

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Η πρωτεϊνική κινάση Chk1 είναι απαραίτητη για την
επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων στην
κυτταρική διαίρεση**

Ελένη Πετσαλάκη

Ηράκλειο 2013

Επιστημονικός υπεύθυνος:

Γ. Ζάχος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων καθηγητής:

Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής επιτροπή:

- Ε. Αθανασάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Δ. Αλεξανδράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής επιτροπή:

- Ε. Αθανασάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Δ. Αλεξανδράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Μ. Κοκκινίδης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Χ. Σπηλιανάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Δ. Τζαμαρίας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθ. Γεώργιο Ζάχο για τις πολύτιμες συμβουλές του πάνω σε αυτή τη μελέτη. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές Ειρήνη Αθανασάκη, Δέσποινα Αλεξανδράκη και Ιωσήφ Παπαματθαιάκη για τα χρήσιμα σχόλια τους αυτά τα 3 χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής μου καθ. Χρήστο Δελιδάκη, καθ. Μιχάλη Κοκκινίδη, καθ. Χαράλαμπο Σπηλιανάκη και καθ. Δημήτρη Τζαμαρία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου και την οικογένειά μου.

Περιεχόμενα	4
Περίληψη	9
Abstract	10
Συνοπτεύσεις	11
1. Εισαγωγή	13
1.1 Μιτωτική διαίρεση	14
1.2 Λανθασμένοι τρόποι πρόσδεσης και το spindle checkpoint	14
1.2.1 Το spindle checkpoint	14
1.2.2 Ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης	14
1.2.3 Ο συντελικός τρόπος πρόσδεσης	15
1.2.4 Ο μεροτελικός τρόπος πρόσδεσης	16
1.3 Chromosomal Passenger Complex (CPC)	18
1.3.1 Το CPC και ο ρόλος του στο spindle checkpoint	18
1.3.2 Η μεταφορά του CPC στα κεντρομερή	19
1.3.3 Η ενεργοποίηση της Aurora-B	19
1.3.4 Ο ρόλος της Aurora-B στο spindle checkpoint	20
1.3.5 Ο ρόλος της Aurora-B στην ανάφαση και στην τελόφαση	21
1.3.6 Ο ρόλος της Aurora-B στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων	21
1.4 Οι κινεσίνες MCAK και Kif2b	22
1.4.1 Ο ρόλος της κινεσίνης MCAK στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων	23
1.4.2 Ο ρόλος της κινεσίνης Kif2b στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων	23
1.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hec1 στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων	25
1.6 Μοντέλο επιδιόρθωσης μεροτελικών προσδέσεων από την Aurora-B	27
1.7 Η κινάση Mps1	29
1.7.1 Ο ρόλος της Mps1 στο spindle checkpoint	29
1.7.2 Ο ρόλος της Mps1 στη φυσιολογική μίτωση	29
1.8 Η πρωτεϊνική κινάση Chk1	30
1.8.1 Τα υποστρώματα της Chk1	31
1.8.2 Ο ρόλος της Chk1 στην S φάση	33

1.8.3 Ο ρόλος της Chk1 στη μετάβαση από την G2 στην M φάση (G2/M checkpoint)	33
1.8.4 Ο ρόλος της Chk1 στη μίτωση	34
1.8.5 Ο ρόλος της Chk1 στην καρκινογένεση	34
Στόχοι	36
2. Υλικά και μέθοδοι	37
2.1 Υλικά	37
2.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια	37
2.1.2 Ένζυμα και kits	37
2.1.3 Βακτήρια	37
2.1.4 Κυτταροκαλλιέργεια	38
2.1.5 Αντισώματα	39
2.1.6 Ανοσοφθορισμός	
2.1.7 Πρωτεΐνες	41
2.1.8 Πλασμίδια, Primers	41
2.1.9 Αλληλουχίες των siRNAs	42
2.1.10 Διάφορα	42
2.2 Μέθοδοι	43
2.2.1 Βακτήρια	43
Μετασχηματισμός βακτηρίων	43
Καλλιέργεια βακτηρίων	43
Απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα	43
Απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα	43
2.2.2 Πρωτόκολλα για DNA	44
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	44
Ηλεκτροφόρηση DNA σε gel αγαρόζης	45
Πρωτόκολλα για cloning	45
2.2.3 Δημιουργία σημειακής μετάλλαξης	45
Πρωτόκολλο της PCR	46
Πέψη με DpnI	46
Μετασχηματισμός XL1-Blue competent cells	46
2.2.4 Κυτταροκαλλιέργεια	47

Συνθήκες καλλιέργειας DT40 κυττάρων	47
Συνθήκες καλλιέργειας BE κυττάρων	47
Συνθήκες καλλιέργειας T-REx CHO κυττάρων	48
Επιμόλυνση BE κυττάρων με siRNA	48
Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	49
Δημιουργία κυτταρικών σειρών με χρήση πλασμιδιακού DNA	49
Διαδικασία απομόνωσης μοναδικών αποικιών	50
2.2.5 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών	52
Εκχυλίσματα από κύτταρα	52
Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Bradford assay)	52
Ανάλυση πρωτεϊνών	52
Μεταφορά πρωτεϊνών	53
Ανάλυση πρωτεϊνών (Western blotting)	54
Ανοσοκατακρήμνιση της Aurora-B και δοκιμασία κινάσης (IP kinase assay)	54
2.2.6 Πρωτόκολλα για κυτταρομετρία ροής	55
Προετοιμασία και μονιμοποίηση των κυττάρων	55
Ανάλυση κυτταρικού κύκλου (pS10-H3/PI staining)	55
Κυτταρομετρία ροής	56
2.2.7 Ανοσοφθορισμός	56
Μονιμοποίηση κυττάρων για συνεστιακή μικροσκοπία	56
Χρώση κυττάρων για συνεστιακή μικροσκοπία	57
Ανάλυση έντασης φθορισμού	57
Αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων οι οποίοι δεν προσδένονται στους κινητοχώρους	57
Απελευθέρωση από MG-132	58
Δοκιμασία ευαισθησίας στο nocodazole	58
Στατιστική ανάλυση	58

3. Αποτελέσματα: Μελέτη του ρόλου της Chk1 στην πρόληψη μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση

3.1 Τα BE κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση	59
3.2 Τα Chk1-/- κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση	61

3.3 Προσδιορισμός με κυτταρομετρία ροής του χρόνου εξόδου των κυττάρων από τη μίτωση σε κύτταρα σταματημένα με MG-132	63
3.4 Η Chk1 απαιτείται για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε κύτταρα σταματημένα στη μετάφαση	65
3.5 Αναστολή της Chk1 οδηγεί στη δημιουργία σταθερών μικροσωληνίσκων κινητοχώρων	67
4. Αποτελέσματα: Μελέτη του εντοπισμού των κινεσινών MCAK και Kif2b και της φωσφορυλίωσης της Hec1	69
4.1 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους	69
4.2 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους	71
4.3 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και σερίνη 44 κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση	73
5. Αποτελέσματα: Φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Aurora-B	78
5.1 Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331	78
5.2 Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη Aurora B στη σερίνη 331 σε αλανίνη ή γλουταμικό οξύ	81
6. Αποτελέσματα: Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στην πρόληψη των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν	83
6.1 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 προλαμβάνει μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν	83
6.2 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους	85
6.3 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους	87
6.4 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 της Aurora-B είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55	89
7. Αποτελέσματα: Οι Mps1 και Chk1 συνεργάζονται για προστασία από τις μεροτελικές προσδέσεις	93

7.1 Ταυτόχρονη αναστολή της Mps1 και της Chk1 παρουσιάζει αθροιστικό αποτέλεσμα στις μεροτελικές προσδέσεις και τα χρωμοσώματα που καθυστερούν	93
7.2 Αναστολή της Mps1 προκαλεί μείωση του εντοπισμού της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους	95
7.3 Αναστολή της Mps1 προκαλεί μείωση του εντοπισμού της Kif2b στους κινητοχώρους	99
8. Αποτελέσματα: Ρόλος της Mps1 και της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων	102
8.1 Η Mps1 είναι απαραίτητη για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της MCAK στα κεντρομερή	102
8.2 Η Mps1 είναι απαραίτητη για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της Kif2b στους κινητοχώρους	105
8.3 Η Mps1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55	109
8.4 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους	112
8.5 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους	115
9. Συμπεράσματα-Συζήτηση	118
10. Βιβλιογραφία	123
11. Δημοσιεύσεις	

Περίληψη

Αν δεν επιδιορθωθούν, οι μεροτελικές προσδέσεις μπορούν να οδηγήσουν στο λανθασμένο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στην ανάφαση. Στην παρούσα διατριβή, δείχνουμε ότι η κίνηση Chk1 προστατεύει τα κύτταρα των σπονδυλωτών από τις μεροτελικές προσδέσεις και τα χρωμοσώματα που καθυστερούν και απαιτείται για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης μετάφασης. Μειωμένη ενεργότητα της Chk1 οδηγεί σε σταθερούς μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων, ασταθή πρόσδεση των MCAK, Kif2b και Mps1 στα κεντρομερή ή στους κινητοχώρους και μειωμένη φωσφορυλίωση της Hec1 από την Aurora-B. Η φωσφορυλίωση της Aurora-B στη σερίνη 331 από την Chk1 είναι υψηλή στην προμετάφαση και μειώνεται σημαντικά στη μετάφαση. Προτείνουμε ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των MCAK, Kif2b και Mps1 στα κεντρομερή ή στους κινητοχώρους και για τη φωσφορυλίωση της Hec1. Επιπροσθέτως, αναστολή της ενεργότητας της Mps1 μειώνει την αρχική πρόσδεση των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή ή στους κινητοχώρους, ελαττώνει τη φωσφορυλίωση της Hec1 και προκαλεί μεροτελικές προσδέσεις στα κύτταρα με μειωμένη Chk1. Προτείνουμε ότι η Chk1 και η Mps1 ρυθμίζουν από κοινού τις Aurora-B, MCAK, Kif2b και Hec1 προκειμένου να επιδιορθωθούν οι μεροτελικές προσδέσεις. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα ρόλο της Chk1 και της Mps1 στην επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων.

Abstract

Merotelic kinetochore attachments can induce mis-segregated chromosomes in anaphase. In the present study, we show that Chk1 kinase, a component of the DNA damage and DNA replication responses, protects vertebrate cells against merotelic attachments and lagging chromosomes and regulates correction of merotelic attachments during a prolonged metaphase. Decreased Chk1 activity leads to hyperstable kinetochore-microtubules, unstable binding of MCAK, Kif2b and Mps1 to centromeres or kinetochores and reduced phosphorylation of Hec1 by Aurora-B kinase. Chk1 phosphorylates Aurora-B Serine 331 at kinetochores and this phosphorylation is high in prometaphase and decreases significantly when chromosomes bi-orient. We propose that phosphorylation of Serine 331 by Chk1 is required for localization of MCAK, Kif2b and Mps1 to centromeres or kinetochores and for Hec1 phosphorylation. Furthermore, inhibition of Mps1 activity diminishes initial recruitment of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores, impairs mitotic Hec1 phosphorylation and exacerbates merotelic attachments in the absence of Chk1 function. We propose that Chk1 and Mps1 jointly regulate Aurora-B, MCAK, Kif2b and Hec1 functions to correct merotelic attachments. These results suggest a previously unreported role for Chk1 and Mps1 in error correction.

Συντομεύσεις

A: Alanine

APC: Anaphase Promoting Complex

AZ: AZ3146

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related

Cdc25: Cell division cycle 25

Cdk: Cyclin-dependent kinase

CENP: Centromeric protein

Chk1: Checkpoint kinase 1

CHO: Chinese Hamster Ovary

CPC: Chromosomal Passenger Complex

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

GFP: Green Fluorescent Protein

Hec1: Highly expressed in cancer 1

HRP: horseradish peroxidase

KD: Kinase dead

Kif2b: Kinesin family member 2b

Mad2: Mitotic arrest deficient 2

MCAK: Mitotic Centromere-Associated Kinesin

Mps1: Monopolar spindle 1

FITC: Fluorescein isothiocyanate

P: Phospho

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFA: Paraformaldehyde

Plk1: Polo like kinase 1

p-S10-H3: Phosphorylation of Serine 10 on Histone 3

Rev: Revertant

S: Serine

SDS: Sodium dodecyl sulphate

Ελένη Πετσαλάκη, 2013

TRITC: Tetramethyl Rhodamine isothiocyanate

T: Threonine

UCN-01: 7-hydroxy-staurosporine

VX: VX-680

WT: Wild Type

1. Εισαγωγή

1.1 Μιτωτική διαίρεση

Κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διαχωρίζονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση αποτελείται από τα εξής στάδια: την πρόφαση, την προμετάφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση (Tanaka, 2012). Κατά την πρόφαση αρχίζει η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων η οποία ακολουθείται από τη διάλυση του πυρηνικού φακέλου κατά την προμετάφαση και την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου στους κινητοχώρους των αδελφών χρωματίδων. Κατά τη μετάφαση όλες οι αδελφές χρωματίδες στοιχίζονται στο ισημερινό επίπεδο και στη συνέχεια τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται στους δύο πόλους της ατράκτου κατά την ανάφαση. Τέλος, ακολουθεί η τελόφαση όπου οι αδελφές χρωματίδες αποσυσπειρώνονται και ξαναδημιουργείται πυρηνική μεμβράνη γύρω από κάθε ομάδα χρωμοσωμάτων (Tanaka, 2012).

Κατά τη μιτωτική διαίρεση, ο σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων απαιτεί πρόσδεση στους αδελφούς κινητοχώρους μικροσωληνίσκων που προέρχονται από αντίθετους πόλους (διπολική ή αμφιτελική πρόσδεση), (Εικόνα 1Α) (Cimini, 2008; Santaguida and Musacchio, 2009; Tanaka, 2012; van der Waal et al., 2012a; Walczak et al., 2010). Στο budding yeast, κάθε κινητοχώρος προσδένει μόνο ένα μικροσωληνίσκο. Τα κύτταρα των σπονδυλωτών όμως διαθέτουν 20-30 θέσεις πρόσδεσης για κάθε κινητοχώρο με αποτέλεσμα να είναι πιο επιρρεπή στις λανθασμένες προσδέσεις (Cimini, 2007). Τα λάθη στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων είναι συχνό φαινόμενο στα καρκινικά κύτταρα κι έχουν ως αποτέλεσμα θυγατρικά κύτταρα με περισσότερα ή λιγότερα χρωμοσώματα από το φυσιολογικό (αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια) (Bakhoun et al., 2009; Ganem et al., 2009; Janssen et al., 2011; Ricke et al., 2008; Sheltzer et al., 2011; Silkworth et al., 2009; Thompson and Compton, 2008; van der Waal et al., 2012a). Η αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια έχει ως αποτέλεσμα την ανευπλοειδία και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση πιθανόν μέσω απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή προσθήκη πρωτο-ογκογονιδίων (Baker et al., 2009; van der Waal et al., 2012a).

1.2 Λανθασμένοι τρόποι πρόσδεσης και το spindle checkpoint

1.2.1 Το spindle checkpoint

Κατά την προμετάφαση, οι spindle checkpoint πρωτεΐνες εντοπίζονται στους μη προσδεδεμένους κινητοχώρους με αποτέλεσμα το σταμάτημα των κυττάρων μέχρι όλοι οι κινητοχώροι να προσδεθούν διπολικά με μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Στους ανθρώπους, τα συστατικά του spindle checkpoint περιλαμβάνουν πρωτεΐνες όπως οι κινάσες BubR1, Bub1, Mps1 και άλλες πρωτεΐνες όπως οι Bub3, Mad1, Mad2 και το σύμπλοκο RZZ (ROD-ZWILCH-ZW10), (Musacchio and Salmon, 2007; Santaguida et al., 2010).

Πρόσδεση των πρωτεϊνών Mad και Bub στους κινητοχώρους είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στην καταλυτική υπομονάδα Cdc20 anaphase-promoting complex/ cyclosome (APC/C) και την απενεργοποίηση του. Το APC/C έχει ενεργότητα λιγάσης ουβικιτίνης και ουβικιτινώνει τις Cyclin B και securin οδηγώντας τις σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η Cyclin B είναι ο παρτενέρ της Cdk1 κινάσης και αποικοδόμηση της Cyclin B οδηγεί σε απενεργοποίηση της Cdk1 και έναρξη της ανάφασης. Επίσης, η securin κρατά δεσμευμένη την separase, όταν η securin αποικοδομηθεί από το πρωτεάσωμα, η separase αποικοδομεί την cohesin, την πρωτεΐνη που κρατά τις αδελφές χρωματίδες ενωμένες, και το κύτταρο προχωρά στην ανάφαση (Musacchio and Salmon, 2007; Santaguida and Musacchio, 2009).

1.2.2 Ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης

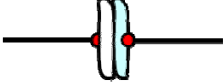
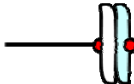
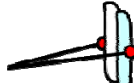

Εκτός από τον αμφιτελικό τρόπο πρόσδεσης, υπάρχουν και λανθασμένοι τρόποι πρόσδεσης, όπως ο μονοτελικός στον οποίο η μία αδελφή χρωματίδα προσδέεται με μικροσωληνίσκους που προέρχονται από τον ένα πόλο ενώ η άλλη αδελφή χρωματίδα παραμένει μη προσδεδεμένη (Εικόνα 1B). Ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης συμβαίνει νωρίς στη μίτωση και συνήθως μετατρέπεται σε αμφιτελικό πριν την έναρξη της ανάφασης (Cimini, 2008; Rieder and Salmon, 1998). Επίσης, ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης έχει ως αποτέλεσμα την τοποθέτηση του χρωμοσώματος κοντά στον ένα πόλο, στον οποίο είναι προσδεδεμένος. Καθώς το

κύτταρο προχωρά από τη μετάφαση στην ανάφαση παρουσία μονοτελικής πρόσδεσης, αυτό οδηγεί σε μετακίνηση και των δύο αδελφών χρωματίδων προς τον ένα πόλο, με αποτέλεσμα την ανευπλοειδία. Ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης, ενεργοποιεί το spindle checkpoint, μηχανισμό που δεν επιτρέπει την έναρξη της ανάφασης μέχρι όλες οι αδελφές χρωματίδες να προσδεθούν διπολικά με μικροσωληνίσκους της ατράκτου (Musacchio and Salmon, 2007). Ακόμα κι ένας κινητοχώρος προσδεδεμένος μονοτελικά μπορεί να διατηρήσει ενεργό το spindle checkpoint (Rieder et al., 1995; Rieder et al., 1994). Συμπερασματικά, ο μονοτελικός τρόπος πρόσδεσης δύσκολα προκαλεί ανευπλοειδία σε κύτταρα με λειτουργικό spindle checkpoint (Cimini, 2008)

1.2.3 Ο συντελικός τρόπος πρόσδεσης

Ο συντελικός τρόπος πρόσδεσης συμβαίνει όταν και οι δύο αδελφές χρωματίδες προσδέονται με μικροσωληνίσκους που προέρχονται από τον ένα πόλο (Εικόνα 1Γ). Η μετάβαση στην ανάφαση παρουσία συντελικής πρόσδεσης θα οδηγούσε σε ένα μονοσωμικό κι ένα τρισωμικό θυγατρικό κύτταρο. Ο συντελικός τρόπος πρόσδεσης συμβαίνει πιο σπάνια σε κύτταρα που μπαίνουν στη μίτωση χωρίς φάρμακα και ενεργοποιεί το spindle checkpoint, λόγω έλλειψης τάσης μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Συνεπώς, είναι δύσκολο να προκληθεί ανευπλοειδία λόγω συντελικής πρόσδεσης σε κύτταρα με λειτουργικό spindle checkpoint (Cimini, 2008; Thompson and Compton, 2011).

Spindle checkpoint

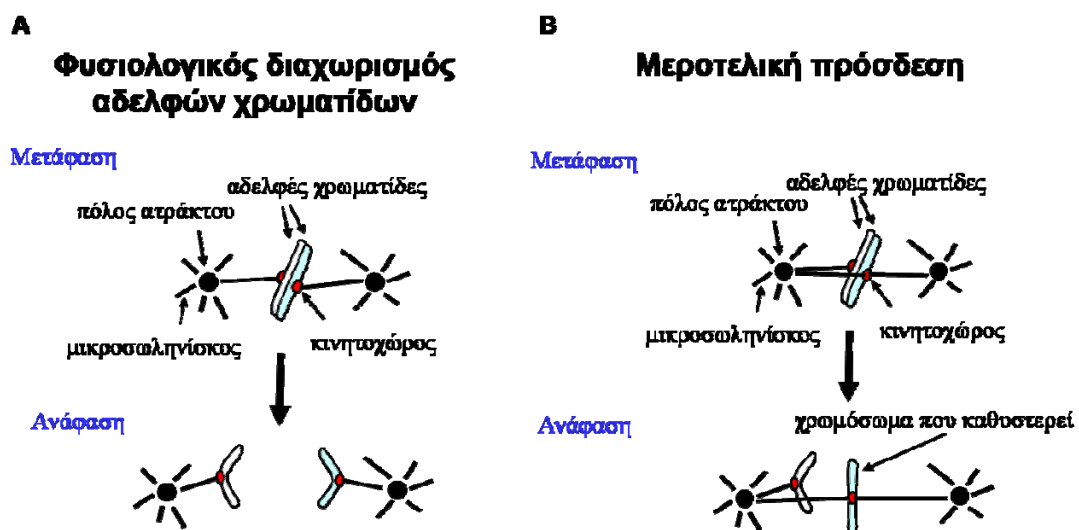
			Ενεργοποίηση του Spindle checkpoint	Ανάφαση
A	Αμφιτελική		OFF	ON
B	Μονοτελική		ON	OFF
Γ	Συντελική		ON	OFF
Δ	Μεροτελική		OFF	ON

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου φαίνονται με μαύρη γραμμή, οι κινητοχώροι με κόκκινο ενώ οι αδελφές χρωματίδες φαίνονται με άσπρο και γαλάζιο. (A) Αμφιτελική πρόσδεση, η οποία δεν ενεργοποιεί το spindle checkpoint (B, Γ) Λανθασμένοι τρόποι πρόσδεσης, οι οποίοι ενεργοποιούν το spindle checkpoint και το κύτταρο δεν προχωρά στην ανάφαση μέχρις ότου διορθωθούν (Δ) Μεροτελική πρόσδεση, η οποία δεν ενεργοποιεί το spindle checkpoint.

1.2.4 Ο μεροτελικός τρόπος πρόσδεσης

Ο μεροτελικός τρόπος πρόσδεσης συμβαίνει όταν η μια αδελφή χρωματίδα προσδένεται μέσω των κινητοχώρων ταυτόχρονα με μικροσωληνίσκους που προέρχονται και από τους δύο πόλους (Εικόνα 1Δ), (Cimini, 2007). Σε αντίθεση με τον μονοτελικό και τον συντελικό τρόπο, η αδελφή χρωματίδα που είναι συνδεδεμένη μεροτελικά, δεν εντοπίζεται κοντά σε έναν από τους δύο πόλους αλλά στοιχίζεται στο ισημερινό επίπεδο κατά τη μετάφαση. Ο μεροτελικός τρόπος πρόσδεσης συμβαίνει νωρίς στη μίτωση και δεν γίνεται αντιληπτός από το spindle checkpoint (Cimini et al., 2004; Cimini et al., 2003). Όταν τα κύτταρα μπαίνουν στην ανάφαση, τότε η αδελφή

χρωματίδα μέσω του κινητοχώρου, θα τραβηχτεί προς τον πόλο από τον οποίο προέρχονται οι περισσότεροι μικροσωληνίσκοι που είναι προσδεδεμένοι σε αυτήν. Συγκεκριμένα, αν η μια δέσμη αποτελείται από σημαντικά περισσότερους μικροσωληνίσκους σε σχέση με την άλλη, τότε ο μεροτελικά συνδεδεμένος κινητοχώρος και κατά συνέπεια η αδελφή χρωματίδα θα τραβηχτούν προς τον πόλο από τον οποίο προέρχεται η δέσμη με τους περισσότερους μικροσωληνίσκους. Εάν ο λόγος των δύο δεσμών είναι περίπου 1, τότε δημιουργείται ένα χρωμόσωμα που καθυστερεί (lagging chromosome), (Εικόνα 2). Το χρωμόσωμα που καθυστερεί, το οποίο αποτελείται τυπικά από μία αδελφή χρωματίδα, παραμένει στο ισημερινό επίπεδο μετά την έναρξη της ανάφασης. Στο τέλος της μίτωσης, η κυτταροπλασματική αύλακα θα σπρώξει το χρωμόσωμα που καθυστερεί σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανευπλοειδία σε 50% των περιπτώσεων (Cimini et al., 2001; Cimini et al., 2003). Μετά το τέλος της μίτωσης και αφού δημιουργηθεί ο νέος πυρηνικός φάκελος, το χρωμόσωμα που καθυστερεί δημιουργεί έναν μικροπυρήνα (Cimini et al., 2002). Επειδή στη μεροτελική πρόσδεση υπάρχει πρόσδεση αλλά και τάση μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, δεν ανιχνεύεται από το spindle checkpoint και είναι ο πιο συχνός τρόπος πρόκλησης ανευπλοειδίας σε κύτταρα θηλαστικών (Cimini et al., 2002; Gregan et al., 2011).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης. (Α) Αμφιτελική πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους κατά τη μετάφαση

και φυσιολογικός διαχωρισμός δύο αδελφών χρωματίδων κατά την ανάφαση. (B) Μεροτελικά προσδεδεδεμένος κινητοχώρος κατά τη μετάφαση και μεροτελική πρόσδεση η οποία παραμένει κατά την ανάφαση και οδηγεί στη δημιουργία χρωμοσώματος που καθυστερεί κατά την ανάφαση. Οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου φαίνονται με μαύρη γραμμή, οι κινητοχώροι με κόκκινο ενώ οι αδελφές χρωματίδες φαίνονται με άσπρο και γαλάζιο.

1.3 Chromosomal Passenger Complex (CPC)

1.3.1 Το CPC και ο ρόλος του στο spindle checkpoint

Το Chromosomal Passenger Complex (CPC) αποτελείται από τις Aurora-B, INCENP, Survivin και Borealin κι έχει χαρακτηριστικό εντοπισμό κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Adams et al., 2000; Bolton et al., 2002; Gassmann et al., 2004; Jelluma et al., 2008; Kaitna et al., 2000; Sampath et al., 2004). Η Aurora-B αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου και έχει ενεργότητα κινάσης (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Η INCENP προσδέεται στην Aurora-B μέσω του καρβοξυτελικού άκρου γνωστού ως IN box και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται σε αυτήν την περιοχή από την Aurora-B (Bishop and Schumacher, 2002; Honda et al., 2003). Αυτή η φωσφορυλίωση ενισχύει την ενεργότητα της Aurora-B (Bishop and Schumacher, 2002; Honda et al., 2003; Yasui et al., 2004). Η Survivin προσδέεται στην INCENP και είναι απαραίτητες για τον εντοπισμό και τη σταθερότητα του συμπλόκου (Kelly et al., 2010; Wheatley et al., 2001). Το CPC εντοπίζεται μέσα στον πυρήνα στη G2 φάση, κατά μήκος των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων κατά την πρόφαση, ενώ συγκεντρώνεται στο εσωτερικό κεντρομερές κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση, και στην αρχή της ανάφασης αφήνει τα χρωμοσώματα και μεταφέρεται στην ενδιάμεση ζώνη και στο ενδιάμεσο σώμα κατά την κυτταροκίνηση (Kelly and Funabiki, 2009; Vagnarelli and Earnshaw, 2004).

Το CPC είναι απαραίτητο για τον εντοπισμό των spindle checkpoint πρωτεϊνών στους κινητοχώρους (Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Mps1 και CENP-E), (Ditchfield et al., 2003b; Lens et al., 2003; Vigneron et al., 2004) καθώς και πρωτεϊνών απαραίτητων για την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων σε αυτούς (CENP-E, Ndc80, Knl1, Mis12, Zwilch, MCAK, Dam1 και Plk1), (Andrews et al., 2004; Emanuele et al., 2008; Goto et al., 2006; Lan et al., 2004). Επίσης, το CPC είναι απαραίτητο για τον εντοπισμό πρωτεϊνών του εσωτερικού κεντρομερούς όπως οι

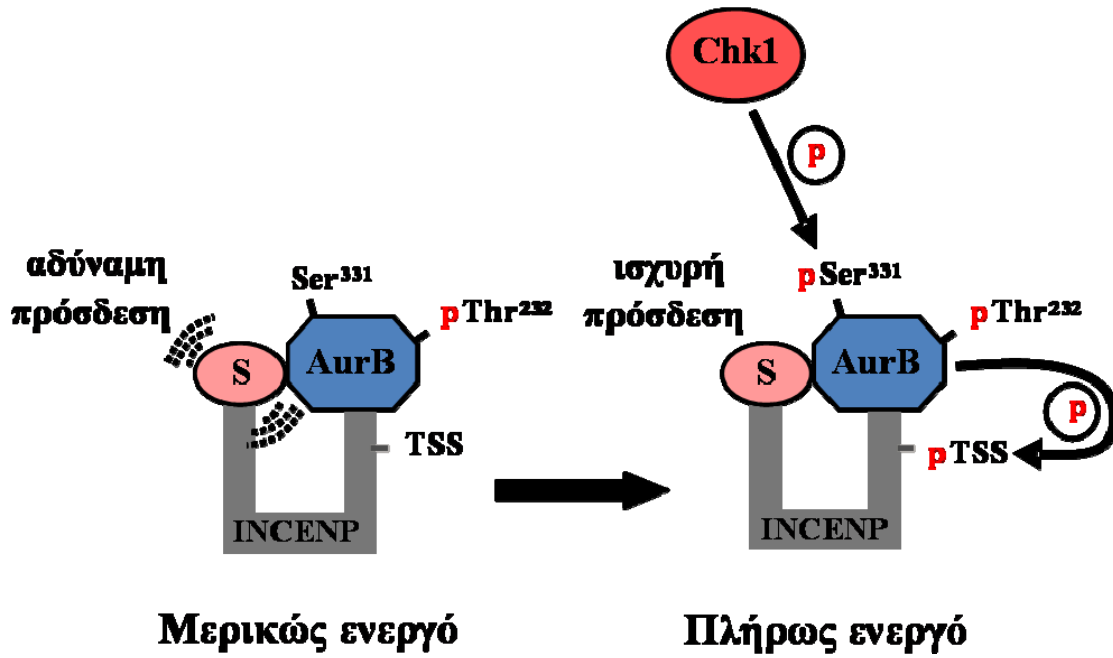
πρωτεΐνες Shugoshin (Sgo1, Sgo2) και MCAK (Huang et al., 2007; Kawashima et al., 2007; Pouwels et al., 2007).

1.3.2 Η μεταφορά του CPC στα κεντρομερή

Το CPC μεταφέρεται στα κεντρομερή μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της ιστόνης 3 στη θρεονίνη 3 από τη Haspin. Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 αναγνωρίζεται από τη συντηρημένη BIR domain της Survivin. Η πρόσδεση της Survivin στη θέση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση όλου του CPC στα κεντρομερή και την ενεργοποίηση της Aurora-B (Kelly et al., 2010). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της ιστόνης 2A στη σερίνη 121 από τη Bub1. Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη 2A στη σερίνη 121 διευκολύνει την πρόσδεση της Shugoshin, έναν προσαρμογέα του CPC στα κεντρομερή (Yamagishi et al., 2010).

1.3.3 Η ενεργοποίηση της Aurora-B

Η Aurora-B, μια κινάση σερίνης-θρεονίνης συντηρημένη από τους μύκητες μέχρι τον άνθρωπο, αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του CPC. Η ενεργότητα της Aurora-B ρυθμίζεται από την INCENP και τη Survivin. Η ενεργοποίηση της Aurora-B απαιτεί πρόσδεση της INCENP μέσω του συντηρημένου καρβοξυτελικού IN άκρου της και αυτοφωσφορυλίωση της Aurora-B στη θρεονίνη 232 (T232) μέσα στο activation loop (Bishop and Schumacher, 2002; Bolton et al., 2002; Honda et al., 2003; Sessa et al., 2005; Yasui et al., 2004). Αυτό προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης της κινάσης με αποτέλεσμα ένα ενδιάμεσο στάδιο ενεργοποίησης (Sessa et al., 2005). Η πλήρης ενεργοποίηση του μορίου απαιτεί φωσφορυλίωση της INCENP στο TSS motif κοντά στο συντηρημένο καρβοξυτελικό IN άκρο (Bishop and Schumacher, 2002). Πρόσφατα δείξαμε ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 και αυτή η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Survivin, τη φωσφορυλίωση της INCENP στο TSS motif και την πλήρη ενεργοποίηση της Aurora-B (Εικόνα 3), (Petsalaki et al., 2011).



Εικόνα 3: Μοντέλο ενεργοποίησης της Aurora-B (AurB). Η Aurora-B συνδεδεμένη με την INCENP και τη Survivin αυτοφωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη 232 (T232) και είναι μερικώς ενεργή. Κατά την προμετάφαση απουσία φαρμάκων ή μετά από επώαση με ταξόλη, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 και αυτή η φωσφορυλίωση απαιτείται για φωσφορυλίωση της INCENP στο TSS motif και πλήρη ενεργοποίηση της Aurora-B. Επίσης, η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για σταθερή πρόσδεση της Survivin στο σύμπλοκο. p=phosphorylation, S=Survivin

1.3.4 Ο ρόλος της Aurora-B στο spindle checkpoint

Όταν το CPC αποσταθεροποιεί τις λανθασμένες προσδέσεις μέσω φωσφορυλίωσης υποστρωμάτων της Aurora-B, τότε δημιουργούνται προσωρινά μη προσδεδεμένοι κινητοχώροι οι οποίοι γίνονται αντιληπτοί από το spindle checkpoint (Pinsky et al., 2006; Rieder et al., 1995; van der Waal et al., 2012a).

Υπάρχουν δύο θεωρίες για τον τρόπο με τον οποίο η Aurora-B φτάνει τα υποστρώματά της στον εξωτερικό κινητοχώρο ενώ η ίδια εντοπίζεται στο κεντρομερές (Lampson and Cheeseman, 2011; Santaguida and Musacchio, 2009; van der Waal et al., 2012a). Σύμφωνα με την πρώτη θεωρία, η Aurora-B διαχέεται μακριά από το κεντρομερές προς τον εξωτερικό κινητοχώρο προκειμένου να φτάσει τα υποστρώματά της ενώ σύμφωνα με τη δεύτερη η INCENP λειτουργεί σαν ένα ‘λουρί’

που τεντώνεται, ώστε η Aurora-B να φτάσει στον εξωτερικό κινητοχώρο (van der Waal et al., 2012a). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την πρώτη θεωρία, δείχνοντας ότι υπάρχει μια διαβάθμιση φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων της Aurora-B, η οποία ξεκινά από το κεντρομερές και απλώνεται μερικά μm μακριά από το κεντρομερές (Wang et al., 2011).

1.3.5 Ο ρόλος της Aurora-B στην ανάφαση και στην τελόφαση

Κατά τη διάρκεια της ανάφασης, το CPC εντοπίζεται στο midzone και ρυθμίζει τη σταθερότητα της μιτωτικής ατράκτου και τη δημιουργία της κυτταροπλασματικής αύλακας (van der Waal et al., 2012a). Κατά τη διάρκεια της κυτταροκίνησης, το CPC εντοπίζεται στο midbody και ρυθμίζει τη σύσφιξη του συσταλτού δακτυλίου ακτίνης μυοσίνης και προστατεύει από τετραπλοειδία (στα θηλαστικά) καθυστερώντας τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος όταν υπάρχει μια χρωμοσωμική γέφυρα, η οποία συνδέει τα δύο θυγατρικά κύτταρα (Norden et al., 2006; van der Waal et al., 2012a).

1.3.6 Ο ρόλος της Aurora-B στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων

Η Aurora-B παίζει σπουδαίο ρόλο στην επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων μέσω φωσφορυλίωσης του δικτύου KMN (Tanaka, 2012). Το δίκτυο KMN αποτελείται από τις πρωτεΐνες KNL-1, Mis12 και το σύμπλοκο Ndc80, είναι συντηρημένο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι πολύ σημαντικό για τη συναρμολόγηση του εξωτερικού κινητοχώρου (Cheeseman et al., 2006; Kline-Smith et al., 2005). Μείωση των πρωτεϊνών KNL-1 ή KNL-3 εξαλείφει ολοκληρωτικά τις προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (Nekrasov et al., 2003). Μείωση του συμπλόκου Mis12 σε άλλους οργανισμούς δυσχεραίνει τη συναρμολόγηση του κινητοχώρου (De Wulf et al., 2003; Kline et al., 2006; Obuse et al., 2004) ενώ μείωση του συμπλόκου Ndc80 οδηγεί στη δημιουργία κινητοχώρων οι οποίοι δεν μπορούν να διατηρήσουν την τάση κατά την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων σε αυτούς (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2005; McClelland et al., 2004; Wigge and Kilmartin, 2001). Η Aurora-B φωσφορυλιώνει

όλα τα μέλη του δικτύου KMN. Η φωσφορυλίωση των συστατικών του δικτύου KMN, αποσταθεροποιεί τους λανθασμένους μικροσωληνίσκους συμβάλλοντας στη δημιουργία αμφιτελικών προσδέσεων (Tanaka, 2012).

Η Aurora-B είναι απαραίτητη για τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση, για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση και για την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης (Andrews et al., 2004; Cimini et al., 2006; Ditchfield et al., 2003b; Emanuele et al., 2008; Fuller et al., 2008; Hauf et al., 2003a; Lampson et al., 2004; Norden et al., 2006; Ruchaud et al., 2007; Steigemann et al., 2009; Tanaka et al., 2002; van der Waal et al., 2012a). Αναστολή της Aurora-B προκαλεί μεροτελικές και συντελικές προσδέσεις (Cimini et al., 2003; Cimini et al., 2006; Ditchfield et al., 2003b; Hauf et al., 2003a; Kelly and Funabiki, 2009; Knowlton et al., 2006; Lampson and Kapoor, 2005). Έχει προταθεί ότι η Aurora-B προκαλεί αποσταθεροποίηση των λανθασμένων μικροσωληνίσκων φωσφορυλιώνοντας τα υποστρώματά της στους κινητοχώρους και προκαλώντας πολυμερισμό και αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Cheeseman et al., 2002; Cimini et al., 2006; Pinsky et al., 2006). Στην περίπτωση του συμπλόκου Ndc80, το οποίο αποτελείται από τις Hec1, Nuf2, Spc24 και Spc25, η Aurora-B φωσφορυλιώνει τη Hec1 στο αμινοτελικό άκρο κι έτσι μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης μικροσωληνίσκων (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2011). Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός είναι υπό διερεύνηση.

1.4 Οι κινεσίνες MCAK και Kif2b

Οι κινεσίνες MCAK (Mitotic centromere associated Kinesin) και Kif2b (Kinesin family member 2b) αποπολυμερίζουν μικροσωληνίσκους που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο της ατράκτου και απαιτούνται για την επιδιόρθωση μεροτελικών προσδέσεων (Andrews et al., 2004; Bakhoum et al., 2009; Desai et al., 1999; Kline-Smith et al., 2004; Knowlton et al., 2006; Lan et al., 2004; Maney et al., 1998).

