridisiert und mittels ECL Reagenz die Proteine nachgewiesen. **B)** Die Signale wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert und ausgewertet. Dabei wurde die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 zur Proteinmenge des Rb Proteins normalisiert. Die relative Rb Phosphorylierung an Serin 780 wurde grafisch dargestellt.

Aus Abbildung 31 geht hervor, dass die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 ausschließlich in der Mitose auftritt. Dies konnte mit einem spezifischen Antikörper gezeigt werden, der als Epitop Serin 780 auf dem Retinoblastom Protein nur dann erkennt, wenn es phosphoryliert ist. In den Nocodazol behandelten Zellen konnte auch Aurora A nachgewiesen werden, wohingegen in nicht arretierten Zellen weder Aurora A exprimiert wurde, noch die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 auftrat. In Abbildung 31 B) ist die relative Phosphorylierung von Rb an Serin 780 dargestellt. Es wird besonders in

# ERGEBNISSE

Nocodazol behandelten Zellen deutlich, dass nach Aurora A Inhibition mittels siRNA die Rb Phosphorylierung an Serin 780 abnahm.

Um das vorhergehende Experiment zu bestätigen wurden H1299 mit einer cDNA, welche für V5-Aurora A kodiert, transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurde den Zellen Nocodazol zugegeben und 24 Stunden inkubiert. 40 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Aurora A und PCNA gerichtet waren, hybridisiert. Die Phosphorylierung von Rb wurde auf einer separaten Membran nachgewiesen. Dabei erfolgte die Hybridisierung mit Antikörpern, die gegen Rb, phospho Serin 780 Rb und Tubulin gerichtet waren. Die Proteine wurden mittels ECL Reagenz detektiert.



**Abbildung 32: Die Rb Phosphorylierung an Serin 780 nimmt nach Mengenzunahme von Aurora A zu**

**A)** H1299 Zellen wurden mit einer cDNA, die für V5-Aurora A kodiert transfiziert. 16 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen Nocodazol in einer Endkonzentration von 0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , oder als Kontrolle DMSO zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. 40 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, 50  $\mu\text{g}$  Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Eine Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Aurora A (V5) und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert. Eine zweite Membran wurde mit Antikörpern, die gegen phosphoSerin780 Rb und gegen Tubulin (Ladekontrolle) gerichtet waren, hybridisiert. Die Proteine wurden mit dem ECL Reagenz visualisiert. Danach wurde die Membran, die mit dem phosphoSerin780 Rb Antikörper inkubiert worden war, mit einem Antikörper, der gegen das Rb Protein gerichtet war rehybridisiert und mittels ECL Reagenz detektiert. **B)** Die Signale wurden mit Hilfe der Image J Software quantifiziert und ausgewertet. Dabei wurde die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 zur Proteinmenge des Rb Proteins normalisiert. Die relative Rb Phosphorylierung an Serin 780 wurde grafisch dargestellt.

## ERGEBNISSE

---

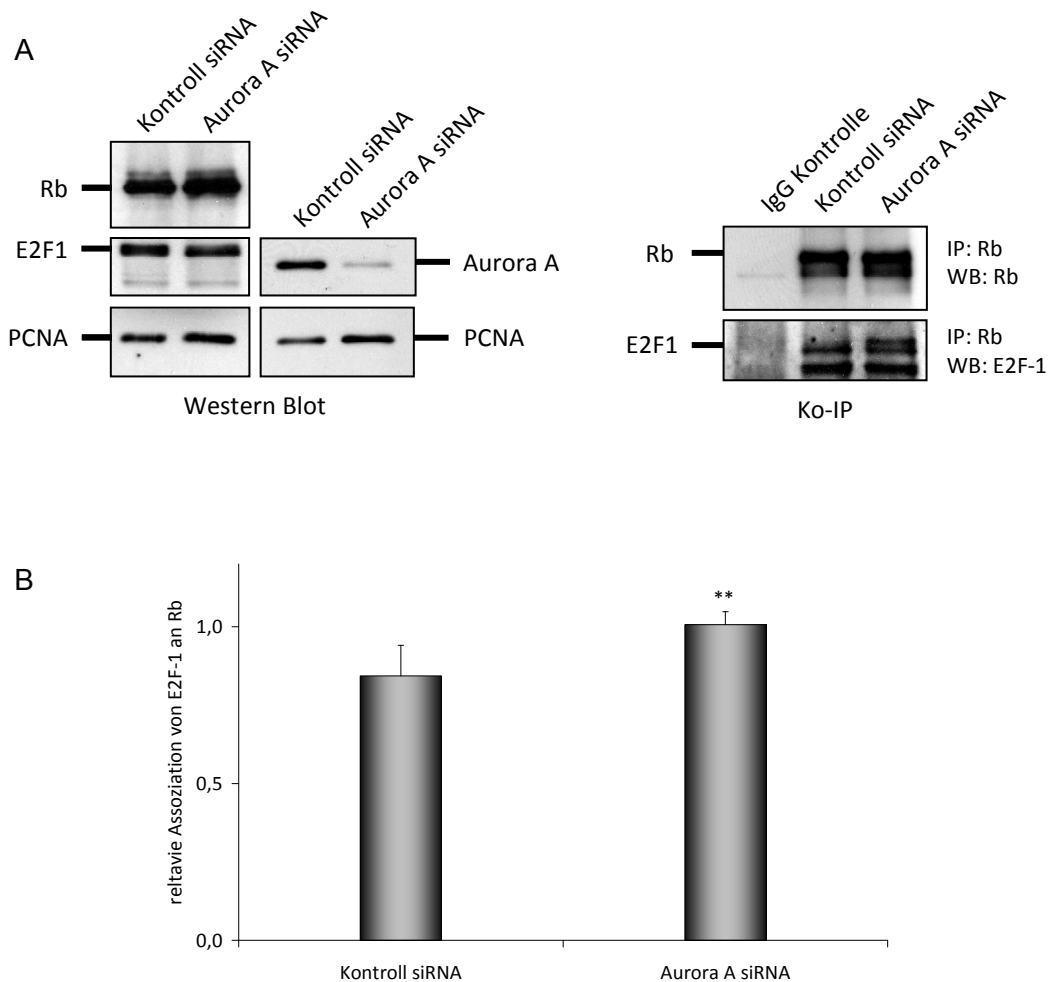
In Abbildung 32 ist gezeigt, dass nach Mengenzunahme des Aurora A Proteins auch die Phosphorylierung von Rb an Serin 780, in den Zellen die mittels Nocodazol in der Mitose arretiert waren, zunimmt. Damit konnte also bestätigt werden, dass Aurora A während der Mitose Einfluss auf die Phosphorylierung des Rb Proteins an Serin 780 hat.

### **3.12 Aurora A reduziert die Assoziation des Rb Proteins mit dem E2F-1 Protein**

Da bis hier hin gezeigt werden konnte, dass Aurora A in der Mitose an der Phosphorylierung des Rb Proteins teilnimmt, stellte sich die Frage, welche physiologische Bedeutung diese Phosphorylierung hat. Das Rb Protein ist, mit Ausnahme der frühen G1-Phase, während dem Zellzyklus phosphoryliert und bindet aufgrund der Phosphorylierung nicht an die E2F Proteine (Hamel et al., 1992; Weintraub et al., 1995). Die E2F Proteine können dann als Transkriptionsfaktor die Expression ihrer Zielgene aktivieren (Mittnacht, 1998; Sherr, 1996). Vor diesem Hintergrund liegt es nahe zu testen, ob die Phosphorylierung des Rb Proteins durch Aurora A die Assoziation des Rb Proteins an E2F Proteine steuert.

Um dies zu untersuchen, wurden U2OS Zellen mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA transfiziert. Um die Zellen in der M-Phase zu arretieren wurde den Zellen 24 Stunden nach Transfektion Nocodazol zugegeben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Rb Protein immunpräzipitiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit einem gegen das E2F-1 Protein gerichteten Antikörper wurde schließlich kopräzipitiertes E2F-1 Protein nachgewiesen. Außerdem wurde die Membran mit einem Antikörper, der gegen Rb gerichtet war, hybridisiert um zu zeigen, dass gleiche Mengen Rb Protein immunpräzipitiert worden waren (Ko-IP). Zusätzlich wurde ein Teil der Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit den Antikörpern, die gegen Rb, Aurora A, E2F-1 und PCNA gerichtet waren, hybridisiert (Western Blot).

# ERGEBNISSE



**Abbildung 33: Aurora A reduziert die Assoziation des Rb Proteins mit dem E2F-1 Protein**

**A)** U2OS Zellen wurden mit einer gegen Aurora A gerichteten siRNA oder mit einer Kontroll siRNA transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen Nocodazol in einer Endkonzentration von 0.6 µg/mL bzw. DMSO als Kontrolle zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und 800 µg Gesamtprotein in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurde das Lysat mit 20 µL Protein A Sepharose, an die ein Antikörper gegen Rb gekoppelt worden war, versetzt. Die Ko-IP erfolgte in 2 Stunden bei 4°C. Die Komplexe wurden anschließend gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem gegen das Rb Protein gerichteten Antikörper hybridisiert, um immunpräzipitiertes Rb Protein zu visualisieren. Das kopräzipitierte E2F-1 Protein wurde mit einem gegen dieses Protein gerichteten Antikörper nachgewiesen (Ko-IP). Zur Kontrolle wurden 50 µg Protein aus dem Zell-Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern, die gegen Rb, E2F-1, Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren hybridisiert und mit ECL detektiert (Western Blot). **B)** Die Signale von A) wurden mittels Image J Software quantifiziert und die Signale für ko-immunpräzipitiertes E2F-1 Protein gegen die Signale für das immunpräzipitierte Rb Protein normalisiert und als relative Assoziation von E2F-1 an das Rb Protein aufgetragen. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte, die mit der Standardabweichung und der statistischen Signifikanz dargestellt sind (\*\* p<0.01).