1.4.1 Ο ρόλος της κινεσίνης MCAK στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων

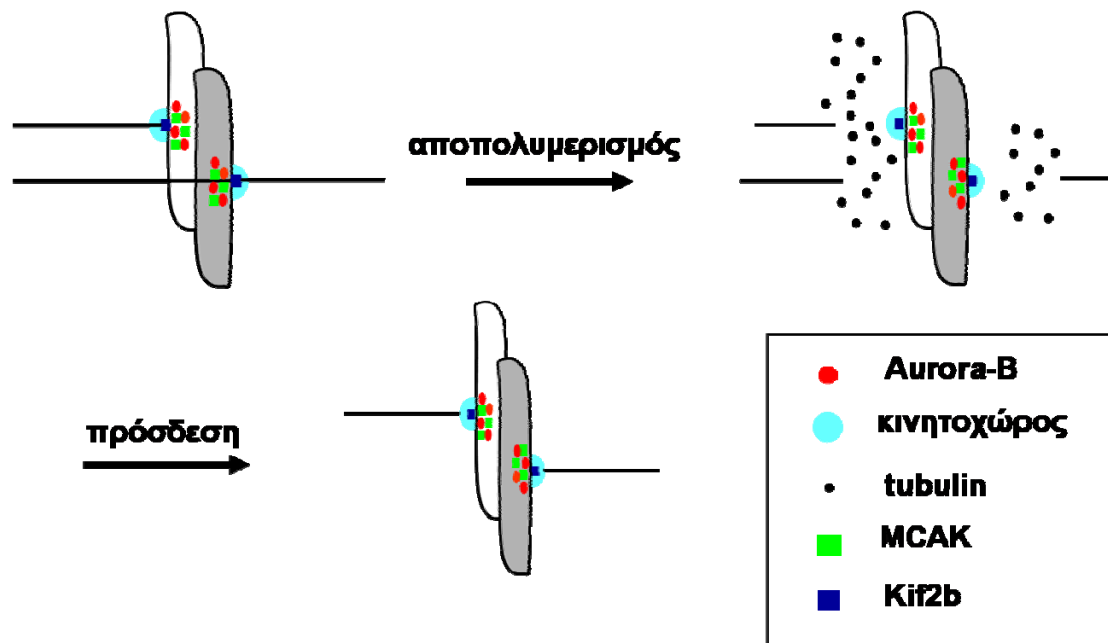
Η MCAK είναι μια KinI πρωτεΐνη, η οποία έχει μια καταλυτική υπομονάδα κινεσίνης στη μέση της πρωτεΐνης (Hertzer et al., 2003; Ovechkina and Wordeman, 2003; Vale and Fletterick, 1997; Walczak et al., 1996; Wordeman and Mitchison, 1995). Αντί να μετακινούνται πάνω στους μικροσωληνίσκους, οι KinI κινεσίνες αποπολυμερίζουν μικροσωληνίσκους (Desai et al., 1999; Hunter et al., 2003; Kline-Smith et al., 2004; Maney et al., 2001; Tanenbaum et al., 2011; Walczak et al., 1996).

Η MCAK εντοπίζεται σε διάφορες δομές συμπεριλαμβανομένων των πόλων της ατράκτου, των κεντρομερών απουσία τάσης κατά την προμετάφαση και των κινητοχώρων παρουσία τάσης κατά τη μετάφαση (Lan et al., 2004). Κατά την ανάφαση και τελόφαση, η MCAK παραμένει προσδεδεμένη στα κεντρομερή (Maney et al., 1998; Wordeman and Mitchison, 1995). Η πρόσδεση της MCAK στα κεντρομερή γίνεται μέσω του αμινοτελικού της άκρου ενώ στην πρόσδεση δεν παίζει ρόλο το motor domain (Andrews et al., 2004).

Η MCAK προκαλεί αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων σε κύτταρα στη μετάφαση (Εικόνα 4) και η απαλοιφή της σχετίζεται με λανθασμένο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στην ανάφαση (Bakhoun et al., 2009; Kline-Smith et al., 2004; Maney et al., 1998). Κύτταρα με μειωμένη MCAK παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (Bakhoun et al., 2009). Η Aurora-B φωσφορυλιώνει την MCAK *in vitro* και *in vivo* στη σερίνη 196 (Andrews et al., 2004; Knowlton et al., 2006; Lan et al., 2004) και η φωσφορυλιωμένη MCAK εντοπίζεται περισσότερο στα μεροτελικά σε σχέση με τα αμφιτελικά προσδεδεμένα κεντρομερή (Knowlton et al., 2006).

1.4.2 Ο ρόλος της κινεσίνης Kif2b στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων

Η κινεσίνη Kif2b εντοπίζεται στα κεντροσώματα κατά τη μεσόφαση και στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης (Manning et al., 2007). Στην ανάφαση συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου και εντοπίζεται στην ενδιάμεση ζώνη ενώ στην τελόφαση παρατηρείται στο ενδιάμεσο σώμα. Τέλος, εντοπίζεται στους εξωτερικούς κινητοχώρους κατά την προμετάφαση μαζί με την πρωτεΐνη Hec1 (Manning et al., 2007).



Εικόνα 4: Επιδιόρθωση μεροτελικών προσδέσεων μέσω των κινεσινών MCAK και Kif2b. Παρουσία μεροτελικής πρόσδεσης, οι κινεσίνες MCAK και Kif2b αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους και στη συνέχεια δημιουργείται στοχαστικά αμφιτελική πρόσδεση. Οι μικροσωληνίσκοι φαίνονται με μαύρη γραμμή ενώ οι αδελφές χρωματίδες με άσπρο και γκρι.

Η Kif2b είναι απαραίτητη για το σχηματισμό της διπολικής ατράκτου σε ανθρώπινα κύτταρα και για την κίνηση των κινητοχώρων που είναι συνδεδεμένοι με τους μικροσωληνίσκους, καθώς κύτταρα με μειωμένη Kif2b παρουσιάζουν μειωμένη ταχύτητα πολυμερισμού μικροσωληνίσκων κατά 80% (Manning et al., 2007). Η Kif2b στους κινητοχώρους ρυθμίζει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων κατά την προμετάφαση (Εικόνα 4). Ο εντοπισμός της Kif2b στους κινητοχώρους ρυθμίζεται μέσω της Aurora-B χωρίς να είναι ακόμα γνωστός ο ακριβής μηχανισμός (Bakhoum et al., 2009). Κύτταρα με μειωμένη Kif2b παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και οι κινητοχώροι αυτών των χρωμοσωμάτων φαίνονται διογκωμένοι και παρουσιάζουν δέσμες μικροσωληνίσκων που προέρχονται από αντίθετους πόλους, γεγονός ενδεικτικό μεροτελικής πρόσδεσης. Επιπροσθέτως, υπερέκφραση τόσο της MCAK όσο και της Kif2b οδηγεί σε σημαντική μείωση του ποσοστού αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση (Bakhoum et al., 2009).

Μείωση των κινεσινών MCAK και Kif2b επηρεάζει το turnover των μικροσωληνίσκων, δηλαδή το ρυθμό πολυμερισμού και αποπολυμερισμού τους αλλά σε διαφορετικές φάσεις της μίτωσης. Μείωση της Kif2b αυξάνει το χρόνο ημιζωής των μικροσωληνίσκων κατά την προμετάφαση σε δοκιμασία ευαισθησίας σε nocodazole, ένα φάρμακο που αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους. Έτσι, κύτταρα με μειωμένη Kif2b έχουν πιο σταθερούς μικροσωληνίσκους στην προμετάφαση με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διορθώσουν αποτελεσματικά τις λανθασμένες προσδέσεις. Αντίθετα, κύτταρα με μειωμένη MCAK παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα μικροσωληνίσκων κυρίως στη μετάφαση, γεγονός που μας δείχνει ότι οι δύο κινεσίνες έχουν διαφορετικούς ρόλους στην επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων στη μίτωση (Bakhoun et al., 2009).

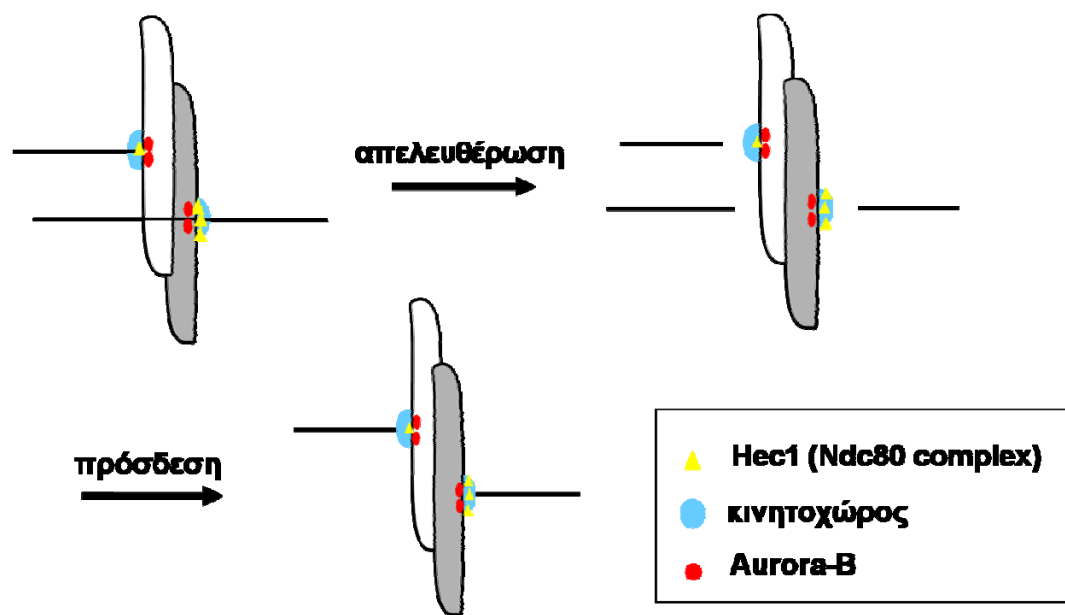
Στη μετάφαση, η Kif2b αντικαθίσταται από το σύμπλοκο των πρωτεϊνών astrin, SKAP και Ska στους κινητοχώρους για να επιτευχθεί σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων των κινητοχώρων και στοίχιση των χρωμοσωμάτων (Chan et al., 2012; Manning et al., 2010; Schmidt et al., 2010; van der Waal et al., 2012a).

1.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hec1 στην επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων

Η Hec1 ανήκει στο σύμπλοκο Ndc80 το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη λανθασμένου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων απελευθερώνοντας λανθασμένους μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων (Εικόνα 5). Το αμινοτελικό άκρο της Hec1 ρυθμίζει τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (DeLuca et al., 2006). Συγκεκριμένα, η Aurora-B φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Hec1 *in vitro* σε έξι κατάλοιπα στο αμινοτελικό της άκρο: σερίνη 5, σερίνη 15, σερίνη 44, θρεονίνη 49, σερίνη 55 και σερίνη 69 ώστε να προκαλέσει αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων των κινητοχώρων (DeLuca et al., 2006). Έκφραση ενός διαγονιδίου με μεταλλαγμένες τις έξι θέσεις σε αλανίνη ώστε να μην μπορούν να φωσφορυλιωθούν, οδηγεί σε αδυναμία των κυττάρων να στοιχίσουν τα χρωμοσώματά τους στο ισημερινό επίπεδο κατά τη μετάφαση και εμφάνιση πολλών μη στοιχισμένων χρωμοσωμάτων. Επίσης, έκφραση του συγκεκριμένου διαγονιδίου είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών προσδέσεων, αύξηση των λανθασμένων μικροσωληνίσκων των κινητοχώρων, μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που

καθυστερούν (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2006). Επιπροσθέτως, προσθήκη καθαρής πρωτεΐνης Aurora-B σε μίγμα με μικροσωληνίσκους και πρωτεΐνη Hec1, οδήγησε σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της Hec1 στους μικροσωληνίσκους (Cheeseman et al., 2006). Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της Hec1 από την Aurora-B μειώνει τη συνάφεια των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους, οδηγώντας σε απελευθέρωση των μικροσωληνίσκων (DeLuca et al., 2011).

Η φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 είναι υψηλή στην προμετάφαση και μειώνεται σημαντικά στη μετάφαση (DeLuca et al., 2011). Ο εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης σερίνης 55 της Hec1 είναι ο μέγιστος στην πρόφαση λίγο πριν τη διάλυση του πυρηνικού φακέλου. Καθώς τα κύτταρα προχωρούν στη μίτωση, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 55 μειώνεται και φτάνει στο πιο χαμηλό επίπεδο στη μετάφαση όπου όλα τα χρωμοσώματα είναι στοιχισμένα στο ισημερινό επίπεδο (DeLuca et al., 2011).



Εικόνα 5: Επιδιόρθωση μεροτελικών προσδέσεων μέσω της Hec1. Παρουσία μεροτελικής πρόσδεσης, η Hec1 φωσφορυλιώνεται από την Aurora-B στο αμινοτελικό άκρο και απελευθερώνει τους μικροσωληνίσκους και στη συνέχεια δημιουργείται στοχαστικά αμφιτελική πρόσδεση. Οι μικροσωληνίσκοι φαίνονται με μαύρη γραμμή ενώ οι αδελφές χρωματίδες με άσπρο και γκρι.

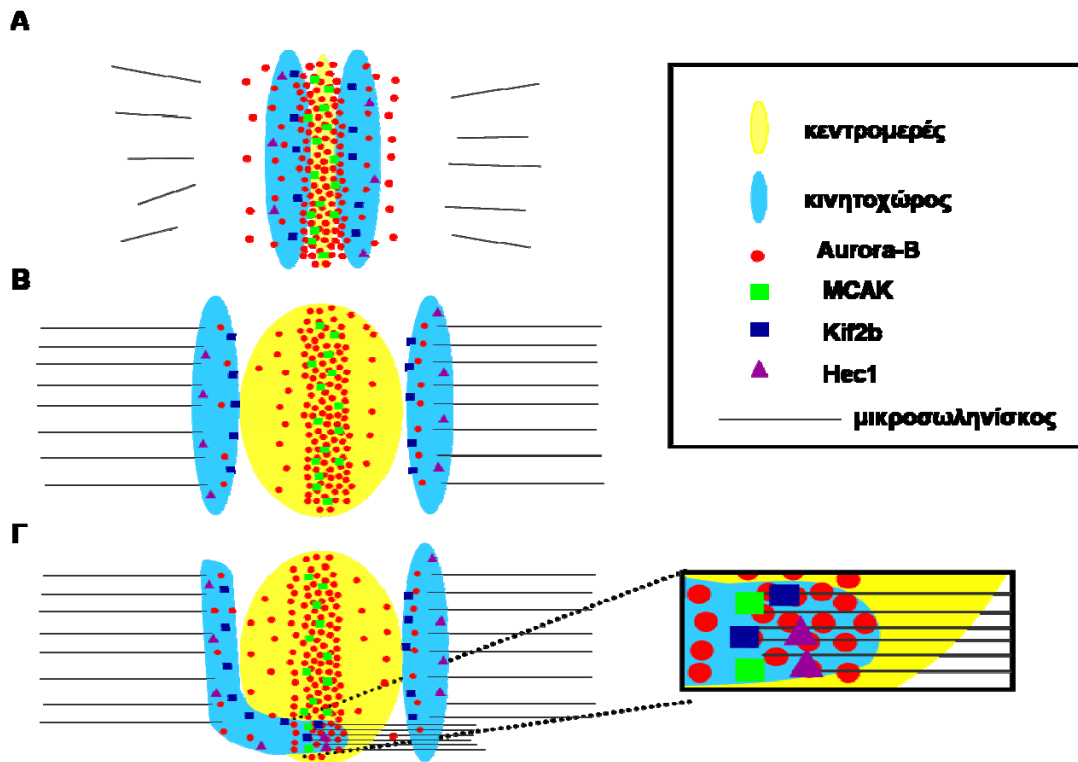
1.6 Μοντέλο επιδιόρθωσης μεροτελικών προσδέσεων από την Aurora-B

Αναστολή της Aurora-B έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας των προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους και αύξηση του ποσοστού των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις (Cimini et al., 2006). Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το επικρατές μοντέλο επιδιόρθωσης μεροτελικών προσδέσεων μέσω της Aurora-B. Στην αρχή της προμετάφασης, το κεντρομερές δεν είναι τεντωμένο και οι προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους μπορούν εύκολα να αποσταθεροποιηθούν επειδή βρίσκονται κοντά στην περιοχή όπου η Aurora-B εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Εικόνα 6A). Η Aurora-B βρίσκεται τότε κοντά στα υποστρώματά της (MCAK, Hec1) και φωσφορυλιώνοντάς τα μπορεί να αποσταθεροποιήσει λανθασμένες προσδέσεις (Εικόνα 6A).

Στη μετάφαση όπου τα χρωμοσώματα έχουν προσδεθεί διπολικά και έχει επιτευχθεί διπολικός προσανατολισμός, το κεντρομερές τεντώνεται και η Aurora-B απομακρύνεται από τα υποστρώματά της με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των σωστών προσδέσεων (Εικόνα 6B). Επίσης, τα άκρα των μικροσωληνίσκων απομακρύνονται από το κεντρομερές όπου η Aurora-B βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Εικόνα 6B). Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση μεταξύ των αδελφών κινητοχώρων, τόσο περισσότερο απομακρύνονται οι μικροσωληνίσκοι από το κεντρομερές κι έτσι σταθεροποιούνται περισσότερο οι προσδέσεις (Cimini et al., 2006).

Όταν υπάρχει μια μεροτελική πρόσδεση, ο ένας από τους δύο κινητοχώρους τραβιέται από δύο δέσμες μικροσωληνίσκων που προέρχονται από αντίθετους πόλους με αποτέλεσμα να τεντώνεται και να εισέρχεται μέσα στην περιοχή όπου η Aurora-B βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Εικόνα 6Γ). Τότε, σύμφωνα με αυτό το μοντέλο επιδιόρθωσης, οι λανθασμένες προσδέσεις βρίσκονται πιο κοντά στην περιοχή όπου η Aurora-B μπορεί να αποσταθεροποιήσει τις προσδέσεις κι έτσι πραγματοποιείται αποπολυμερισμός των λανθασμένων και σταθεροποίηση των σωστών προσδέσεων (Εικόνα 6Γ) (Cimini et al., 2006). Συνεπώς, η επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων περιλαμβάνει δύο στάδια: Τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο και επαναπρόσδεση

των μικροσωληνίσκων από το σωστό πόλο στις κενές θέσεις που θα δημιουργηθούν. Αναστολή της Aurora-B προκαλεί μείωση του turnover των μικροσωληνίσκων κι αυτό μειώνει την πιθανότητα επιδιόρθωσης (Cimini et al., 2006).



Εικόνα 6 Μοντέλο επιδιόρθωσης μεροτελικών προσδέσεων βασισμένο στο (Cimini et al., 2006) (A) Το κεντρομερές απουσία τάσης κατά την προμετάφαση (B) Αμφιτελική πρόσδεση (Γ) Μεροτελική πρόσδεση.

1.7 Η κινάση Mps1

1.7.1 Ο ρόλος της Mps1 στο spindle checkpoint

Η Mps1 είναι μια κινάση απαραίτητη για τους οργανισμούς από το μύκητα μέχρι τον άνθρωπο. Αρχικά ανακαλύφθηκε στο μύκητα σε μια μελέτη μεταλλαγμάτων που προκαλούν μιτωτικές ατράκτους με ένα πόλο (Winey et al., 1991), ωστόσο ο ρόλος της Mps1 στο διπλασιασμό του κεντροσώματος και τη δημιουργία διπολικής ατράκτου σε κύτταρα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι από διερεύνηση (Fisk et al., 2003; Stucke et al., 2002). Η Mps1 είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του spindle checkpoint παρουσία μη προσδεμένων κινητοχώρων με μικροσωληνίσκους της ατράκτου (Abrieu et al., 2001; Fisk and Winey, 2004; Hewitt et al., 2010; Santaguida et al., 2010; Stucke et al., 2002; Weiss and Winey, 1996). Ο ρόλος της στο spindle checkpoint έχει αποδοθεί επίσης στην Mps1 λόγω της αναγκαιότητάς της στον εντοπισμό των Mad2 και BubR1 στους κινητοχώρους (Abrieu et al., 2001; Jelluma et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2010; Meraldi et al., 2004; Slidrecht et al., 2010; Tighe et al., 2008). Επίσης, η Mps1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Bub1 στους κινητοχώρους (Maciejowski et al., 2010; Slidrecht et al., 2010). Αναστολή της Mps1 οδηγεί σε απουσία λειτουργικού spindle checkpoint με αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται ανευπλοειδικά και τελικά να πεθαίνουν γεγονός που καθιστά την Mps1 καλό στόχο για αντικαρκινική θεραπεία (Lan and Cleveland, 2010).

1.7.2 Ο ρόλος της Mps1 στη φυσιολογική μίτωση

Εκτός από τη λειτουργία της στο spindle checkpoint, η Mps1 είναι απαραίτητη για τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο κατά τη μετάφαση καθώς και για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση (Abrieu et al., 2001; Hewitt et al., 2010; Jelluma et al., 2008; Maure et al., 2007; Santaguida et al., 2010; Stucke et al., 2002).

Αναστολή ή μείωση με siRNA της Mps1 δεν επηρεάζουν τον εντοπισμό του δικτύου KMN ούτε τη δομή του εξωτερικού κινητοχώρου (Santaguida et al., 2010). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η Mps1 φωσφορυλιώνει τη Borealin ώστε να

ενισχύσει την ενεργότητα της Aurora-B (Jelluma et al., 2008; Saurin et al., 2011). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι αναστολή της Mps1 δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 10 της ιστόνης H3 ούτε τη φωσφορυλίωση της ιστόνης CENP-A στη σερίνη 7 στους κινητοχώρους, τα οποία είναι υποστρώματα της Aurora-B. Επιπροσθέτως, η Aurora-B εντοπίζεται φυσιολογικά σε κύτταρα με μειωμένη Mps1. Αντίθετα, αναστολή της Aurora-B προκαλεί μειωμένο εντοπισμό της Mps1 στους κινητοχώρους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Mps1 δρα μεταγενέστερα από την Aurora-B (Hewitt et al., 2010; Santaguida et al., 2010; Santaguida et al., 2011; Saurin et al., 2011; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010). Μια άλλη μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ενεργότητα της Mps1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Aurora-B στα κεντρομερή στην αρχή της μίτωσης ενώ αν γίνει αναστολή της Mps1 μετά τη συγκέντρωση της Aurora-B στα κεντρομερή, τότε ο εντοπισμός της Aurora-B δεν επηρεάζεται (van der Waal et al., 2012b). Ωστόσο, ο ρόλος της Mps1 στην πρόληψη των μεροτελικών προσδέσεων δεν έχει περιγραφεί ως τώρα.

1.8 Η πρωτεϊνική κινάση Chk1

Η Chk1 ανακαλύφθηκε αρχικά στο fission μύκητα ως μια κινάση σερίνης/θρεονίνης απαραίτητη για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου όταν υπάρχουν βλάβες στο DNA (Patil et al., 2013; Walworth et al., 1993). Η Chk1 είναι καλά συντηρημένη και σε άλλα είδη όπως η *Drosophila*, ο *Xenopus*, το ποντίκι και ο άνθρωπος (Fogarty et al., 1994; Kumagai et al., 1998; Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997). Στο fission yeast, οι κινάσες Chk1 και Cds1 (το ομόλογο της Chk2 των θηλαστικών) ενεργοποιούνται με διαφορετικά σήματα και αναλαμβάνουν διαφορετικά καθήκοντα: η Chk1 ενεργοποιείται παρουσία DNA damage και είναι υπεύθυνη για το σταμάτημα στη G2 φάση, ενώ η Cds1 ενεργοποιείται με αναστολή της σύνθεσης του DNA και απαιτείται και για καθυστέρηση της μίτωσης και για σταθεροποίηση των δομών της αντιγραφής στην S φάση (Chen and Sanchez, 2004; O'Connell et al., 2000). Ωστόσο, η κατάσταση είναι διαφορετική στα κύτταρα σπονδυλωτών: Η Chk1 ενεργοποιείται παρουσία DNA damage και μετά από αναστολή της σύνθεσης του DNA, πιθανόν μέσω της ATR, και φαίνεται να είναι ο κύριος υπεύθυνος της στάσης των κυττάρων στη G2 φάση και στις λειτουργίες του

checkpoint της αντιγραφής (Bartek and Lukas, 2003; Chen and Sanchez, 2004). Σε αντίθεση με την Cds1 του fission yeast, η Chk2 ενεργοποιείται παρουσία DNA damage στα κύτταρα των σπονδυλωτών μέσω φωσφορυλίωσης από την ATM (Ahn et al., 2000; Matsuoka et al., 1998).

Παρουσία DNA damage ή αναστολέων της αντιγραφής του DNA, η Chk1 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στη σερίνη 317 και στη σερίνη 345 από την ATR (Capasso et al., 2002; Liu et al., 2000; Patil et al., 2013; Tapia-Alveal et al., 2009; Zhao and Piwnicka-Worms, 2001). Επιπλέον, η Claspin προσδένεται στην ενεργοποιημένη Chk1 και τη σταθεροποιεί (Kumagai and Dunphy, 2000). Αποικοδόμηση της claspin μέσω ουμπικιτινίωσης και καταστροφής από το πρωτεάσωμα οδηγεί σε απενεργοποίηση της Chk1 (Gewurz and Harper, 2006). Η ενεργοποιημένη Chk1 φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα, προκειμένου να προκαλέσει σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (Blasius et al., 2011).

Απενεργοποίηση της ATR ή της Chk1 έχει ως αποτέλεσμα θάνατο νωρίς στην εμβρυογένεση ενώ απαλοιφή της ATM ή της Chk2 σε knock-out ποντίκια δεν προκαλεί θνησιμότητα (Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000; Smith et al., 2010a; Takai et al., 2000). Σωματικά κύτταρα χωρίς ATM ή Chk2 πολλαπλασιάζονται επιτυχώς σε κυτταροκαλλιέργεια (Jallepalli et al., 2003; Lavin and Shiloh, 1997; Xu et al., 1996) ενώ κύτταρα χωρίς τις ATR ή Chk1 οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (Brown and Baltimore, 2003; Liu et al., 2000; Niida et al., 2007; Smith et al., 2010b). Αντίθετα, απαλοιφή της Chk1 από τα DT40 κύτταρα, τα οποία είναι B-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο δεν προκαλεί κυτταρικό θάνατο αν και δημιουργεί προβλήματα στο G2/M DNA damage checkpoint και στη διατήρηση των δομών της αντιγραφής μετά από αναστολή της DNA πολυμεράσης (Zachos et al., 2003). Επιπροσθέτως, η Chk1 προκαλεί ενεργοποίηση των μονοπατιών επιδιόρθωσης του DNA ακόμα και απόπτωση όταν οι βλάβες στο DNA είναι πολύ σοβαρές (Chen and Poon, 2008; Harper and Elledge, 2007).

1.8.1 Τα υποστρώματα της Chk1

Τα κυριότερα υποστρώματα της Chk1 όταν υπάρχει DNA damage, είναι οι φωσφατάσες Cdc25 και η κινάση Wee1 (Patil et al., 2013). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις Cdc25 φωσφατάσες: Cdc25A, Cdc25B και Cdc25C, οι οποίες

αποφωσφορυλιώνουν τις Cdks με αποτέλεσμα να προχωρά ο κυτταρικός κύκλος (Patil et al., 2013). Όλες οι παραπάνω φωσφατάσες μπορούν να φωσφορυλιωθούν από την Chk1 παρουσία DNA damage. Μετά από φωσφορυλίωση, οι τρεις φωσφατάσες μπορούν να οδηγήσουν σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου με διαφορετικούς τρόπους (Donzelli and Draetta, 2003; Patil et al., 2013; Uto et al., 2004).

Φωσφορυλίωση της Cdc25A από την Chk1 οδηγεί σε αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος και αναστολή των Cdk1 και Cdk2 με αποτέλεσμα σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη G1 στην S, σταμάτημα στην S και σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη G2 στην M (Mailand et al., 2000; Sanchez et al., 1997). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη Nek11, η οποία φωσφορυλιώνει τη Cdc25A με αποτέλεσμα το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου παρουσία DNA damage (Melixetian et al., 2009; Patil et al., 2013).

Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Cdc25B στα κεντροσώματα, οδηγώντας τη σε απομάκρυνση από τα κεντροσώματα και αναστολή της Cdk1 πριν την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης (Kramer et al., 2004). Όσον αφορά στη Cdc25C, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Cdc25C με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων πρόσδεσης για τις 14-3-3 πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύουν τη Cdc25C και τη μεταφέρουν στο κυτταρόπλασμα. Έτσι επιτυγχάνεται απενεργοποίηση της Cdk1 και σταμάτημα στη G2 φάση (Patil et al., 2013; Peng et al., 1997).

Επιπροσθέτως, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Wee1, μια κινάση υπεύθυνη για την ανασταλτική φωσφορυλίωση της Cdk1 στην τυροσίνη 15. Παρουσία DNA damage, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Wee1 με αποτέλεσμα την αναστολή της Cdk1 και σταμάτημα στη G2 φάση (Lee et al., 2001; O'Connell et al., 1997). Ακόμα, η Chk1 ρυθμίζει αρνητικά την Plk1, μια μιτωτική κινάση απαραίτητη για την ωρίμανση των κεντροσωμάτων, το σχηματισμό της ατράκτου και την κυτταροκίνηση (Patil et al., 2013; Tang et al., 2006). Η Plk1 φωσφορυλιώνει τη Wee1 και την οδηγεί σε αποικοδόμηση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Cdk1 και είσοδο στη μίτωση (Patil et al., 2013). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνει την p53 κατά την ενεργοποίηση του DNA damage ckeckpoint (Ou et al., 2005; Shieh et al., 2000). Επίσης, παρουσία DNA damage, η Chk1 φωσφορυλιώνει την p73 στη σερίνη 47, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης της p73 και απόπτωση (Gonzalez et al., 2003; Urist et al., 2004).

1.8.2 Ο ρόλος της Chk1 στην S φάση

Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από τις Cdks οι οποίες εξαρτώνται από την πρόσδεση των συμπαραγόντων τους, των κυκλινών, από κινάσες και Cdc25 φωσφατάσες. Η Cdk1 ενεργοποιείται με πρόσδεση της Cyclin B, φωσφορυλίωση στη σερίνη 161 και αποφωσφορυλίωση στη θρεονίνη 14 και τυροσίνη 15 από τις Cdc25 (Patil et al., 2013; Zhang and Hunter, 2013).

Η Chk1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο σταμάτημα των κυττάρων στην S φάση παρουσία γενοτοξικού stress (αναστολέων της αντιγραφής του DNA πχ. υδροξουρία ή βλαβών στο DNA) (Zhang and Hunter, 2013). Η Chk1 φωσφορυλιώνει τη Cdc25A με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος. Το αποτέλεσμα είναι η απενεργοποίηση της Cdk2 και το σταμάτημα των δομών της αντιγραφής (Falck et al., 2001; Mailand et al., 2000; Shimuta et al., 2002; Sorensen et al., 2003; Zhang and Hunter, 2013; Zhao et al., 2002). Επίσης, η Chk1 ελέγχει και την αντιγραφή του DNA στη φυσιολογική S φάση απουσία γενοτοξικού stress (Syljuasen et al., 2005). Συγκεκριμένα, η Chk1 ρυθμίζει την αντιγραφή του DNA με τρεις τρόπους: ελέγχει την αργοποιημένη εκπυρσοκρότηση νέων σημείων έναρξης της αντιγραφής, ελέγχει τη διαδικασία επιμήκυνσης και σταθεροποιεί τις δομές της αντιγραφής (Conti et al., 2007; Lopes et al., 2001; Petermann et al., 2006; Petermann et al., 2010; Zachos et al., 2003). Αναστολή της Chk1 οδηγεί σε εκπυρσοκρότηση νέων σημείων έναρξης της αντιγραφής και αυτό είναι βλαβερό για το κύτταρο διότι οι νέες αυτές θέσεις θα καταρρεύσουν μετά από παρατεταμένη αναστολή της αντιγραφής, απουσία της Chk1, και οι περιοχές αυτές δεν θα μπορέσουν να αντιγραφούν (Zhang and Hunter, 2013).

1.8.3 Ο ρόλος της Chk1 στη μετάβαση από την G2 στην M φάση (G2/M checkpoint)

Όταν υπάρχει DNA damage στην S φάση, η Chk1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη Wee1, η οποία φωσφορυλιώνει με τη σειρά της τη Cdk1 στην τυροσίνη 15 και την αναστέλλει (O'Connell et al., 1997; Rhind et al., 1997). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνει τη Cdc25C στη σερίνη 216, η οποία είναι απαραίτητη για να αφαιρέσει την ανασταλτική φωσφορυλίωση της Cdk1 στην τυροσίνη 15 με σκοπό τα

κύτταρα να προχωρήσουν στη μίτωση (Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997). Επίσης, η φωσφορυλίωση της Cdc25C δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για τις 14-3-3 πρωτεΐνες, οι οποίες απομακρύνουν τη Cdc25C από τον πυρήνα κι έτσι δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο Cdk1/Cyclin B (Lopez-Girona et al., 1999). Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η μετάβαση από τη G2 στην M φάση παρουσία βλαβών στο DNA, έως ότου αυτές επιδιορθωθούν.

1.8.4 Ο ρόλος της Chk1 στη μίτωση

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τον ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και για τη λειτουργία του spindle checkpoint (Petsalaki et al., 2011; Zachos et al., 2007). Επίσης, η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της BubR1 στους κινητοχώρους κατά την ενεργοποίηση του spindle checkpoint (Zachos et al., 2007). Σε πρόσφατη δημοσίευσή μας, δείξαμε ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 και προκαλεί την ενεργοποίησή της (Petsalaki et al., 2011). Χρησιμοποιώντας ένα φωσφοαντίσωμα εναντίον της φωσφορυλιωμένης σερίνης 331 της Aurora-B, δείξαμε ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Aurora-B κατά την προμετάφαση ή κατά την επώαση των κυττάρων με ταξόλη, η οποία σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (Petsalaki et al., 2011). Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της INCENP στο TSS motif, για την πρόσδεση της Survivin στο CPC και την πλήρη ενεργοποίηση της Aurora-B αλλά όχι τον εντοπισμό της Aurora-B στα κεντρομερή, τη φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 232 ή την πρόσδεση στην INCENP (Petsalaki et al., 2011). Υπερέκφραση μιας μορφής της Aurora-B η οποία δεν φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 331 οδηγεί σε λανθασμένο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων, μειωμένο εντοπισμό της BubR1 στους κινητοχώρους και έξοδο από τη μίτωση παρουσία ταξόλης (Petsalaki et al., 2011). Η ενεργοποιημένη Chk1 εντοπίζεται στα κεντροσώματα, όπου ελέγχει την έναρξη της μίτωσης μέσω αναστολής του συμπλόκου Cdk1/Cyclin B τόσο μετά από DNA damage όσο και στη φυσιολογική μίτωση (Kramer et al., 2004).

1.8.5 Ο ρόλος της Chk1 στην καρκινογένεση

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η Chk1 υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του παχέως εντέρου, του ήπατος, του στομάχου και του ρινοφάρυγγα (Cho et al., 2005; Hong et al., 2012; Madoz-Gurpide et al., 2007; Sriuranpong et al., 2004; Verlinden et al., 2007; Xu et al., 2013; Yao et al., 2010; Zhang and Hunter, 2013). Όμως, μεταλλάξεις στην Chk1 είναι εξαιρετικά σπάνιες στον καρκίνο επειδή η Chk1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση (Liu et al., 2000; Takai et al., 2000). Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε περιοχή με δορυφορικό DNA καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης της Chk1 με αποτέλεσμα τη δημιουργία κολοβής πρωτεΐνης, όμως το δεύτερο αλληλόμορφο του γονιδίου είναι φυσιολογικό οπότε η Chk1 εκφράζεται κανονικά (Bartek and Lukas, 2003; Codegani et al., 1999; Patil et al., 2013).

Στόχοι

Στην παρούσα διατριβή, δείχνουμε ότι η Chk1 ρυθμίζει τον εντοπισμό και τη δράση των MCAK, Kif2b, Hec1 και Aurora-B στα κεντρομερή ή στους κινητοχώρους και συνεργάζεται με την Mps1 για μείωση των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (Petsalaki and Zachos, 2013). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα με μειωμένη Chk1 με χρήση siRNA ή DT40 κύτταρα, B-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο, γενετικά απαλλαγμένα από την Chk1 δείχνουμε ότι η Chk1 προστατεύει τα κύτταρα από αναφάσεις με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν και απαιτείται για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε κύτταρα σταματημένα στη μετάφαση. Επίσης, δείχνουμε ότι μειωμένη ενεργότητα της Chk1 οδηγεί σε σταθερούς μικροσωληνίσκους και η Chk1 απαιτείται για σταθερή πρόσδεση των κινεσινών MCAK, Kif2b και Mps1 στα κεντρομερή ή τους κινητοχώρους και για φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και σερίνη 44.

Δείχνουμε επίσης ότι η φωσφορυλιωμένη Aurora-B στη σερίνη 331 εντοπίζεται στους κινητοχώρους και αυτή η φωσφορυλίωση είναι υψηλή στην προμετάφαση και μειώνεται σημαντικά στη μετάφαση. Χρησιμοποιώντας κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν τη μεταλλαγμένη Aurora-B στη σερίνη 331 σε αλανίνη, δείχνουμε ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για βέλτιστο εντοπισμό των MCAK, Kif2b και Mps1 στα κεντρομερή ή τους κινητοχώρους και για φωσφορυλίωση της Hec1. Επιπροσθέτως, αναστολή της ενεργότητας της Mps1 ή μείωση της Mps1 με siRNA, μειώνει τον αρχικό εντοπισμό των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή ή τους κινητοχώρους, μειώνει τη φωσφορυλίωση της Hec1 και αυξάνει ακόμα περισσότερο το ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν σε κύτταρα με μειωμένη Chk1. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, προτείνουμε ότι οι Mps1 και Chk1 συνεργάζονται προκειμένου να ρυθμίσουν τις Aurora-B, MCAK, Kif2b και Mps1 με σκοπό να επιδιορθώσουν τις μεροτελικές προσδέσεις.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Τα χημικά, τα πλαστικά και τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις παρακάτω εταιρίες: Applichem, Fisher Chemicals, Greiner, Invitrogen, Merck-Millipore, New England Biolabs, Roth, Sarstedt, Sigma-Aldrich

2.1.2 Ένζυμα και kits

Invitrogen Ltd: Ένζυμα περιορισμού και buffers αντίδρασης

New England Biolabs: Quick T4 DNA λιγάση

Stratagene: Quick Change Site Directed Mutagenesis kit

Thermo Scientific Pierce: Αντιδραστήρια ανίχνευσης ECL Western blotting (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, SuperSignal West Femto)

2.1.3 Βακτήρια

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

-Υγρό μέσο καλλιέργειας LB Broth το οποίο αποτελείται από: 10 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g yeast extract για 1 λίτρο LB.

-Πιάτα LB με 100 µg/ml αμπικιλίνη ή 50 µg/ml καναμυκίνη.

-*E. coli* DH5a competent cells

-Soc medium το οποίο αποτελείται από 2g Bacto tryptone, 0,5 g Bacto yeast extract, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, 1 ml από 2M Mg⁺² stock φιλτραρισμένο και 1 ml από 2 M γλυκόζη φιλτραρισμένη σε τελικό όγκο 100 ml pH=7.

-Αποστειρωμένη γλυκερόλη

2.1.4 Κυτταροκαλλιέργεια

Αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffer Saline), (1 λίτρο 1X PBS περιέχει 8g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄ pH=7.4)

AppliChem: DMSO (Dimethyl Sulfoxide), Nocodazole, Taxol

Axon Medchem: AZ3146

Bellco Glass: Γυάλινα rings διαμέτρου 6*8 mm

Greiner Cell Star: Cell culture dishes

Invitrogen: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Ham's F-12 medium, 200 mM L-Glutamine (100X), Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Optimem I (Reduced Serum Medium), 0.05% Trypsin, PenStrep (100X), Fungizone, Hygromycin B

Merck-Millipore: MG-132

Sarstedt: Αποστειρωμένες Stripettes των 5, 10 και 25 ml

Sigma: UCN-01, Tetracycline

Selleck Chem: VX-680

2.1.5 Αντισώματα

Πίνακας 1. Προτεύοντα αντισώματα

Αντίσωμα	Είδος ξενιστή	Εταιρία	Αραίωση	Εφαρμογή
Chk1 (G-4)	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Western blot
phospho- Ser ¹⁰ Histone H3	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Western blot
CENP-B (H-65)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Ανοσοφθορισμός
GFP (FL)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Western blot
TTK (Mps1; C19)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	Western blot
Hec1 (9G3)	Mouse monoclonal	Abcam	1:250	Ανοσοφθορισμός
Aurora-B	Rabbit polyclonal	Abcam	1:250	Ανοσοφθορισμός
CENP-A (3-19)	Mouse monoclonal	Genetex	1:250	Ανοσοφθορισμός
Actin (AC-40)	Mouse monoclonal	Sigma	1:6000	Western blot
α -tubulin (DM1A)	Mouse monoclonal	Sigma	1:250	Ανοσοφθορισμός
Aurora-B (AIM-1)	Mouse monoclonal	BD Biosciences	1:2000	Western blot
Avian CENP-O	Rabbit polyclonal	MBL	1:100	Ανοσοφθορισμός
pS331 Aurora B	Rabbit polyclonal	EUROGENTEC, UK	1:100	Ανοσοφθορισμός

anti-pS55	Rabbit polyclonal	Δώρο από την J. DeLuca (DeLuca et al., 2011)	1:100	Ανοσοφθορισμός
anti-pS44	Rabbit polyclonal	Δώρο από την J. DeLuca (DeLuca et al., 2011)	1:100	Ανοσοφθορισμός
SMP1.1 Mps1	Sheep polyclonal	Δώρο από τον S. Taylor (Tighe et al., 2008)	1:100	Ανοσοφθορισμός

Πίνακας 2. Δευτερεύοντα αντισώματα

Αντίσωμα	Είδος ξενιστή	Εταιρία	Αραίωση	Εφαρμογή
anti-mouse FITC	Goat	Jackson ImmunoResearch	1:100	Ανοσοφθορισμός
anti-rabbit FITC	Goat	Jackson ImmunoResearch	1:100	Ανοσοφθορισμός
anti-mouse TRITC	Sheep	Jackson ImmunoResearch	1:100	Ανοσοφθορισμός
anti-rabbit TRITC	Goat	Jackson ImmunoResearch	1:100	Ανοσοφθορισμός
anti-sheep FITC	Donkey	Jackson ImmunoResearch		Ανοσοφθορισμός
anti-mouse HRP	Horse	Cell Signaling	1:6000	Western blot
anti-rabbit HRP	Goat	Cell Signaling	1:6000	Western blot

2.1.6 Ανοσοφθορισμός

Ελένη Πετσαλάκη, 2013

Applichem: Paraformaldehyde, Methanol

Invitrogen: Topro-3 Iodide (642/661)

Thermo Scientific: Polysine slides

Vector: Vectashield (Mounting Medium for Immunofluorescence)

2.1.7 Πρωτεΐνες

Upsate Biotechnology: Ανασυνδυασμένη ιστόνη H3.

2.1.8 Πλασμίδια, Primers

Πλασμίδια

- pcDNA5/FRT/TO από την Invitrogen
- pTK-Hygro από την Agilent Technologies
- 6myc-pcDNA3 δώρο από τον Δ. Καρδάσση, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- MCAK:GFP που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη MCAK υβριδική με GFP δώρο από τον J. Swedlow (Andrews et al., 2004)
- Kif2b:GFP που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη Kif2b υβριδική με GFP δώρο από τον B. Orr και τον D. Compton (Bakhoun et al., 2009)
- Mps1:GFP που κωδικοποιεί για την Mps1 υβριδική με GFP δώρο από τον S. Taylor (Hewitt et al., 2010)

Primers

Aurora B	S331A_sense (t991g)	5'-gtccgggccaacgctcggagggtgc-3'
Aurora B	S331A_antisense (t991g)	5'-gcaccctccgagcgttgcccgac-3'
Aurora B	S331E_sense (t991g_c992a_t993g)	5'-gggtccgggccaacgagcggagggtgctgcc-3'

Aurora B	S331E_antisense (t991g_c992a_t993g)	5'-ggcagcaccctccgctcgttgcccgacc-3'
----------	--	------------------------------------

2.1.9 Αλληλουχίες των siRNAs

Thermo Scientific Dharmacon: Smart pool ON-Targetplus Chk1 siRNA L-003255-00 (pool 4 διαφορετικών siRNAs)

Thermo Scientific Dharmacon: siGenome Human TTK siRNA (siMps1) D-004105-03

siRNA	Αλληλουχία
Chk1 siRNA smart pool	CAAGAUGUGUGGUACUUUA GAGAAGGCAAUAUCCAAUA CCACAUGUCCUGAUCUAU GAAGUUGGGCUAUCAAUGG
Mps1 individual siRNA	Sense: GCACGUGACUACUUUCAA Antisense: UUUGAAAGUAGUCACGUGC

2.1.10 Διάφορα

Fuji Film: Super RX Medical X-ray Film

GE Healthcare Life Sciences: Whatman Protran Transfer Membrane (0.45 μM)

Invitrogen: 1 kB DNA ladder

New England Biolabs: 3X SDS Sample buffer, DTT

Santa Cruz Biotechnology: Protein A/G Agarose Beads

Thermo Scientific Fermentas: Spectra Multicolor Broad range Protein Ladder

Whatman: 3 mm Chromatography paper

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Βακτήρια

Μετασηματισμός βακτηρίων

E. coli DH5a competent κύτταρα ξεπάγωσαν αργά στον πάγο κι ένα aliquot 100 μl αναμίχθηκε με 1-5 μl πλασμδιακού DNA (διαφόρων συγκεντρώσεων) για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε θερμικό shock στους 42° C για 45 sec και μετά έμειναν στον πάγο για 2 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 900 μl SOC medium και επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37° C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm, επαναδιάλυση σε 250 μL SOC medium, άπλωμα σε πιάτα LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση όλη νύχτα στους 37° C.

Καλλιέργεια βακτηρίων

Μοναδικές αποικίες επιλέχθηκαν από πιάτο LB και μεταφέρθηκαν σε 5 ml LB με κατάλληλο αντιβιοτικό στους 37° C υπό ανάδευση. Μετά από 8 ώρες, η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε τελικό όγκο 100 ml LB με κατάλληλο αντιβιοτικό στους 37° C υπό ανάδευση για 16 ώρες. Για μακροχρόνια αποθήκευση, 700 μl βακτήρια αναμίχθηκαν με 300 μl αποστειρωμένη γλυκερόλη σε erpendorf και φυλάχθηκαν στους -70° C.

Απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα

4.5 ml καλλιέργειας βακτηρίων φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 30 sec σε μια μικρή φυγόκεντρο. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε και αναλύθηκε με το Nucleo spin plasmid της Macherey Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το DNA που απομονώθηκε φυλάχθηκε στους -20° C.

Απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα

100 ml καλλιέργειας βακτηρίων φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 30 min σε μια μεγάλη φυγόκεντρο eppendorf. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε και αναλύθηκε με το Nucleo Bond Xtra Midi της Macherey Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκε με φωτόμετρο Biophotometer της eppendorf. Το DNA που απομονώθηκε φυλάχτηκε στους -20°C .

2.2.2 Πρωτόκολλα για DNA

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση της Pfu πολυμεράσης της Invitrogen. Το τυπικό πρωτόκολλο της PCR περιλαμβάνει:

- 94° C για 5 λεπτά
- 94° C για 1 λεπτό
- 50-60° C για 1 λεπτό
- 68° C για 1 λεπτό/kb
- Επανάληψη 30 φορές
- 68° C για 10 λεπτά
- 4° C

Μια τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από:

- 1 μl από κάθε dNTP (10 mM stock)
- 0.5 μl Pfu Polymerase
- 5 μl Pfu buffer (10X)
- 1 μl (50-500 ng) template DNA
- 5 μl primer 1 (10 μM stock)
- 5 μl primer 2 (10 μM stock)
- 5 μl enhancer
- 1 μl MgSO_4 από stock 50 mM
- Αποστειρωμένο H_2O σε τελικό όγκο 50 μl

Μετά την PCR τρέχουμε όλο το προϊόν σε 1% gel αγαρόζης. Εάν η ζώνη είναι στο σωστό μέγεθος, την κόβουμε με νυστέρι από το gel και την καθαρίζουμε με το QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε gel αγαρόζης

Τα gels αποτελούνταν από 1% αγαρόζη σε 1X TAE buffer (40 mM Tris, 0.114% v/v glacial acetic acid, 1mM EDTA pH=8). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης της Biorad γεμάτη με 1X TAE buffer. Τα δείγματα DNA διαλύθηκαν σε 6X DNA loading buffer (30% v/v glycerol, 0.25% w/v bromophenol blue, 0.25% w/v xylene cyanol FF) και φορτώθηκαν στα πηγάδια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V με τροφοδοτικό της Biorad.

Πρωτόκολλα για cloning

Οι πέψεις του DNA πραγματοποιήθηκαν με περιοριστικά ένζυμα και τα αντίστοιχα buffers των εταιριών New England Biolabs και Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37° C για 2 ώρες. Το DNA από τις πέψεις ή την PCR, καθαρίστηκε με το QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για καθαρισμό DNA από gel αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το ίδιο kit και οι ζώνες κόπηκαν από το gel με νυστέρι. Το ligation πραγματοποιήθηκε με την Quick T4 DNA λιγάση της New England Biolabs για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.3 Δημιουργία σημειακής μετάλλαξης

Η σημειακή μετάλλαξη της σερίνης 331 σε αλανίνη ή γλουταμικό οξύ πραγματοποιήθηκε με το QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε ως εξής:

5 µl Reaction buffer

1 µl (50 ng) dsDNA template (Aurora-B/pcDNA5/FRT/TO)

1.25 µl (125 ng) primer #1 (sense S331A or S331E)

Ελένη Πετσαλάκη, 2013

1.25 μ l (125 ng) primer #1 (antisense S331A or S331E)

1 μ l dNTP mix

dH₂O σε τελικό όγκο 50 μ l

1 μ l PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U/ μ l)

Πρωτόκολλο της PCR

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	95° C	30 sec
12-18	95° C	30 sec
	55° C	1 minute
	68° C	1 minute/kb of plasmid length

Ο αριθμός των κύκλων ήταν 16 σύμφωνα με οδηγία του κατασκευαστή.

Πέψη με DpnI

Μετά το πέρας της PCR, 1 μ l περιοριστικού ενζύμου DpnI (10U/ μ l) προστέθηκε απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια, το μίγμα αναδεύτηκε με προσοχή και επώαστηκε για 1 ώρα στους 37° C προκειμένου να κοπεί το πατρικό υπερελικωμένο DNA. Το ένζυμο DpnI κόβει μόνο μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA άρα δεν κόβει το προϊόν της PCR.

Μετασηματισμός XL1-Blue competent cells

Τα XL1-Blue competent cells ξεπάγωσαν αργά στον πάγο. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 μ l βακτηρίων σε ένα παγωμένο 15 ml falcon.

Στη συνέχεια, 2 μ l από το DNA που επώαστηκε με DpnI μεταφέρθηκε στο falcon με τα βακτήρια. Το δείγμα ανακατεύτηκε και επώαστηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε heat shock στους 42° C για 45 sec και μετά το δείγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκαν 0.5 ml SOC ζεσταμένο στους 37° C και το δείγμα επώαστηκε για 1 ώρα στους 37° C υπό

ανάδευση στις 225-250 rpm. Έπειτα, 250 μl από το μίγμα απλώθηκαν σε πιάτο αμπικιλίνης και επώαστηκαν στους 37° C για περισσότερες από 16 ώρες.

2.2.4 Κυτταροκαλλιέργεια

Όλες οι εργασίες κυτταροκαλλιέργειας διεξήχθησαν με χρήση άσηπτων τεχνικών μέσα σε εστία ειδική για κυτταροκαλλιέργεια.

Συνθήκες καλλιέργειας DT40 κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου DT40 κύτταρα Β-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο (WT), DT40 στα οποία έχει απαλειφθεί γενετικά η Chk1 (Chk1^{-/-}), Chk1^{-/-} κύτταρα στα οποία έχει γίνει ξανά ένθεση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Chk1 (Rev) ή Chk1^{-/-} κύτταρα στα οποία έχει γίνει ένθεση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια μεταλλαγμένη μορφή της Chk1 των πτηνών με μεταλλαγμένο το ασπαρτικό οξύ 130 σε αλανίνη (D130A ,kinase dead cells-KD).

Τα DT40 κύτταρα (Β λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο) καλλιεργήθηκαν στους 39.5 °C, 5% CO₂ σε συνθήκες υγρασίας. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των DT40 κυττάρων ήταν DMEM, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% chicken serum, 10 μM β-μερκαπτοαιθανόλη, 30 μg/ml πενικιλίνη και 50 μg/ml στρεπτομυκίνη (όλα τα αντιδραστήρια από τη Gibco). Τα DT40 κύτταρα μεγαλώνουν σε εναιώρημα και συνήθως αραιώνονται 1:5-1:10 κάθε 3 μέρες σε φρέσκο θρεπτικό καλλιέργειας. Για μακροχρόνια φύλαξη, τα DT40 κύτταρα παγώνουν σε 10% DMSO σε FBS και φυλάσσονται σε δοχείο υγρού αζώτου. Τα Chk1^{-/-} κύτταρα προήλθαν από αγρίου τύπου DT40 με εξάλειψη των ενδογενών αλληλομόρφων του γονιδίου της Chk1 όπως περιγράφηκε (Zachos et al., 2003).

Συνθήκες καλλιέργειας BE κυττάρων

Τα BE κύτταρα, καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου του ανθρώπου, είναι προσκολλημένα στο υπόστρωμα και καλλιεργήθηκαν στους 37 °C, 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ήταν DMEM, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum, 30 μg/ml πενικιλίνη and 50 μg/ml στρεπτομυκίνη (όλα τα

αντιδραστήρια από τη Gibco). Τα BE κύτταρα συνήθως αραιώνονται 1:5-1:10 κάθε 3 μέρες σε φρέσκο θρεπτικό καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ξεπλένονται στην αρχή με PBS, επωάζονται με θρυψίνη για 3-5 λεπτά μέχρι να ξεκολλήσουν, φυγοκεντρώνται και επαναδιαλύονται σε φρέσκο θρεπτικό έπειτα από αραιώση. Για μακροχρόνια φύλαξη, τα BE κύτταρα παγώνουν σε 10% DMSO σε DMEM και φυλάσσονται σε δοχείο υγρού αζώτου.

Συνθήκες καλλιέργειας T-REx CHO κυττάρων

Τα CHO κύτταρα, καρκινικά κύτταρα της ωοθήκης του hamster, είναι προσκολλημένα στο υπόστρωμα και καλλιεργήθηκαν στους 37 °C, 5% CO₂. Τα T-REx CHO εκφράζουν σταθερά τον Tet repressor (Invitrogen). Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ήταν HAM's F12, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum, 30 µg/ml πενικιλίνη and 50 µg/ml στρεπτομυκίνη (όλα τα αντιδραστήρια από τη Gibco). Τα CHO κύτταρα συνήθως αραιώνονται 1:5 κάθε 3 μέρες σε φρέσκο θρεπτικό καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ξεπλένονται στην αρχή με PBS, επωάζονται με θρυψίνη για 5 λεπτά μέχρι να ξεκολλήσουν, φυγοκεντρώνται και επαναδιαλύονται σε φρέσκο θρεπτικό έπειτα από αραιώση. Για μακροχρόνια φύλαξη, τα CHO κύτταρα παγώνουν σε 45% conditioned medium (δηλαδή θρεπτικό υλικό στο οποίο έχουν καλλιεργηθεί CHO κύτταρα), 45% φρέσκο θρεπτικό και 10% DMSO και φυλάσσονται σε δοχείο υγρού αζώτου.

Επιμόλυνση BE κυττάρων με siRNA

Το siRNA έναντι της Chk1 του ανθρώπου, της Mps1 ή το αρνητικό siRNA (Thermo Scientific Dharmacon), εισήχθησαν με παροδική επιμόλυνση σε κύτταρα BE, 24-48 ώρες πριν την ανάλυση ή τη χρήση φαρμάκων, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Lipofectamine (Invitrogen). Γενικά, τα BE κύτταρα στήθηκαν την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης σε πυκνότητα 50-70% σε κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 35 mm (π.χ. BE κύτταρα 3-4*10⁵). Μετά από 16-24 ώρες πραγματοποιήθηκε η επιμόλυνση με το εκάστοτε siRNA με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Γενικά, το siRNA (100 pmol siRNA pool) και η Lipofectamine διαλύθηκαν σε 250 µl Optimem το καθένα, επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, στη

συνέχεια αναμίχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 20 λεπτά και μετά προστέθηκαν απευθείας στα κύτταρα. Η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης ελέγχθηκε μετά από 24-48 ώρες καλλιέργειας και ελέγχθηκε με Western blot.

Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Για παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA, τα κύτταρα στήθηκαν την προηγούμενη μέρα σε πυκνότητα 90% σε κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 35 mm (π.χ. BE κύτταρα $5,5 \cdot 10^5$). Μετά από 16-24 ώρες, πραγματοποιήθηκε η επιμόλυνση με το πλασμιδιακό DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Γενικά, το DNA (4 μg) και η Lipofectamine διαλύθηκαν σε 250 μl Optimem το καθένα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, στη συνέχεια αναμίχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 20 λεπτά και μετά προστέθηκαν απευθείας στα κύτταρα. Η έκφραση του διαγονιδίου γενικά ελέγχθηκε μετά από 24 ώρες.

Δημιουργία κυτταρικών σειρών T-REx CHO με χρήση πλασμιδιακού DNA

Για επιμόλυνση κυττάρων T-REx CHO (Invitrogen) με πλασμιδιακό DNA με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα στήθηκαν την προηγούμενη μέρα σε πυκνότητα 90% σε κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 60 mm ($1,7 \cdot 10^6$). Μετά από 16-24 ώρες, πραγματοποιήθηκε η επιμόλυνση με το πλασμιδιακό DNA με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Γενικά, το DNA (8 μg) και η Lipofectamine διαλύθηκαν σε 500 μl Optimem το καθένα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, στη συνέχεια αναμίχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 20 λεπτά και μετά προστέθηκαν απευθείας στα κύτταρα. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και διαλύθηκαν σε 5 ml φρέσκο θρεπτικό. Στη συνέχεια 100 μl , 200 μl , 500 μl από τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 150 mm με 30 ml θρεπτικό με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (Hygromycin για το vector pcDNA5/FRT/TO) και Fungizone.

Διαδικασία απομόνωσης μοναδικών αποικιών

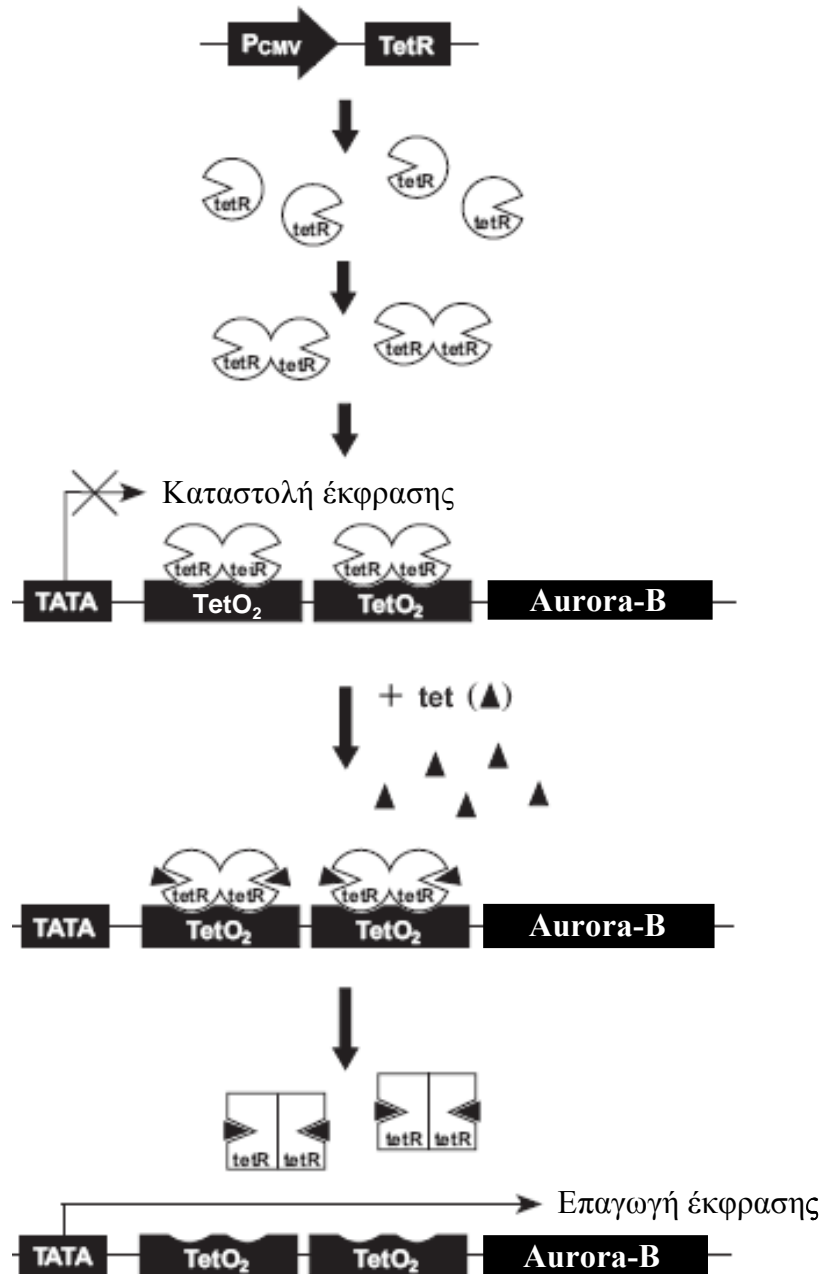
Μετά από περίπου 15 ημέρες, στα τρυβλία είχαν σχηματιστεί μοναδιαίες αποικίες μετά τη δράση του αντιβιοτικού και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία απομόνωσής τους. Γυάλινα rings διαμέτρου 6*8 mm (Bellco Glass) και βαζελίνη αποστειρώθηκαν. Ακολούθως, τα κύτταρα μέσα στα τρυβλία πλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο PBS και με τη βοήθεια λαβίδας τα rings μεταφέρθηκαν πρώτα στη βαζελίνη για λίγα δευτερόλεπτα και στη συνέχεια μέσα στο τρυβλίο με τα κύτταρα με σκοπό κάθε ring να περικυκλώνει μια μοναδική αποικία και να υπάρχει μόνωση με τη βοήθεια της βαζελίνης. Έπειτα, 200 μl θρυψίνης τοποθετήθηκαν μέσα σε κάθε ring και επώαστηκαν για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η θρυψίνη μαζί με τα κύτταρα μεταφέρθηκαν απευθείας σε 24 well-plates με την προσθήκη 1 ml θρεπτικού. Έτσι για κάθε αποικία υπήρχε ένα συγκεκριμένο αριθμημένο πηγάδι.

Μετά από λίγες ημέρες και αφού τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν και γέμισαν το πηγάδι, οι αποικίες θρυψινοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε 6 well-plates. Στο θρεπτικό συνεχίσαμε την προσθήκη Hygromycin για ακόμα μερικές διαιρέσεις. Όταν τα κύτταρα γέμισαν τα 6 well-plates, τότε θρυψινοποιήθηκαν και χωρίστηκαν σε 2 μέρη. Το ένα μέρος μεταφέρθηκε σε τρυβλίο 35 mm και από το άλλο παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με Western Blot με σκοπό την εύρεση αποικιών που εκφράζουν σταθερά το διαγονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Ανίχνευση κατάλληλων αποικιών

Επιλέχθηκαν κάποιες θετικές αποικίες οι οποίες υποβλήθηκαν σε διαδοχικές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης (10-500 ng) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-24 ώρες), (Εικόνα 7). Σκοπός ήταν η εύρεση αποικιών που να εκφράζουν περίπου 10 φορές περισσότερη μεταλλαγμένη Aurora B σε σχέση με την ενδογενή Aurora B. Τέτοια επίπεδα υπερέκφρασης θεωρείται ότι καλύπτουν τη δράση της ενδογενούς πρωτεΐνης χωρίς να προκαλούν λάθη στον εντοπισμό της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται (Ditchfield et al., 2003a). Τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου ελέγχθηκαν με Western Blot ενώ ο εντοπισμός της πρωτεΐνης με ανοσοφθορισμό σε κύτταρα στην προμετάφαση με χρήση του αντισώματος εναντίον του myc.

Ελέγχθηκε επίσης όλα τα κύτταρα να εκφράζουν μεταξύ τους παρόμοια επίπεδα μεταλλαγμένης Aurora-B.



Εικόνα 7: Τα συστατικά του Tet-ON συστήματος. Τα κύτταρα TREx-CHO εκφράζουν σταθερά ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί για τον Tet repressor. Ο Tet repressor όταν εκφραστεί, ομοδιμερίζεται και κάθεται πάνω στις αλληλουχίες TetO₂ του πλασμιδίου και καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Όμως μετά την προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο, αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση του Tet repressor κι έτσι αυτός ξεκολλάει από τις αλληλουχίες TetO₂ και επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

2.2.5 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

Εκχυλίσματα από κύτταρα

Τα κύτταρα λύθηκαν σε κρύο (4° C) διάλυμα WCE (Whole Cell Extract), (20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.4 M KCl, 0.4% Triton X-100, 10% glycerol, 5 mM NaF, 1 mM DTT, 5 µg/ml Leupeptin, 50 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1mM Benzamidine, 5 µg/ml Aprotinin, 1 mM Na₃VO₄) για 30 λεπτά στον πάγο. Τα προϊόντα της κυτταρολύσεως φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε νέα eppendorf tubes και αναλύθηκαν για συγκέντρωση πρωτεΐνης και φυλάχθηκαν στους -80° C.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Bradford assay)

Χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη των βοοειδών (BSA) από stock 2 mg/ml, ώστε να φτιαχτεί μια σειρά standard διαδοχικών αραιώσεων (0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.7 mg/ml, 1 mg/ml, 1.2 mg/ml). Τα standards χρησιμοποιήθηκαν για να φτιαχτεί μια καμπύλη συγκέντρωσης με σκοπό να υπολογιστεί η συγκέντρωση των εκάστοτε δειγμάτων. Τα standards και τα δείγματα αραιώθηκαν σε 50% Bradford reagent (Applichem) αραιωμένο με νερό και τοποθετήθηκαν σε ειδικές κυψελίδες για φωτόμετρο eppendorf. Συγκεκριμένα, από κάθε standard φορτώθηκαν 10 µl σε 1 ml αραιωμένο Bradford reagent ενώ από κάθε δείγμα 2-5 µl σε 1 ml αραιωμένο Bradford reagent.

Ανάλυση πρωτεϊνών

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε SDS gel πολυακρυλαμίδης σε 10% ή 12% resolving gel και σε stacking gel.

Πίνακας 3. SDS page resolving and stacking gel

10% Resolving gel	40 ml
H ₂ O	19.2 ml

40% acrylamide mix	10 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	10 ml
10% SDS	0.4 ml
10% ammonium persulfate	0.4 ml
TEMED	0.016 ml
12% Resolving gel	40 ml
H ₂ O	17.2 ml
40% acrylamide mix	12 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	10 ml
10% SDS	0.4 ml
10% ammonium persulfate	0.4 ml
TEMED	0.016 ml
Stacking gel	10 ml
H ₂ O	7.3 ml
40% acrylamide mix	1.25 ml
1 M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.01 ml

Γενικά, 50-100 µg πρωτεΐνης σε SDS sample buffer με DTT βράστηκαν για 5 λεπτά στους 95° C, φορτώθηκαν σε ξεχωριστά πηγάδια για κάθε δείγμα και δίπλα φορτώθηκαν 10 µl protein marker. Τα gels τοποθετήθηκαν σε ειδικές δεξαμενές γεμάτες με Tris Glycine Running buffer (25 mM Tris, 0.1% SDS, 0.19 M glycine) για gels και οι πρωτεΐνες έτρεξαν προς το θετικό πόλο με σταθερή τάση 180 V. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με semi-dry transfer.

Μεταφορά πρωτεϊνών (Transfer)

Τα gels πολυακρυλαμίδης μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με semi-dry blotter (Scie-plas). Στη συσκευή transfer τοποθετήθηκαν τα εξής με την παρακάτω

σειρά: 6 χαρτιά Whatman μεγέθους 10*10cm, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεγέθους 10*10cm, το gel πολυακρυλαμίδης, 6 χαρτιά Whatman μεγέθους 10*10cm με προσανατολισμό από την άνοδο στην κάθοδο. Όλα τα αντιδραστήρια είχαν μουλιάσει προηγουμένως σε διάλυμα Transfer buffer pH=9.2 (47.8 mM Tris base, 39 mM Glycine, 1.28 mM SDS, 10% methanol). Το transfer πραγματοποιήθηκε για 1,5-2 ώρες ανάλογα το μέγεθος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει στα 20 V.

Ανάλυση πρωτεϊνών (Western blotting)

Μετά το transfer, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με 5% γάλα σε TBS-Tween pH=7.4 (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% v/v Tween-20) για 1 ώρα για μπλοκάρισμα των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Εάν πρόκειται για φωσφοαντίσωμα, το μπλοκάρισμα πραγματοποιήθηκε σε 5% BSA σε TBS-Tween. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με τα κατάλληλα αντισώματα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις σε 1% γάλα ή BSA σε TBS-Tween για 16 ώρες στους 4° C.

Την επόμενη μέρα, η μεμβράνη πλύθηκε 1 φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά με TBS-Tween και στη συνέχεια επώαστηκε με τα κατάλληλα αντισώματα αραιωμένα 1:6000 συνδεδεμένα με HRP σε 1% γάλα ή BSA σε TBS-Tween για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε 1 πλύσιμο 15 λεπτά με TBS-Tween και 4 πλύσιμα από 5 λεπτά το καθένα και στη συνέχεια η μεμβράνη αναλύθηκε με ECL detection kit (Thermo Scientific Pierce).

Ανοσοκατακρήμνιση της Aurora-B και δοκιμασία κινάσης (IP kinase assay)

Τα κύτταρα λύθηκαν με υπερήχους 3*10 sec σε διάλυμα Radio-immunoprecipitation lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 30 µg/ml RNase, 20 mM β-glycerophosphate, 0.3 mM Na₃VO₄) και επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα η Aurora-B ανοσοκατακρημνίστηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Aurora-B (Abcam) για 16 ώρες στους 4 °C και ακολούθως επώαστηκε με Protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa Cruz) για 1 ώρα στους 4 °C. Ακολούθησαν 2 πλύσεις των σφαιριδίων με διάλυμα radio-immunoprecipitation lysis buffer, μια πλύση με διάλυμα wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 M NaCl, 1% NP-40,

0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin) και 2 πλύσεις με Tris buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM PMSF).

Για τη δοκιμασία κινάσης, η ανοσοκατακρημνισμένη κινάση Aurora-B επώαστηκε με καθαρή ιστόνη H3 (Upstate Biotechnology) για υπόστρωμα και 0.1 mM ATP σε μια αντίδραση 20 µl σε διάλυμα kinase assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM glycerophosphate, 5 mM Na₃VO₄) (Honda et al., 2003). Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν με Western blotting με πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της phospho-Ser¹⁰ της ιστόνης H3. Η πυκνομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

2.2.6 Πρωτόκολλα για κυτταρομετρία ροής

Προετοιμασία και μονιμοποίηση των κυττάρων

Τα BE και τα DT40 κύτταρα στήθηκαν και επώαστηκαν με διάφορα φάρμακα όπως έπρεπε. Στη συνέχεια, τουλάχιστον $1 \cdot 10^6$ κύτταρα συλλέχθηκαν (με θρυψινοποίηση για τα προσκολλημένα στο υπόστρωμα), πλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 70% αιθανόλη σε PBS για 30 λεπτά στον πάγο μέχρι όλη νύχτα. Στη συνέχεια, φυλάχθηκαν στους 4° C ή βιάφτηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Ανάλυση κυτταρικού κύκλου (pS10-H3/PI staining)

Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 10 της ιστόνης 3 (pS10-H3) συμβαίνει νωρίς στη μίτωση και αποτελεί ένα εργαλείο προσδιορισμού των μιτωτικών κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Αρχικά, γίνεται φυγοκέντρηση των μονιμοποιημένων κυττάρων στις 1200 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύσιμο με PBS και φυγοκέντρηση κι έπειτα επαναδιάλυση σε 0.1% Triton PBS για 15 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και επαναδιαλύονται σε 100 µl 1% BSA PBS που περιέχει αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης σερίνης 10 της ιστόνης 3 (Santa Cruz Biotechnology) σε αραιώση 1:200 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη 500 µl PBS, φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε PBS που περιέχει αντίσωμα anti-rabbit FITC σε αραιώση 1:200 και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Έπειτα, ακολουθεί προσθήκη 500 µl

PBS, που περιέχει 25 µg/ml Propidium Iodide (PI) και 250 µg/ml RNaseA πριν την ανάλυση.

Κυτταρομετρία ροής

Τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρητή ροής Becton Dickinson FACScan και στη συνέχεια αναλύθηκαν στον υπολογιστή με το λογισμικό WinMDI.

2.2.7 Ανοσοφθορισμός

Μονιμοποίηση κυττάρων για συνεστιακή μικροσκοπία

Για μελέτη της φωσφορυλίωσης της Hec1 στη σερίνη 55 ή στη σερίνη 44, τα κύτταρα προ-μονιμοποιήθηκαν πάνω σε Polysine slides με 4% PFA σε Hec1- PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM Hepes pH 7.0, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ pH=6.9) για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, οι μεμβράνες τους έγιναν διαπερατές με 1% Triton X-100 και 100 nM Microcystin (Sigma) ώστε να απενεργοποιηθούν οι φωσφατάσες (Gorbsky and Ricketts, 1993) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA σε Hec1- PHEM buffer για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύθηκαν 2 φορές με PBS με 0.1% Triton X-100 και βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα (DeLuca et al., 2011).

Για μελέτη της φωσφορυλίωσης της Aurora B στη σερίνη 331, BE κύτταρα επώαστηκαν με 0.5% CHAPS σε διάλυμα PHEM (60 mM PIPES, 25 mM Hepes pH 7.0, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO₄) το οποίο περιείχε 100 nM Microcystin. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη και βάφτηκαν με πολυκλωνικό φωσφο-αντίσωμα anti-pS331. Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού έγινε με το Leica Confocal Software και οι τιμές της pS331 κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την ένταση της CENP-A.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας ευαισθησίας στο nocodazole, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με πολυλυσίνη (Thermo Scientific) με 4% PFA σε Cytoskeletal buffer pH 6.1 (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 1.1 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 2 mM, PIPES 5 mM, glucose 5.5 mM) για 5 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου, οι μεμβράνες τους έγιναν διαπερατές με 0.5% Triton X-100 σε Cytoskeletal buffer και βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα (Zachos et al., 2007).

Χρώση κυττάρων για συνεστιακή μικροσκοπία

Τα κύτταρα πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες επώαστηκαν με 1% BSA PBS για 30 λεπτά στους 37°C για μπλοκάρισμα των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα σε αραιώση 1:100-1:250 σε 1% BSA PBS για 1 ώρα στους 37°C ή για 16 ώρες στους 4°C. Έπειτα, το πρωτεύον αντίσωμα ξεπλύθηκε 3 φορές με PBS προθερμασμένο στους 37°C για 5 λεπτά κάθε φορά και επώαστηκε με τα δευτερεύοντα αντισώματα για 45 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκαν τα δευτερεύοντα αντισώματα με PBS προθερμασμένο στους 37°C για 5 λεπτά κάθε φορά και ακολούθησε mounting με Vectashield και varnish με διάφανο βερνίκι στα άκρα για μόνωση. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες φυλάχθηκαν στους 4°C μέχρι την παρατήρηση.

Ανάλυση έντασης φθορισμού

Για να αναλύσουμε την ένταση του φθορισμού, αφαιρέσαμε το background και οι εντάσεις ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Leica LCS Lite. Οι τιμές GFP κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τη CENP-B ή τη Hec1, οι pS44 και pS55 σε σχέση με τη Hec1, η pS331 σε σχέση με τη CENP-A και η Mps1 σε σχέση με τη Hec1. Πολλά ζευγάρια κινητοχώρων ανά κύτταρο από τουλάχιστον 3 κύτταρα ανά πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων οι οποίοι δεν προσδένονται στους κινητοχώρους

Τα κύτταρα επώαστηκαν με κρύο θρεπτικό υλικό (4°C) για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, ακολούθησε μια σύντομη μονιμοποίηση με προθερμασμένη 4% PFA σε PHEM για 10 sec σε θερμοκρασία δωματίου και οι μεμβράνες των κυττάρων έγιναν διαπερατές με προθερμασμένο 0.5% Triton σε PHEM για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προθερμασμένη 4% PFA σε

Ελένη Πετσαλάκη, 2013

PHEM για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε blocking με 1% BSA σε PBS και επώαση με αντισώματα για ανοσοφθορισμό (Silkworth et al., 2009).

Απελευθέρωση από MG-132

Στα πειράματα απελευθέρωσης από MG-132, τα Chk1^{-/-} DT40 κύτταρα, τα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα και τα BE κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες με το φάρμακο. Όλα τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 µg/ml MG132 (Calbiochem). Μετά την επώαση με το φάρμακο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και επώαστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό προκειμένου να μπουν στην ανάφαση. Μετά από 150 λεπτά για τα αγρίου τύπου DT40, 3,5 ώρες για τα Chk1^{-/-} και 165 λεπτά για τα BE, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν είτε με 70% αιθανόλη σε phosphate-buffered saline (PBS) με σκοπό να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής είτε με PFA (παραφορμαλδεΐδη) για μελέτη με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.