## ERGEBNISSE

---

Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass Aurora A tatsächlich einen Einfluss auf die Interaktion des Rb Proteins mit dem Transkriptionsfaktor E2F-1 hat. Es konnte gezeigt werden, dass nach Inhibition von Aurora A mittels siRNA, die Menge an kopräzipitiertem E2F-1 Protein anstieg. Diese Zunahme war statistisch sehr signifikant (\*\* $p < 0.01$ ) und deutet darauf hin, dass Aurora A tatsächlich mit der Bindung des Rb Proteins an das E2F-1 Protein interferiert.

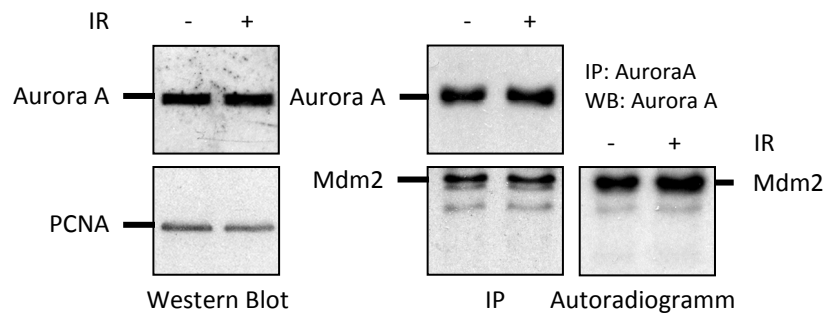
### 3.13 Aurora A wird nach ionisierender Strahlung nicht inhibiert

Die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins, innerhalb derer auch Aurora A verschiedene Serine phosphoryliert, zeigt nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung eine Reduktion in der Phosphorylierung (Blattner et al., 2002). Kinasen, welche die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins *in vivo* phosphorylieren, sollten demnach durch ionisierende Strahlung inaktiviert werden. Daher stellte sich die Frage ob Aurora A durch ionisierende Strahlung inaktiviert wird.

Zu diesem Zweck wurden U2OS Zellen mit 7.5 Gray ionisierender Strahlung behandelt. Zwei Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und Aurora A immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierte Kinase wurde mit bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem GST-Mdm2 Protein (zentrale Domäne) in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran die Proteine nachgewiesen. Dabei wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Aurora A hybridisiert um sicher zu gehen, dass mit und ohne Bestrahlung gleiche Mengen der Kinase vorhanden waren. Außerdem wurde die Membran mit einem gegen GST gerichteten Antikörper hybridisiert, um das eingesetzte Mdm2 zu visualisieren (IP). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm). Des Weiteren wurde ein Teil des Zell-Lysats als Kontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Aurora A und gegen PCNA hybridisiert (Western Blot).

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 34: Die Aktivität von Aurora A ist nach ionisierender Strahlung unverändert**

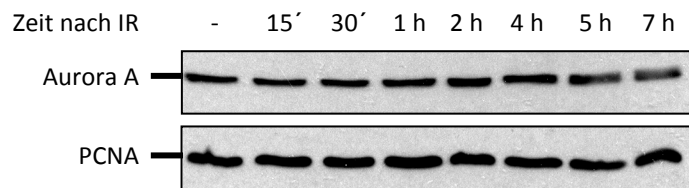
U2OS Zellen wurden mit 7.5 Gy ionisierender Strahlung behandelt. 2 Stunden danach wurden die Zellen lysiert und 1 mg Gesamtprotein in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurden 20  $\mu$ L Protein A Sepharose eingesetzt, an die ein Antikörper gegen Aurora A gekoppelt worden war. Die Proben wurden mit der Protein A Sepharose versetzt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Komplexe wurden anschließend gewaschen und das an die Protein A Sepharose gebundene Aurora A Protein mit 250 ng GST-Mdm2 (aa190-305) in Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP eine Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran die Proteine mit Antikörpern, die gegen Aurora A oder gegen GST gerichtet waren, nachgewiesen (IP). Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert (Autoradiogramm). Zur Kontrolle wurden 50  $\mu$ g Protein aus dem Zell-Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern, die gegen Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren hybridisiert und mit ECL detektiert (Western Blot).

In Abbildung 34 konnte 2 Stunden nach Bestrahlung keine Inaktivierung von Aurora A beobachtet werden. Die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins wurde in gleichem Ausmaß phosphoryliert, unabhängig davon, ob Aurora A aus bestrahlten oder aus unbehandelten Zellen präzipitiert worden war.

Allerdings könnte die Aktivität von Aurora A auch durch eine Änderung der Proteinmenge beeinflusst werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden U2OS Zellen mit 7.5 Gy ionisierender Strahlung behandelt und zu den in Abbildung 35 angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem gegen das Aurora A Protein gerichteten Antikörper hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einem PCNA Antikörper hybridisiert und die Proteine mit dem ECL Reagenz visualisiert.

# ERGEBNISSE

---



**Abbildung 35: Die Proteinmenge von Aurora A ändert sich nicht nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung**

U2OS Zellen wurden mit 7.5 Gy ionisierender Strahlung behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Pro Zeitpunkt wurden 50 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern, die gegen Aurora A und PCNA (Ladekontrolle) gerichtet waren hybridisiert und mit ECL detektiert.

In Abbildung 35 ist gezeigt, dass bei der Ernte der Zellen bis zu 7 Stunden nach Bestrahlung die Proteinmenge der Aurora A Kinase unverändert bleibt. Die Aktivität von Aurora A wird also nicht durch eine Veränderung in der Proteinmenge nach ionisierender Strahlung beeinflusst.



# DISKUSSION

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Aurora A ist eine physiologische Kinase von Mdm2

Die Phosphorylierung der zentrale Domäne des Mdm2 Proteins ist für den effektiven Abbau des p53 Proteins wichtig (Blattner et al., 2002). Kinasen, die Mdm2 in der zentralen Domäne phosphorylieren können sind CKII, CK1 $\delta$  und GSK3 $\beta$  (Allende-Vega et al., 2005; Gotz et al., 1999; Kulikov et al., 2005; Winter et al., 2004).

Es ist möglich, dass es weitere Kinasen gibt, die den zentralen Bereich des Mdm2 Proteins phosphorylieren. Ein weiterer Kandidat, Aurora A, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Aurora A ist eine Kinase, die während der Mitose die höchste Aktivität besitzt (Bischoff et al., 1998; Kimura et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass Aurora A sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Mdm2 Protein phosphoryliert. In einem *in vitro* Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Aurora A humanes und murines Mdm2 Protein in der zentralen Domäne phosphoryliert (siehe Abbildung 9 bis Abbildung 12).

Zwar phosphoryliert Aurora A die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins *in vitro* und *in vivo*, allerdings konnte keine spezifische Phosphorylierungs-Stelle identifiziert werden. In einem Experiment wurden Punktmutanten der zentralen Domäne von Mdm2 eingesetzt. Bei diesen Fragmenten wurden sukzessive alle Serine durch Alanine ausgetauscht, die nicht mehr phosphoryliert werden können. Als diese Protein-Fragmente mit Aurora A *in vitro* phosphoryliert wurden, korrelierte die Abnahme der Phosphorylierung mit der Zunahme der ausgetauschten Serine. Aurora A kann demnach als Kinase der zentralen Domäne angesehen werden, allerdings konnte hier keine Stelle gezeigt werden, wo die Phosphorylierung signifikant abnahm. Für die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins scheint vielmehr der gesamte zentrale Bereich wichtig zu sein (siehe Abbildung 14).

Die *in vitro* nachgewiesene Phosphorylierung hat möglicherweise eine physiologische Bedeutung, wie dies aus der inkorporierten Phosphatmenge von bis zu 200% hervorgeht (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Allerdings ist diese Phosphorylierung für den Fall dass alle 13 Serin-Reste in der zentralen Domäne durch Aurora A phosphoryliert werden nicht mehr all zu aussagkräftig, da sich dann die Phosphat-Inkorporation pro Serin noch auf 15% beläuft.

Die Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A konnte aber in einem *in vivo* Experiment nachgewiesen werden. Daher ist durchaus denkbar, dass Aurora A wichtig für die Regulation

## DISKUSSION

---

von Mdm2 ist, indem diese Kinase den Phosphorylierungs-Status der gesamten zentralen Domäne sicher stellt. Bei diesem Vorgang würde die Phosphorylierung nicht spezifisch an einem Serin statt finden, sondern alle Serine der zentralen Domäne einbeziehen, die dann alle bis zu einem bestimmtem Maß phosphoryliert werden. Es ist auch denkbar, dass sich dabei das Phosphorylierungs-Muster der zentralen Domänen verschiedener Mdm2 Proteine unterscheidet. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Aurora A *in vivo* nur auf wenige Serine einen Phosphat Rest überträgt. Dies hätte insofern eine große Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass die Serine in der zentralen Domäne von Mdm2 unterschiedlich wichtig sind für den Abbau von p53. Dabei waren die Serine 240, 242, 246, 253, 256, 260 und 262 besonders entscheidend. Es könnte also sein, dass *in vivo* nur diese Serine der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins phosphoryliert werden.

Problematisch bei der Interpretation der Ergebnisse ist ferner, dass das Mdm2 Protein keine Aurora A Konsensus Sequenz R/K/N/R-S\*/T\*-B (B ist eine hydrophobe Aminosäure, mit Ausnahme von Prolin) enthält (Ferrari et al., 2005). Allerdings befinden sich unter den physiologisch nachgewiesenen Substraten von Aurora A unter anderem Histon H3, BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) und das p53 Protein (Crosio et al., 2002; Katayama et al., 2004; Ouchi et al., 2004). Alle diese Proteine werden von Aurora A phosphoryliert, obwohl keine Konsensus-Sequenz in der Primärstruktur dieser Proteine enthalten ist. Das bedeutet, dass Aurora A Proteine phosphorylieren kann, auch wenn keine Konsensus-Sequenz vorhanden ist. Eine Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A kann also allein durch das Fehlen einer Konsensus-Sequenz nicht ausgeschlossen werden.