Δοκιμασία ευαισθησίας μικροσωληνίσκων στο nocodazole

Τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 µg/ml MG132 (Merck) για 3 ώρες παρουσία ή απουσία 300 nM UCN-01. Στο τέλος της επώασης, προστέθηκαν 500 ng/ml nocodazole για διάφορα χρονικά διαστήματα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεΐδη σε cytoskeleton buffer και αναλύθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι εικόνες συλλέχθηκαν με τομές των 0,2 µm σε βάθος 10 µm και συγχωνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το Leica LCS Lite software και η ένταση φθορισμού που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους που προκύπτει από κάθε μιτωτικό κύτταρο ποσοτικοποιήθηκε αναλύοντας μια περιοχή ίσου εμβαδού χρησιμοποιώντας το Image J (NIH). Προκειμένου να διερευνήσουμε τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, η ένταση φθορισμού που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους κανονικοποιήθηκε στα 2 λεπτά, επειδή μετά από 2 λεπτά στο nocodazole, η πλειονότητα των μικροσωληνίσκων που δεν συνδέονται με κινητοχώρους αποπολυμερίζεται όπως φαίνεται με συνεστιακή μικροσκοπία.

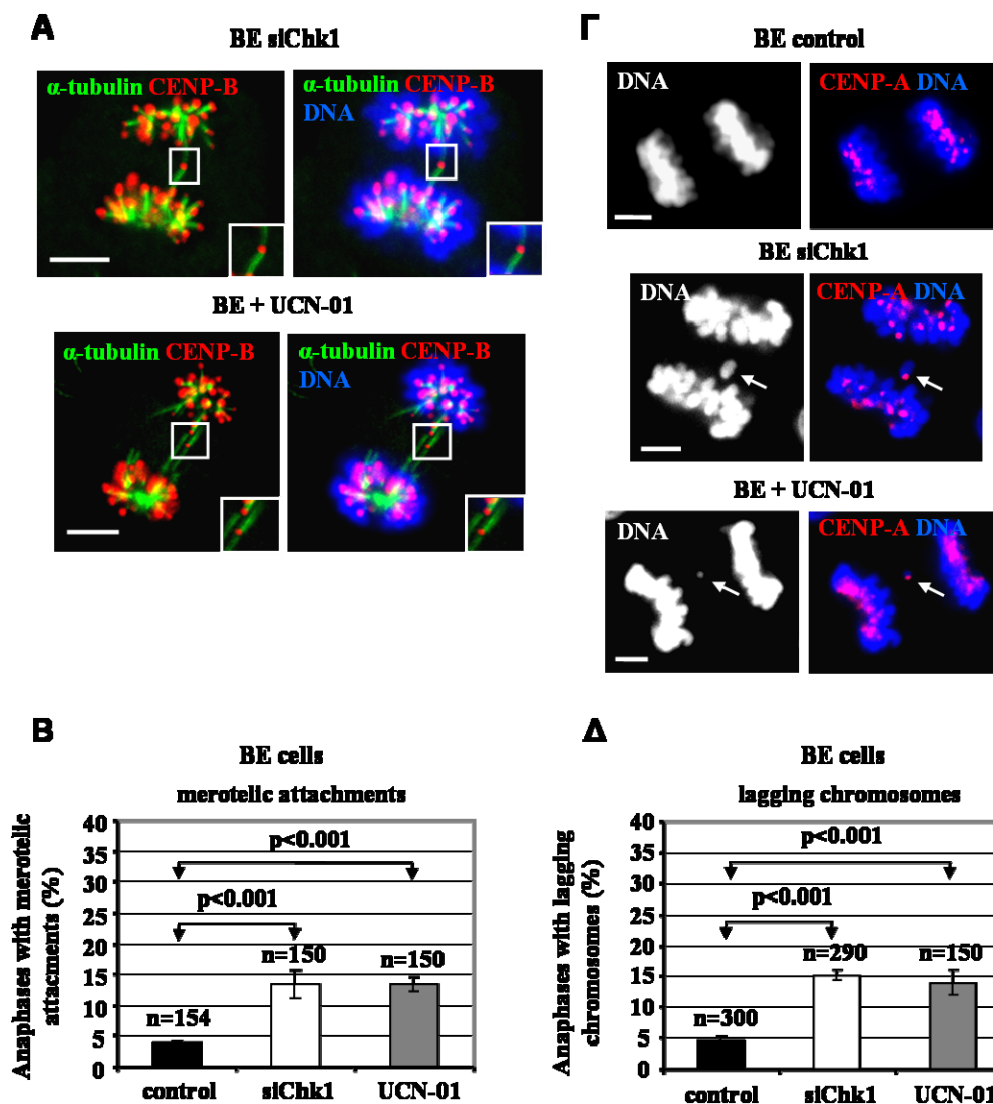
Στατιστική ανάλυση

Οι p-values υπολογίστηκαν με χρήση του Student's *t*-test.

3. Αποτελέσματα: Μελέτη του ρόλου της Chk1 στην πρόληψη μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση

3.1 Τα BE κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν

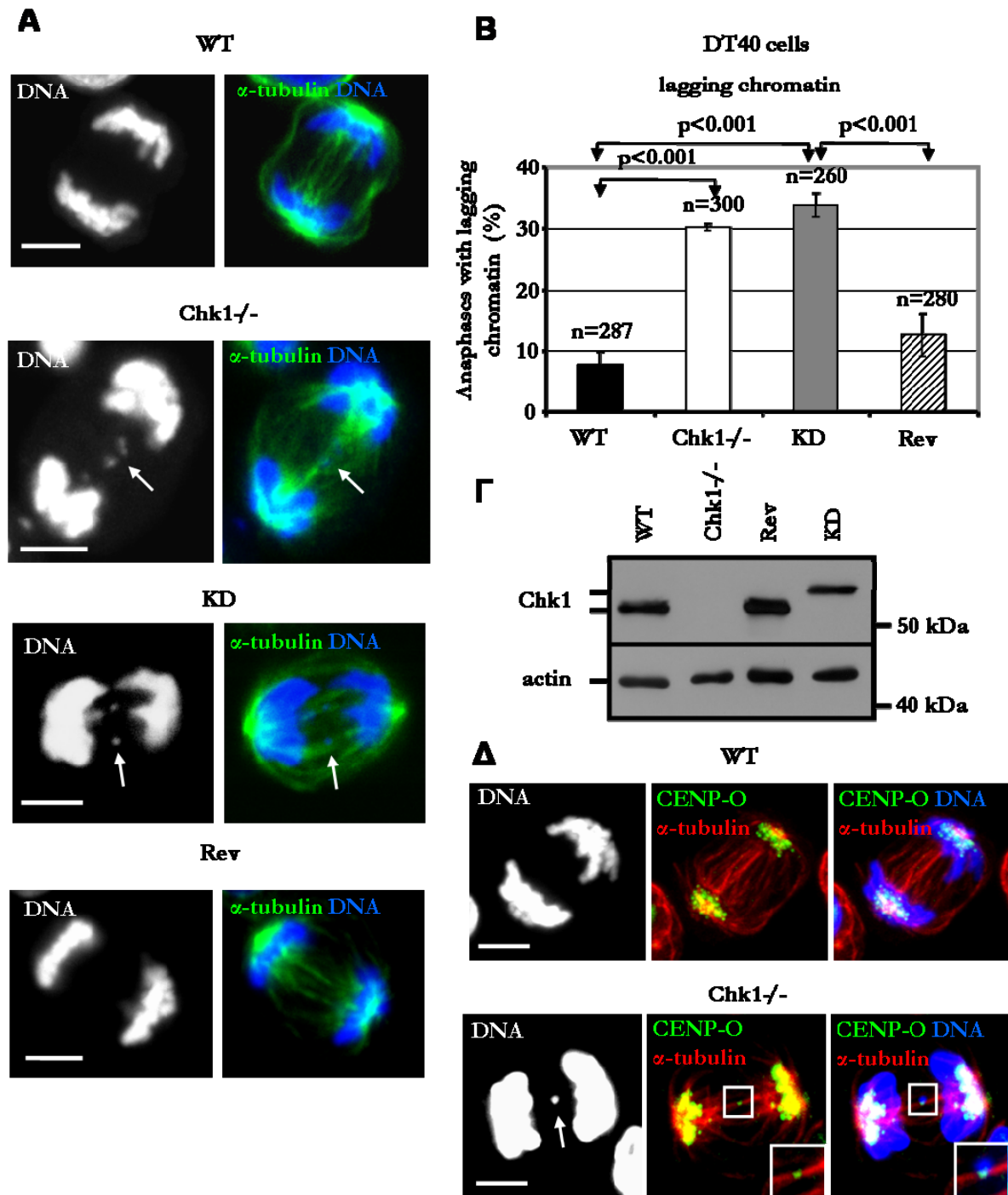
Προκειμένου να μελετήσουμε ένα πιθανό ρόλο της Chk1 στην πρόληψη αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις, κύτταρα BE (καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου του ανθρώπου) επιμολύνθηκαν με siRNA εναντίον της Chk1 ή επώαστηκαν με UCN-01 (αναστολέας της Chk1) για 3 ώρες, μονιμοποιήθηκαν και βιάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα με σκοπό τον υπολογισμό του αριθμού αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις ή χρωμοσώματα που καθυστερούν. Μείωση της έκφρασης της Chk1 με siRNA ή επώαση με UCN-01 οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (13,3% και 13,4% αντίστοιχα), (Εικόνα 8B) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (controls), (3,9%). Επίσης, μείωση της Chk1 ή αναστολή της ενεργότητάς αυτής με UCN-01 οδηγούν σε αύξηση των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (15,1% και 14% αντίστοιχα), (Εικόνα 8Δ) σε σχέση με τα controls (4,7%). Τα χρωμοσώματα που καθυστερούν παρουσιάζονται τυπικά σαν μια αδερφή χρωματίδα η οποία εντοπίζεται στο ισημερινό επίπεδο (Εικόνα 8Α,Γ).



Εικόνα 8: Τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αναφάσεις με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν. Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή επώαστηκαν με UCN-01 για 3 ώρες. (A) Παράδειγμα ανάφασης στα BE κύτταρα. Ένα αδελφό κεντρομερές συνδέεται με μικροσωληνίσκους από τους δύο πόλους της ατράκτου. Πράσινο: α -tubulin, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. (B) Συχνότητες αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις. Τουλάχιστον 50 αναφάσεις αναλύθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Τα error bars δείχνουν τη σταθερή απόκλιση (standard deviation) του μέσου από 3 ανεξάρτητα πειράματα. n= ο αριθμός των αναφάσεων που μελετήθηκαν (Γ) Παράδειγμα ανάφασης με χρωμόσωμα που καθυστερεί σε κύτταρα BE. Κόκκινο: CENP-A, μπλε: DNA Scale bars: 5 μ M (Δ) Συχνότητες αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν. Τουλάχιστον 50 αναφάσεις αναλύθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.2 Τα DT40 Chk1^{-/-} κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν στην ανάφαση

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας σε άλλο κυτταρικό τύπο, χρησιμοποιήσαμε DT40 κύτταρα (B-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου DT40 κύτταρα (WT), DT40 στα οποία έχει απαλειφθεί γενετικά η Chk1 (Chk1^{-/-}), Chk1^{-/-} κύτταρα στα οποία έχει γίνει ξανά ένθεση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Chk1 (Rev) ή Chk1^{-/-} κύτταρα στα οποία έχει γίνει ένθεση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια μεταλλαγμένη μορφή της Chk1 των πτηνών με μεταλλαγμένο το ασπαρτικό οξύ 130 σε αλανίνη (D130A, kinase dead cells-KD), (Εικόνα 9Γ). Τα Chk1^{-/-} ή τα KD κύτταρα εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (30,3% και 33,8% αντίστοιχα σε σχέση με τα WT (7,6%) ή τα Rev (12,5%), (Εικόνα 9Α,Β). Επίσης, τα Chk1^{-/-} κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (22,5%) σε σχέση με τα WT (1,3%) και τα Rev (3,8%), (Εικόνα 9Δ). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργότητα της Chk1 είναι απαραίτητη για τη μείωση των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις σε κύτταρα σπονδυλωτών.

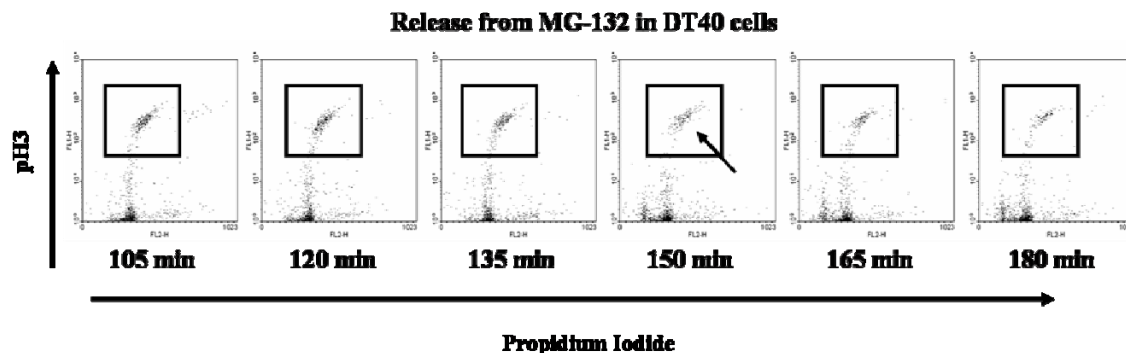


Εικόνα 9: Τα Chk1^{-/-} κύτταρα παρουσιάζουν αναφάσεις με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις. (A) Παραδείγματα αναφάσεων στα αγρίου τύπου (WT), στα Chk1^{-/-}, στα kinase-dead (KD) και στα Revertant (Rev) DT40 κύτταρα. Πράσινο: α -tubulin, μπλε: DNA. **(B)** Συχνότητες αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν στα DT40 κύτταρα. Τουλάχιστον 80 αναφάσεις αναλύθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα. n= ο αριθμός των αναφάσεων που μελετήθηκαν

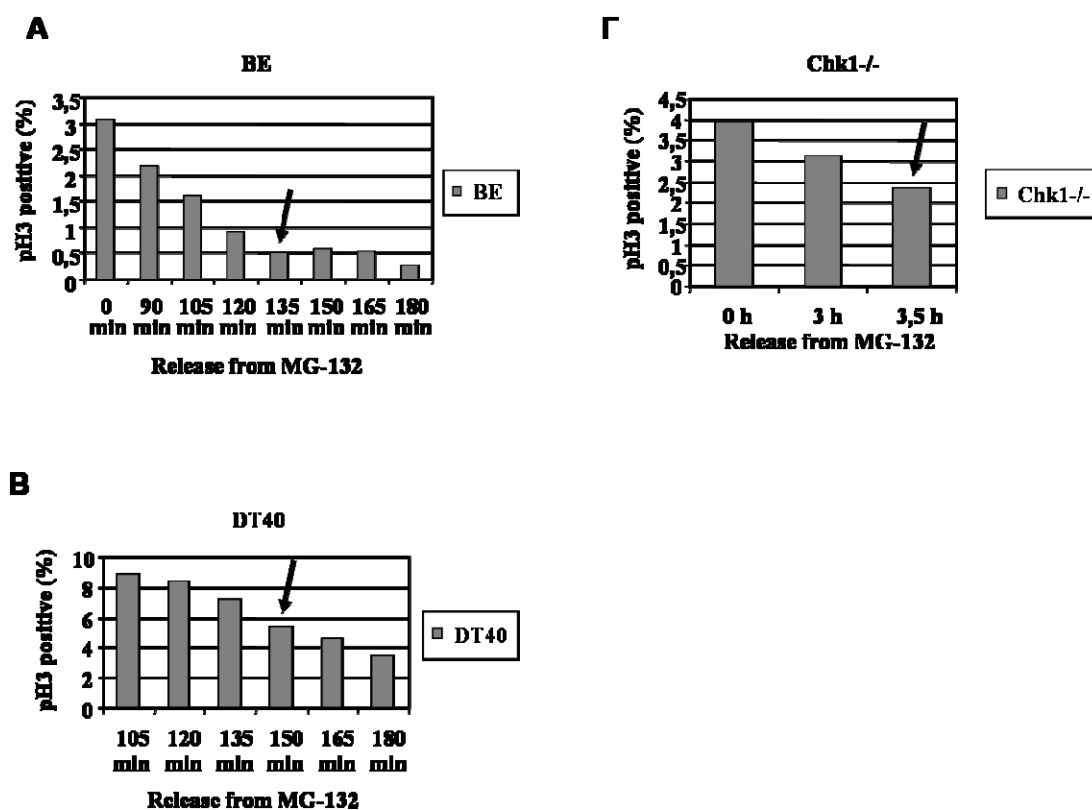
(Γ) Ανάλυση Western blot της ολικής Chk1 ή ακτίνης στα wild-type (WT), Chk1^{-/-}, kinase-dead (KD) ή revertant (Rev) DT40 κύτταρα. (Δ) Παράδειγμα ανάφασης στα DT40 κύτταρα. Στα Chk1^{-/-} κύτταρα, ένας αδελφός κινητοχώρος συνδέεται με μικροσωληνίσκους από τους δύο πόλους της ατράκτου. Πράσινο: CENP-O, κόκκινο: α -tubulin, μπλε: DNA. Τα χρωμοσώματα που δεν έχουν διαχωριστεί φαίνονται με βέλος. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

3.3 Προσδιορισμός με κυτταρομετρία ροής του χρόνου εξόδου των κυττάρων από τη μίτωση σε κύτταρα σταματημένα με MG-132

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων, σταματήσαμε τα κύτταρα στη μετάφαση για 3 ώρες με χρήση του αναστολέα του πρωτεασώματος MG-132 προκειμένου να δώσουμε χρόνο στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις λανθασμένες προσδέσεις (Cimini et al., 2003). Με χρήση του αναστολέα MG-132 επιτυγχάνεται παράταση της μετάφασης λόγω αναστολής διάσπασης των cohesins (πρωτεΐνες που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες συνδεδεμένες μεταξύ τους) και παρεμπόδισης της αποικοδόμησής της Cyclin B. Μετά την πάροδο των 3 ωρών, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με προθερμασμένο PBS και απελευθερώθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό για κατάλληλο χρονικό διάστημα μέχρι να περάσουν από τη μετάφαση στην ανάφαση. Προκειμένου να προσδιορίσουμε την ακριβή χρονική στιγμή κατά την οποία τα κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση, χρησιμοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την απελευθέρωση σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και βιάφτηκαν με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης σερίνης 10 της ιστόνης 3 (μιτωτικός δείκτης) και με Propidium Iodide (περιεχόμενο DNA) και προσδιορίστηκε ο αριθμός των pH3-θετικών κυττάρων (Zachos et al., 2005). Μείωση του ποσοστού των pH3-θετικών κυττάρων συμβαδίζει με έναρξη της ανάφασης και ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης (Εικόνα 11). Ο συγκεκριμένος χρόνος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για πειράματα προσδιορισμού του ποσοστού αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν.



Εικόνα 10: Παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής φθορισμού ο οποίος σχετίζεται με τη φωσφορυλιωμένη σερίνη 10 της ιστόνης 3 (pH3) και το περιεχόμενο του DNA (Propidium Iodide) σε αγρίου τύπου κύτταρα DT40. Μέσα στο ορθογώνιο περικλείονται τα μιτωτικά κύτταρα. Στα 150 λεπτά αρχίζει να μειώνεται ο πληθυσμός των μιτωτικών κυττάρων.



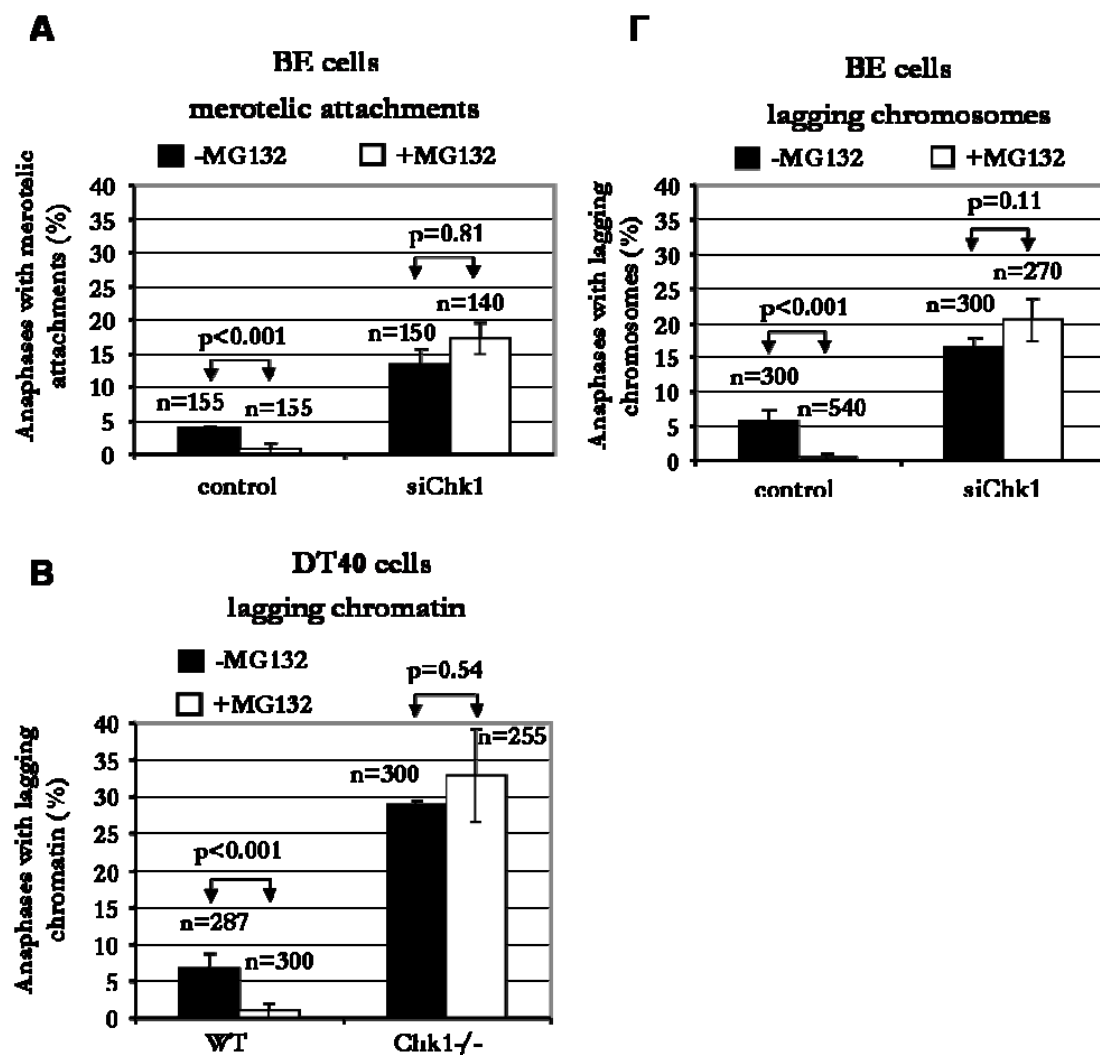
Εικόνα 11: Ανάλυση μιτωτικού δείκτη σε κύτταρα BE (A), αγρίου τύπου DT40 (B) και Chk1^{-/-} (Γ). (A) Μετά από 135 λεπτά απελευθέρωσης από MG-132, τα BE κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση

(βέλος). (B) Μετά από 150 λεπτά απελευθέρωσης από MG-132, τα DT40 κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση (βέλος). (Γ) Μετά από 3,5 ώρες απελευθέρωσης από MG-132, τα Chk1^{-/-} κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση (βέλος).

3.4 Η Chk1 απαιτείται για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε κύτταρα σταματημένα στη μετάφαση

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων, control ή κύτταρα με μειωμένη Chk1 επώαστηκαν με MG-132 για 3 ώρες και μετά από απελευθέρωση, εξετάστηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Στα control κύτταρα, παράταση της μετάφασης οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (0,6%), (Εικόνα 12Α) και χρωμοσώματα που καθυστερούν (0,6%), (Εικόνα 12Γ) σε σχέση με κύτταρα που μπαίνουν στην ανάφαση χωρίς MG-132 (3,9% και 5,7% αντίστοιχα), ($p < 0,001$), (Εικόνα 12Α). Αντίθετα, στα κύτταρα με μειωμένη Chk1 παράταση της μετάφασης με επώαση με MG132 δεν οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (17,2%), (Εικόνα 12Α) ή χρωμοσώματα που καθυστερούν (20,3%), (Εικόνα 12Γ) σε σχέση με τα κύτταρα που μπαίνουν στην ανάφαση χωρίς MG132 (13,3% και 16,3% αντίστοιχα).

Επίσης, επώαση των DT40 κυττάρων με MG-132 προκάλεσε μείωση του ποσοστού των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν στα WT κύτταρα (1%) σε σχέση με τα WT κύτταρα χωρίς MG-132 (6,7%), αλλά όχι στα Chk1^{-/-} κύτταρα σε σχέση με τα Chk1^{-/-} κύτταρα χωρίς MG-132 (32,8% και 28,8% αντίστοιχα), (Εικόνα 12B). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων πριν την ανάφαση.

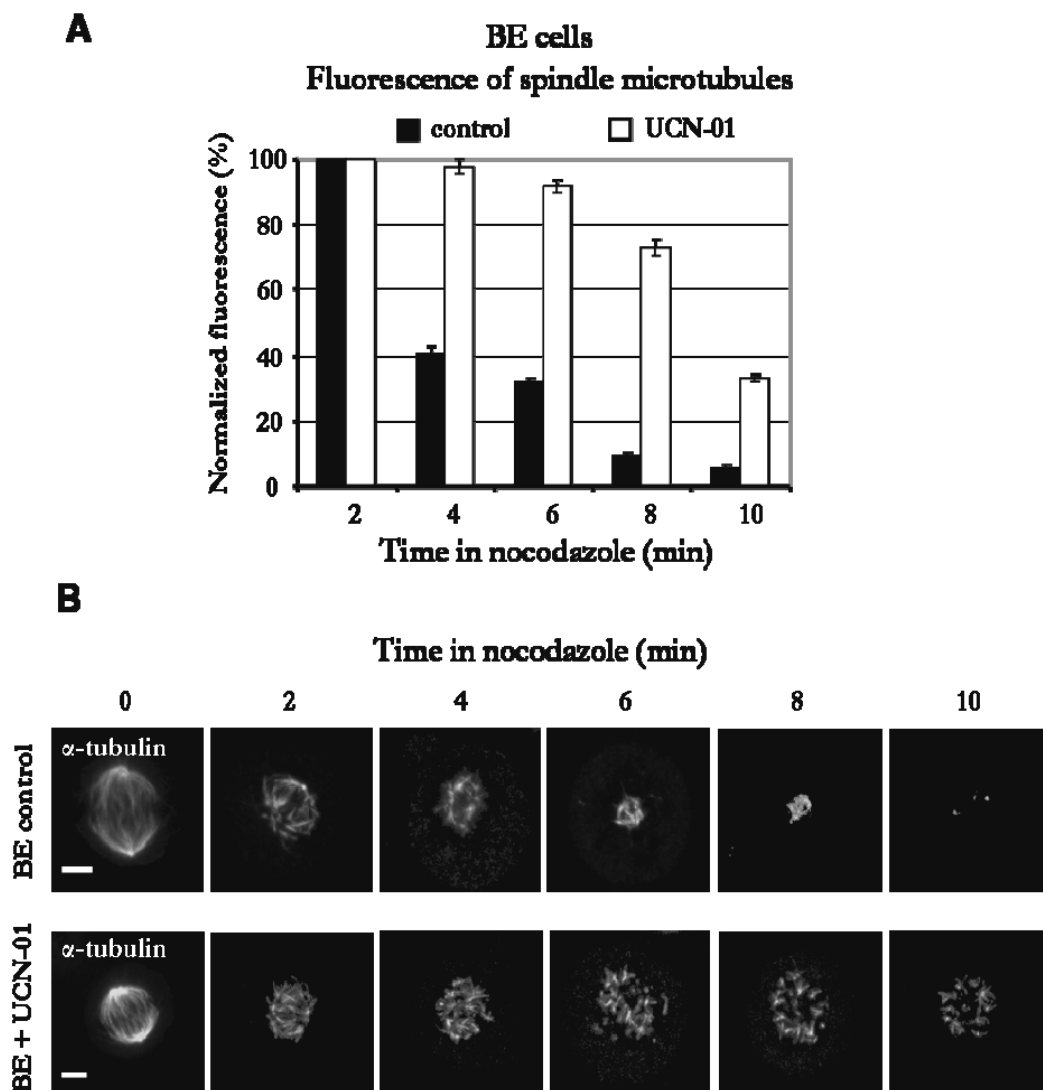


Εικόνα 12: (A, B, Γ) Η Chk1 απαιτείται για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε κύτταρα που έχουν καθυστερήσει στη μετάφαση. Συχνότητες αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (A) ή χρωμοσώματα που καθυστερούν (B, Γ) σε κύτταρα BE (A, Γ) ή DT40 (B). Τα κύτταρα αναλύθηκαν στην ανάφαση απουσία του φαρμάκου MG132 (-MG132) ή μετά από απελευθέρωση των κυττάρων από τρίωρη επώαση με MG132 (+MG132). Τουλάχιστον 50 (A), 80 (B) ή 90 (Γ) αναφάσεις αναλύθηκαν για το καθένα από 3 ανεξάρτητα πειράματα. n= ο αριθμός των αναφάσεων που μελετήθηκαν. Τα error bars δείχνουν τη σταθερή απόκλιση (standard deviation) του μέσου από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

3.5 Αναστολή της Chk1 οδηγεί στη δημιουργία σταθερών μικροσωληνίσκων κινητοχώρων

Αυξημένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων (Bakhoun et al., 2009; Cimini et al., 2006). Κύτταρα BE σταματημένα στη μετάφαση με MG-132 για 3 ώρες, επώαστηκαν με UCN-01 και υψηλές δόσεις nocodazole, το οποίο αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους, για 0-10 λεπτά. Στα 0 λεπτά παρατηρούμε σχηματισμένη άτρακτο τόσο στα control κύτταρα όσο και στα κύτταρα μετά από επώαση με UCN-01 ενώ η ένταση του φθορισμού που προκύπτει από τους μικροσωληνίσκους κανονικοποιήθηκε στα 2 λεπτά ώστε να έχουν αποπολυμεριστεί οι περισσότεροι μικροσωληνίσκοι που δεν προσδέονται στους κινητοχώρους (αστρικοί και επικάλυψης, Εικόνα 13B).

Στα control κύτταρα, επώαση με nocodazole οδήγησε σε ταχύ αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (το 60% των μικροσωληνίσκων αποπολυμερίστηκε μετά από επώαση 4 λεπτά στο nocodazole) ενώ παρατηρήθηκε καθυστέρηση στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων μετά από επώαση με nocodazole και UCN-01 σε σχέση με τα control, υποδεικνύοντας σταθερούς μικροσωληνίσκους (Εικόνα 13A). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργότητα της Chk1 απαιτείται για να έχουμε δυναμικούς μικροσωληνίσκους κινητοχώρων.



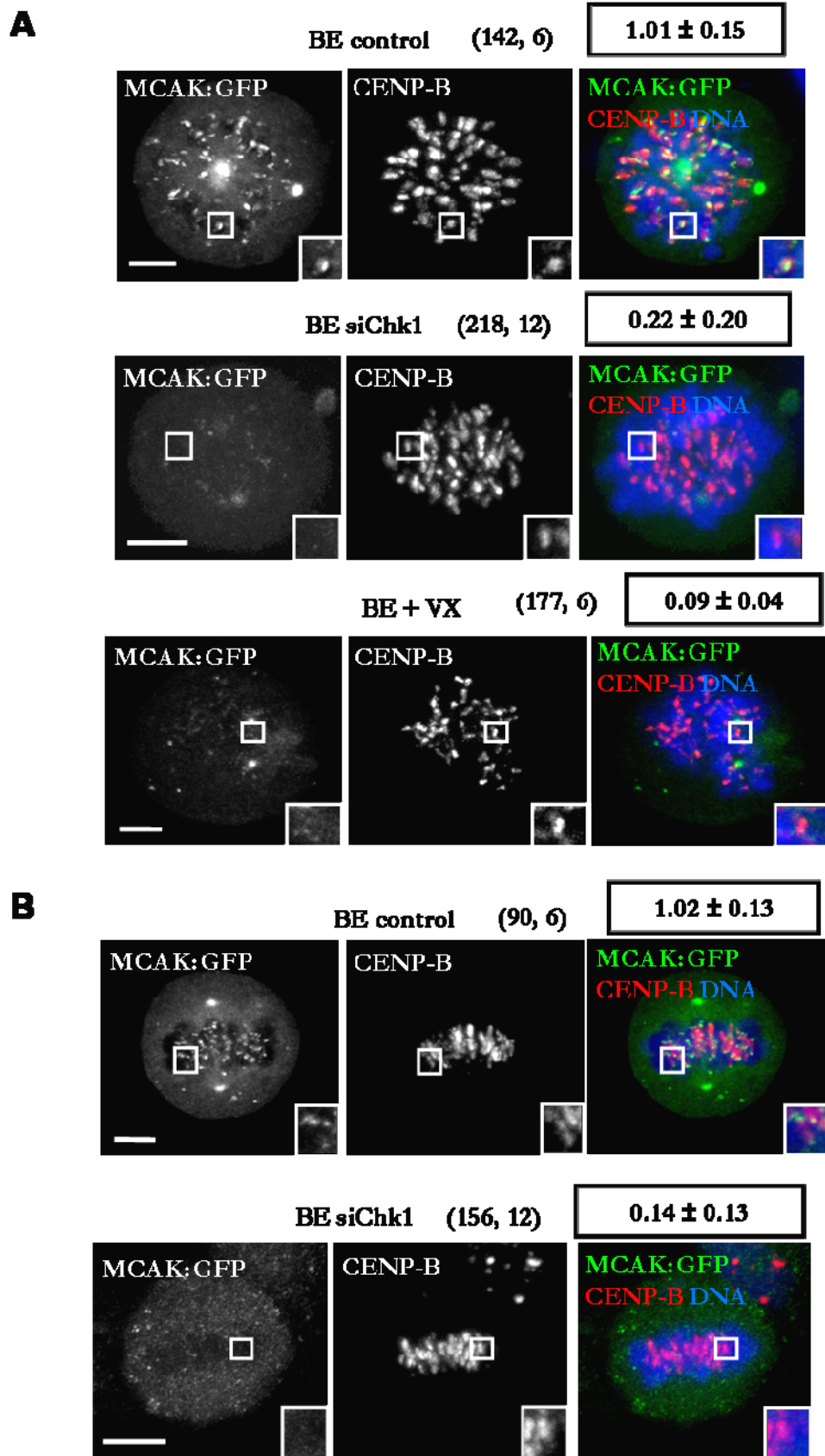
Εικόνα 13: (A, B) Αναστολή της Chk1 μειώνει την ευαισθησία των μικροσωληνίσκων των κινητογώρων στο nocodazole. Κύτταρα BE επώστηκαν με MG132 για 3 ώρες απουσία (control) ή παρουσία UCN-01 και εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις nocodazole. Οι εντάσεις του φθορισμού που προκύπτουν από τους μικροσωληνίσκους κανονικοποιήθηκαν στα 2 λεπτά. Τουλάχιστον 10 κύτταρα αναλύθηκαν για κάθε χρονική στιγμή. Οι τιμές παριστάνουν το μέσο όρο \pm SD.

4. Αποτελέσματα: Μελέτη του εντοπισμού των κινεσινών MCAK και Kif2b και της φωσφορυλίωσης της Hec1

4.1 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους

Οι κινεσίνες MCAK και Kif2b αποσταθεροποιούν μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων όταν υπάρχουν λανθασμένες προσδέσεις (Bakhoun et al., 2009). Προκειμένου να ερευνησουμε το ρόλο της Chk1 στον εντοπισμό της κινεσίνης MCAK, κύτταρα BE επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο που κωδικοποιεί για υβριδική πρωτεΐνη MCAK:GFP και μελετήθηκε ο εντοπισμός της MCAK:GFP σε control κύτταρα ή κύτταρα μετά από ταυτόχρονη επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1. Στα control κύτταρα στην προμετάφαση, η MCAK:GFP εντοπίζεται φυσιολογικά στα κεντρομερή μαζί με τη CENP-B, πρωτεΐνη των κεντρομερών (Εικόνα 14A). Μείωση της έκφρασης της Chk1 οδηγεί σε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή στην προμετάφαση κατά 78% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$). Ως θετικό control, επώαση των κυττάρων με αναστολέα της Aurora-B (VX-680) προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP κατά 91% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$).

Στα control κύτταρα στη μετάφαση, η MCAK:GFP εντοπίζεται φυσιολογικά στους κινητοχώρους εξωτερικά της CENP-B. Μείωση της έκφρασης της Chk1 προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP κατά 86% στους κινητοχώρους στη μετάφαση σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 14B). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση και μετάφαση απουσία φαρμάκων της μιτωτικής ατράκτου.

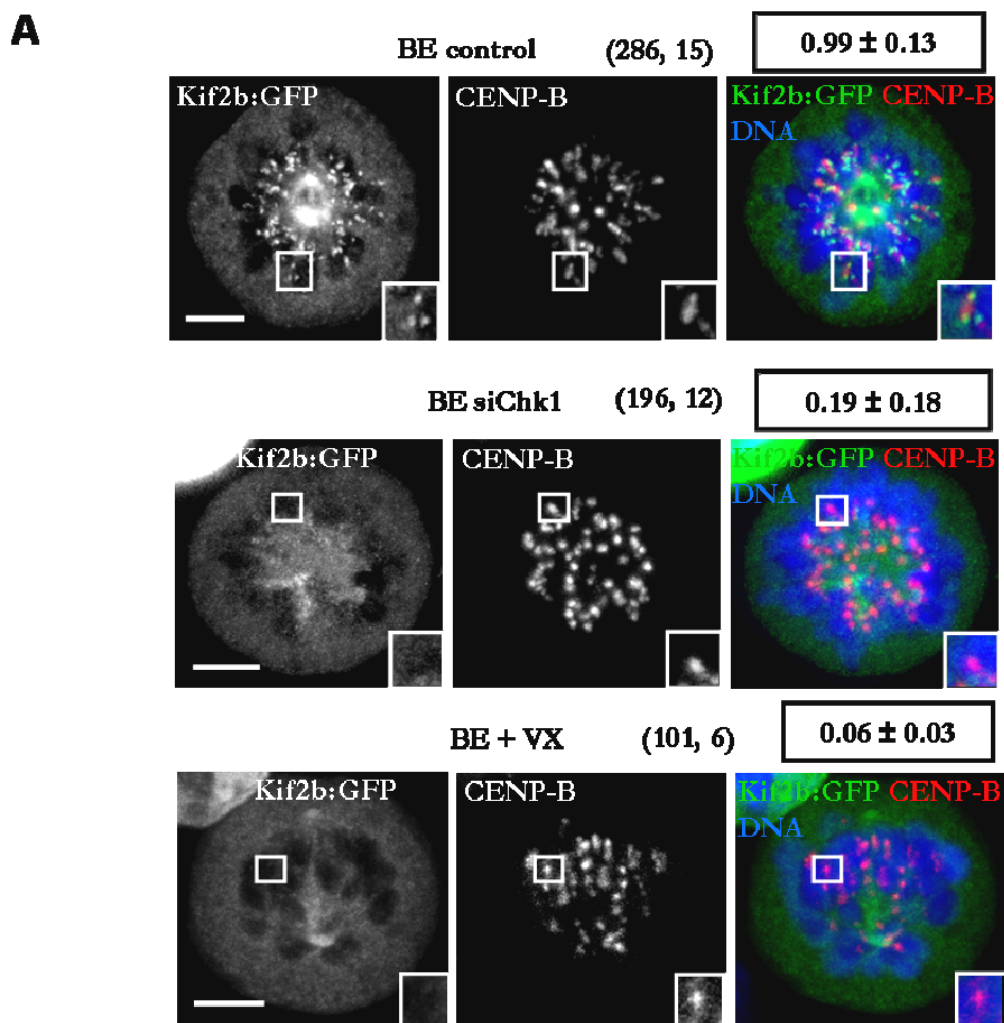


Εικόνα 14: Η Chk1 απαιτείται για τον εντοπισμό της MCAK:GFP στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους. (A, B) Εντοπισμός της MCAK στην προμετάφαση (A) και στη μετάφαση (B). BE κύτταρα που εκφράζουν την MCAK:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή επώαστηκαν με VX680 για 3 ώρες. Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

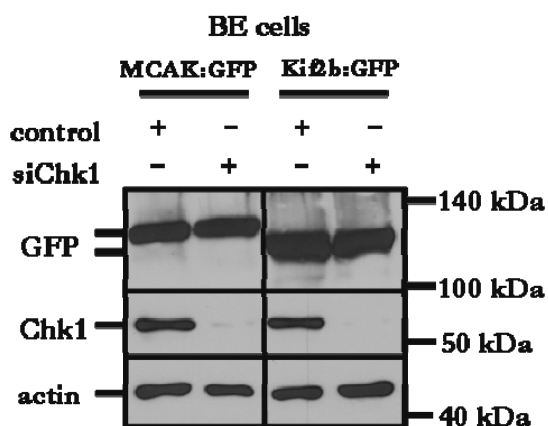
4.2 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους

Η κινεσίνη Kif2b εντοπίζεται φυσιολογικά στην προμετάφαση στους κινητοχώρους, στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και στους μικροσωληνίσκους (Bakhoun et al., 2009). Προκειμένου να ερευνησουμε το ρόλο της Chk1 στον εντοπισμό της κινεσίνης Kif2b, κύτταρα BE επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο που κωδικοποιεί για υβριδική πρωτεΐνη Kif2b:GFP και μελετήθηκε ο εντοπισμός της Kif2b:GFP σε control κύτταρα ή κύτταρα μετά από ταυτόχρονη επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1.

Στα control κύτταρα η Kif2b εντοπίζεται κανονικά στους κινητοχώρους εξωτερικά της CENP-B. Μείωση της έκφρασης της Chk1 προκάλεσε μείωση στον εντοπισμό της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους στην προμετάφαση κατά 81% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 15A). Ως θετικό control, επώαση των κυττάρων με VX-680 προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους κατά 94% ($p < 0,001$). Ωστόσο, τα συνολικά επίπεδα των MCAK:GFP και Kif2b:GFP δεν επηρεάστηκαν από τη μείωση της έκφρασης της Chk1 (Εικόνα 15B). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους κατά τη μίτωση απουσία φαρμάκων της μιτωτικής ατράκτου.



B



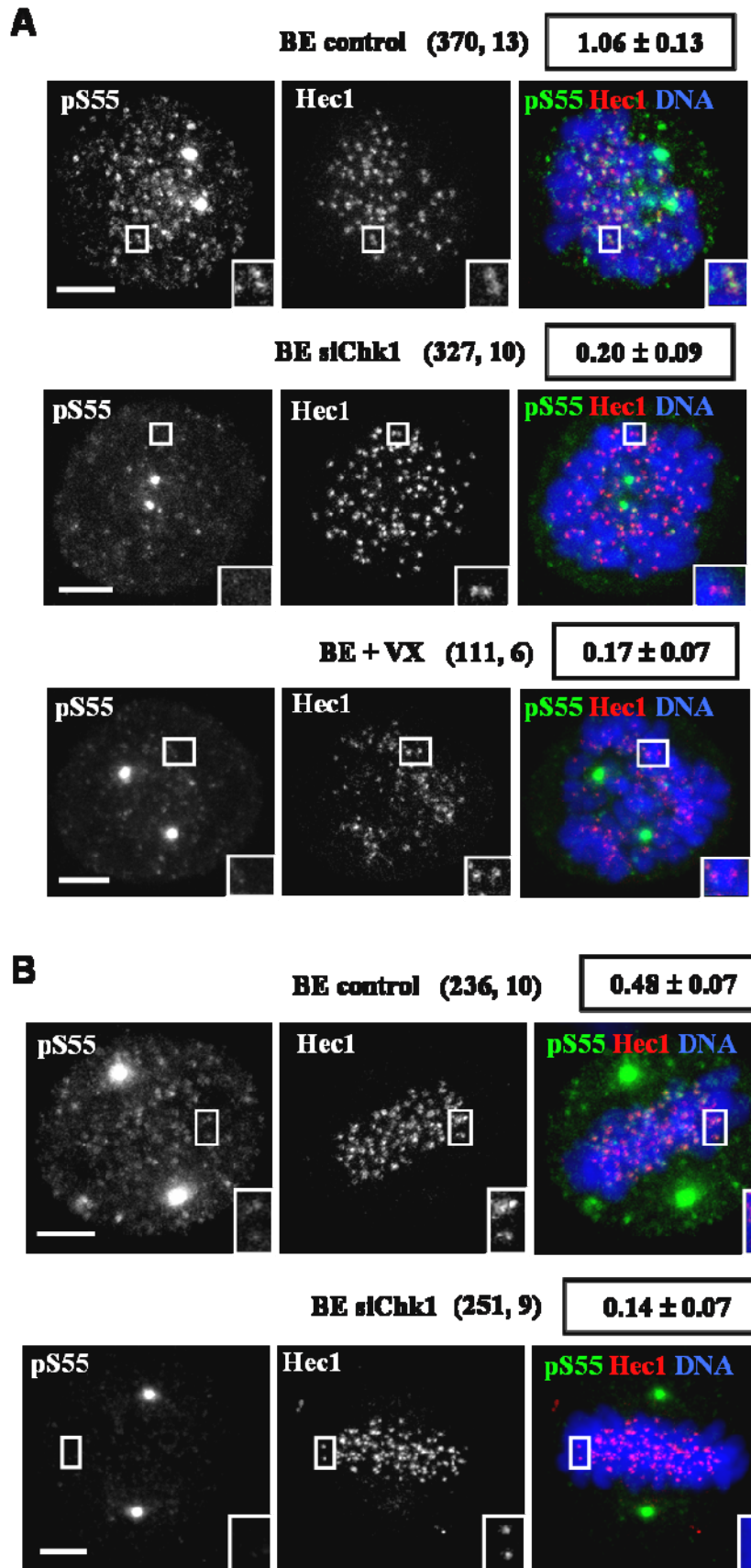
Εικόνα 15: Η Chk1 απαιτείται για τον εντοπισμό της Kif2b:GFP στους κινητοχόρους. (A) Εντοπισμός της Kif2b στην προμετάφαση. BE κύτταρα που εκφράζουν την Kif2b:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή επωάστηκαν με VX680 για 3 ώρες. Πράσινο: Kif2b:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχόρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι

τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. (B) Ανάλυση Western blot της ολικής GFP, Chk1 και ακτίνης σε κύτταρα BE που εκφράζουν MCAK:GFP ή Kif2b:GFP κι έχουν επιμολυνθεί όπως στο A. Scale bars: 5 μ M.

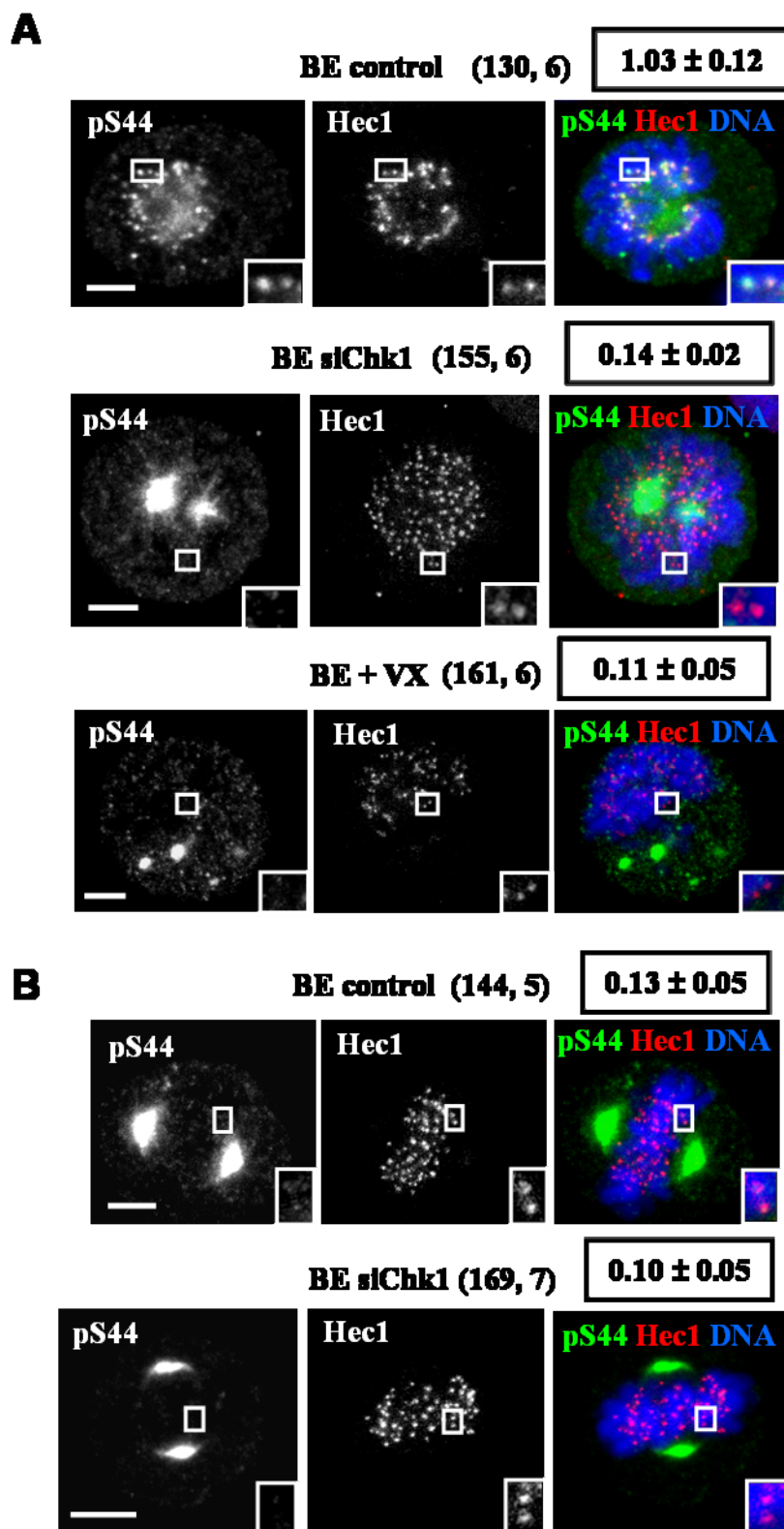
4.3 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και σερίνη 44 κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση

Φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και στη σερίνη 44 αποσταθεροποιεί τις προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (DeLuca et al., 2011). Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Chk1 στη φωσφορυλίωση της Hec1, κύτταρα BE control και κύτταρα BE με μειωμένη Chk1 μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με κατάλληλα φωσφοαντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης σερίνης 55 και σερίνης 44 της Hec1 και μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Κύτταρα BE control στην προμετάφαση έχουν φωσφορυλιωμένη σερίνη 55 στους κινητοχώρους και αυτή η φωσφορυλίωση μειώνεται μετά από μείωση της έκφρασης της Chk1 ή μετά από αναστολή της Aurora-B με VX-680 κατά 81% και 84% αντίστοιχα σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνες 16A,18A). Επίσης, control κύτταρα στη μετάφαση παρουσιάζουν μειωμένη φωσφορυλίωση στη σερίνη 55 στους κινητοχώρους κατά 55% σε σχέση με control κύτταρα στην προμετάφαση ($p < 0,001$), (Εικόνες 16B,18A). Μείωση της έκφρασης της Chk1 προκαλεί περαιτέρω μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 κατά 71% στη μετάφαση σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$).

Επιπροσθέτως, κύτταρα με μειωμένη Chk1 ή κύτταρα μετά από επώαση με VX-680 στην προμετάφαση εμφανίζουν μειωμένη φωσφορυλίωση στη σερίνη 44 στην προμετάφαση κατά 86% και 89% αντίστοιχα σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνες 17A,18B). Στη μετάφαση, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 44 είναι πολύ χαμηλά στα controls και στα κύτταρα με μειωμένη Chk1, πιθανώς διότι έχουν ήδη δημιουργηθεί οι προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (DeLuca et al., 2011) (Εικόνα 17B). Συμπερασματικά, η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 44 και στη σερίνη 55 κατά την προμετάφαση και μετάφαση απουσία φαρμάκων της μιτωτικής ατράκτου.

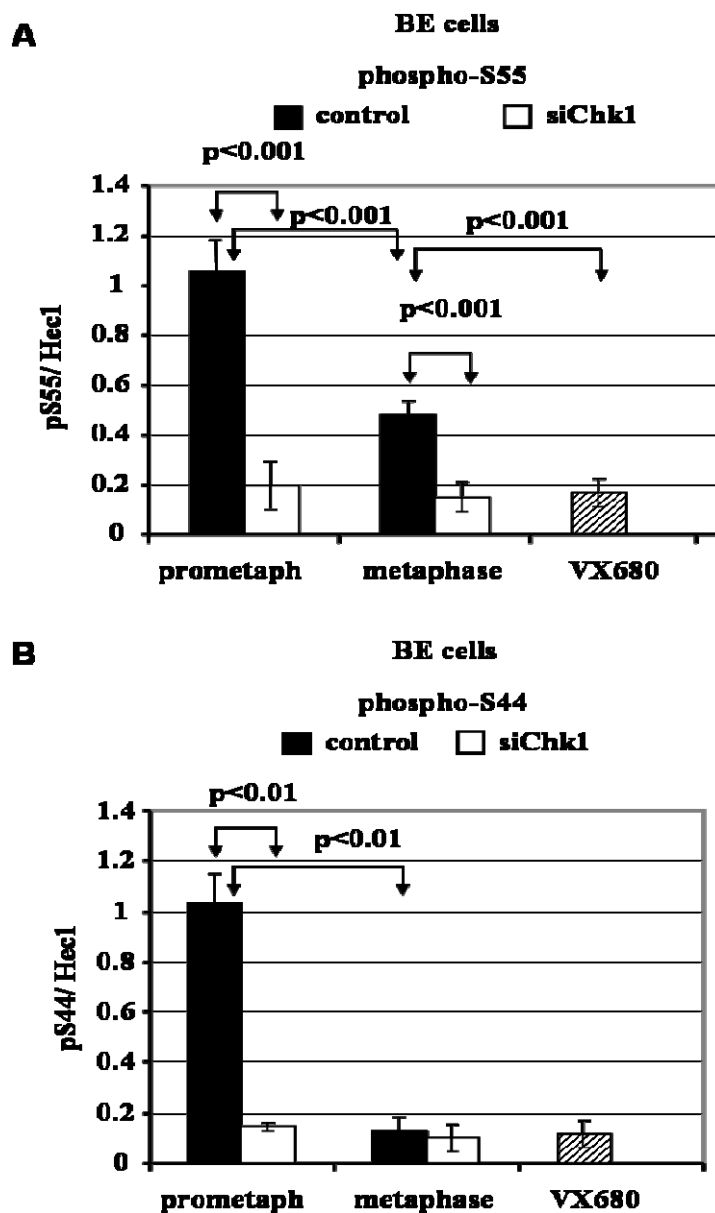


Εικόνα 16: Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 . (A, B)
Φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 σε κύτταρα στην προμετάφαση (A) και στη μετάφαση (B). BE κύτταρα επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή επώαστηκαν με VX680 για 3 ώρες. Πράσινο: pS55, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS55/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.



Εικόνα 17: Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 44. (A, B) Φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 44 σε κύτταρα στην προμετάφαση (A) και στη μετάφαση (B). BE κύτταρα επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή

επώαστηκαν με VX680 για 3 ώρες. Πράσινο: pS44, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS44/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

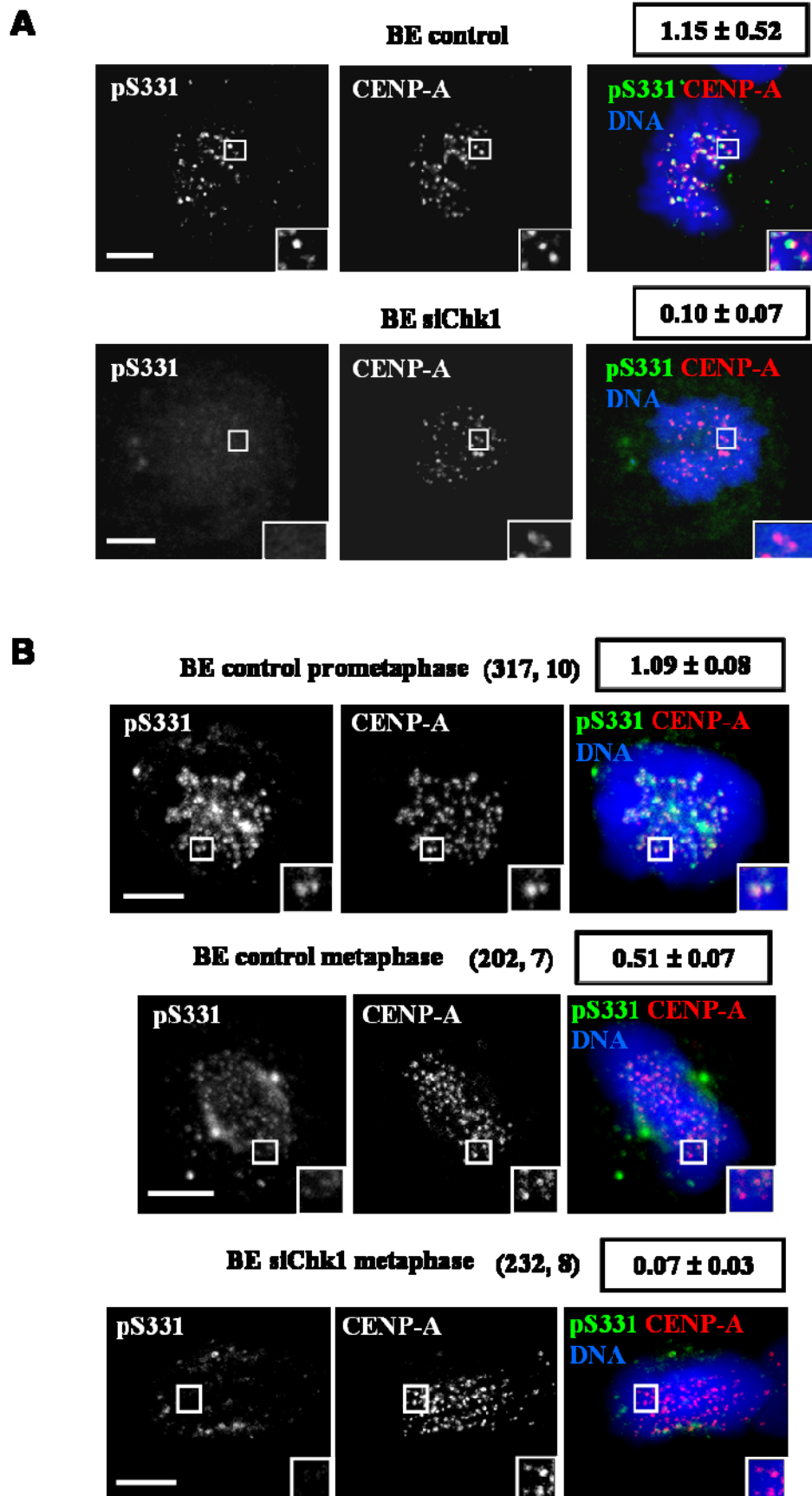


Εικόνα 18: Αναστολή της Chk1 μειώνει τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 55 και 44 της Hec1. (A, B) Μέσος όρος του λόγου pS55/Hec1 (A) ή pS44/Hec1 (B) της έντασης φθορισμού στην προμετάφαση (prometaph) και στη μετάφαση (metaphase) σε κύτταρα μετά από επιμόλυνση με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή μετά από επώαση με VX680 για 3 ώρες. Τα error bars δείχνουν τη σταθερή απόκλιση (standard deviation) από τη μέση τιμή.

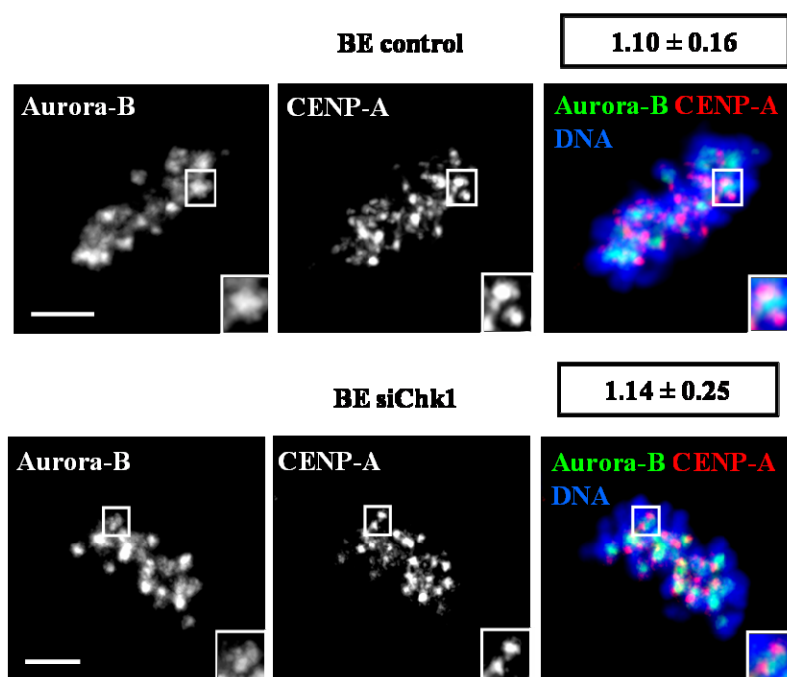
5. Αποτελέσματα: Φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Aurora-B

5.1 Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331

Πρόσφατα δείξαμε ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 παρουσία ταξόλης (Petsalaki et al., 2011). Η φωσφορυλιωμένη σερίνη 331 (pS331) συνεντοπίζεται με τη CENP-A και τη Hec1 στους κινητοχώρους στην προμετάφαση και στη μετάφαση σε control κύτταρα. Ποσοτικοποίηση του λόγου pS331/Hec1 και pS331/CENP-A της έντασης του φθορισμού της pS331 στους κινητοχώρους έδειξε μια μείωση κατά 57% και 53% αντίστοιχα στην ένταση της φωσφορυλιωμένης σερίνης 331 από την προμετάφαση στη μετάφαση (Εικόνα 19B). Μείωση της έκφρασης της Chk1 προκαλεί μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 κατά 91% στην προμετάφαση και κατά 94% στη μετάφαση σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 19), ωστόσο δεν προκαλεί μείωση της συνολικής ποσότητας της Aurora-B στα κεντρομερή ($p = 0,76$), (Εικόνα 20). Συμπερασματικά, η Chk1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της σερίνης 331 κατά την προμετάφαση και μετάφαση απουσία μιτωτικών φαρμάκων.



Εικόνα 19: (A, B) Εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης Aurora-B στη σερίνη 331. (A) Εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης Aurora-B στη σερίνη 331 σε κύτταρα control και κύτταρα με μειωμένη Chk1 (siChk1) στην προμετάφαση. (B) Εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης Aurora-B στη σερίνη 331 σε κύτταρα control και κύτταρα με μειωμένη Chk1 (siChk1) στην προμετάφαση και μετάφαση. Πράσινο: pS331, κόκκινο: CENP-A, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS331/CENP-A. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

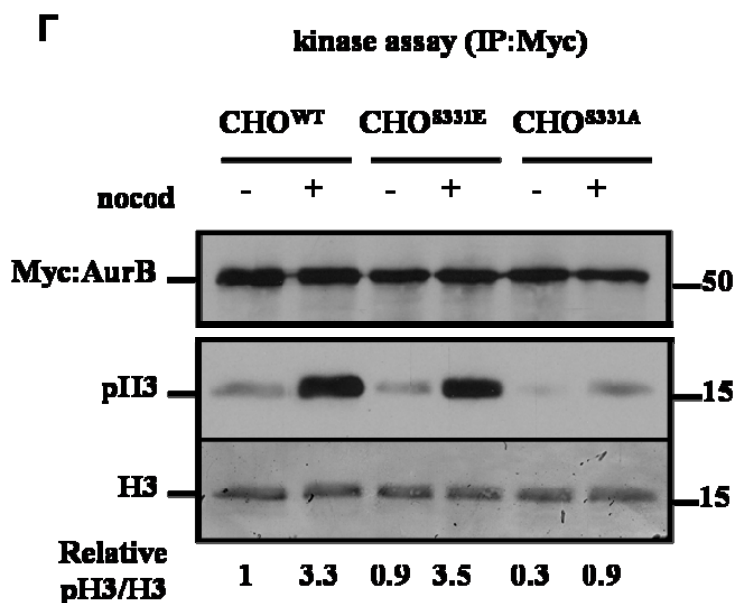
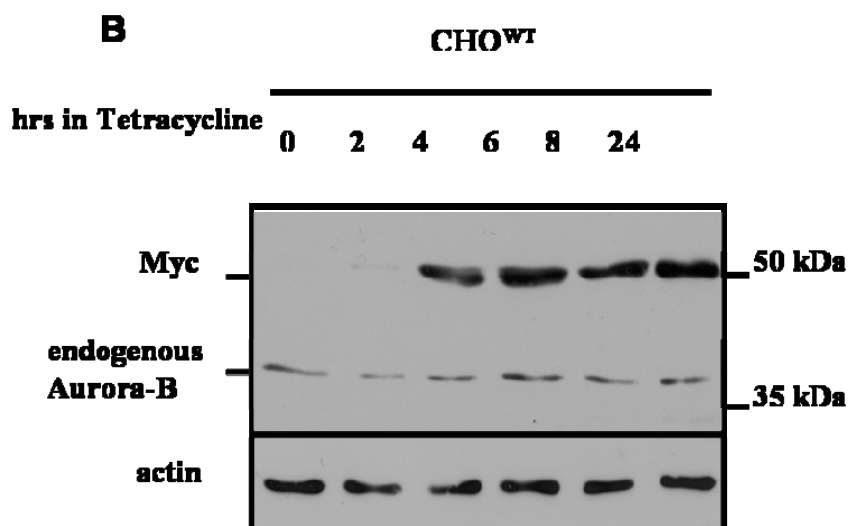
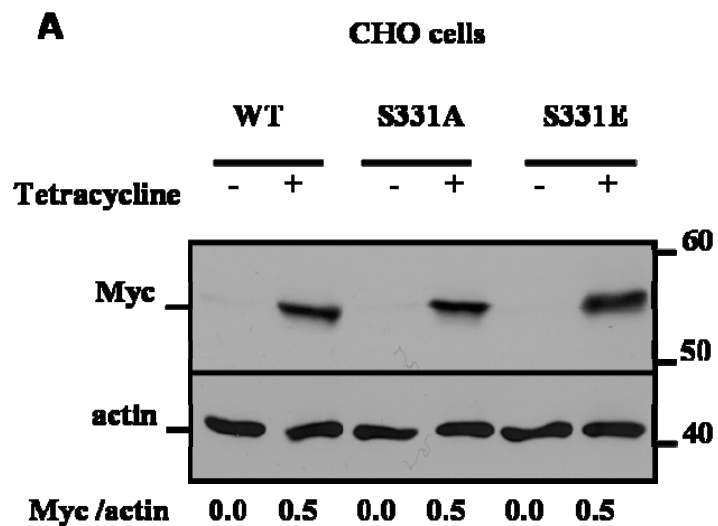


Εικόνα 20: Εντοπισμός της Aurora-B σε κύτταρα control και κύτταρα με μειωμένη Chk1 (siChk1) στη μετάφαση. Πράσινο: Aurora-B, κόκκινο: CENP-A, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο Aurora-B/CENP-A. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M.

5.2 Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη Aurora B στη σερίνη 331 σε αλανίνη ή γλουταμικό οξύ

Προκειμένου να μελετήσουμε τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331, δημιουργήσαμε κύτταρα CHO τα οποία εκφράζουν τη σημασμένη με 6X-Myc αγρίου τύπου Aurora-B (CHO^{WT}), τη μεταλλαγμένη Aurora-B στη σερίνη 331 σε αλανίνη (CHO^{S331A}), η οποία δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί στη θέση αυτή ή τη μεταλλαγμένη Aurora-B στη σερίνη 331 σε γλουταμικό οξύ (CHO^{S331E}), η οποία μιμείται τη συνεχώς φωσφορυλιωμένη σερίνη 331 υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που επάγεται με τετρακυκλίνη. Προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο για 8-24 ώρες οδηγεί σε συσσώρευση των 6X-Myc Aurora-B σε επίπεδα παρόμοια μεταξύ τους και περίπου 10 φορές υψηλότερα σε σχέση με την ενδογενή Aurora-B (Εικόνα 21A,B). Τέτοια επίπεδα υπερέκφρασης θεωρείται ότι καλύπτουν τη δράση της ενδογενούς πρωτεΐνης χωρίς να προκαλούν λάθη στον εντοπισμό της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται (Ditchfield et al., 2003a) Μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, οι πρωτεΐνες 6X-Myc Aurora-B^{WT}, 6X-Myc Aurora-B^{S331A} και 6X-Myc Aurora-B^{S331E} εντοπίζονταν στα κεντρομερή κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής προμετάφρασης σε όλα τα κύτταρα που εξετάστηκαν (Petsalaki et al., 2011).

Επιπλέον, μελετήθηκε η ενεργότητα κινάσης στα κύτταρα CHO^{WT}, CHO^{S331A} και CHO^{S331E} με δοκιμασία κινάσης με ανοσοκατακρήμνιση παρουσία ή απουσία nocodazole. Συγκεκριμένα ανοσοκατακρημνίστηκε η 6X-MycAurora-B με αντίσωμα έναντι του myc και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κινάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη σερίνη 10 της ιστόνης 3. Η ενεργότητα της 6X-Myc Aurora-B μειώθηκε στα CHO^{S331A} κύτταρα κατά 70% σε σχέση με τα CHO^{WT}, CHO^{S331E} (Εικόνα 21Γ). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη καταλυτική ενεργότητα της Aurora-B κινάσης.



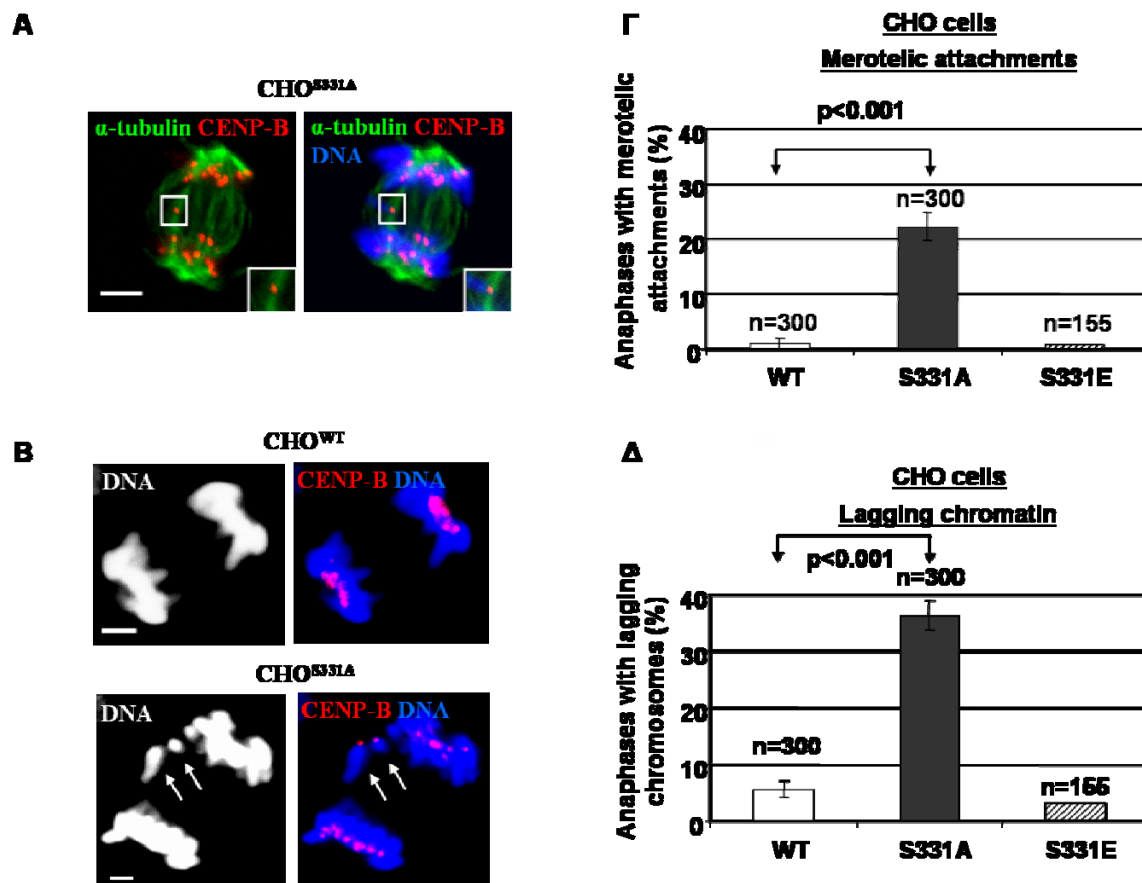
Εικόνα 21: Φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 απαιτείται για πλήρη ενεργοποίηση της Aurora-B. (Α) Ανάλυση Western blot της δ myc-Aurora-B (myc) και ακτίνης σε κύτταρα CHO^{WT}, CHO^{S331A} και CHO^{S331E} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη. (Β) Ανάλυση Western blot της δ myc-Aurora-B (myc) και ακτίνης σε κύτταρα CHO^{WT}, CHO^{S331A} και CHO^{S331E} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη σε σχέση με την ενδογενή Aurora-B (Γ) Δοκιμασία κινάσης μετά από ανοσοκατακρήμνιση (IP-kinase assay). Κύτταρα CHO^{WT}, CHO^{S331A} και CHO^{S331E} επώαστηκαν με τετρακυκλίνη και έμειναν untreated (un) ή επώαστηκαν με nocodazole (nocod) για 6 ώρες.

6. Αποτελέσματα: Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στην πρόληψη των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν

6.1 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 προστατεύει από μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν

Για να μελετήσουμε το ρόλο της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στην πρόληψη μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση, κύτταρα CHO^{WT}, CHO^{S331A} και CHO^{S331E} επώαστηκαν με τετρακυκλίνη για 16 ώρες, μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν στην ανάφαση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, 67/300 (22,3%) των CHO^{S331A} κυττάρων εμφανίζουν αναφάσεις με μεροτελικές προσδέσεις σε σχέση με 3/300 (1%) στα CHO^{WT} κύτταρα και 1/155 (0,6%) στα CHO^{S331E} ($p < 0,001$), (Εικόνα 22Α, Γ).

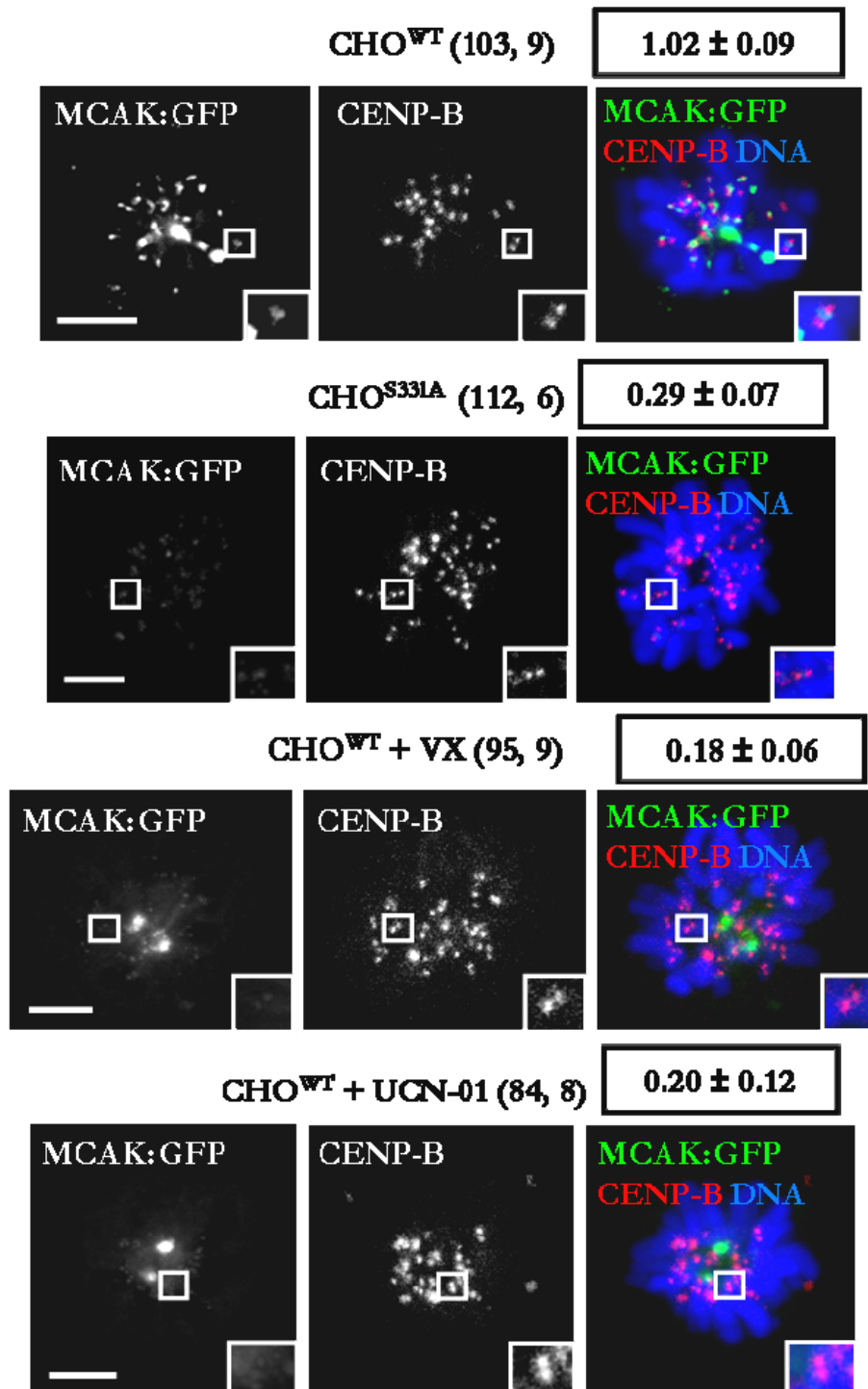
Επίσης, 109/300 (36,3%) των CHO^{S331A} κυττάρων εμφανίζουν αναφάσεις με χρωμοσώματα που καθυστερούν σε σχέση με 17/300 (5,7%) των CHO^{WT} κυττάρων και 5/155 (3,2%) των CHO^{S331E} ($p < 0,001$), (Εικόνα 22Β, Δ). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη προστατεύει από αναφάσεις με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν.