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A physiologisch relevant ist, wurde die Translation von Aurora A durch eine gegen diese Proteinkinase gerichtete siRNA spezifisch inhibiert. Im Vergleich dazu wurden Zellen mit einer Kontroll siRNA behandelt. Dabei wird während der Inkubationszeit der Zellen das Mdm2 Protein in den siRNA behandelten Proben nicht mehr durch Aurora A phosphoryliert, weil diese hier inhibiert ist. Im Vergleich dazu findet die Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A in den Zellen, die mit der Kontroll siRNA transfiziert waren noch statt. Das endogene Mdm2 Protein wurde aus diesen Zellen immunpräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase Experiment mit rekombinanter Aurora A eingesetzt. Dabei konnte das Mdm2 Protein aus den Kontroll-Zellen nicht mehr phosphoryliert werden, weil es schon *in vivo* phosphoryliert worden war. Das Mdm2 Protein aus den Zellen, welche mit der siRNA transfiziert worden waren, war hingegen noch nicht *in vivo* phosphoryliert worden und konnte in dem *in vitro* Experiment durch rekombinante Aurora A phosphoryliert werden (siehe Abbildung 17). Die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins in diesem Experiment lässt den

## DISKUSSION

---

Schluss zu, dass das Mdm2 Protein ein physiologisches Substrat von Aurora A ist. Dabei konnte allerdings noch nicht endgültig geklärt werden, ob die Phosphorylierung in der zentralen Domäne statt findet. Um dies zu belegen sollte das Experiment wiederholt werden. Dabei sollte eine Mdm2 Mutante, deren zentrale Domäne deletiert ist ektopisch exprimiert werden. Wenn Aurora A das Mdm2 Protein auch unter physiologischen Bedingungen im zentralen Bereich phosphoryliert, dann sollte sich beim Einsatz einer solchen Deletionsmutante des Mdm2 Proteins kein Unterschied in der Phosphorylierung zeigen, unabhängig, ob eine gegen Aurora A gerichtete siRNA verwendet wurde oder nicht.

Wenn das Mdm2 Protein ein Substrat der Aurora A Kinase ist, dann sollten diese beiden Proteine in der Zelle assoziieren. Eine solche Interaktion ist vermutlich transient, da es sich hier um eine Enzym-Substrat Reaktion handelt. Sie sollte aber trotzdem nachweisbar sein.

Durch Ko-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Aurora A Proteinkinase mit dem Mdm2 Protein assoziiert (siehe Abbildung 18).

Diese Interaktion ist ferner direkt und erfordert keine weiteren Kofaktoren, da sie *in vitro* mit aufgereinigten Mdm2 und Aurora A Proteinen statt fand (siehe Abbildung 19).

Außerdem wurde in einer Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt, dass die beiden Proteine an den Zentriolen mitotischer Zellen kolokalisieren (siehe Abbildung 20). Im Gegensatz zu Aurora A trat das Mdm2 Protein aber auch außerhalb der Zentriolen auf. Da die Proteinkinase Aurora A während der Mitose aktiv ist, ist es wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora A an den Spindelpolen statt findet.

Neben Aurora A zählen auch die beiden Isoformen Aurora B und Aurora C zu der Familie der Aurora Proteinkinasen (Nigg, 2001). Alle drei Kinasen phosphorylieren das Mdm2 Protein *in vitro* (siehe Abbildung 21). Dabei ergab die Phosphorylierung des Mdm2 Proteins mit Aurora C das stärkste Signal im Autoradiogramm. Dieses Ergebnis legt den Schluss nah, dass Aurora C möglicherweise die spezifischste der Aurora Kinasen für das Mdm2 Protein sein könnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die drei Kinasen in ihrer Aktivität unterscheiden. Zwar wurde sorgfältig darauf geachtet, vergleichbare Mengen der Kinasen einzusetzen, die Kinasen wurden aber von unterschiedlichen Herstellern bezogen, so dass Abweichungen in der Präparation und in den Aktivitätsmessungen nicht ausgeschlossen werden können.

Nichtsdestoweniger weist dieses Experiment darauf hin, dass Aurora B und C analog zu Aurora A das Mdm2 Protein phosphorylieren können.

Allerdings ist dies für Aurora B aufgrund seiner Lokalisierung während der M-Phase eher unwahrscheinlich. Wie in Abbildung 20 gezeigt ist das Mdm2 Protein während der Mitose ausschließlich außerhalb der DNA lokalisiert. Aurora B hingegen befindet sich während der

# DISKUSSION

---

Mitose im Bereich der Kinetochoren, die sich im Zentrum der Chromatiden befinden (Andrews et al., 2003; Meraldi et al., 2004). Es wäre jedoch denkbar, dass beide Proteine in einer späteren Phase der Mitose kolokalisieren und damit eine Phosphorylierung des Mdm2 Proteins durch Aurora B möglich wird. Um dies zu klären, müssten weitere Immunfärbungen in späteren Stadien der Mitose durchgeführt werden.

Aurora C ist für die Regulation von Mdm2 in somatischen Zellen zweitrangig, da dieses Protein hauptsächlich Hoden-spezifisch exprimiert ist (Tang et al., 2006). Um aber eine Aussage darüber treffen zu können, ob Aurora C hier an der Phosphorylierung von Mdm2 beteiligt ist, fehlen weitere Untersuchungen in entsprechenden Zellen.

## 4.2 Aurora A reguliert die Menge des p53 Proteins

Da die Phosphorylierung des zentralen Bereichs von Mdm2 als entscheidender Faktor für die Degradation von p53 gilt (Blattner et al., 2002), wurde der Einfluss von Aurora A auf die Menge an p53 Protein ermittelt.

Wie schon von Katayama et al. gezeigt (Katayama et al., 2004), nahm die Menge des p53 Proteins zu, wenn die Menge an Aurora A in der Zelle reduziert wurde. Im Gegensatz dazu führte eine Mengenzunahme von Aurora A zur Verringerung der p53 Proteinmenge (siehe Abbildung 22). Katayama et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Phosphorylierung von p53 an Serin 315 durch Aurora A an dem Einfluss von Aurora A auf die Stabilität des p53 Proteins beteiligt ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p53 keine bedeutende Rolle für seinen Abbau spielt (Blattner et al., 1999). Zusätzlich wurde in immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit keine Kolokalisation von Aurora A und dem p53 Protein gefunden werden (siehe Abbildung 20). Dies spricht wiederum gegen die Schlussfolgerung von Katayama et al., dass der Einfluss von Aurora A auf p53 von der direkten p53 Phosphorylierung an Serin 315 abhängt und unterstreicht vielmehr den indirekten Effekt über die Mdm2 Regulation durch Phosphorylierung seiner zentralen Domäne durch Aurora A.

Ein wichtiger Punkt beim Einfluss der Aurora A Proteinkinase auf die Regulation von p53 ist dessen transkriptionelle Aktivität. In der Krebsforschung wurden in den letzten Jahren enorme Anstrengungen unternommen, um Therapien zu entwickeln, die zu einer Mengenzunahme des p53 Proteins und in der Folge zur Apoptose in Tumorzellen führt. Dabei ist es aber wichtig, dass das vorhandene p53 Protein auch aktiv ist und seine Zielgene aktivieren kann, die dann in Tumorzellen die Apoptose einleiten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das p53 Protein auch nach Reduktion der Aurora A Proteinkinase

## DISKUSSION

---

transkriptionell aktiv ist (siehe Abbildung 23). Die Werte waren zwar nicht besonders hoch, aber dennoch statistisch signifikant ( $***p < 0.05$ ) und geben so die Tendenz wider, dass durch Inhibition von Aurora A der Cdk Inhibitor p21 induziert werden kann, der dann Zellzyklus Arrest auslöst (Xiong et al., 1993). Diese Beobachtung ist sehr vielversprechend für den Einsatz von Aurora A Inhibitoren bei der Krebstherapie. Zwar würde eine Aktivierung der *p21* Gen-Expression nicht primär zur Apoptose führen, aber das p21 Protein würde als Inhibitor des ZyklinE/Cdk2 Kinase-Komplex zur Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase und damit zur Hemmung der Zellproliferation führen. Dadurch würde die Prognose bei vielen Tumorarten, wie zum Beispiel dem invasiv wachsenden malignen Melanom verbessert werden. Außerdem konnte für p21 eine Funktion bei der Seneszenz, die auch als Zellalterung bezeichnet wird, gezeigt werden (Kagawa et al., 1999). Dabei verlassen die Zellen den Zellzyklus endgültig und es kommt nicht mehr zu einer Zellteilung. Dieser Effekt wäre bei einer Krebstherapie ebenfalls von Nutzen. Außerdem konnte dem p21 Protein neben seiner Funktion als Cdk Inhibitor auch eine Rolle bei der Apoptose zugeordnet werden (Han et al., 2002). Dabei könnte eine Zunahme der p21 Proteinmenge in Tumorzellen zur Apoptose beitragen.

Die Halbwertszeiten der Mdm2 und p53 Proteine waren in der Mitose-Phase um ca. 10 min verkürzt. Bei Mdm2 verringerte sich die Halbwertszeit von 81 auf 71 min, bei dem p53 Protein von 119 auf 110 min (siehe Abbildung 24). Die Abnahme der Halbwertszeit von Mdm2 steht in Einklang mit den Daten von Gu et al., die eine Halbwertszeit für das Mdm2 Protein von 90 min in der S-Phase und von 45 min in der M-Phase ermittelten (Gu et al., 2003). Die Abweichung zu den Ergebnissen in der hier vorliegenden Arbeit kann dadurch erklärt werden, dass hier die Halbwertszeit von endogenem Mdm2 Protein in U2OS Zellen bestimmt wurde und außerdem die Zellen mittels Aphidicolin synchronisiert worden waren. Gu et al. hingegen bestimmten die Halbwertszeit von ektopisch exprimiertem Mdm2 in Zellen, die durch einen doppelten Thymidin-Block arretiert worden waren.