Εικόνα 22: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν. (A) Παράδειγμα ανάφασης με μεροτελική πρόσδεση στα CHO^{S331A} κύτταρα μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη. Ένας αδελφός κινητοχώρος συνδέεται με μικροσωληνίσκους από τους δύο πόλους της ατράκτου. Πράσινο: α-tubulin, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μM. (B) Χρωμοσώματα που καθυστερούν φαίνονται με βέλη. Κύτταρα CHO^{WT} και CHO^{S331A} φαίνονται στην ανάφαση. Τα χρωμοσώματα που καθυστερούν φαίνονται με βέλη. Κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. (Γ) Συχνότητες αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις. Τουλάχιστον 50 αναφάσεις ανά πείραμα αναλύθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Τα error bars δείχνουν τη σταθερή απόκλιση (standard deviation) του μέσου από 3 ανεξάρτητα πειράματα. n= ο αριθμός των αναφάσεων που μελετήθηκαν. (Δ) Συχνότητες αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν. Τουλάχιστον 50 αναφάσεις ανά πείραμα αναλύθηκαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

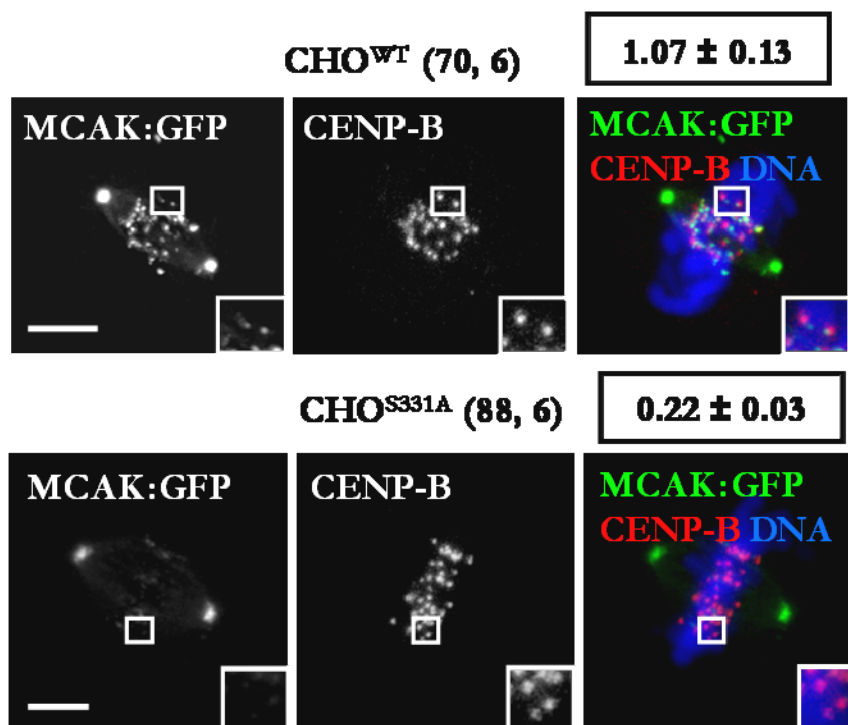
6.2 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους

Προκειμένου να ερευνήσουμε τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στον εντοπισμό της MCAK, κύτταρα CHO^{WT} και CHO^{S331A} που εκφράζουν παροδικά MCAK:GFP, επώαστηκαν με τετρακυκλίνη και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και αναλύθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Έκφραση της μεταλλαγμένης Aurora-B^{S331A} προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή ή στους κινητοχώρους κατά 72% στην προμετάφαση και 80% στη μετάφαση σε σχέση με τα CHO^{WT} κύτταρα ($p < 0,001$), (Εικόνα 23). Επίσης, επώαση των CHO^{WT} κυττάρων με VX-680 ή UCN-01 οδήγησε σε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή κατά 82% και 80% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$). Επιπροσθέτως, τα CHO^{S331A} κύτταρα στη μετάφαση παρουσιάζουν μειωμένο εντοπισμό της MCAK:GFP κατά 80% σε σχέση με τα CHO^{WT} κύτταρα ($p < 0,001$), (Εικόνα 24). Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 της Aurora-B απαιτείται για το βέλτιστο εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους.



Εικόνα 23: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή στην προμετάφαση. Εντοπισμός της MCAK:GFP κατά την προμετάφαση. Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, που εκφράζουν την MCAK:GFP έμειναν untreated ή επώαστηκαν με VX-680 (VX) ή UCN-01 για 3 ώρες. Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που

μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M.

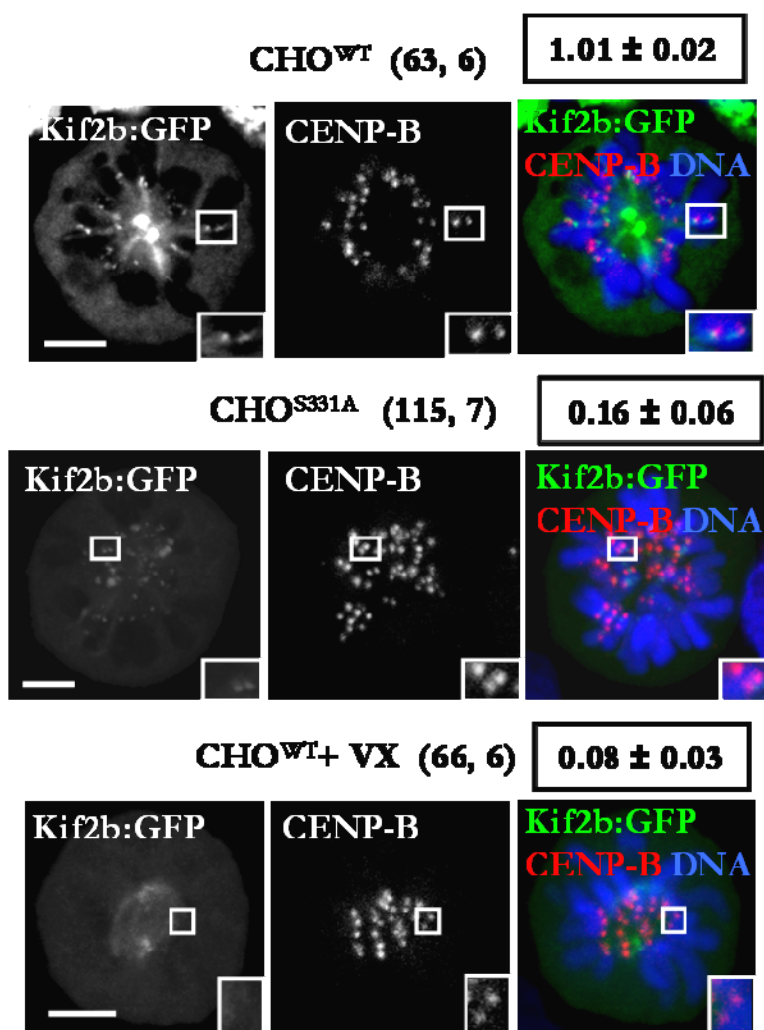


Εικόνα 24: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στους κινητοχώρους κατά τη διάρκεια της μετάφασης. Εντοπισμός της MCAK:GFP κατά τη μετάφαση. Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} που εκφράζουν την MCAK:GFP μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη. Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M.

6.3 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους

Για να ερευνήσουμε τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στον εντοπισμό της Kif2b, κύτταρα CHO^{WT} και CHO^{S331A} που εκφράζουν παροδικά

Kif2b:GFP, επώαστηκαν με τετρακυκλίνη και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και αναλύθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο. Έκφραση της Aurora-B^{S331A} ή επώαση με τον VX-680 προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση κατά 84% και 92% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 25). Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 της Aurora-B απαιτείται για το βέλτιστο εντοπισμό της Kif2b στους κινητοχώρους.



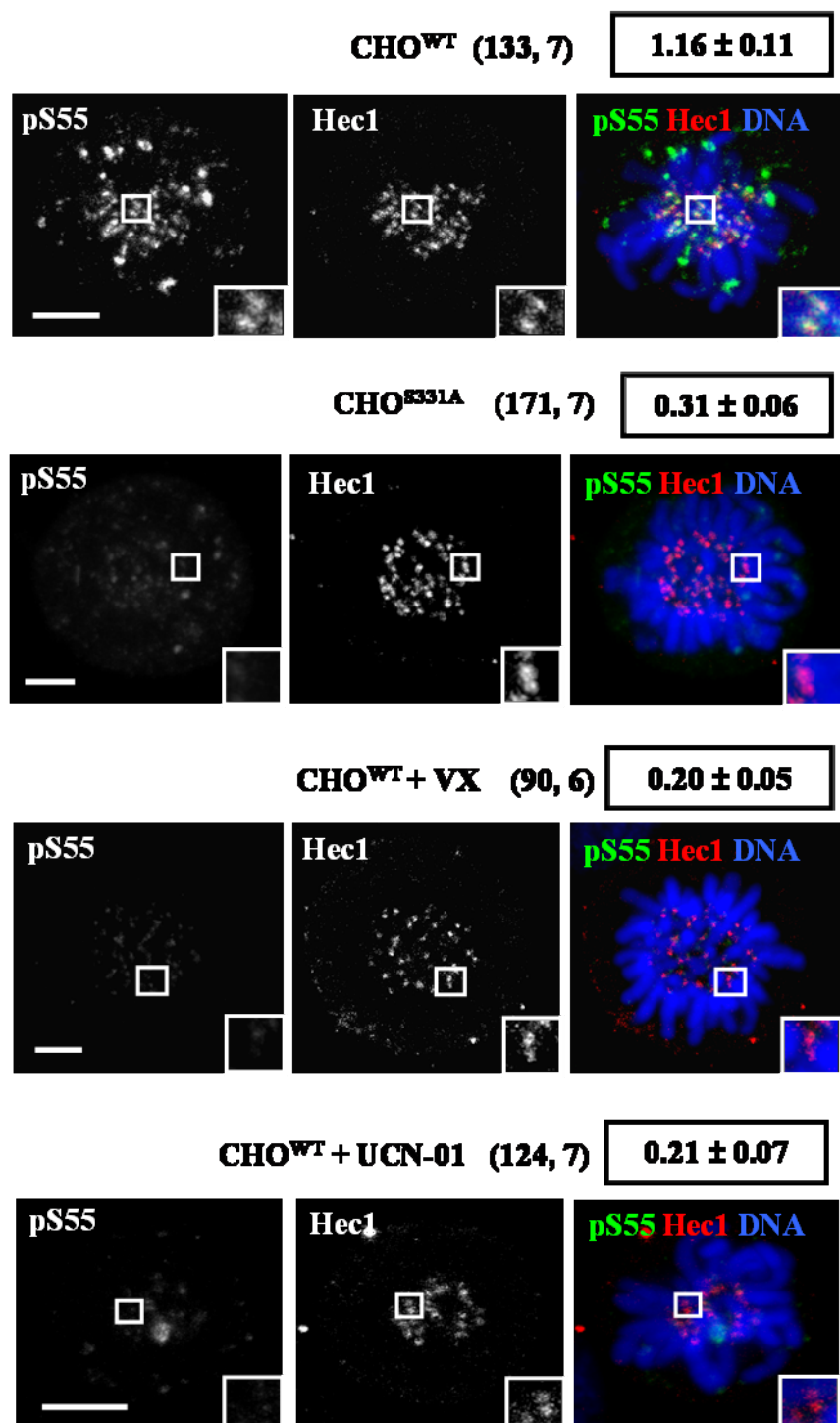
Εικόνα 25: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε μείωση του εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους κατά τη διάρκεια της προμετάφασης. Εντοπισμός της Kif2b:GFP κατά την προμετάφαση. Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, που εκφράζουν την Kif2b:GFP έμειναν untreated ή επώαστηκαν με VX-680 (VX) για 3 ώρες. Πράσινο: Kif2b:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων

που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

6.4 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55

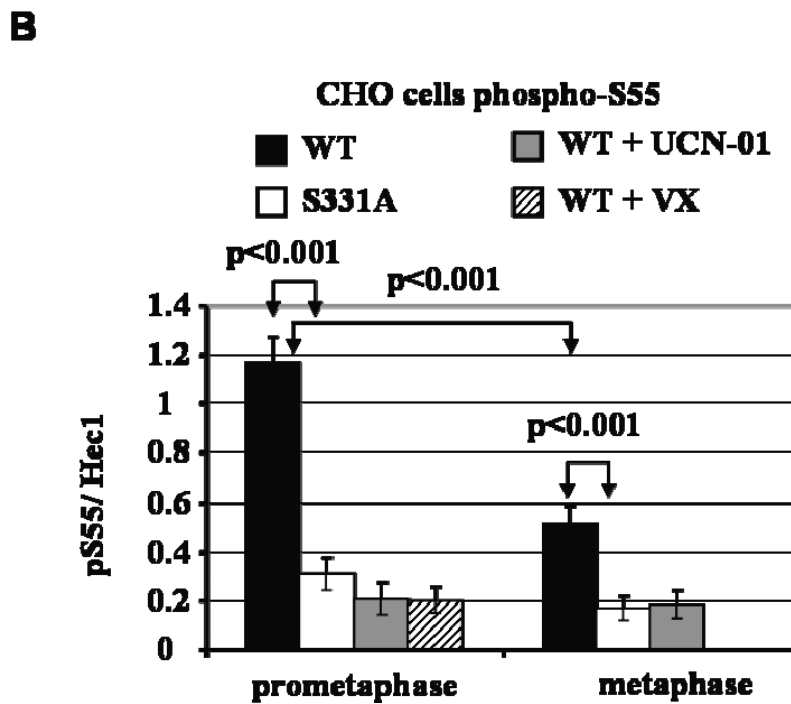
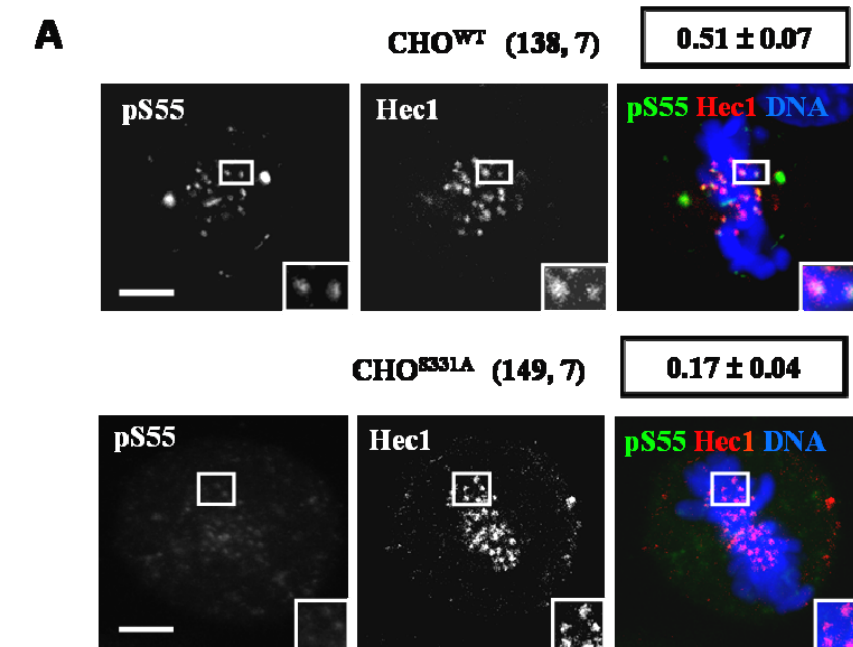
Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 για τη φωσφορυλίωση της Hec1, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα CHO^{WT} και CHO^{S331A}, τα οποία μονιμοποιήθηκαν, βιάστηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, παρατηρήσαμε μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 στα CHO^{S331A} κύτταρα κατά 73% σε σχέση με τα CHO^{WT} ($p < 0,001$), (Εικόνες 26,27B). Συγκριτικά, επώαση των κυττάρων CHO^{WT} με VX-680 ή UCN-01 οδήγησε σε μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 κατά 83% και 82% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνες 26,27B).

Επιπλέον, τα CHO^{S331A} κύτταρα στη μετάφαση παρουσιάζουν μειωμένη φωσφορυλίωση στη σερίνη 55 κατά 56% σε σχέση με τα CHO^{WT} (Εικόνα 27). Ακόμα, έκφραση της Auroga-B^{S331A} προκάλεσε περαιτέρω μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 στη μετάφαση κατά 67% σε σχέση με τα CHO^{WT} ($p < 0,001$), (Εικόνα 27). Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 της Auroga-B είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση.



Εικόνα 26: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της Hec1 στη σερίνη 55 στην προμετάφαση. Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, έμειναν untreated ή επωάστηκαν με VX-680 (VX) ή UCN-01 για 3 ώρες. Πράσινο: pS55, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα

κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS55/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

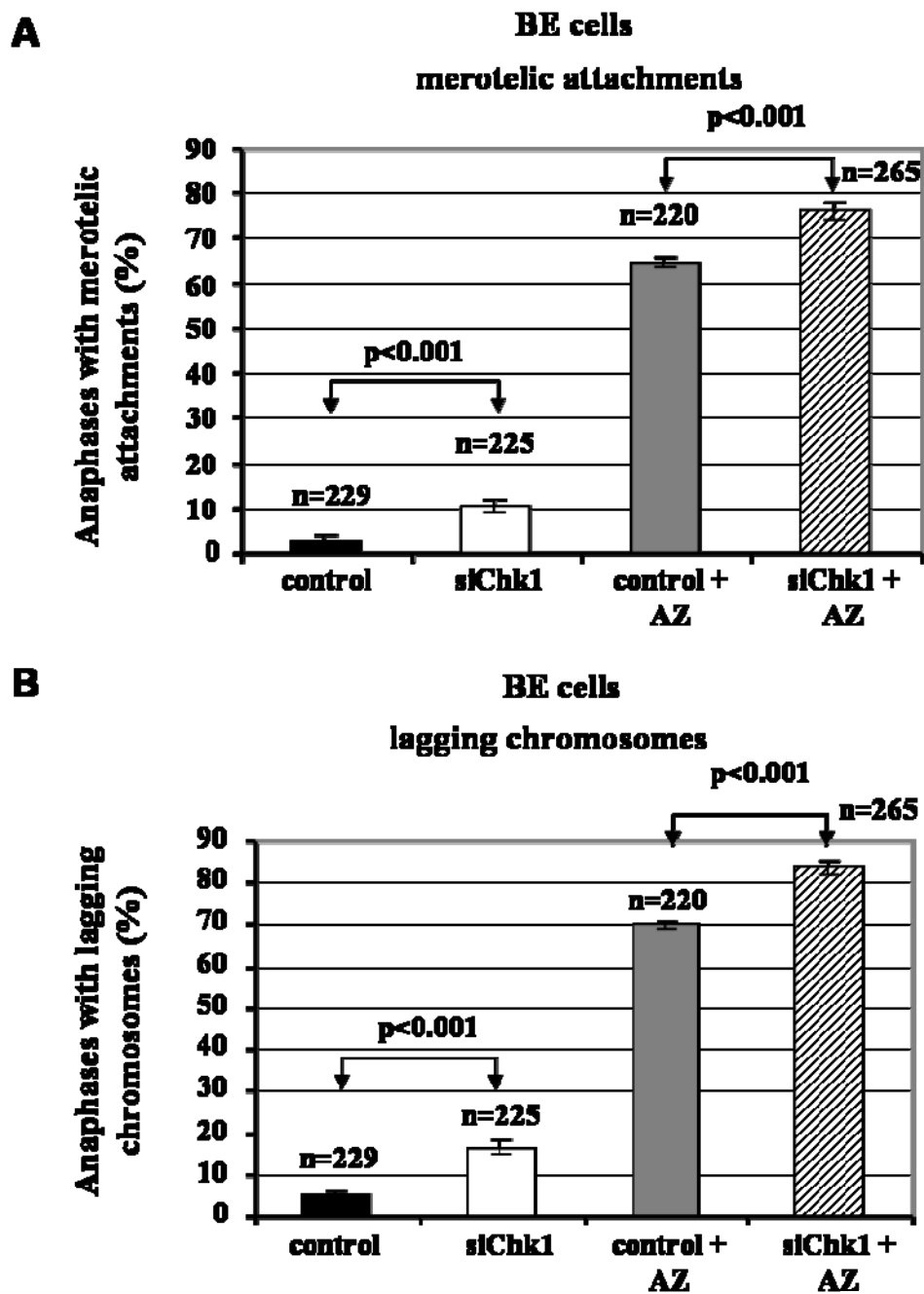


Εικόνα 27: Η έκφραση της Aurora-B S331A οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης της Hec1 στη σερίνη 55 στη μετάφαση. (A, B) Φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 (A) Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη κατά τη διάρκεια της μετάφασης. Πράσινο: pS55, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS55/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. (B) Μέσος όρος των τιμών της έντασης φθορισμού pS55/Hec1. Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, έμειναν untreated ή επώαστηκαν με VX-680 (VX) ή UCN-01 για 3 ώρες. Τα error bars δείχνουν τη σταθερή απόκλιση (standard deviation) από τη μέση τιμή. Scale bars: 5 μM.

7. Αποτελέσματα: Οι Mps1 και Chk1 συνεργάζονται για προστασία από τις μεροτελικές προσδέσεις

7.1 Ταυτόχρονη αναστολή της Mps1 και της Chk1 παρουσιάζει αθροιστικό αποτέλεσμα στις μεροτελικές προσδέσεις και τα χρωμοσώματα που καθυστερούν

Η Mps1 είναι απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Αναστολή της ενεργότητας της Mps1 με τον αναστολέα AZ3146 (AZ) σε control BE κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (64,6%), (Εικόνα 28A) και χρωμοσώματα που καθυστερούν (70%), (Εικόνα 28B) σε σχέση με τα controls (2,6% και 5,2% αντίστοιχα), ($p < 0,001$). Επίσης, μείωση της έκφρασης της Chk1 σε συνδυασμό με αναστολή της Mps1 με τον AZ (siChk1+AZ) προκάλεσε περαιτέρω αύξηση των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (76,4%), (Εικόνα 28A) και χρωμοσώματα που καθυστερούν (83,8%), (Εικόνα 28B) σε σχέση με τα control+AZ κύτταρα ($p < 0,001$). Συμπερασματικά, η ταυτόχρονη αναστολή της Mps1 και η μείωση της έκφρασης της Chk1 παρουσιάζουν ένα αθροιστικό αποτέλεσμα όσον αφορά στις αναφάσεις με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν.

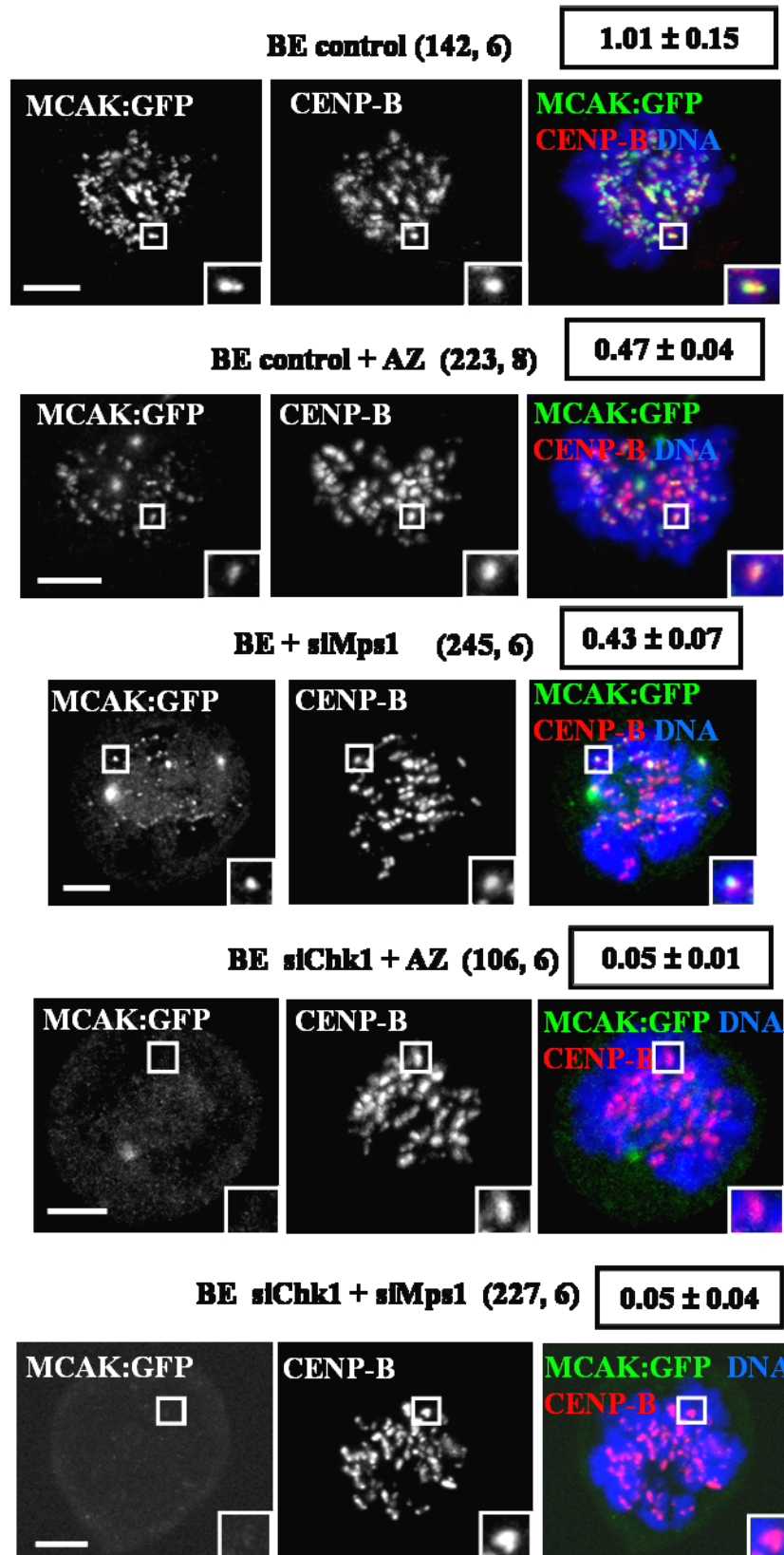


Εικόνα 28: Αθροιστικό αποτέλεσμα από την ταυτόχρονη αναστολή των Mps1 και Chk1. Συχνότητες αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (A) ή χρωμοσώματα που καθυστερούν (B). Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες και αναλύθηκαν στην ανάφαση. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο \pm SD από 3 διαφορετικά πειράματα. Τουλάχιστον 60 αναφάσεις αναλύθηκαν σε κάθε πείραμα. n=ο αριθμός των αναφάσεων που μελετήθηκαν.

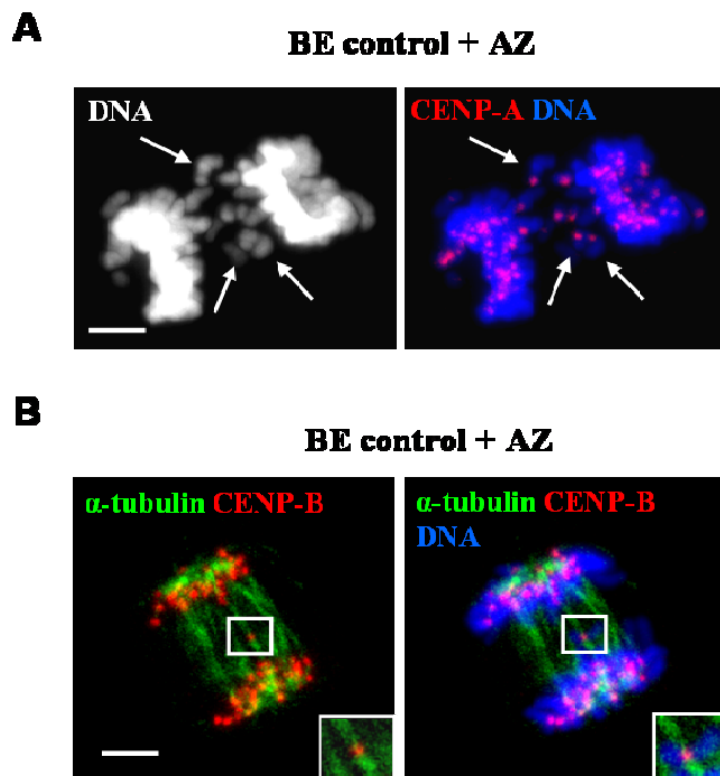
7.2 Αναστολή της Mps1 προκαλεί μείωση του εντοπισμού της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Mps1 στον εντοπισμό της κινεσίνης MCAK, κύτταρα BE επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την MCAK:GFP, επώαστηκαν με τον αναστολέα της Mps1 AZ3146, μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν στην προμετάφαση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Επώαση με AZ ή μείωση της έκφρασης της Mps1 με siRNA προκάλεσε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή στην προμετάφαση κατά 54% ή 57% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 29). Επιπροσθέτως, συνδυασμός μείωσης της έκφρασης της Chk1 με επώαση με AZ ή με ελάττωση της Mps1 με siRNA (siMps1) οδήγησε σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στα κεντρομερή κατά 88-89% σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με AZ ή siMps1 ($p < 0,001$), (Εικόνα 29).

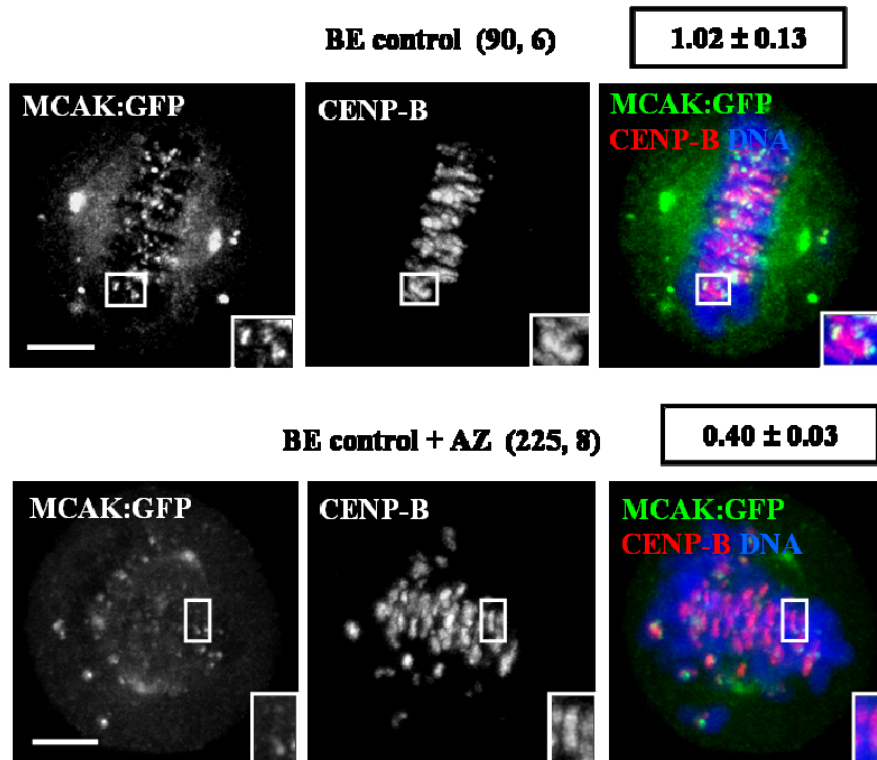
Επίσης, τα κύτταρα μετά από επώαση με AZ παρουσίασαν μεταφάσεις με χρωμοσώματα που δεν είχαν διαταχθεί στο ισημερινό επίπεδο και μεροτελικές προσδέσεις (Εικόνα 30) και ο εντοπισμός της MCAK:GFP ήταν μειωμένος κατά 61% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 31). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 και η Mps1 ρυθμίζουν από κοινού τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μίτωσης.



Εικόνα 29: Αθροιστικό αποτέλεσμα από την ταυτόχρονη αναστολή των Mps1 και Chk1. Εντοπισμός της MCAK:GFP. BE κύτταρα που εκφράζουν την MCAK:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή siRNA εναντίον της Mps1 (siMps1) και έμειναν untreated ή επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες παρουσία ή απουσία siRNA εναντίον της Mps1 (siMps1). Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M.



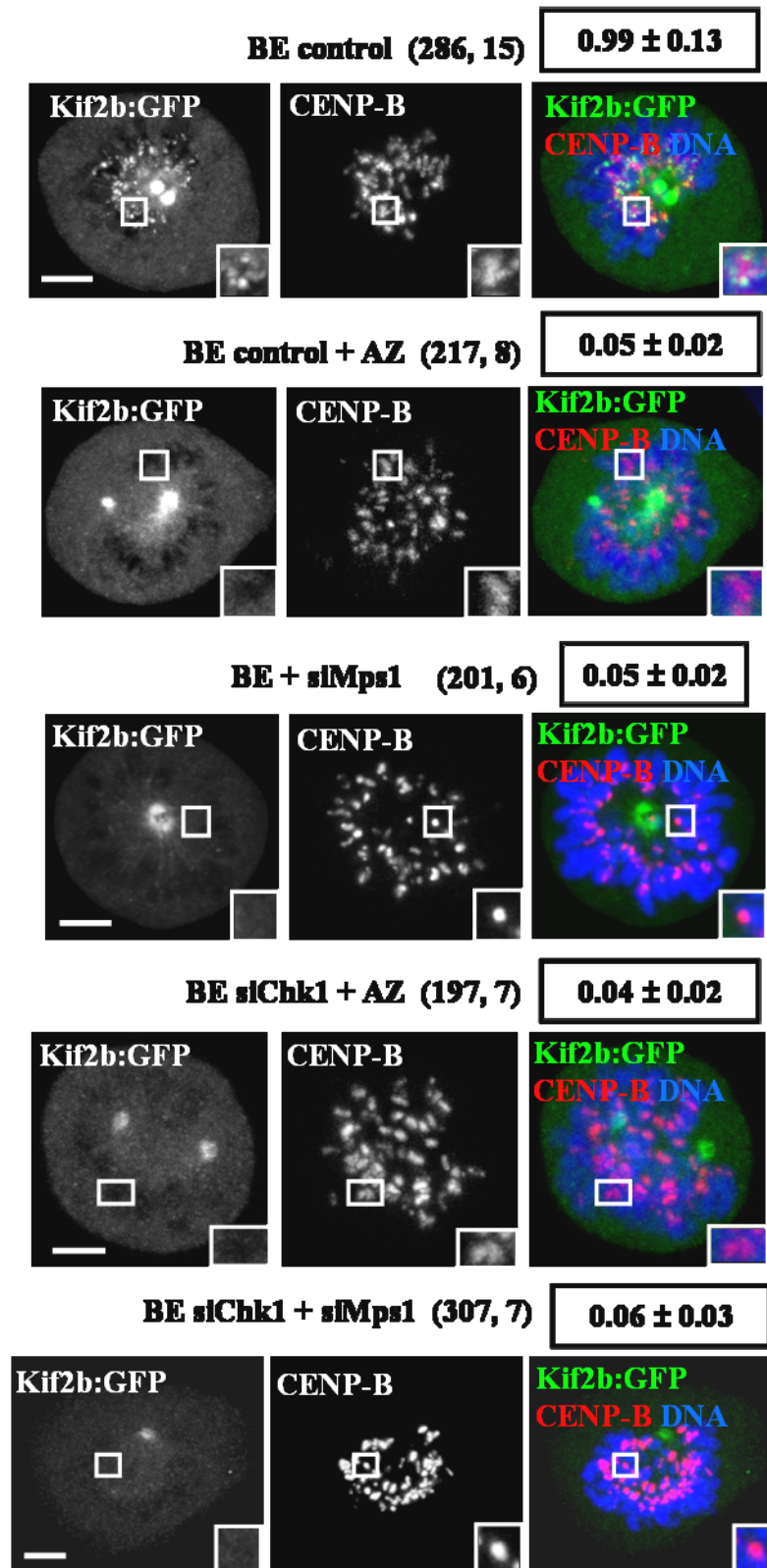
Εικόνα 30: (A, B) Αναστολή της Mps1 οδηγεί στη δημιουργία χρωμοσωμάτων που καθυστερούν και μεροτελικών προσδέσεων. (A) Παράδειγμα ανάφασης με χρωμοσώματα που καθυστερούν στο ισημερινό επίπεδο σε κύτταρο μετά από επώαση με AZ. Κόκκινο: CENP-A, μπλε: DNA. (B) Παράδειγμα ανάφασης με μεροτελική πρόσδεση μετά από επώαση με AZ. Πράσινο: α -tubulin, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA.



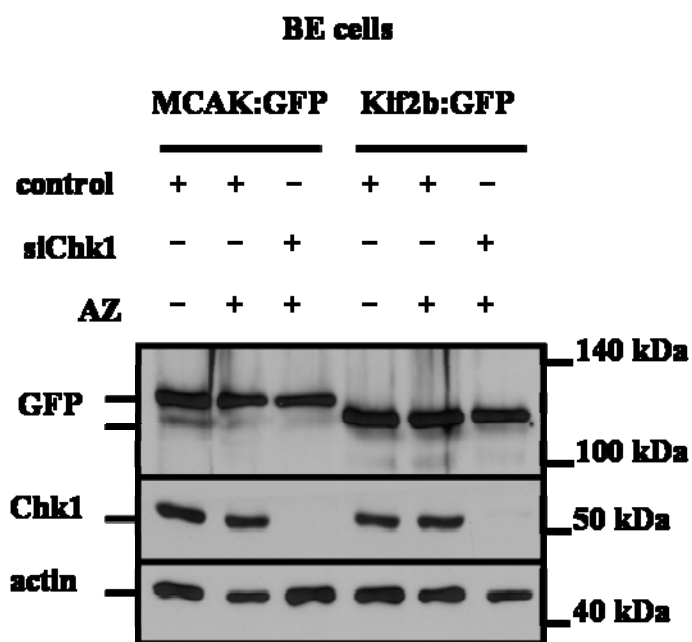
Εικόνα 31: Αναστολή της *Mps1* οδηγεί σε μείωση του εντοπισμού της MCAK:GFP στους κινητοχώρους στη μετάφαση. Εντοπισμός της MCAK:GFP κατά τη μετάφαση. Κύτταρα BE που εκφράζουν την MCAK:GFP. Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M.

7.3 Αναστολή της Mps1 προκαλεί μείωση του εντοπισμού της Kif2b στους κινητοχώρους

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Mps1 στον εντοπισμό της κινεσίνης Kif2b, κύτταρα BE επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την Kif2b:GFP, επώαστηκαν με τον αναστολέα της Mps1 AZ3146, μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν στην προμετάφαση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Επώαση των κυττάρων με AZ, μείωση της Mps1 με siRNA ή συνδυασμός μείωσης της Chk1 με επώαση με AZ ή siMps1, οδήγησε σε μείωση του εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους κατά 95-96% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 32). Επίσης, τα επίπεδα των MCAK:GFP και Kif2b:GFP δεν επηρεάστηκαν από την επώαση με AZ απουσία ή παρουσία siRNA εναντίον της Chk1 (Εικόνα 33). Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργότητα της Mps1 είναι απαραίτητη για το βέλτιστο εντοπισμό των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους.



Εικόνα 32: Αποτέλεσμα από την ταυτόχρονη αναστολή των Mps1 και Chk1. (A) Εντοπισμός της Kif2b:GFP. BE κύτταρα που εκφράζουν την Kif2b:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) ή siRNA εναντίον της Mps1 (siMps1) και έμειναν untreated ή επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες παρουσία ή απουσία siRNA εναντίον της Mps1 (siMps1). Πράσινο: Kif2b:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Scale bars: 5 μ M. Scale bars: 5 μ M.



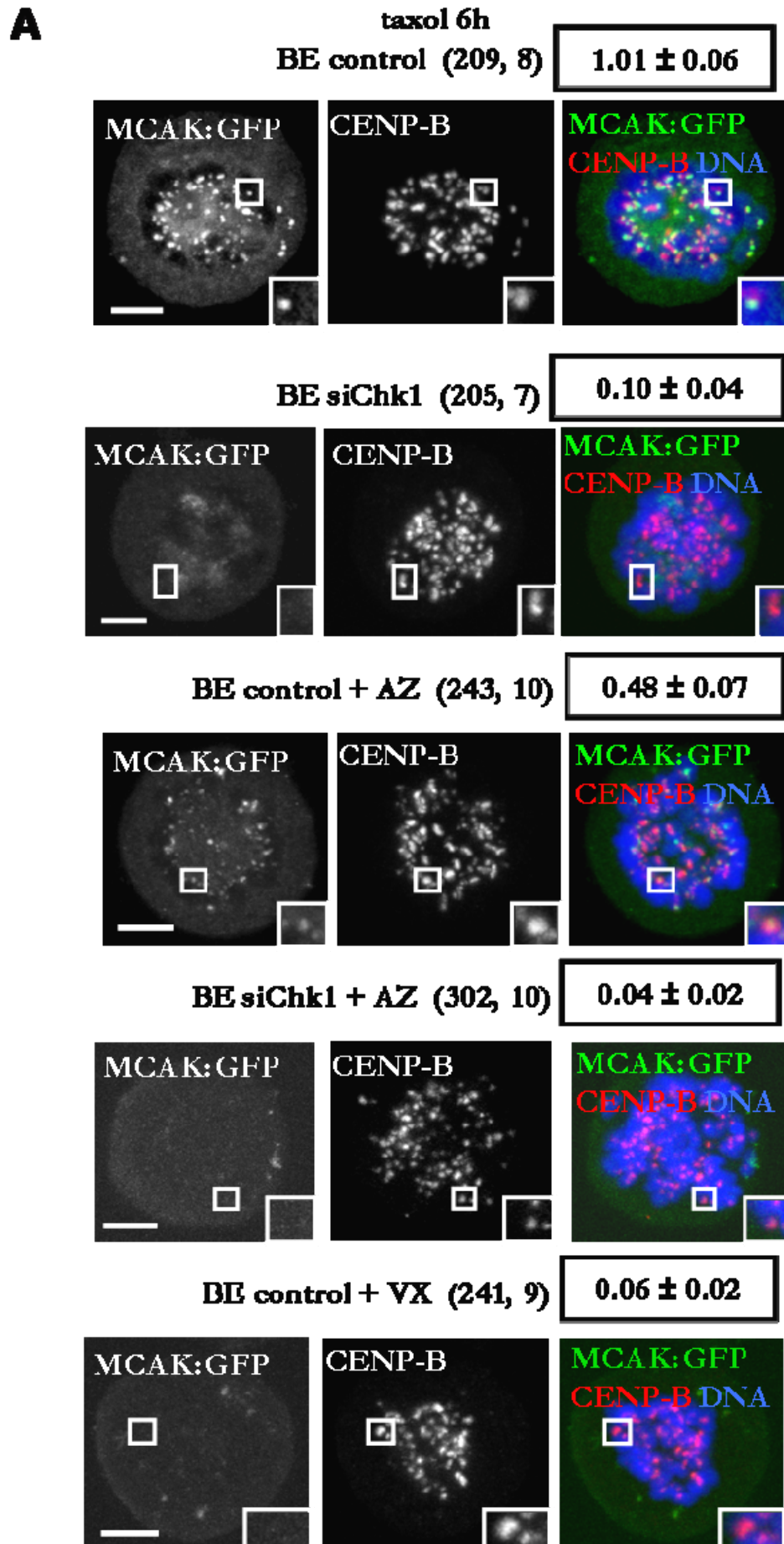
Εικόνα 33: Ανάλυση Western Blot της ολικής GFP, Chk1 και ακτίνης. BE κύτταρα επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες.

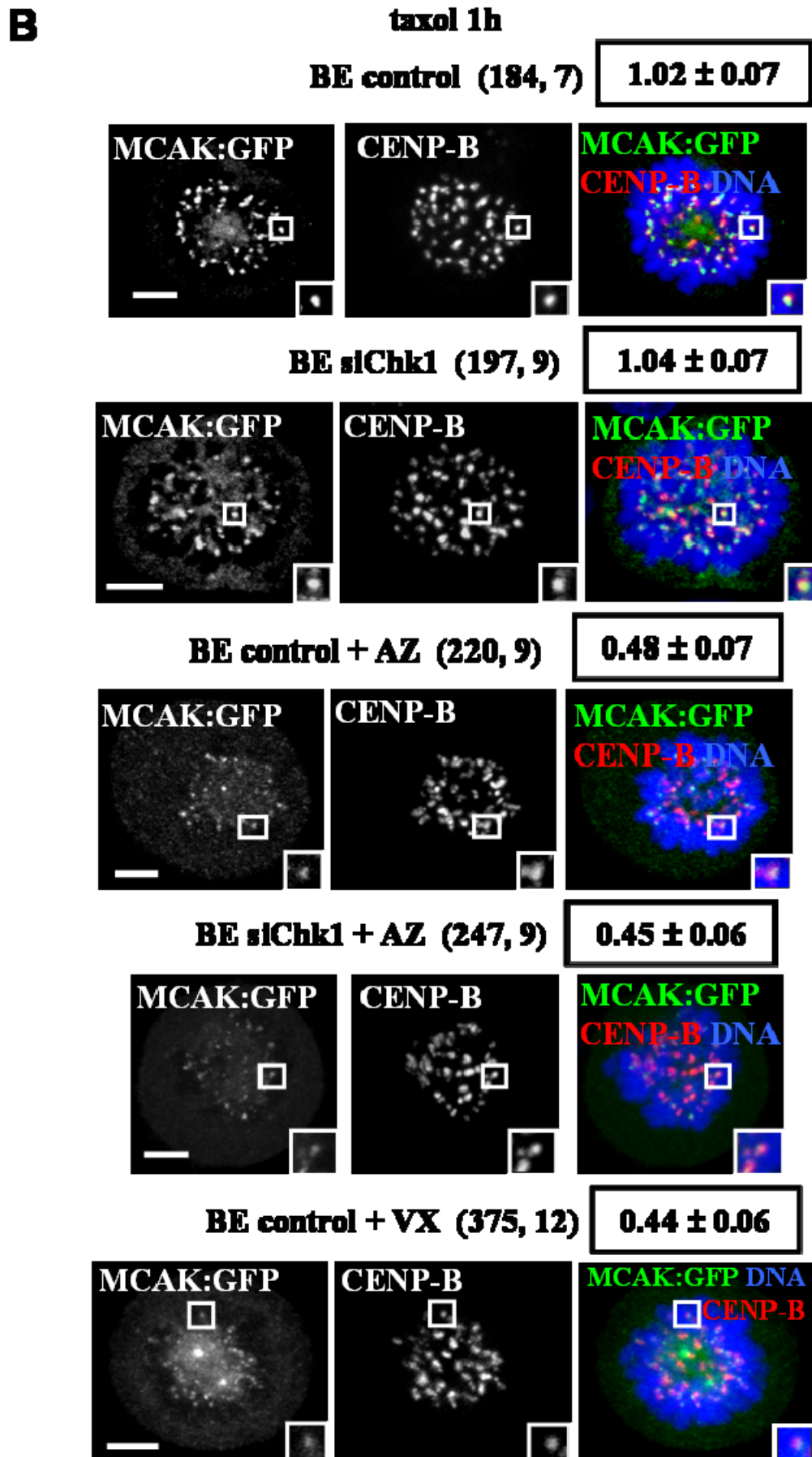
8. Αποτελέσματα: Ρόλος της Mps1 και της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων

8.1 Η Mps1 είναι απαραίτητη για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της MCAK στα κεντρομερή

Προκειμένου να ερευνησουμε αν οι Chk1 και Mps1 είναι απαραίτητες για αρχική πρόσδεση ή διατήρηση της MCAK στα κεντρομερή, BE κύτταρα επώαστηκαν με ταξόλη, ένα φάρμακο που σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους για 1 ώρα ή 6 ώρες, μονιμοποιήθηκαν, βιάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν στην προμετάφαση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Ταυτόχρονα με την ταξόλη, τα κύτταρα επώαστηκαν με MG-132 ώστε να μην βγουν από τη μίτωση μετά τη μείωση της έκφρασης της Chk1 ή μετά από επώαση με AZ (Abrieu et al., 2001; Zachos et al., 2007). Μετά από επώαση με ταξόλη και MG-132 για 6 ώρες, ο εντοπισμός της MCAK:GFP στα κεντρομερή σε control κύτταρα μετά από επώαση με AZ μειώθηκε κατά 52% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$). Επίσης, μείωση της Chk1, συνδυασμός μείωσης της Chk1 με επώαση με AZ ή επώαση με VX-680 οδήγησε σε μείωση της MCAK:GFP στα κεντρομερή κατά 90-96% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνες 34A,36A).

Αντίθετα, μετά από επώαση με ταξόλη και MG-132 για 1 ώρα, τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 είχαν παρόμοια επίπεδα MCAK:GFP στα κεντρομερή σε σχέση με τα controls ($p = 0,48$), (Εικόνα 34B). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 έχουν δυνατότητα πρόσδεσης της MCAK:GFP μετά από 1 ώρα επώασης με ταξόλη αλλά δεν μπορούν να τη διατηρήσουν στα κεντρομερή. Επίσης, στα control+AZ κύτταρα, στα control+VX και στα siChk1+VX ο εντοπισμός της MCAK:GFP μειώθηκε κατά 53-57% σε σχέση με τα controls μετά από 1 ή 6 ώρες επώαση με ταξόλη και MG-132 ($p < 0,001$), (Εικόνα 34B,36A). Συμπερασματικά, η ενεργότητα της Mps1 είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη πρόσδεση της MCAK στα κεντρομερή παρουσία ταξόλης.



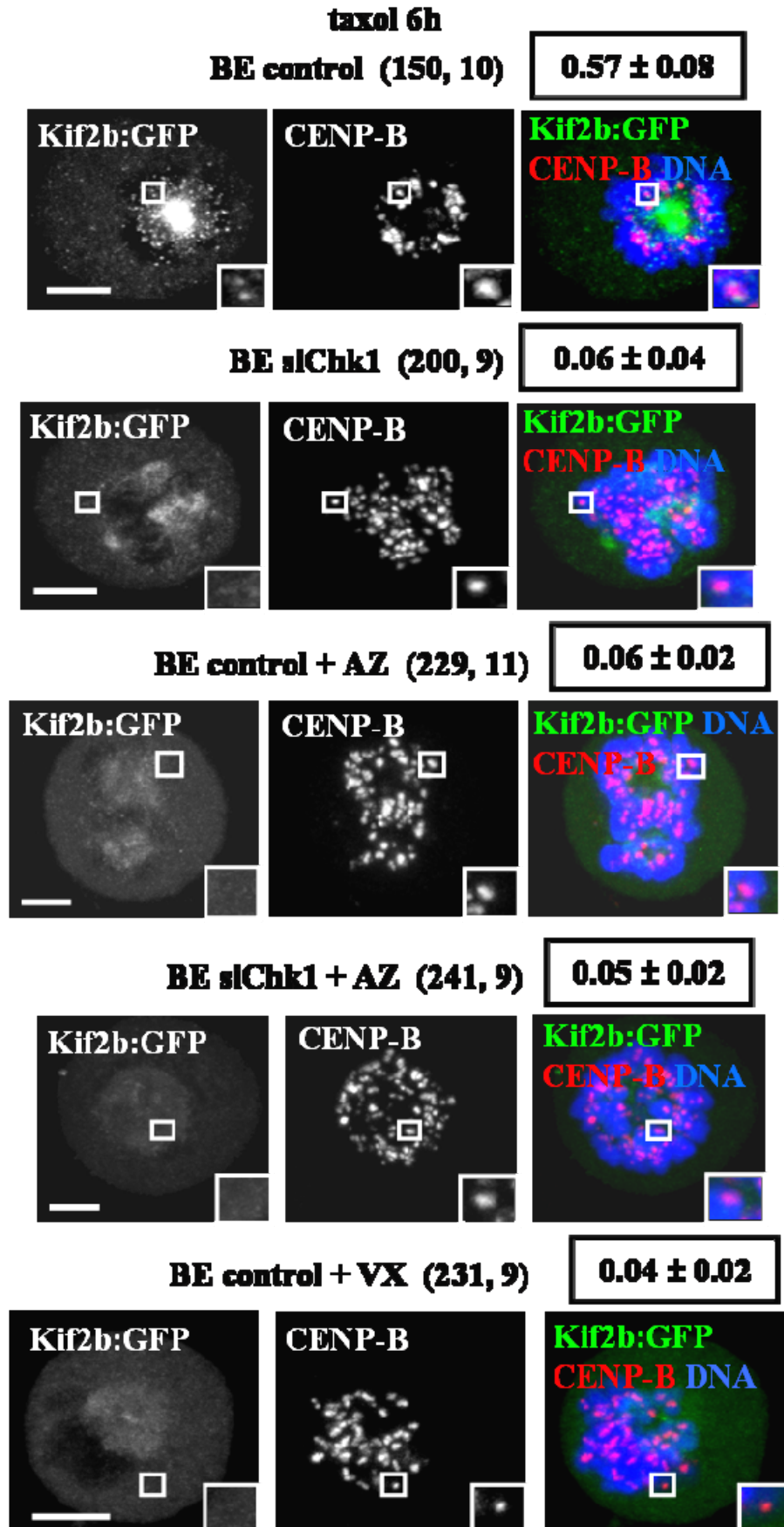


Εικόνα 34: Η ενεργότητα της Mps1 απαιτείται για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της MCAK:GFP στα κεντρομερή. Εντοπισμός της MCAK:GFP. Κύτταρα BE που εκφράζουν την MCAK:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με ταξόλη και MG132 για 6 ώρες (A) ή 1 ώρα (B) παρουσία ή απουσία AZ3146 (AZ) ή VX680 (VX). Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κεντρομερών που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένα κεντρομερή. Πράσινο: MCAK:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA Scale bars: 5 μ M.

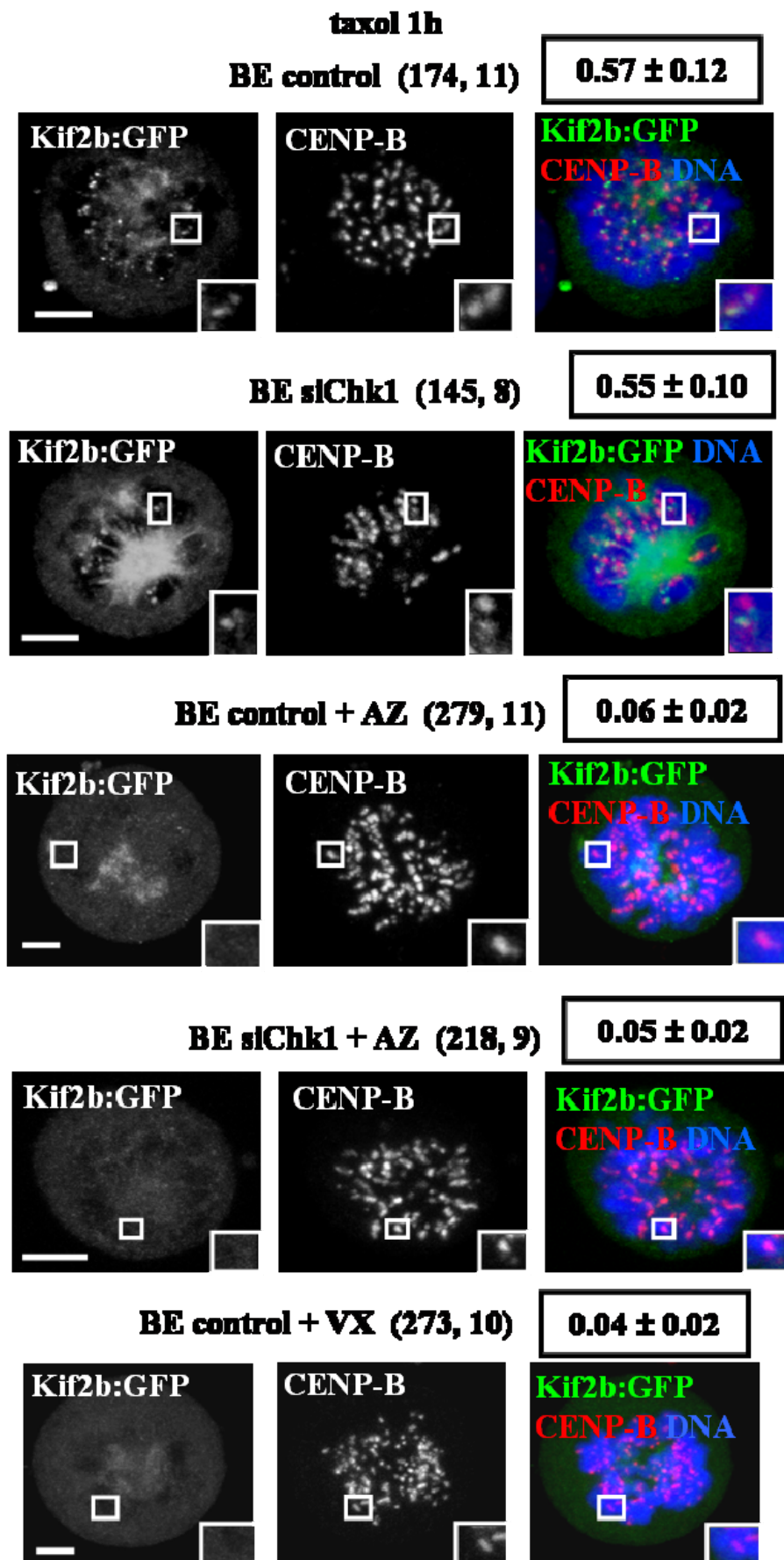
8.2 Η Mps1 είναι απαραίτητη για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της Kif2b στους κινητοχώρους

Προκειμένου να ερευνήσουμε αν οι Chk1 και Mps1 είναι απαραίτητες για αρχική πρόσδεση ή διατήρηση της Kif2b στους κινητοχώρους, BE κύτταρα επώαστηκαν με ταξόλη και MG-132 για 1 ώρα ή 6 ώρες, μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν στην προμετάφαση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Επώαση με ταξόλη και MG-132 για 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα μείωση του εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους σε κύτταρα με μειωμένη Chk1, σε control+AZ κύτταρα, σε control+VX και στα siChk1+AZ κατά 89-93% σε σχέση με τα control κύτταρα ($p < 0,001$), (Εικόνα 35A,36B). Ωστόσο, μετά από επώαση με ταξόλη και MG-132 για 1 ώρα τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 είχαν παρόμοια επίπεδα εντοπισμού της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους ($p = 0,71$), ενώ μετά από επώαση με AZ3146, VX680 ή συνδυασμός μείωσης της έκφρασης της Chk1 με επώαση με AZ οδήγησε σε μείωση της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους κατά 89-93% σε σχέση με τα control κύτταρα ($p < 0,001$), (Εικόνα 35B,36B). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της Kif2b στους κινητοχώρους, και όχι για την αρχική της πρόσδεση, παρουσία ταξόλης.

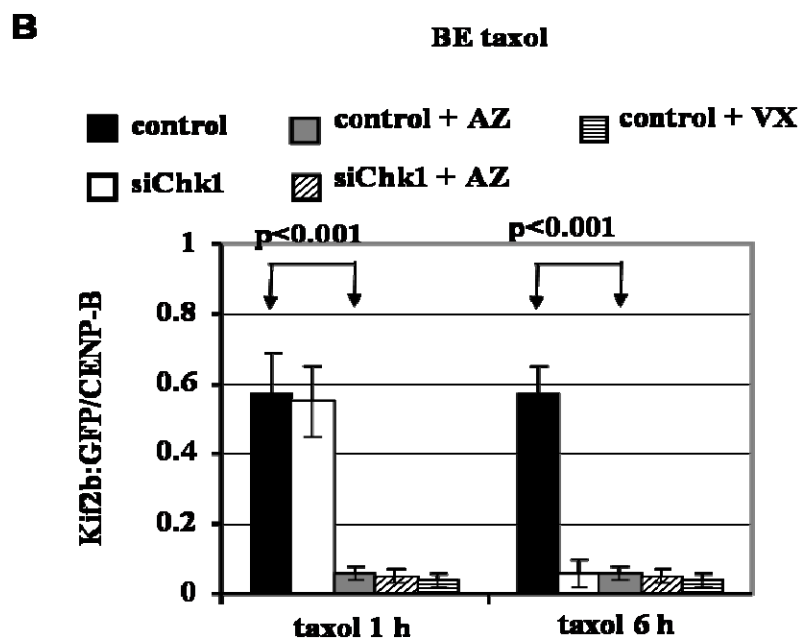
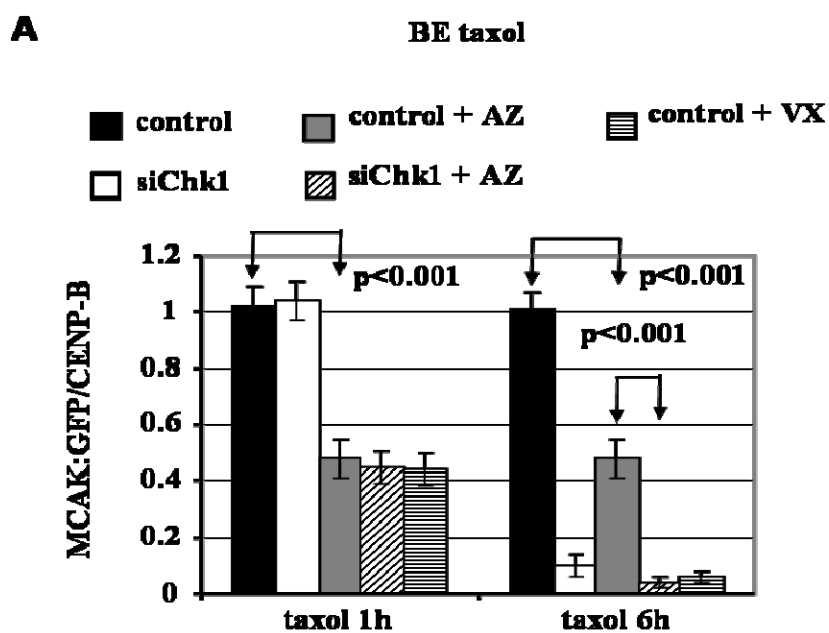
A



B



Εικόνα 35: (A) Η ενεργότητα της Mps1 απαιτείται για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της Kif2b:GFP στα κεντρομερή. (A) Εντοπισμός της Kif2b:GFP. Κύτταρα BE που εκφράζουν την Kif2b:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επωάστηκαν με ταξόλη και MG132 για 6 ώρες (A) ή 1 ώρα (B) παρουσία ή απουσία AZ3146 (AZ) ή VX680 (VX). Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινήτοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινήτοχώρους. Πράσινο: Kif2b:GFP, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA Scale bars: 5 μ M

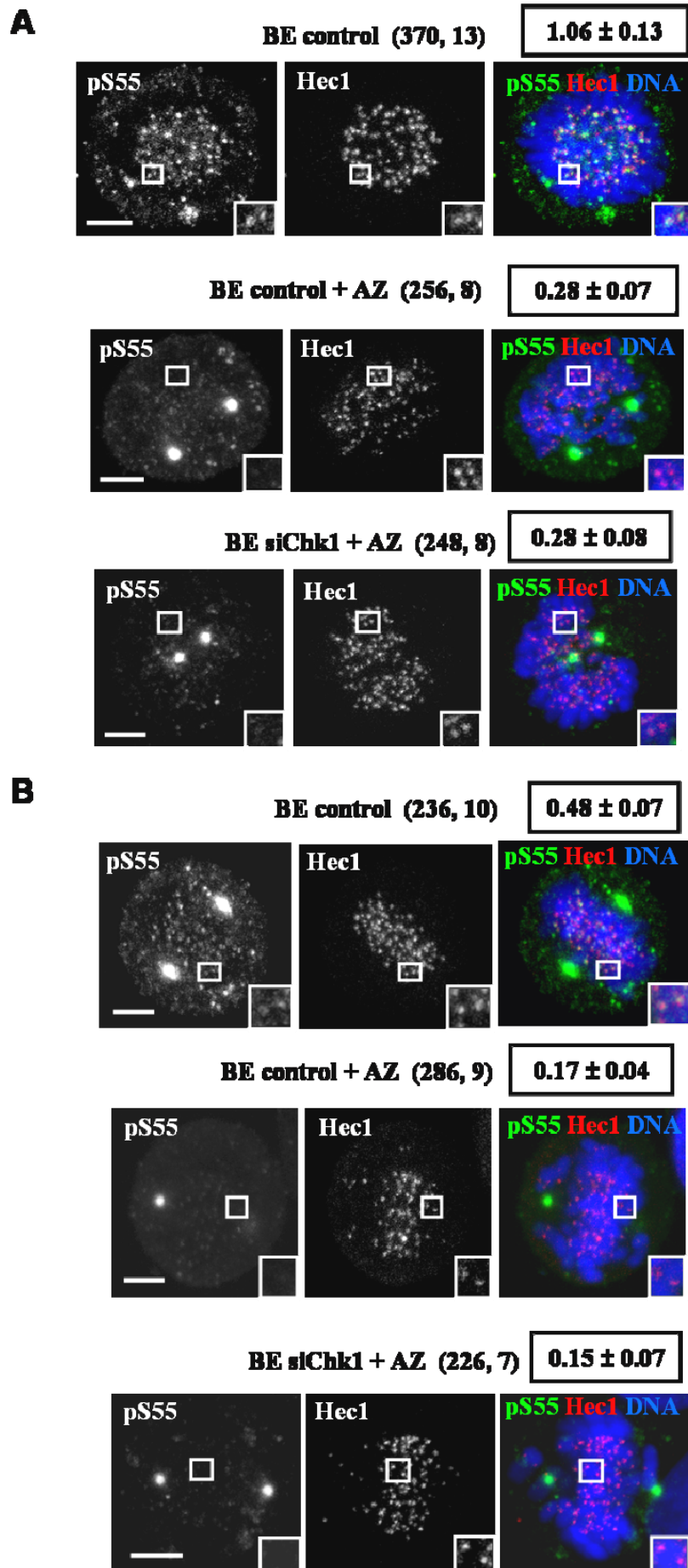


Εικόνα 36: Η ενεργότητα της Mps1 απαιτείται για την αρχική πρόσδεση και η Chk1 για τη διατήρηση της MCAK:GFP στα κεντρομερή και της Kif2b:GFP στους κινητοχώρους. (A, B) Κύτταρα BE που εκφράζουν την MCAK:GFP ή την Kif2b:GFP επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με ταξόλη και MG132 για 1 ώρα ή 6 ώρες παρουσία ή απουσία AZ3146 (AZ) ή VX680 (VX). Ένταση φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/CENP-B στα κεντρομερή (A) ή στους κινητοχώρους (B). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο \pm SD.

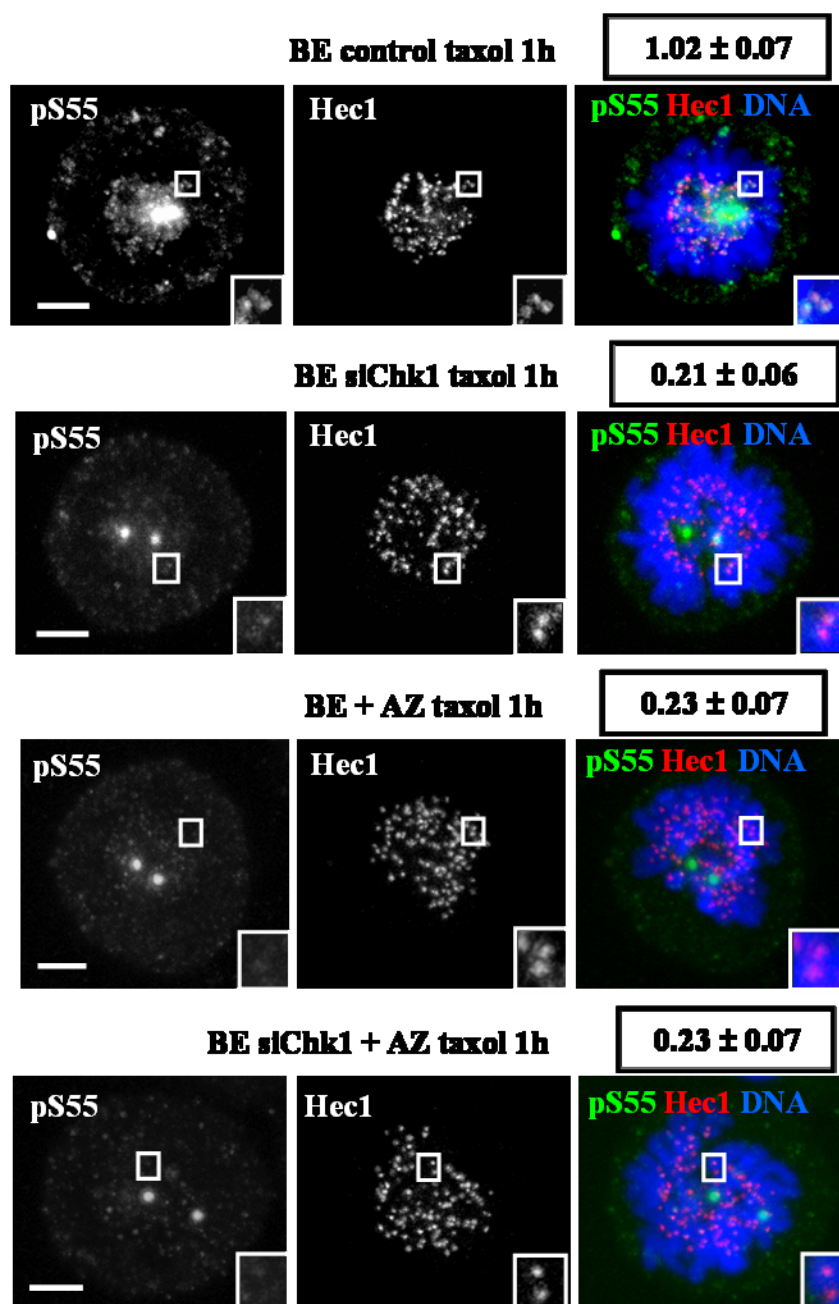
8.3 Η Mps1 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Mps1 στη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55, κύτταρα BE επώαστηκαν με AZ για 3 ώρες, μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκε η φωσφορυλίωση στη σερίνη 55 με ανοσοφθορισμό. Επώαση των BE κυττάρων με AZ ή συνδυασμός μείωσης της έκφρασης της Chk1 με επώαση με AZ, προκάλεσε μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 της Hec1 στους κινητοχώρους κατά 74% στην προμετάφαση και 65-69% στη μετάφαση σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 37).

Επιπλέον, μετά από επώαση με ταξόλη και MG-132 για 1 ώρα, παρατηρήθηκε μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 55 της Hec1 στα κύτταρα με μειωμένη Chk1, σε control+AZ ή σε siChk1+AZ κατά 78-81% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 38). Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ενεργότητα της Mps1 απαιτείται για τη βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μίτωσης ή παρουσία ταξόλης.



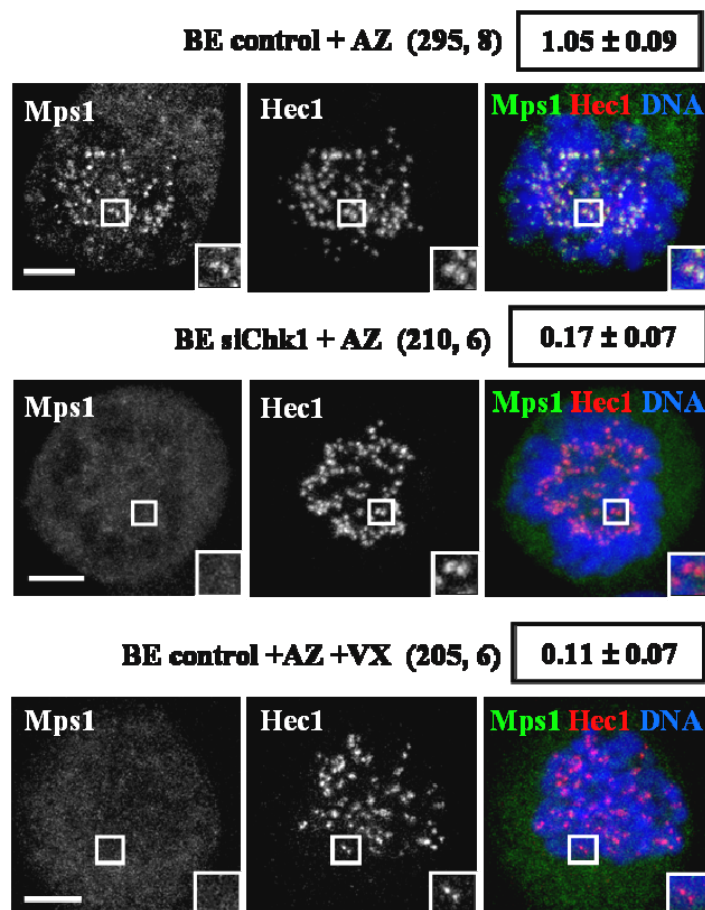
Εικόνα 37: (A, B) Αναστολή της Mps1 προκαλεί μείωση της pS55 της Hec1 στην προμετάφαση (A) και στη μετάφαση (B). (A, B) Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και έμειναν untreated ή επωάστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS55/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Πράσινο: pS55, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Scale bars: 5 μ M



Εικόνα 38: Αναστολή της Mps1 μειώνει τη φωσφορυλίωση της σερίνης 55 της Hec1. BE κύτταρα επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με ταξόλη για 1 ώρα παρουσία ή απουσία AZ και μελετήθηκαν στην προμετάφαση. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS55/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Πράσινο: pS55, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Scale bars: 5 μ M

8.4 Η Chk1 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους

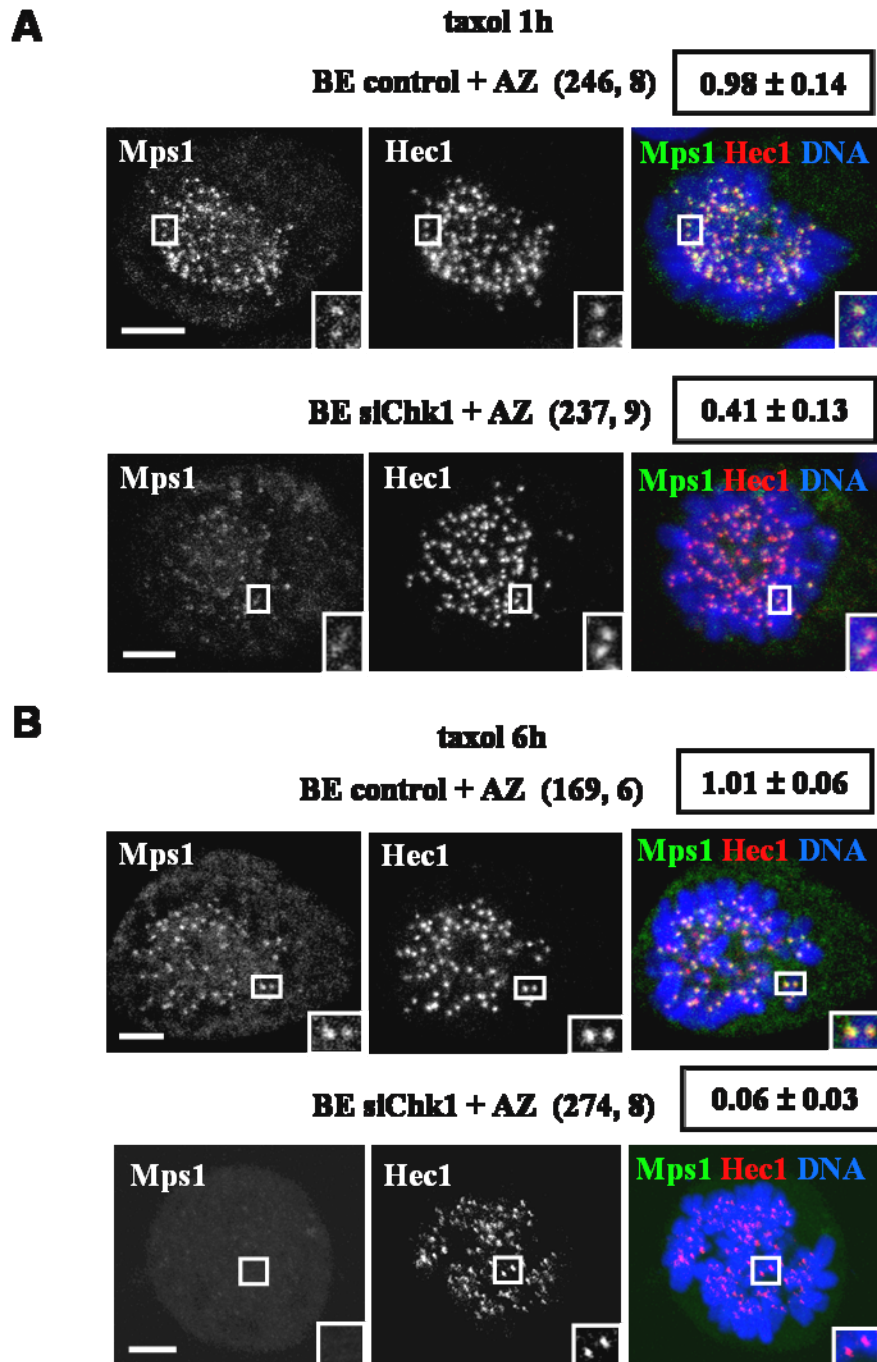
Αναστολή της Mps1 αυξάνει τον εντοπισμό της Mps1 στους κινητοχώρους (Hewitt et al., 2010). Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Chk1 στον εντοπισμό της Mps1, κύτταρα BE επώαστηκαν με AZ και αναλύθηκαν στην προμετάφαση με συνεστιακή μικροσκοπία. Μείωση της Chk1 οδήγησε σε μείωση της Mps1 στους κινητοχώρους κατά 84% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$). Επίσης, επώαση με VX-680 οδήγησε σε μείωση της Mps1 στους κινητοχώρους κατά 90% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 39). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για το βέλτιστο εντοπισμό της Mps1 στους κινητοχώρους απουσία φαρμάκων που δηλητηριάζουν τη μιτωτική άτρακτο.