Unter physiologischen Bedingungen ist es wichtig, dass das p53 Protein effektiv abgebaut und so auf niedrigem Niveau gehalten wird. Der Abbau des p53 Proteins wird hauptsächlich durch das Mdm2 Protein vermittelt (Wu et al., 1993). Dabei ist für die effektive Degradation die Phosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins notwendig (Blattner et al., 2002; Hay und Meek, 2000). Eine Kinase, die bereits in diesem Kontext beschrieben wurde ist GSK3 $\beta$ , welche die zentrale Domäne von Mdm2 phosphorylieren kann (Kulikov et al., 2005). Die verringerte Halbwertszeit des p53 Proteins in der Mitose spricht für eine Zunahme der Degradation des p53 Proteins, welche eine effektive Phosphorylierung der zentralen

## DISKUSSION

---

Domäne erfordert. Dabei könnte die mitotische Aurora A Kinase über die Phosphorylierung der zentralen Domäne eine wichtige Funktion im Abbau des p53 Proteins haben. Die Aktivität von Aurora A könnte, da die oben beschriebene GSK3 $\beta$  während der Mitose an den Spindelpolen durch Protein Kinase B (PKB) inaktiviert wird von besonderer Bedeutung sein (Wakefield et al., 2003).

Aurora A könnte in der Mitose die Funktion von GSK3 $\beta$  übernehmen, die während den restlichen Zellzyklus-Phasen aktiv ist. Diese Bedeutung wird durch weitere Untersuchungen verstärkt, wo eine wechselseitige Wirkung von GSK3 $\beta$  und Aurora A gezeigt wurde. GSK3 $\beta$  aktiviert in der frühen Mitose-Phase Aurora A, indem es AIP (*Aurora interacting protein*) phosphoryliert und dadurch inaktiviert. AIP ist ein negativer Regulator von Aurora A, der seinerseits durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Fumoto et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Aurora A GSK3 $\beta$  an Serin 9 phosphoryliert, wodurch GSK3 $\beta$  inaktiviert wird (Dar et al., 2009). Wenn am Ende der Mitose Aurora A abgebaut wird, kann diese inaktivierende Phosphorylierung nicht mehr stattfinden. Damit ist GSK3 $\beta$  nicht länger durch Aurora A inhibiert und kann nun die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins wieder phosphorylieren. Diese beiden Kinasen hätten dann eine wichtige Funktion in der Degradation des p53 Proteins während des gesamten Zellzyklus.

Der Abbau des p53 Proteins wird über das Ubiquitin/Proteasom System vermittelt (Argentini et al., 2001; Honda und Yasuda, 1999). Da Aurora A die Menge des p53 Proteins reguliert, ist es naheliegend, dass Aurora A die Ubiquitinierung des p53 Proteins beeinflusst. Eine Mengenzunahme des Aurora A Proteins führte tatsächlich zu einer Zunahme der Ubiquitinierung des p53 Proteins (siehe Abbildung 25).

Die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins ist wichtig für die Ubiquitinierung des p53 Proteins (Kawai et al., 2003; Meulmeester et al., 2003). Hier befindet sich außerdem ein Bereich, an den das p53 Protein neben der N-terminalen Bindestelle mit dem Mdm2 Protein assoziiert (Kulikov et al., 2006; Ma et al., 2006; Yu et al., 2006a). Diese Assoziation wird durch Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 reguliert (Kulikov et al., 2006).

Es wäre daher denkbar, dass die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 durch Aurora A in der Mitose zur Zunahme der Bindung zwischen p53 und Mdm2 führt. Das p53 Protein würde daraufhin durch das Mdm2 Protein vermehrt ubiquitiniert und dadurch vermehrt abgebaut werden. Im Gegensatz dazu würde ein Mangel an Aurora A nicht mehr zur Phosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins beitragen, damit die Assoziation mit dem p53 Protein schwächen und die Ubiquitinierung nicht mehr ermöglichen. Neben Mdm2 können auch andere E3 Ligasen, wie Pirh2 und COP1 das p53 Protein ubiquitinieren (Dornan et al., 2004; Leng et al., 2003). Diese E3 Ligasen könnten, wie das

# DISKUSSION

---

Mdm2 Protein ebenfalls durch Aurora A reguliert werden und so den Einfluss von Aurora A auf die Ubiquitinierung des p53 Proteins vermitteln. Allerdings war in Zellen, die mit p53 und Aurora A transfiziert worden waren, kein Einfluss auf die Ubiquitinierung des p53 Proteins nachweisbar. Daraus ist zu schließen, dass der Einfluss von Aurora A auf die Ubiquitinierung des p53 Proteins Mdm2 abhängig ist (siehe Abbildung 26).

## 4.3 Aurora A phosphoryliert das Rb Protein

Da das Mdm2 Protein neben der Degradation des p53 Proteins auch die Degradation des Rb Proteins vermittelt (Hsieh et al., 1999; Xiao et al., 1995), wurde untersucht, ob die Phosphorylierung der zentralen Domäne des Mdm2 Proteins durch Aurora A möglicherweise auch den Abbau des Rb Proteins reguliert. Dabei wurde Aurora A durch siRNA Behandlung inhibiert und die Proteinmenge des Rb Proteins mittels SDS-PAGE und Western Blot bestimmt. Zwar war dabei kein Einfluss auf die Degradation des Rb Proteins zu beobachten, allerdings ergab sich in Abwesenheit von Aurora A eine Änderung der Modifikation des Rb Proteins (siehe Abbildung 27). Da die Phosphorylierung des Rb Proteins eine wichtige Bedeutung bei dessen Funktion hat und es sich bei Aurora A um eine Kinase handelt, lag die Vermutung nahe, dass Aurora A das Rb Protein phosphoryliert. In einem *in vitro* Experiment konnte Aurora A das Rb Protein aber nicht direkt phosphorylieren (siehe Abbildung 28). Erst in Gegenwart von Mdm2 war die Phosphorylierung von Rb durch Aurora A möglich (siehe Abbildung 29).

Das Mdm2 Protein bindet mit seiner zentralen Domäne an die C-Pocket Region des Rb Proteins (Xiao et al., 1995). Damit assoziiert das Mdm2 Protein sowohl mit dem Rb Protein, als auch mit Aurora A, wie dies in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (siehe Abbildung 30). Außerdem findet die Phosphorylierung des Rb Proteins nur in Anwesenheit von Mdm2 statt. Es ist daher denkbar, dass das Mdm2 Protein eine Plattform bildet, welche die Phosphorylierung des Rb Proteins durch Aurora A auch ohne direkte Assoziation mit Aurora A ermöglicht.

Die Aminosäure Serin 780 gilt als mitotische Phosphorylierungs-Stelle des Rb Proteins und wird auch als Marker für mitotische Zellen verwendet (Jacobberger et al., 2008). Da Aurora A während der Mitose maximal exprimiert und aktiv ist, wurde untersucht, ob Aurora A einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rb an dieser Stelle hat. Es konnte mit spezifischen Antikörpern *in vivo* gezeigt werden, dass nach Aurora A siRNA Behandlung die Phosphorylierung an Serin 780 abnahm. Im Gegensatz dazu wurde bei Mengenzunahme von Aurora A Serin 780 vermehrt phosphoryliert (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32). Außerdem phosphoryliert Aurora B das Rb Protein (Lin und Wang, 1992). Die

## DISKUSSION

---

Phosphorylierung konnte dabei auf Serin 780 eingegrenzt werden (Nair et al., 2009), derselben Stelle, die hier durch Aurora A phosphoryliert wurde. Da Aurora A und Aurora B in ihrer Kinase-Domäne zu 70% identisch sind (Bischoff et al., 1998; Giet und Prigent, 1999), wäre durchaus denkbar, dass diese beiden Kinasen einen redundanten Effekt auf die Phosphorylierung des Rb Proteins haben.

Rb kann im phosphorylierten Zustand nicht mehr an E2F-1 binden und es kommt zur Expression der E2F-1 Zielgene (Hamel et al., 1992; Weintraub et al., 1995). Daher wäre es denkbar, dass Aurora A über die Phosphorylierung des Rb Proteins die Assoziation von Rb und E2F-1 reguliert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine Verminderung der Aurora A Proteinmenge mittels siRNA führte zur vermehrten Bindung des Rb Proteins an das E2F-1 Protein (siehe Abbildung 33). Das unterstreicht die Vermutung, dass Aurora A über die Phosphorylierung des Rb Proteins einen Einfluss auf dessen Assoziation mit dem E2F-1 Protein hat.

### **4.4 Aurora A wird durch ionisierende Strahlung nicht beeinflusst**

Die zentrale Domäne von Mdm2 ist unter physiologischen Bedingungen an mehreren Serinen phosphoryliert. Nach Exposition von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung nimmt diese Phosphorylierung ab (Blattner et al., 2002). Kinasen, die in der Lage sind, den zentralen Bereich des Mdm2 Proteins unter physiologischen Bedingungen zu phosphorylieren, sollten demnach durch ionisierende Strahlung inaktiviert werden. Dies konnte zum Beispiel bei der Kinase GSK3 $\beta$ , die spezifisch den zentralen Bereich von Mdm2 phosphoryliert, beobachtet werden (Kulikov et al., 2005).

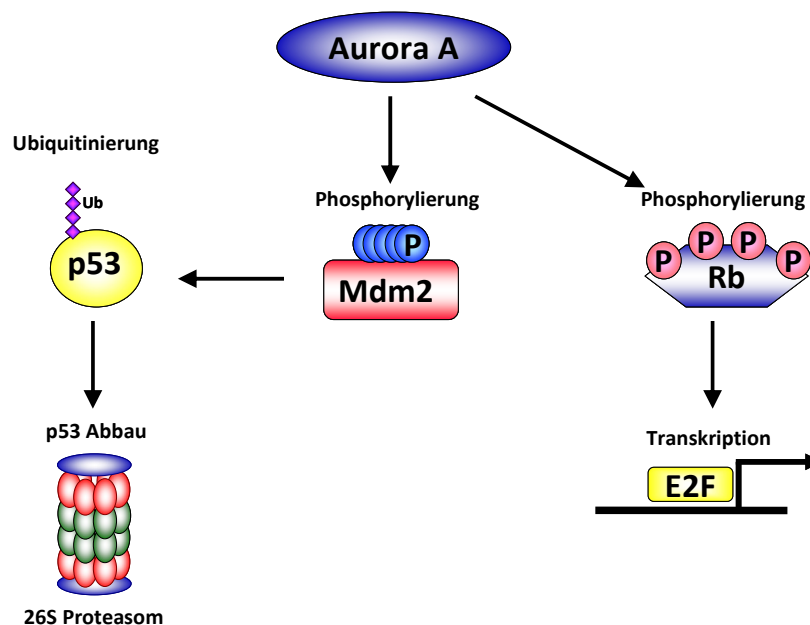
Da Aurora A die zentrale Domäne des Mdm2 Proteins phosphorylieren kann, sollte sofern sie eine physiologische Kinase des Mdm2 Proteins ist, ihre Aktivität nach ionisierender Strahlung abnehmen. Es ist bereits bekannt, dass Aurora A 10 Stunden nach Behandlung mit Etoposid inaktiviert wird (Krystyniak et al., 2006). Etoposid induziert wie die ionisierende Strahlung DNA-Doppelstrangbrüche. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Aktivität von Aurora A nach Bestrahlung der Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 34). Auch die Proteinmenge von Aurora A war nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung unverändert (siehe Abbildung 35) und es kann eine Reduktion der Phosphorylierung von Mdm2 aufgrund der Mengenabnahme der Kinase ausgeschlossen werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Aurora A an einer Mengenzunahme des p53 Proteins nach ionisierender Strahlung beteiligt ist.



# DISKUSSION

## 4.5 Aurora A reguliert die beiden Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb

Der korrekte Ablauf der Mitose ist von der richtigen Balance an Aurora Kinasen abhängig (Carmena und Earnshaw, 2003). Eventuell kommt dabei der Phosphorylierung des Rb Proteins durch Aurora A eine Funktion bei der zeitlichen Regulation der Mitose zu. Während der Mitose, solange Aurora A exprimiert wird und aktiv ist, wird das Rb Protein phosphoryliert und ist damit inaktiv. Dadurch entfällt seine Funktion als Repressor der E2F Proteine. Entsprechend werden die Zielgene der E2F Transkriptionsfaktoren, die für das Fortschreiten des Zellzyklus nötig sind, exprimiert (Mitnacht, 1998). Wenn am Ende der Mitose, nach erfolgter Trennung der Chromosomen und nach erfolgter Zytokinese Aurora A vermehrt über den APC/C Komplex abgebaut wird (Littlepage und Ruderman, 2002; Taguchi et al., 2002), kann die Rb Phosphorylierung durch Aurora A nicht mehr vermittelt werden. Das hypophosphorylierte Rb Protein wirkt dann in der frühen G1-Phase als Repressor der E2F Proteine und könnte damit zeitlich zum Ende der Mitose und zum Eintritt der Zelle in die G1-Phase führen. Für die Regulation von E2F würde das bedeuten, dass Aurora A über die Rb Phosphorylierung zur Aktivierung der E2F Zielgene beiträgt.



**Abbildung 36: Aurora A reguliert die beiden Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb**

Aurora A phosphoryliert das Mdm2 Protein in seiner zentralen Domäne. Dies gewährleistet den Abbau des p53 Proteins. Zusätzlich trägt Aurora A zur Ubiquitinierung des p53 Proteins bei. Aurora A phosphoryliert Rb in Gegenwart von Mdm2. Damit wird Rb inaktiviert und es kommt zur Freisetzung des E2F Proteins. E2F induziert dann die Expression seiner Zielgene, die zum Fortschreiten des Zellzyklus führen.

## DISKUSSION

---

Die Menge an p53 Protein während der Mitose kann durch Aurora A über die Phosphorylierung der zentralen Domäne von Mdm2 und den dadurch induzierten Abbau des p53 Proteins reguliert werden. Vor diesem Hintergrund hat Aurora A eine wichtige Funktion beim p53 Abbau und verhindert so unter physiologischen Bedingungen die Akkumulation von p53 und die Expression der p53 Zielgene während der Mitose.

Die Amplifikation von Aurora A trägt zur Tumorentstehung bei und es wurde beschrieben, dass Aurora Kinasen in Krebs-Tumoren deutlich in der Proteinmenge erhöht sind (Bischoff et al., 1998). Dabei könnte es nach den hier gezeigten Daten durch die Mengenzunahme von Aurora A zur Inaktivierung der Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb und damit zum Verlust des G1 Kontrollpunkts kommen. Allerdings ist diese Theorie eher unwahrscheinlich, weil die Zunahme von Aurora A nur dann zur Transformation von Zellen führte, wenn das p53 Gen deletiert oder mutiert ist (Meraldi et al., 2002).

## 5 ANHANG

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Alanin
A-Box/DAD	Aurora Box/D-Box aktivierende Domäne
AD	<i>acidic domain</i>
AIP	<i>Aurora interacting protein</i>
Apaf-1	<i>Apoptosis activating factor-1</i>
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/Cyclosome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Ark1	<i>Aurora related Kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basenpaare
Bax	<i>Bcl-X Activated ptotein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BRCA1	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
C	Cytosin
Cdc20	<i>cell-division cycle protein 20</i>
CDE/CHR	<i>cell cycle-dependent element/cell cycle gene homology region</i>
Cdh1	Cadherin-1
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
CK II	Casein kinase II
CK1δ	Casein kinase 1δ
COP1	<i>constitutive photomorphogenic protein 1</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Cu	Curie
Da	Dalton
D-Box	<i>destruction Box</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreithol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

# ANHANG

---

ECL	<i>enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FoxM1	Forkhead Box M1
fw	<i>forward</i>
G	Guanin
GADD	<i>growth arrest and DNA damage</i>
GSK3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray
h	Stunde
HBS	HEPES buffered Saline
HDAC	Histone Deazetylase
Hdm2	<i>human double minute 2</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfon-Säure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
INCENP	<i>inner centromer protein</i>
IP	Immunpräzipitation
Ip1	<i>Increase in ploidy 1</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
IR	Ionisierende Strahlung (ionizing radiation)
KD	Kinase defizient
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LATS	<i>long acting thyroid stimulator</i>
LB	Lennox-Broth
Mad2	<i>mitotic arrest deficient 2 protein</i>
Mdm2	<i>murine double minute 2</i>
MOPS	(3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NDEL1	<i>nuclear distribution protein nudE-like 1</i>
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Sequence</i>
NoLS	<i>Nucleolar Localisation Sequence</i>
NP-40	Nonylphenyl-polyethylene glycol
OD	optische Dichte
Pak1	<i>p21-activated kinase 1</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

# ANHANG

---

PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pirh2	<i>protein with RING-H2 domain</i>
PKB	Protein Kinase B (Akt)
Plk-1	<i>Polo like kinase 1</i>
PMSF	Phenylmethansulfonyl Fluorid
PP1	Proteinphosphatase 1
PUMA	<i>p53 upregulated mediator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	<i>reverse</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
S	Serin
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smc	<i>structural maintenance of chromosomes like protein</i>
T	Thymin
TACC	<i>transforming acidic coild-coil</i>
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
TPX2	<i>targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tzfp	<i>testis specific zinc finger protein</i>
U	<i>Units</i>
UV	ultraviolette Strahlung
WB	Western Blot
wt	Wildtyp

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zellzyklus und Kontrollpunkte .....	2
Abbildung 2:	Strukturen der humanen Aurora Kinasen .....	4
Abbildung 3:	Die Proteinmenge von Aurora A in Abhängigkeit vom Zellzyklus .....	5
Abbildung 4:	Wechselseitige Wirkung von Aurora A und p53.....	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Mdm2 Proteins mit Phosphorylierungs- ' und Protein-Interaktionsstellen .....	13
Abbildung 6:	Negative Regulation des p53 Proteins durch Mdm2.....	14
Abbildung 7:	Aktivierung des p53 Proteins nach zellulärem Stress.....	16
Abbildung 8:	Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des Rb Proteins.....	21
Abbildung 9:	Aurora A phosphoryliert das humane Mdm2 Protein <i>in vitro</i> .....	56
Abbildung 10:	Aurora A phosphoryliert die zentrale Domäne von Mdm2 <i>in vitro</i> .....	57
Abbildung 11:	Aurora A phosphoryliert das murine Mdm2 Protein <i>in vitro</i> .....	58
Abbildung 12:	Phosphorylierung von Fragmenten des zentralen Bereichs .....	
	von Mdm2 durch Aurora A .....	59
Abbildung 13:	Zweidimensionale Phosphopeptid-Kartierung der zentralen Domäne .....	
	von Mdm2 .....	60
Abbildung 14:	Analyse der Aminosäuren im zentralen Bereich von Mdm2, die durch Aurora A phosphoryliert werden .....	62
Abbildung 15:	Zeitabhängige Phosphorylierung von Mdm2 durch Aurora A .....	64
Abbildung 16:	Messung der inkorporierten Phosphatmenge .....	65
Abbildung 17:	Aurora A phosphoryliert Mdm2 <i>in vivo</i> .....	67
Abbildung 18:	Aurora A assoziiert mit dem Mdm2 Protein .....	69

# ANHANG

---

Abbildung 19:	Aurora A interagiert direkt mit dem Mdm2 Protein.....	70
Abbildung 20:	Aurora A und das Mdm2 Protein kolokalisieren an den Zentriolen.....	71
Abbildung 21:	Aurora A, Aurora B und Aurora C phosphorylieren das Mdm2 Protein ....	72
Abbildung 22:	Einfluss von Aurora A auf die Stabilität des p53 Proteins.....	74
Abbildung 23:	p53 ist nach Aurora A Inhibition transkriptionell aktiv .....	76
Abbildung 24:	Die Halbwertszeiten der p53 und Mdm2 Proteine sind in der ..... Mitose verkürzt.....	78
Abbildung 25:	Aurora A induziert die Ubiquitinierung des p53 Proteins .....	80
Abbildung 26:	Die Induktion der Ubiquitinierung des p53 Proteins durch Aurora A ist Mdm2 abhängig.....	81
Abbildung 27:	Aurora A bewirkt keine Änderung der Proteinmenge von Rb .....	82
Abbildung 28:	Aurora A phosphoryliert das Rb Protein <i>in vitro</i> nicht direkt .....	84
Abbildung 29:	Aurora A phosphoryliert das Rb Protein <i>in vitro</i> bei Anwesenheit von Mdm2 .....	85
Abbildung 30:	Aurora A kolokalisiert mit dem Rb Protein an den Zentriolen .....	86
Abbildung 31:	Die Rb Phosphorylierung an Serin 780 nimmt nach Aurora A siRNA Behandlung ab.....	88
Abbildung 32:	Die Rb Phosphorylierung an Serin 780 nimmt nach Mengenzunahme von Aurora A zu .....	89
Abbildung 33:	Aurora A reduziert die Assoziation des Rb Proteins mit ..... dem E2F-1 Protein.....	91
Abbildung 34:	Die Aktivität von Aurora A ist nach ionisierender Strahlung unverändert	93
Abbildung 35:	Die Proteinmenge von Aurora A ändert sich nicht nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung .....	94
Abbildung 36:	Aurora A reguliert die beiden Tumorsuppressor Proteine p53 und Rb ..	103

# ANHANG

---

## 5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Restriktions-Enzyme .....	42
Tabelle 2:	Pipettierschema für die Herstellung von Trenn- und Sammelgel.....	49



## 5.4 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Ohsugi, M., Haraguchi, K., Fujimoto, J. and Yamamoto, T.** (2006). LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett* **580**, 782-8.
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L. and Earnshaw, W. C.** (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol* **10**, 1075-8.
- Adnane, J., Shao, Z. and Robbins, P. D.** (1995). The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem* **270**, 8837-43.
- Agnese, V., Bazan, V., Fiorentino, F. P., Fanale, D., Badalamenti, G., Colucci, G., Adamo, V., Santini, D. and Russo, A.** (2007). The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy. *Ann Oncol* **18 Suppl 6**, vi47-52.
- Allende-Vega, N., Dias, S., Milne, D. and Meek, D.** (2005). Phosphorylation of the acidic domain of Mdm2 by protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* **274**, 85-90.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. and Venkitaraman, A. R.** (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51-62.
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J. and Swedlow, J. R.** (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 672-83.
- Argentini, M., Barboule, N. and Wasyluk, B.** (2001). The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene* **20**, 1267-75.
- Ashcroft, M. and Vousden, K. H.** (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-43.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y. et al.** (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-21.
- Barros, T. P., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Raff, J. W.** (2005). Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *J Cell Biol* **170**, 1039-46.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J.** (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res* **237**, 1-6.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E.** (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* **12**, 851-62.
- Bernard, M., Saneau, P., Henry, C., Couturier, A. and Prigent, C.** (1998). Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics* **53**, 406-9.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C. et al.** (1998). A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* **17**, 3052-65.
- Bischoff, J. R. and Plowman, G. D.** (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol* **9**, 454-9.
- Blattner, C., Hay, T., Meek, D. W. and Lane, D. P.** (2002). Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol* **22**, 6170-82.
- Blattner, C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P.** (1999). DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene* **18**, 1723-32.
- Bode, A. M. and Dong, Z.** (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 793-805.
- Bolanos-Garcia, V. M.** (2005). Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1572-7.
- Bond, G. L., Hu, W. and Levine, A. J.** (2005). MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* **5**, 3-8.
- Borel, F., Lohez, O. D., Lacroix, F. B. and Margolis, R. L.** (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9819-24.
- Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W. L., Howard, S. F. and Lane, D. P.** (1997). Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol* **7**, 860-9.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**, 597-601.
- Brown, J. R., Koretke, K. K., Birkeland, M. L., Saneau, P. and Patrick, D. R.** (2004). Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol* **4**, 39.

# ANHANG

---

- Buchkovich, K., Duffy, L. A. and Harlow, E.** (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**, 1097-105.
- Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U. and George, D. L.** (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* **13**, 235-44.
- Carmena, M. and Earnshaw, W. C.** (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 842-54.
- Carvajal, R. D., Tse, A. and Schwartz, G. K.** (2006). Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 6869-75.
- Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbe, J. C., Prigent, C. and Lorca, T.** (2002). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep* **3**, 1209-14.
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C. and Ducommun, B.** (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* **4**, 1233-8.
- Chan, C. S. and Botstein, D.** (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* **135**, 677-91.
- Chau, B. N. and Wang, J. Y.** (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* **3**, 130-8.
- Chen, C. and Okayama, H.** (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.
- Chen, J., Marechal, V. and Levine, A. J.** (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**, 4107-14.
- Chen, S. S., Chang, P. C., Cheng, Y. W., Tang, F. M. and Lin, Y. S.** (2002). Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J* **21**, 4491-9.
- Cobrinik, D.** (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-809.
- Crane, R., Kloepper, A. and Ruderman, J. V.** (2004). Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* **117**, 5975-83.
- Crosio, C., Fimia, G. M., Louny, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C. D. and Sassone-Corsi, P.** (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* **22**, 874-85.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. and Reid, B. J.** (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**, 1353-6.
- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M. and Dean, D. C.** (2001). Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* **8**, 557-69.
- Dar, A. A., Belkhir, A. and El-Rifai, W.** (2009). The aurora kinase A regulates GSK-3beta in gastric cancer cells. *Oncogene* **28**, 866-75.
- De Luca, M., Lavia, P. and Guarguaglini, G.** (2006). A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell Cycle* **5**, 296-303.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W. and Old, L. J.** (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 2420-4.
- Deshpande, A., Sicinski, P. and Hinds, P. W.** (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**, 2909-15.
- Dobbelstein, M. and Roth, J.** (1998). The large T antigen of simian virus 40 binds and inactivates p53 but not p73. *J Gen Virol* **79** ( Pt 12), 3079-83.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G. D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. and Dixit, V. M.** (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**, 86-92.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. and Harlow, E.** (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-7.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25.
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G. and Maller, J. L.** (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol* **13**, 691-7.
- Eyers, P. A. and Maller, J. L.** (2004). Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2. *J Biol Chem* **279**, 9008-15.
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P. and George, D. L.** (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* **10**, 1565-9.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. and Weissman, A. M.** (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275**, 8945-51.
- Felsani, A., Mileo, A. M. and Paggi, M. G.** (2006). Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene* **25**, 5277-85.
- Felsenfeld, G.** (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* **355**, 219-24.

# ANHANG

---

- Ferrari, S., Marin, O., Pagano, M. A., Meggio, F., Hess, D., El-Shemerly, M., Krystyniak, A. and Pinna, L. A.** (2005). Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. *Biochem J* **390**, 293-302.
- Finlay, C. A.** (1993). The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* **13**, 301-6.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W. and Levine, A. J.** (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-93.
- Flatt, P. M., Tang, L. J., Scatena, C. D., Szak, S. T. and Pietenpol, J. A.** (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol* **20**, 4210-23.
- Francisco, L., Wang, W. and Chan, C. S.** (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to Ipl1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **14**, 4731-40.
- Freedman, D. A. and Levine, A. J.** (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* **18**, 7288-93.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. and Dryja, T. P.** (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**, 643-6.
- Fukuda, T., Mishina, Y., Walker, M. P. and DiAugustine, R. P.** (2005). Conditional transgenic system for mouse aurora a kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Mol Cell Biol* **25**, 5270-81.
- Fumoto, K., Lee, P. C., Saya, H. and Kikuchi, A.** (2008). AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3beta. *Oncogene* **27**, 4478-87.
- Fung, Y. K., Murphree, A. L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H. and Benedict, W. F.** (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* **236**, 1657-61.
- Garbe, J. C., Holst, C. R., Bassett, E., Tlsty, T. and Stampfer, M. R.** (2007). Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle* **6**, 1927-36.
- Giacinti, C. and Giordano, A.** (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-7.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M. J., Raff, J. W., Prigent, C. and Glover, D. M.** (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol* **156**, 437-51.
- Giet, R. and Prigent, C.** (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* **112** ( Pt 21), 3591-601.
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A. and Parry, H.** (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95-105.
- Gold, M. G., Barford, D. and Komander, D.** (2006). Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 693-701.
- Gotz, C., Kartarius, S., Scholtes, P., Nastainczyk, W. and Montenarh, M.** (1999). Identification of a CK2 phosphorylation site in mdm2. *Eur J Biochem* **266**, 493-501.
- Green, D. R. and Chipuk, J. E.** (2006). p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* **126**, 30-2.
- Gu, L., Ying, H., Zheng, H., Murray, S. A. and Xiao, Z. X.** (2003). The MDM2 RING finger is required for cell cycle-dependent regulation of its protein expression. *FEBS Lett* **544**, 218-22.
- Hahn, W. C. and Weinberg, R. A.** (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 331-41.
- Hamel, P. A., Gill, R. M., Phillips, R. A. and Gallie, B. L.** (1992). Transcriptional repression of the E2-containing promoters E1aE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol Cell Biol* **12**, 3431-8.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P. and Wyche, J. H.** (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* **277**, 17154-60.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. and Oegema, K.** (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **155**, 1109-16.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M.** (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-9.
- Hay, T. J. and Meek, D. W.** (2000). Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett* **478**, 183-6.
- Haydon, C. E., Evers, P. A., Aveline-Wolf, L. D., Resing, K. A., Maller, J. L. and Ahn, N. G.** (2003). Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1055-67.
- Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A.** (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **13**, 6501-8.
- Helton, E. S. and Chen, X.** (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* **100**, 883-96.

# ANHANG

---

- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.** (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**, 3-11.
- Hickman, E. S., Moroni, M. C. and Helin, K.** (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 60-6.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H.** (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* **114**, 585-98.
- Hofseth, L. J., Robles, A. I., Yang, Q., Wang, X. W., Hussain, S. P. and Harris, C.** (2004). p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology. *Chest* **125**, 83S-5S.
- Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H.** (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-7.
- Honda, R. and Yasuda, H.** (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* **18**, 22-7.
- Honda, R. and Yasuda, H.** (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* **19**, 1473-6.
- Horowitz, J. M., Park, S. H., Bogenmann, E., Cheng, J. C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Minna, J. D., Dryja, T. P. and Weinberg, R. A.** (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2775-9.
- Hsieh, J. K., Chan, F. S., O'Connor, D. J., Mittnacht, S., Zhong, S. and Lu, X.** (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* **3**, 181-93.
- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A. and Knoblich, J. A.** (2006). Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell* **11**, 147-57.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. and Nevins, J. R.** (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* **21**, 4684-99.
- Jackson, M. W., Agarwal, M. K., Yang, J., Bruss, P., Uchiumi, T., Agarwal, M. L., Stark, G. R. and Taylor, W. R.** (2005). p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J Cell Sci* **118**, 1821-32.
- Jacobberger, J. W., Frisa, P. S., Sramkoski, R. M., Stefan, T., Shults, K. E. and Soni, D. V.** (2008). A new biomarker for mitotic cells. *Cytometry A* **73**, 5-15.
- Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A. and Bradley, A.** (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206-8.
- Kagawa, S., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., Fukazawa, T., Sok-Joo, R., Roth, J. A. and Tanaka, N.** (1999). Overexpression of the p21 sdi1 gene induces senescence-like state in human cancer cells: implication for senescence-directed molecular therapy for cancer. *Cell Death Differ* **6**, 765-72.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. and Fornace, A. J., Jr.** (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-97.
- Katayama, H., Brinkley, W. R. and Sen, S.** (2003). The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* **22**, 451-64.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z. M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A. and Sen, S.** (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36**, 55-62.
- Kawai, H., Wiederschain, D. and Yuan, Z. M.** (2003). Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol Cell Biol* **23**, 4939-47.
- Keen, N. and Taylor, S.** (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **4**, 927-36.
- Khatib, Z. A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D. N., Sherr, C. J. and Look, A. T.** (1993). Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* **53**, 5535-41.
- Kimmins, S., Crosio, C., Kotaja, N., Hirayama, J., Monaco, L., Hoog, C., van Duin, M., Gossen, J. A. and Sassone-Corsi, P.** (2007). Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol* **21**, 726-39.
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K. and Okano, Y.** (1997). Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem* **272**, 13766-71.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., Sumi, N. and Okano, Y.** (1998). Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of Drosophila and yeast IPL1. *Cytogenet Cell Genet* **82**, 147-52.
- Kimura, M., Uchida, C., Takano, Y., Kitagawa, M. and Okano, Y.** (2004). Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 930-6.
- Knudsen, E. S. and Wang, J. Y.** (1996). Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* **271**, 8313-20.

# ANHANG

---

- Knudsen, E. S. and Wang, J. Y.** (1997). Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol Cell Biol* **17**, 5771-83.
- Kondo, S., Morimura, T., Barnett, G. H., Kondo, Y., Peterson, J. W., Kaakaji, R., Takeuchi, J., Toms, S. A., Liu, J., Werbel, B. et al.** (1996). The transforming activities of MDM2 in cultured neonatal rat astrocytes. *Oncogene* **13**, 1773-9.
- Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C. and Ferrari, S.** (2006). Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* **25**, 338-48.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H.** (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kufer, T. A., Sillje, H. H., Korner, R., Gruss, O. J., Meraldi, P. and Nigg, E. A.** (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* **158**, 617-23.
- Kulikov, R., Boehme, K. A. and Blattner, C.** (2005). Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol* **25**, 7170-80.
- Kulikov, R., Winter, M. and Blattner, C.** (2006). Binding of p53 to the central domain of Mdm2 is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 28575-83.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J. and Pavletich, N. P.** (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-53.
- Lane, D. P. and Crawford, L. V.** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-3.
- Lee, C. Y., Andersen, R. O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K. D., Lanskey, M. J., Bashirullah, A. and Doe, C. Q.** (2006). *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev* **20**, 3464-74.
- Lee, W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y. and Lee, E. Y.** (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* **235**, 1394-9.
- Leng, R. P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J. M., Lozano, G., Hakem, R. and Benchimol, S.** (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**, 779-91.
- Lens, S. M. and Medema, R. H.** (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle* **2**, 507-10.
- Levine, A. J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-31.
- Li, X., Sakashita, G., Matsuzaki, H., Sugimoto, K., Kimura, K., Hanaoka, F., Taniguchi, H., Furukawa, K. and Urano, T.** (2004). Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* **279**, 47201-11.
- Lin, B. T. and Wang, J. Y.** (1992). Cell cycle regulation of retinoblastoma protein phosphorylation. *Ciba Found Symp* **170**, 227-41; discussion 241-3.
- Lindqvist, A., Kallstrom, H., Lundgren, A., Barsoum, E. and Rosenthal, C. K.** (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* **171**, 35-45.
- Linzer, D. I. and Levine, A. J.** (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.
- Lipinski, M. M. and Jacks, T.** (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**, 7873-82.
- Littlepage, L. E. and Ruderman, J. V.** (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-85.
- Littlepage, L. E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J. K., Amundadottir, L. T. and Ruderman, J. V.** (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15440-5.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Chen, J. and Cheng, J. Q.** (2004). Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem* **279**, 52175-82.
- Liu, Q. and Ruderman, J. V.** (2006). Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5811-6.
- Lohrum, M. A., Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. and Vousden, K. H.** (2000). Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol* **2**, 179-81.
- Lozano, G. and Montes de Oca Luna, R.** (1998). MDM2 function. *Biochim Biophys Acta* **1377**, M55-9.
- Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C. M., Lee, W. H., Paucha, E. and Livingston, D. M.** (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**, 57-65.
- Ludlow, J. W., Glendening, C. L., Livingston, D. M. and DeCaprio, J. A.** (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **13**, 367-72.
- Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A.** (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-61.
- Lundgren, K., Montes de Oca Luna, R., McNeill, Y. B., Emerick, E. P., Spencer, B., Barfield, C. R., Lozano, G., Rosenberg, M. P. and Finlay, C. A.** (1997). Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev* **11**, 714-25.

# ANHANG

---

- Luo, R. X., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**, 463-73.
- Ma, J., Martin, J. D., Zhang, H., Auger, K. R., Ho, T. F., Kirkpatrick, R. B., Grooms, M. H., Johanson, K. O., Tummino, P. J., Copeland, R. A. et al. (2006). A second p53 binding site in the central domain of Mdm2 is essential for p53 ubiquitination. *Biochemistry* **45**, 9238-45.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B. and Medema, R. H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119-23.
- Mao, J. H., Wu, D., Perez-Losada, J., Jiang, T., Li, Q., Neve, R. M., Gray, J. W., Cai, W. W. and Balmain, A. (2007). Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell* **11**, 161-73.
- Markey, M. P., Angus, S. P., Strobeck, M. W., Williams, S. L., Gunawardena, R. W., Aronow, B. J. and Knudsen, E. S. (2002). Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional repression identifies novel targets and distinctions from E2F action. *Cancer Res* **62**, 6587-97.
- Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F. and Hwang, P. M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**, 1650-3.
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* **18**, 7666-75.
- Meek, D. W. and Knippschild, U. (2003). Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res* **1**, 1017-26.
- Menendez, D., Krysiak, O., Inga, A., Krysiak, B., Resnick, M. A. and Schonfelder, G. (2006). A SNP in the fit-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1406-11.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J* **21**, 483-92.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 29-36.
- Meulmeester, E., Frenk, R., Stad, R., de Graaf, P., Marine, J. C., Vousden, K. H. and Jochemsen, A. G. (2003). Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol Cell Biol* **23**, 4929-38.
- Mittnacht, S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 21-7.
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N., Pevsner-Fischer, M., Olson, M., Rinon, A., Tzahor, E., Lozano, G., Zipori, D., Sarig, R. et al. (2008). p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS One* **3**, e3707.
- Momand, J., Wu, H. H. and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29.
- Momand, J. and Zambetti, G. P. (1997). Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* **64**, 343-52.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-45.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S. and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-6.
- Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, Y. Y., Kinoshita, K. et al. (2007). NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol* **27**, 352-67.
- Moroni, M. C., Hickman, E. S., Lazzarini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**, 552-8.
- Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D. and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* **15**, 267-85.
- Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E. and Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* **8**, 4099-105.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A. and Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 702-12.
- Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D., Narita, M., Zhang, M. Q., Lazebnik, Y., Barsagi, D. and Lowe, S. W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* **4**, 859-64.
- Nair, J. S., Ho, A. L., Tse, A. N., Coward, J., Cheema, H., Ambrosini, G., Keen, N. and Schwartz, G. K. (2009). Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780. *Mol Biol Cell* **20**, 2218-28.
- Nelson, D. A., Krucher, N. A. and Ludlow, J. W. (1997). High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **272**, 4528-35.
- Nevo, J. R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* **9**, 585-93.

# ANHANG

---

- Nevins, J. R.** (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 699-703.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. et al.** (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-5.
- Nigg, E. A.** (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 21-32.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. and Vogelstein, B.** (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-3.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.** (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-60.
- Ouchi, M., Fujiuchi, N., Sasai, K., Katayama, H., Minamishima, Y. A., Ongusaha, P. P., Deng, C., Sen, S., Lee, S. W. and Ouchi, T.** (2004). BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem* **279**, 19643-8.
- Pal, S., Datta, K. and Mukhopadhyay, D.** (2001). Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* **61**, 6952-7.
- Palmero, I. and Peters, G.** (1996). Perturbation of cell cycle regulators in human cancer. *Cancer Surv* **27**, 351-67.
- Pan, J. and Snell, W. J.** (2000). Regulated targeting of a protein kinase into an intact flagellum. An aurora/lpl1p-like protein kinase translocates from the cell body into the flagella during gamete activation in chlamydomonas. *J Biol Chem* **275**, 24106-14.
- Pan, J. and Snell, W. J.** (2003). Kinesin II and regulated intraflagellar transport of Chlamydomonas aurora protein kinase. *J Cell Sci* **116**, 2179-86.
- Parra, M. A. and Wyrick, J. J.** (2007). Regulation of gene transcription by the histone H2A N-terminal domain. *Mol Cell Biol* **27**, 7641-8.
- Pazin, M. J. and Kadonaga, J. T.** (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**, 325-8.
- Petersen, J., Paris, J., Willer, M., Philippe, M. and Hagan, I. M.** (2001). The S. pombe aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* **114**, 4371-84.
- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A. and Lane, D. P.** (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* **9**, 2523-9.
- Qin, Q., Baudry, M., Liao, G., Noniyev, A., Galeano, J. and Bi, X.** (2009). A novel function for p53: regulation of growth cone motility through interaction with Rho kinase. *J Neurosci* **29**, 5183-92.
- Reed, S. I.** (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* **29**, 7-23.
- Reich, A., Yanai, A., Mesilaty-Gross, S., Chen-Moses, A., Wides, R. and Motro, B.** (1999). Cloning, mapping, and expression of ial, a novel Drosophila member of the lpl1/aurora mitotic control kinase family. *DNA Cell Biol* **18**, 593-603.
- Reissmann, P. T., Koga, H., Figlin, R. A., Holmes, E. C. and Slamon, D. J.** (1999). Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**, 61-70.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A. and Dynlacht, B. D.** (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* **16**, 245-56.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A.** (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 402-12.
- Roger, L., Gadea, G. and Roux, P.** (2006). Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell* **98**, 141-52.
- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. and Prigent, C.** (1998). The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci* **111 ( Pt 5)**, 557-72.
- Rubin, E., Mitnacht, S., Villa-Moruzzi, E. and Ludlow, J. W.** (2001). Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene* **20**, 3776-85.
- Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D. L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E. A. et al.** (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **59**, 249-63.
- Satinover, D. L., Brautigan, D. L. and Stukenberg, P. T.** (2006). Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in Xenopus early embryonic cell cycles. *Cell Cycle* **5**, 2268-74.
- Schumacher, J. M., Ashcroft, N., Donovan, P. J. and Golden, A.** (1998a). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in Caenorhabditis elegans embryos. *Development* **125**, 4391-402.
- Schumacher, J. M., Golden, A. and Donovan, P. J.** (1998b). AIR-2: An Aurora/lpl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos. *J Cell Biol* **143**, 1635-46.
- Sdek, P., Ying, H., Chang, D. L., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M. J. and Xiao, Z. X.** (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell* **20**, 699-708.

# ANHANG

---

- Sdek, P., Ying, H., Zheng, H., Margulis, A., Tang, X., Tian, K. and Xiao, Z. X.** (2004). The central acidic domain of MDM2 is critical in inhibition of retinoblastoma-mediated suppression of E2F and cell growth. *J Biol Chem* **279**, 53317-22.
- Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C. Y., Yates, J. R. and Fang, G.** (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**, 1655-8.
- Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L. B., Schneider, T. R., Stukenberg, P. T. and Musacchio, A.** (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* **18**, 379-91.
- Shao, S., Wang, Y., Jin, S., Song, Y., Wang, X., Fan, W., Zhao, Z., Fu, M., Tong, T., Dong, L. et al.** (2006). Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. *J Biol Chem* **281**, 28943-50.
- Shapiro, G. I., Park, J. E., Edwards, C. D., Mao, L., Merlo, A., Sidransky, D., Ewen, M. E. and Rollins, B. J.** (1995). Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* **55**, 6200-9.
- Sherr, C. J.** (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-7.
- Sherr, C. J.** (2000). Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* **96**, 73-92.
- Sherr, C. J. and McCormick, F.** (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-12.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.
- Siddiqui, H., Solomon, D. A., Gunawardena, R. W., Wang, Y. and Knudsen, E. S.** (2003). Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol Cell Biol* **23**, 7719-31.
- Singh, K., Mogare, D., Giridharagopalan, R. O., Gogiraju, R., Pande, G. and Chattopadhyay, S.** (2007). p53 target gene SMAR1 is dysregulated in breast cancer: its role in cancer cell migration and invasion. *PLoS One* **2**, e660.
- Soussi, T. and Beroud, C.** (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**, 233-40.
- Stevaux, O. and Dyson, N. J.** (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 684-91.
- Stewart, S. and Fang, G.** (2005). Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res* **65**, 8730-5.
- Sun, Y.** (2003). Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **2**, 623-9.
- Taguchi, S., Honda, K., Sugiura, K., Yamaguchi, A., Furukawa, K. and Urano, T.** (2002). Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett* **519**, 59-65.
- Tamrakar, S., Rubin, E. and Ludlow, J. W.** (2000). Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* **5**, D121-37.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S. and Ishigatsubo, Y.** (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem* **277**, 10719-26.
- Tang, C. J., Chuang, C. K., Hu, H. M. and Tang, T. K.** (2001). The zinc finger domain of Tzfp binds to the tbs motif located at the upstream flanking region of the Aie1 (aurora-C) kinase gene. *J Biol Chem* **276**, 19631-9.
- Tang, C. J., Lin, C. Y. and Tang, T. K.** (2006). Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol* **290**, 398-410.
- Tatsuka, M., Sato, S., Kitajima, S., Suto, S., Kawai, H., Miyauchi, M., Ogawa, I., Maeda, M., Ota, T. and Takata, T.** (2005). Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 1122-7.
- Taura, M., Eguma, A., Suico, M. A., Shuto, T., Koga, T., Komatsu, K., Komune, T., Sato, T., Saya, H., Li, J. D. et al.** (2008). p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol* **28**, 6557-67.
- Tedeschi, A. and Di Giovanni, S.** (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* **10**, 576-83.
- Teodoro, J. G., Parker, A. E., Zhu, X. and Green, M. R.** (2006). p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* **313**, 968-71.
- Terada, Y., Uetake, Y. and Kuriyama, R.** (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *J Cell Biol* **162**, 757-63.
- Thomas, D. M., Carty, S. A., Piscopo, D. M., Lee, J. S., Wang, W. F., Forrester, W. C. and Hinds, P. W.** (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell* **8**, 303-16.
- Toji, S., Yabuta, N., Hosomi, T., Nishihara, S., Kobayashi, T., Suzuki, S., Tamai, K. and Nojima, H.** (2004). The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells* **9**, 383-97.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J. A.** (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1519-24.
- Trimarchi, J. M. and Lees, J. A.** (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 11-20.



# ANHANG

---

- Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y.** (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* **5**, 242-8.
- Vader, G. and Lens, S. M.** (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 60-72.
- Vader, G., Medema, R. H. and Lens, S. M.** (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* **173**, 833-7.
- van Vugt, M. A., Bras, A. and Medema, R. H.** (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* **15**, 799-811.
- van Vugt, M. A., Bras, A. and Medema, R. H.** (2005). Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt. *Cancer Res* **65**, 7037-40.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D.** (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol* **21**, 6484-94.
- Vernell, R., Helin, K. and Muller, H.** (2003). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem* **278**, 46124-37.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-10.
- Vousden, K. H.** (2006). Outcomes of p53 activation--spoils for choice. *J Cell Sci* **119**, 5015-20.
- Wakefield, J. G., Stephens, D. J. and Tavaré, J. M.** (2003). A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J Cell Sci* **116**, 637-46.
- Walter, A. O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. and Lees, E.** (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* **19**, 4906-16.
- Wang, H., Somers, G. W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F. and Chia, W.** (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of Drosophila neuroblasts. *Genes Dev* **20**, 3453-63.
- Wang, W. and Malcolm, B. A.** (2002). Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol* **182**, 37-43.
- Weinberg, R. A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-30.
- Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H., He, S. and Dean, D. C.** (1995). Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**, 812-5.
- Winter, M., Milne, D., Dias, S., Kulikov, R., Knippschild, U., Blattner, C. and Meek, D.** (2004). Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. *Biochemistry* **43**, 16356-64.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. and Vernos, I.** (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol* **149**, 1405-18.
- Wong, S. and Weber, J. D.** (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J* **407**, 451-60.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. and Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-32.
- Xiao, Z. X., Chen, J., Levine, A. J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. R. and Livingston, D. M.** (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* **375**, 694-8.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D.** (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4.
- Xirodimas, D. P., Stephen, C. W. and Lane, D. P.** (2001). Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res* **270**, 66-77.
- Yap, D. B., Hsieh, J. K., Chan, F. S. and Lu, X.** (1999). mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* **18**, 7681-9.
- Yu, G. W., Rudiger, S., Veprintsev, D., Freund, S., Fernandez-Fernandez, M. R. and Fersht, A. R.** (2006a). The central region of HDM2 provides a second binding site for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1227-32.
- Yu, X., Harris, S. L. and Levine, A. J.** (2006b). The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* **66**, 4795-801.
- Zeitlin, S. G., Shelby, R. D. and Sullivan, K. F.** (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* **155**, 1147-57.
- Zhang, Z. W., Patchett, S. E. and Farthing, M. J.** (2000). Topoisomerase I inhibitor (camptothecin)-induced apoptosis in human gastric cancer cells and the role of wild-type p53 in the enhancement of its cytotoxicity. *Anticancer Drugs* **11**, 757-64.
- Zhao, Z. S., Lim, J. P., Ng, Y. W., Lim, L. and Manser, E.** (2005). The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell* **20**, 237-49.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S.** (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**, 189-93.