Εικόνα 39: Η Chk1 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους (A) Εντοπισμός της Mps1. Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) ή VX680 (VX) για 3 ώρες. Πράσινο: Mps1, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο Mps1/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της Chk1 στη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους, επώασαμε κύτταρα BE με ταξόλη, AZ και MG-132 για 1 ώρα ή 6 ώρες και εξετάσαμε τον εντοπισμό της Mps1 στους κινητοχώρους με ανοσοφθορισμό. Μετά από επώαση με ταξόλη, MG132 και AZ για 1 ώρα, τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσίασαν μειωμένη Mps1 στους κινητοχώρους κατά 58% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 40A), το οποίο δείχνει ότι τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 έχουν τη δυνατότητα να προσδέσουν ασθενώς την Mps1.

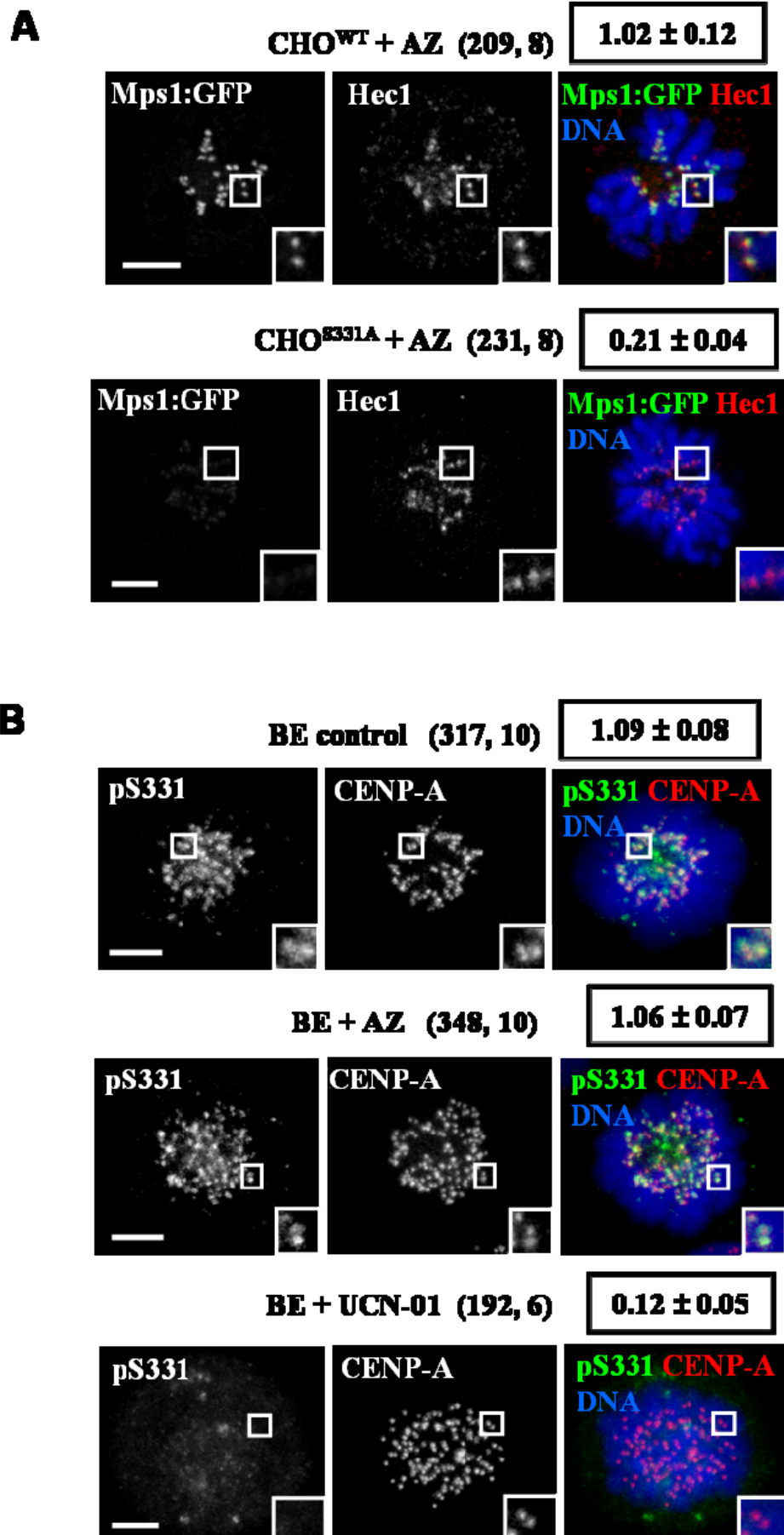
Αντίθετα, επώαση με ταξόλη, MG132 και AZ για 6 ώρες, προκάλεσε μείωση της Mps1 σε κύτταρα με μειωμένη Chk1 κατά 94% σε σχέση με τα controls ($p < 0,001$), (Εικόνα 40B). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους παρουσία ταξόλης.



Εικόνα 40: Η Chk1 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους
(A) Εντοπισμός της Mps1. Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με αρνητικό siRNA (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) και ταξόλη και MG132 για 1 ώρα (A) ή 6 ώρες (B). Πράσινο: Mps1, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο Mps1/Hec1. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Scale bars: 5 μ M.

8.5 Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 331 στη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα CHO^{WT} και CHO^{S331A} που εκφράζουν παροδικά Mps1:GFP. Μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη και επώαση με AZ, κύτταρα CHO^{S331A} που εκφράζουν παροδικά Mps1:GFP παρουσιάζουν μειωμένο εντοπισμό της Mps1:GFP στους κινητοχώρους κατά 79% σε σχέση με τα CHO^{WT} ($p < 0,001$), (Εικόνα 41A). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της Aurora-B στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για το βέλτιστο εντοπισμό της Mps1 στους κινητοχώρους. Αντίθετα, επώαση με AZ δεν άλλαξε σημαντικά τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 σε σχέση με τα controls ($p < 0,44$), (Εικόνα 41B).



Εικόνα 41: Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους. (A) Κύτταρα CHO^{WT} ή CHO^{S331A} μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη, που εκφράζουν την Mps1:GFP επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) για 3 ώρες. Πράσινο: Mps1:GFP, κόκκινο: Hec1, μπλε: DNA. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο GFP/Hec1. (B) Αναστολή της Mps1 δεν μειώνει τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 331. Κύτταρα BE επώαστηκαν με AZ3146 (AZ) ή UCN-01 για 3 ώρες. Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των κινητοχώρων που μετρήθηκαν και τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Τα ένθετα δείχνουν μεγεθυμένους κινητοχώρους. Οι τιμές μέσα στα κουτιά δείχνουν το μέσο όρο του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS331/CENP-A. Scale bars: 5 μM

9. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η Chk1 είναι μια καλά συντηρημένη κινάση η οποία ενεργοποιείται παρουσία βλαβών στο DNA (Patil et al., 2013). Πρόσφατα, δείξαμε ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 και αυτή η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του spindle checkpoint (Petsalaki et al., 2011; Zachos et al., 2007). Η Aurora-B παίζει ρόλο τόσο στη λειτουργία του spindle checkpoint παρουσία ταξόλης (Hauf et al., 2003b; Zachos et al., 2007) όσο και στην επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων (DeLuca et al., 2006). Πρόσφατα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η Aurora-B ίσως έχει ρόλο παρουσία πολλών μη προσδεδωμένων μικροσωληνίσκων ανεξάρτητα από την επιδιόρθωση των προσδέσεων (Santaguida et al., 2011). Ωστόσο, ο ρόλος της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως.

Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν. Επιπλέον, επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματά μας και σε καρκινικά Β-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο στα οποία έχει απαλειφθεί γενετικά η Chk1 (Chk1^{-/-}) και σε KD κύτταρα απαλλαγμένα από την καταλυτική ενεργότητα της Chk1. Συμπερασματικά, η καταλυτική ενεργότητα της Chk1 είναι απαραίτητη για μείωση του ποσοστού αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν σε κύτταρα σπονδυλωτών.

Στη συνέχεια, δείξαμε ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε κύτταρα σταματημένα στη μετάφαση ενώ αναστολή της Chk1 οδηγεί σε δημιουργία σταθερών προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους. Επίσης, δείξαμε ότι η ενεργότητα της Chk1 είναι απαραίτητη για το βέλτιστο εντοπισμό των κινεσινών MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους. Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι μείωση της Kif2b ή της MCAK στους κινητοχώρους οδηγεί σε σταθερότερους μικροσωληνίσκους (Bakhoum et al., 2009).

Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B στη σερίνη 331 και η φωσφορυλιωμένη Aurora-B εντοπίζεται στους κινητοχώρους μαζί με τη CENP-A και τη Hec1 σε κύτταρα στην προμετάφαση και τη μετάφαση. Ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού που προκύπτει από το λόγο pS331/Hec1, έδειξε ότι η

φωσφορυλίωση είναι υψηλή στην προμετάφαση και μειώνεται σημαντικά στη μετάφαση όπου έχουν πλέον δημιουργηθεί οι προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους.

Χρησιμοποιώντας κύτταρα CHO που εκφράζουν την αγρίου τύπου Aurora-B ή τη μεταλλαγμένη Aurora-B στη σερίνη 331 σε αλανίνη, δείξαμε ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 και η πλήρης ενεργοποίηση της Aurora-B βοηθά στην πρόληψη των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν. Επιπλέον δείξαμε ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για το βέλτιστο εντοπισμό των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους και τη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και σερίνη 44. Η Aurora-B συνεντοπίζεται με την MCAK στα κεντρομερή και τη φωσφορυλιώνει (Andrews et al., 2004). Σε αντιστοιχία με τα δικά μας αποτελέσματα, αναστολή της Aurora-B οδηγεί σε εντοπισμό της MCAK στο κυτταρόπλασμα και στη μιτωτική άτρακτο και όχι στα κεντρομερή με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δημιουργηθούν σωστές προσδέσεις (Andrews et al., 2004; Petsalaki and Zachos, 2013). Επίσης, μειωμένη ενεργότητα της Aurora-B οδηγεί σε αποκλεισμό της Kif2b από τους κινητοχώρους (Bakhoun et al., 2009).

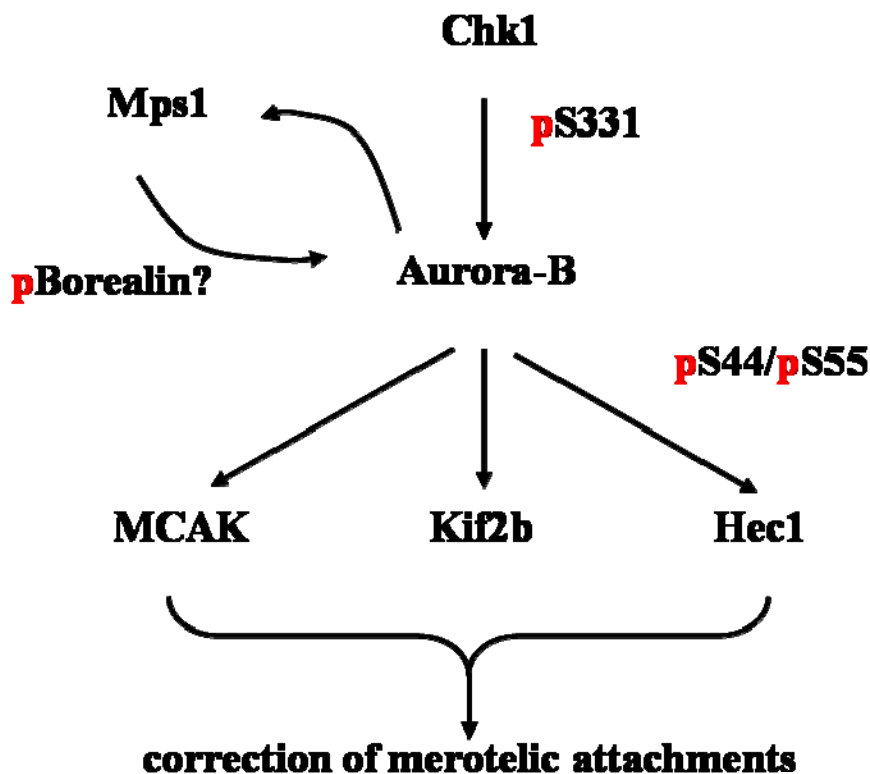
Επιπροσθέτως, δείχνουμε ότι αναστολή της Mps1 προκαλεί μεροτελικές προσδέσεις και χρωμοσώματα που καθυστερούν και παρουσιάζει αθροιστικό αποτέλεσμα με ταυτόχρονη μείωση της Chk1. Μέχρι τώρα, δεν ήταν γνωστός ο ρόλος της Mps1 στην πρόληψη των μεροτελικών προσδέσεων. Επίσης, αναστολή της Mps1 οδηγεί σε μειωμένο εντοπισμό των κινεσινών MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους και μείωση της φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55. Είναι γνωστό ότι η Mps1 φωσφορυλιώνει τη Borealin για να αυξήσει την ενεργότητα της Aurora-B (Jelluma et al., 2008; Sliedrecht et al., 2010) οπότε υπάρχει ένα ενδεχόμενο η δράση της Mps1 να οφείλεται στη φωσφορυλίωση της Borealin. Υπάρχουν όμως και άλλες περιπτώσεις όπου η Aurora-B ρυθμίζει τον εντοπισμό της Mps1 παρουσία μη προσδεδωμένων κινητοχώρων (Hewitt et al., 2010; Saurin et al., 2011), (Jelluma et al., 2008; Santaguida et al., 2010; van der Waal et al., 2012b). Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, αναστολή της Mps1 δεν προκάλεσε μείωση της φωσφορυλιωμένης σερίνης 331 στους κινητοχώρους.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ταξόλη, ένα φάρμακο που σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους, δείξαμε ότι η Mps1 είναι απαραίτητη για τον αρχικό εντοπισμό των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους ενώ η Chk1 για τη

σταθερή πρόσδεση κι όχι για τον αρχικό εντοπισμό τους σε κύτταρα στην προμετάφαση. Συγκεκριμένα, κύτταρα με μειωμένη Chk1 μετά από επώαση με ταξόλη για 1 ώρα εμφανίζουν εντοπισμένες MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους αντίστοιχα, παρά τα μειωμένα επίπεδα της Mps1. Πιθανώς, μια μικρή ποσότητα της Mps1 είναι αρκετή για να ρυθμίσει τον εντοπισμό των MCAK και Kif2b. Υπάρχει και το ενδεχόμενο η παρουσία της Mps1 στους κινητοχώρους να μην είναι απολύτως απαραίτητη αλλά να είναι απαραίτητη η κυτταροπλασματική Mps1 προκειμένου να επιτευχθεί ο σωστός εντοπισμός των MCAK και Kif2b (Maciejowski et al., 2010). Μετά από επώαση με ταξόλη για 6 ώρες και αναστολή της Mps1 παρατηρήθηκε μείωση του εντοπισμού της MCAK στα κεντρομερή ενώ ταυτόχρονη αναστολή των Mps1 και Chk1 μείωσε ακόμα περισσότερο τον εντοπισμό της MCAK στα κεντρομερή. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μίτωσης χωρίς φάρμακα, τα κύτταρα με μειωμένη Chk1 έχουν τη δυνατότητα να προσδέσουν μια μικρή ποσότητα των MCAK και Kif2b συνεπώς προτείνουμε ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης 331 και η πλήρης ενεργοποίηση της Aurora-B είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση των MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους.

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, προτείνουμε το παρακάτω μοντέλο επιδιόρθωσης των μεροτελικών προσδέσεων από τις Chk1 και Mps1 (Εικόνα 42). Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στη σερίνη 331 και αυτή η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για τη σταθερή πρόσδεση των κινεσινών MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και στους κινητοχώρους και τη βέλτιστη φωσφορυλίωση της Hec1 στη σερίνη 55 και σερίνη 44 με σκοπό την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων πριν την ανάφαση. Επίσης, η Chk1 προκαλεί τη σταθερή πρόσδεση της Mps1 στους κινητοχώρους μέσω φωσφορυλίωσης της Aurora B στη σερίνη 331. Η Mps1 με τη σειρά της απαιτείται για τον αρχικό εντοπισμό των κινεσινών MCAK και Kif2b στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους και τη φωσφορυλίωση της Hec1, ίσως μέσω της Borealin.

A



Εικόνα 42: Μοντέλο επιδιόρθωσης μεροτελικών προσδέσεων από την Mps1 και την Chk1. Το p υποδεικνύει φωσφορυλίωση.

Το μοντέλο μας δημιουργεί νέα ερωτήματα σχετικά με τη σημασία της φωσφορυλίωσης της Aurora-B στη σερίνη 331 ώστε να επιτευχθεί η επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων και τον πιθανό ρόλο των Mps1 και Chk1 στη θανάτωση καρκινικών κυττάρων με ταυτόχρονη χρήση φαρμάκων που δηλητηριάζουν τη μιτωτική άτρακτο.

Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι πως η Aurora-B αποσταθεροποιεί τις λανθασμένες προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους. Ένα από τα μοντέλα προτείνει ότι η Aurora-B φτάνει στον εξωτερικό κινητοχώρο, όπου πραγματοποιούνται οι προσδέσεις, μέσω διάχυσης κι έτσι φτάνει τα υποστρώματά της όταν οι αδελφοί κινητοχώροι βρίσκονται υπό χαμηλή τάση (Cheeseman et al., 2002; Liu et al., 2009; Pinsky et al., 2006; Wang et al., 2011). Η φωσφορυλιωμένη Aurora-B εντοπίζεται αποκλειστικά στους κινητοχώρους κι όχι στο κεντρομερές

συνεπώς μπορεί να αποτελεί μια λεπτή ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικροσωληνίσκων και κινητοχώρων, σε συμφωνία με άλλες μελέτες οι οποίες έδειξαν πρόσφατα ότι μια μικρή ποσότητα της Aurora-B εντοπίζεται στους κινητοχώρους (Andrews et al., 2004; DeLuca et al., 2011; Liu et al., 2009). Επίσης, έχουμε δει ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 μειώνεται από την προμετάφαση στη μετάφαση και αυτή η μείωση μπορεί να διευκολύνει τη δημιουργία αμφιτελικών προσδέσεων μειώνοντας τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της Aurora-B στον εξωτερικό κινητοχώρο όπως η σερίνη 55 της Hec1. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη σερίνη 55 της Hec1, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 της Aurora-B δεν εξαφανίζεται τελείως στη μετάφαση κι αυτό μπορεί να επιτρέπει την επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων ακόμα και αργά στη μίτωση για παράδειγμα μειώνοντας την ανασταλτική φωσφορυλίωση της MCAK στη σερίνη 196 (Andrews et al., 2004; DeLuca et al., 2011; Lan et al., 2004).

Πολλές κινάσες συμπεριλαμβανομένων των Chk1, Aurora-B και Mps1 απαιτούνται για επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων και σωστή λειτουργία του spindle checkpoint (Abrieu et al., 2001; Ditchfield et al., 2003a; Hauf et al., 2003b; Santaguida et al., 2011; Zachos et al., 2007). Μέχρι τώρα όμως ο ρόλος της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων δεν ήταν γνωστός. Αναστολείς της Chk1, αναπτύσσονται και δοκιμάζονται μόνοι τους ή σε συνδυασμό με άλλους αναστολείς σε κλινικές δοκιμές προκειμένου να ευαισθητοποιήσουν τα καρκινικά κύτταρα στην αντικαρκινική θεραπεία (Patil et al., 2013). Οι αναστολείς της Chk1 μπορούν να στοχεύσουν στις λειτουργίες της Chk1 κατά τη διάρκεια της μίτωσης είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με αντιμιτωτικά φάρμακα προκειμένου να επάγουν λάθη στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στα καρκινικά κύτταρα και θανάτωση αυτών (Kops et al., 2005). Η παρούσα μελέτη δείχνει νέες λειτουργίες της Chk1 και της Mps1 στην επιδιόρθωση των λαθών, οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν πολύ σημαντικά αποτελέσματα στη θεραπεία του καρκίνου.

10. Βιβλιογραφία

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W. and Labbe, J. C.** (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**, 83-93.
- 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.
- Ahn, J. Y., Schwarz, J. K., Piwnica-Worms, H. and Canman, C. E.** (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* **60**, 5934-6.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J. R.** (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* **6**, 253-68.
- Baker, D. J., Jin, F., Jeganathan, K. B. and van Deursen, J. M.** (2009). Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell* **16**, 475-86.
- Bakhom, S. F., Thompson, S. L., Manning, A. L. and Compton, D. A.** (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* **11**, 27-35.
- Bartek, J. and Lukas, J.** (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**, 421-9.
- Bishop, J. D. and Schumacher, J. M.** (2002). Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem* **277**, 27577-80.
- Blasius, M., Forment, J. V., Thakkar, N., Wagner, S. A., Choudhary, C. and Jackson, S. P.** (2011). A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol* **12**, R78.
- Bolton, M. A., Lan, W., Powers, S. E., McClelland, M. L., Kuang, J. and Stukenberg, P. T.** (2002). Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* **13**, 3064-77.
- Brown, E. J. and Baltimore, D.** (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**, 397-402.
- Brown, E. J. and Baltimore, D.** (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**, 615-28.
- Capasso, H., Palermo, C., Wan, S., Rao, H., John, U. P., O'Connell, M. J. and Walworth, N. C.** (2002). Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J Cell Sci* **115**, 4555-64.
- Chan, Y. W., Jeyaprakash, A. A., Nigg, E. A. and Santamaria, A.** (2012). Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol* **196**, 563-71.
- Cheeseman, I. M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E. M., Kang, J., Yates, J. R., 3rd, Chan, C. S., Drubin, D. G. and Barnes, G.** (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* **111**, 163-72.

- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. and Desai, A.** (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**, 983-97.
- Chen, Y. and Poon, R. Y.** (2008). The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Front Biosci* **13**, 5016-29.
- Chen, Y. and Sanchez, Y.** (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1025-32.
- Cho, S. H., Toouli, C. D., Fujii, G. H., Crain, C. and Parry, D.** (2005). Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* **4**, 131-9.
- Cimini, D.** (2007). Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle* **6**, 1558-64.
- Cimini, D.** (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 32-40.
- Cimini, D., Cameron, L. A. and Salmon, E. D.** (2004). Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr Biol* **14**, 2149-55.
- Cimini, D., Fioravanti, D., Salmon, E. D. and Degrossi, F.** (2002). Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. *J Cell Sci* **115**, 507-15.
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrossi, F. and Salmon, E. D.** (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* **153**, 517-27.
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J. C. and Salmon, E. D.** (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci* **116**, 4213-25.
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C. B. and Salmon, E. D.** (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol* **16**, 1711-8.
- Codegoni, A. M., Bertoni, F., Colella, G., Caspani, G., Grassi, L., D'Incalci, M. and Broggin, M.** (1999). Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. *Oncol Res* **11**, 297-301.
- Conti, C., Seiler, J. A. and Pommier, Y.** (2007). The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses. *Cell Cycle* **6**, 2760-7.
- De Wulf, P., McAinsh, A. D. and Sorger, P. K.** (2003). Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev* **17**, 2902-21.
- DeLuca, J. G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J. M., Salmon, E. D. and McEwen, B. F.** (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol Cell* **16**, 519-31.
- DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. and Salmon, E. D.** (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-82.

DeLuca, K. F., Lens, S. M. and DeLuca, J. G. (2011). Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J Cell Sci* **124**, 622-34.

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J. and Walczak, C. E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* **96**, 69-78.

Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S. S. (2003a). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**, 267-280.

Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S. S. (2003b). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**, 267-80.

Donzelli, M. and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671-7.

Emanuele, M. J., Lan, W., Jwa, M., Miller, S. A., Chan, C. S. and Stukenberg, P. T. (2008). Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J Cell Biol* **181**, 241-54.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J. and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-7.

Fisk, H. A., Mattison, C. P. and Winey, M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14875-80.

Fisk, H. A. and Winey, M. (2004). Spindle regulation: Mps1 flies into new areas. *Curr Biol* **14**, R1058-60.

Fogarty, P., Kalpin, R. F. and Sullivan, W. (1994). The Drosophila maternal-effect mutation grapes causes a metaphase arrest at nuclear cycle 13. *Development* **120**, 2131-42.

Fuller, B. G., Lampson, M. A., Foley, E. A., Rosasco-Nitcher, S., Le, K. V., Tobelmann, P., Brautigan, D. L., Stukenberg, P. T. and Kapoor, T. M. (2008). Midzone activation of Aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* **453**, 1132-1136.

Furnari, B., Rhind, N. and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277**, 1495-7.

Ganem, N. J., Godinho, S. A. and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**, 278-82.

Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L. and Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**, 179-91.

Gewurz, B. E. and Harper, J. W. (2006). DNA-damage control: Claspin destruction turns off the checkpoint. *Curr Biol* **16**, R932-4.

Gonzalez, S., Prives, C. and Cordon-Cardo, C. (2003). p73alpha regulation by Chk1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **23**, 8161-71.

Gorbsky, G. J. and Ricketts, W. A. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J Cell Biol* **122**, 1311-21.

Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E. A. and Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* **8**, 180-7.

Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolic-Norrelykke, I. M. and Cimini, D. (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol* **21**, 374-81.

Harper, J. W. and Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-45.

Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L. and Peters, J. M. (2003a). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**, 281-94.

Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L. and Peters, J. M. (2003b). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **161**, 281-294.

Hertzner, K. M., Ems-McClung, S. C. and Walczak, C. E. (2003). Kin I kinesins: insights into the mechanism of depolymerization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**, 453-69.

Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A. M., Jones, C. D., Musacchio, A., Green, S. and Taylor, S. S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* **190**, 25-34.

Honda, R., Korner, R. and Nigg, E. A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 3325-41.

Hong, J., Hu, K., Yuan, Y., Sang, Y., Bu, Q., Chen, G., Yang, L., Li, B., Huang, P., Chen, D. et al. (2012). CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* **122**, 2165-75.

Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J. B., Liu, S. T., Kao, G. D., Muschel, R., Chan, G. K. and Yen, T. J. (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol* **177**, 413-24.

Hunter, A. W., Caplow, M., Coy, D. L., Hancock, W. O., Diez, S., Wordeman, L. and Howard, J. (2003). The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol Cell* **11**, 445-57.

Jallepalli, P. V., Lengauer, C., Vogelstein, B. and Bunz, F. (2003). The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 20475-9.

Janssen, A., van der Burg, M., Szuhai, K., Kops, G. J. and Medema, R. H. (2011). Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* **333**, 1895-8.

Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J., Crujisen, C. W., van Osch, M. H., Lens, S. M., Medema, R. H. and Kops, G. J. (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* **132**, 233-246.

- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V. and Glotzer, M.** (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol* **10**, 1172-81.
- Kawashima, S. A., Tsukahara, T., Langeegger, M., Hauf, S., Kitajima, T. S. and Watanabe, Y.** (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev* **21**, 420-35.
- Kelly, A. E. and Funabiki, H.** (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 51-8.
- Kelly, A. E., Ghenoiu, C., Xue, J. Z., Zierhut, C., Kimura, H. and Funabiki, H.** (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* **330**, 235-239.
- Kline-Smith, S. L., Khodjakov, A., Hergert, P. and Walczak, C. E.** (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell* **15**, 1146-59.
- Kline-Smith, S. L., Sandall, S. and Desai, A.** (2005). Kinetochore-spindle microtubule interactions during mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 35-46.
- Kline, S. L., Cheeseman, I. M., Hori, T., Fukagawa, T. and Desai, A.** (2006). The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* **173**, 9-17.
- Knowlton, A. L., Lan, W. and Stukenberg, P. T.** (2006). Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr Biol* **16**, 1705-10.
- Kops, G. J., Weaver, B. A. and Cleveland, D. W.** (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773-85.
- Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Bartek, J. and Lukas, J.** (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* **6**, 884-91.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G.** (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **6**, 839-49.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K. H., Wang, S. X. and Dunphy, W. G.** (1998). The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J Cell Biol* **142**, 1559-69.
- Kwiatkowski, N., Jelluma, N., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Manak, M. S., Kwon, M., Choi, H. G., Sim, T., Deveraux, Q. L., Rottmann, S. et al.** (2010). Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nat Chem Biol* **6**, 359-68.
- Lampson, M. A. and Cheeseman, I. M.** (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol* **21**, 133-40.
- Lampson, M. A. and Kapoor, T. M.** (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol* **7**, 93-8.
- Lampson, M. A., Renduchitala, K., Khodjakov, A. and Kapoor, T. M.** (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* **6**, 232-7.
- Lan, W. and Cleveland, D. W.** (2010). A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *J Cell Biol* **190**, 21-4.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E. and Stukenberg, P. T.** (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* **14**, 273-86.

- Lavin, M. F. and Shiloh, Y.** (1997). The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* **15**, 177-202.
- Lee, J., Kumagai, A. and Dunphy, W. G.** (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell* **12**, 551-63.
- Lens, S. M., Wolthuis, R. M., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. and Medema, R. H.** (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J* **22**, 2934-47.
- Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J., Lampson, M. A. and Lens, S. M.** (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**, 1350-1353.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A. et al.** (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1448-59.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S. and Foiani, M.** (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**, 557-61.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. and Russell, P.** (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172-5.
- Maciejowski, J., George, K. A., Terret, M. E., Zhang, C., Shokat, K. M. and Jallepalli, P. V.** (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* **190**, 89-100.
- Madoz-Gurpide, J., Canamero, M., Sanchez, L., Solano, J., Alfonso, P. and Casal, J. I.** (2007). A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* **6**, 2150-64.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J.** (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-9.
- Maney, T., Hunter, A. W., Wagenbach, M. and Wordeman, L.** (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol* **142**, 787-801.
- Maney, T., Wagenbach, M. and Wordeman, L.** (2001). Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* **276**, 34753-8.
- Manning, A. L., Bakhoun, S. F., Maffini, S., Correia-Melo, C., Maiato, H. and Compton, D. A.** (2010). CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity. *EMBO J* **29**, 3531-43.
- Manning, A. L., Ganem, N. J., Bakhoun, S. F., Wagenbach, M., Wordeman, L. and Compton, D. A.** (2007). The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol Biol Cell* **18**, 2970-9.
- Matsuoka, S., Huang, M. and Elledge, S. J.** (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**, 1893-7.
- Maure, J. F., Kitamura, E. and Tanaka, T. U.** (2007). Mps1 kinase promotes sister-kinetochore bi-orientation by a tension-dependent mechanism. *Curr Biol* **17**, 2175-2182.

McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbsky, G. J. and Stukenberg, P. T. (2004). The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr Biol* **14**, 131-7.

Melixetian, M., Klein, D. K., Sorensen, C. S. and Helin, K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 1247-53.

Meraldi, P., Draviam, V. M. and Sorger, P. K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* **7**, 45-60.

Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-93.

Nekrasov, V. S., Smith, M. A., Peak-Chew, S. and Kilmartin, J. V. (2003). Interactions between centromere complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 4931-46.

Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M. P. and Nakanishi, M. (2007). Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* **27**, 2572-81.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C. V., Biggins, S. and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* **125**, 85-98.

O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M. and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* **16**, 545-54.

O'Connell, M. J., Walworth, N. C. and Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* **10**, 296-303.

Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y. and Yanagida, M. (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol* **6**, 1135-41.

Ou, Y. H., Chung, P. H., Sun, T. P. and Shieh, S. Y. (2005). p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol Biol Cell* **16**, 1684-95.

Ovechkina, Y. and Wordeman, L. (2003). Unconventional motoring: an overview of the Kin C and Kin I kinesins. *Traffic* **4**, 367-75.

Patil, M., Pabla, N. and Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci*.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501-5.

Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D. A., Jackson, D. A. and Caldecott, K. W. (2006). Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* **26**, 3319-26.

Petermann, E., Woodcock, M. and Helleday, T. (2010). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16090-5.

Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E. J., Gillespie, D. A. F. and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *Journal of Cell Biology* **195**, 449-466.

- Petsalaki, E. and Zachos, G.** (2013). Chk1 and Mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments. *J Cell Sci* **126**, 1235-46.
- Pinsky, B. A., Kung, C., Shokat, K. M. and Biggins, S.** (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* **8**, 78-83.
- Pouwels, J., Kukkonen, A. M., Lan, W., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Stukenberg, T. and Kallio, M. J.** (2007). Shugoshin 1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell Cycle* **6**, 1579-85.
- Rhind, N., Furnari, B. and Russell, P.** (1997). Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev* **11**, 504-11.
- Ricke, R. M., van Ree, J. H. and van Deursen, J. M.** (2008). Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet* **24**, 457-66.
- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. and Sluder, G.** (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* **130**, 941-8.
- Rieder, C. L. and Salmon, E. D.** (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* **8**, 310-8.
- Rieder, C. L., Schultz, A., Cole, R. and Sluder, G.** (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* **127**, 1301-10.
- Ruchaud, S., Carmena, M. and Earnshaw, W. C.** (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 798-812.
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A. and Funabiki, H.** (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**, 187-202.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H. and Elledge, S. J.** (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-501.
- Santaguida, S. and Musacchio, A.** (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* **28**, 2511-2531.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A. M., Taylor, S. S. and Musacchio, A.** (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* **190**, 73-87.
- Santaguida, S., Vernieri, C., Villa, F., Ciliberto, A. and Musacchio, A.** (2011). Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J* **30**, 1508-1519.
- Saurin, A. T., van der Waal, M. S., Medema, R. H., Lens, S. M. and Kops, G. J.** (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat Commun* **2**, 316.
- Schmidt, Jens C., Arthanari, H., Boeszoermyeni, A., Dashkevich, Natalia M., Wilson-Kubalek, Elizabeth M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, Ron A., Bathe, M. et al.** (2010). The Kinetochore-Bound Ska1 Complex Tracks Depolymerizing Microtubules and Binds to Curved Protofilaments. *Developmental Cell*.

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.

Sheltzer, J. M., Blank, H. M., Pfau, S. J., Tange, Y., George, B. M., Humpton, T. J., Brito, I. L., Hiraoka, Y., Niwa, O. and Amon, A. (2011). Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* **333**, 1026-30.

Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**, 289-300.

Shimuta, K., Nakajo, N., Uto, K., Hayano, Y., Okazaki, K. and Sagata, N. (2002). Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the *Xenopus* midblastula transition. *EMBO J* **21**, 3694-703.

Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Scholl, L. M. and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PloS One* **4**, e6564.

Sliedrecht, T., Zhang, C., Shokat, K. M. and Kops, G. J. (2010). Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PloS One* **5**, e10251.

Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A. (2010a). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* **108**, 73-112.

Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A. (2010b). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* **108**, 73-112.

Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B. B., Bartek, J. and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247-58.

Sriuranpong, V., Mutirangura, A., Gillespie, J. W., Patel, V., Amornphimoltham, P., Molinolo, A. A., Kerekhanjanarong, V., Supanakorn, S., Supiyaphun, P., Rangdaeng, S. et al. (2004). Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res* **10**, 4944-58.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M. H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S. and Gerlich, D. W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**, 473-84.

Stucke, V. M., Sillje, H. H., Arnaud, L. and Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J* **21**, 1723-1732.

Syljuasen, R. G., Sorensen, C. S., Hansen, L. T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J. and Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**, 3553-62.

Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K. and Nakanishi, M. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* **14**, 1439-47.

Tanaka, K. (2012). Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J. and Nasmyth, K.** (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**, 317-329.
- Tanenbaum, M. E., Macurek, L., van der Vaart, B., Galli, M., Akhmanova, A. and Medema, R. H.** (2011). A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol* **21**, 1356-65.
- Tang, J., Erikson, R. L. and Liu, X.** (2006). Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11964-9.
- Tapia-Alveal, C., Calonge, T. M. and O'Connell, M. J.** (2009). Regulation of chk1. *Cell Div* **4**, 8.
- Thompson, S. L. and Compton, D. A.** (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* **180**, 665-72.
- Thompson, S. L. and Compton, D. A.** (2011). Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17974-8.
- Tighe, A., Staples, O. and Taylor, S.** (2008). Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J Cell Biol* **181**, 893-901.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V. and Prives, C.** (2004). p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* **18**, 3041-54.
- Uto, K., Inoue, D., Shimuta, K., Nakajo, N. and Sagata, N.** (2004). Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J* **23**, 3386-96.
- Vagnarelli, P. and Earnshaw, W. C.** (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* **113**, 211-22.
- Vale, R. D. and Fletterick, R. J.** (1997). The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 745-77.
- van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C., van der Horst, A. and Lens, S. M.** (2012a). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp Cell Res* **318**, 1407-20.
- van der Waal, M. S., Saurin, A. T., Vromans, M. J., Vleugel, M., Wurzenberger, C., Gerlich, D. W., Medema, R. H., Kops, G. J. and Lens, S. M.** (2012b). Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO Rep* **13**, 847-54.
- Vazquez-Novelle, M. D. and Petronczki, M.** (2010). Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Curr Biol* **20**, 1402-7.
- Verlinden, L., Vanden Bempt, I., Eelen, G., Drijkoningen, M., Verlinden, I., Marchal, K., De Wolf-Peters, C., Christiaens, M. R., Michiels, L., Bouillon, R. et al.** (2007). The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res* **67**, 6574-81.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J. C., Castro, A. and Lorca, T.** (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* **15**, 4584-96.

- Walczak, C. E., Cai, S. and Khodjakov, A.** (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 91-102.
- Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A.** (1996). XKCM1: a Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* **84**, 37-47.
- Walworth, N., Davey, S. and Beach, D.** (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* **363**, 368-71.
- Wang, E., Ballister, E. R. and Lampson, M. A.** (2011). Aurora B dynamics at centromeres create a diffusion-based phosphorylation gradient. *J Cell Biol* **194**, 539-549.
- Weiss, E. and Winey, M.** (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol* **132**, 111-23.
- Wheatley, S. P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. and Earnshaw, W. C.** (2001). INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* **11**, 886-90.
- Wigge, P. A. and Kilmartin, J. V.** (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* **152**, 349-60.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P. and Byers, B.** (1991). MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol* **114**, 745-54.
- Wordeman, L. and Mitchison, T. J.** (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* **128**, 95-104.
- Xu, J., Li, Y., Wang, F., Wang, X., Cheng, B., Ye, F., Xie, X., Zhou, C. and Lu, W.** (2013). Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene* **32**, 976-87.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S. and Baltimore, D.** (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* **10**, 2411-22.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y. and Watanabe, Y.** (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* **330**, 239-243.
- Yao, H., Yang, Z. and Li, Y.** (2010). [Expression of checkpoint kinase 1 and polo-like kinase 1 and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of the stomach]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **35**, 1080-4.
- Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K., Takahashi, T., Izawa, I. and Inagaki, M.** (2004). Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem* **279**, 12997-3003.
- Zachos, G., Black, E. J., Walker, M., Scott, M. T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W. C. and Gillespie, D. A.** (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* **12**, 247-60.
- Zachos, G., Rainey, M. D. and Gillespie, D. A.** (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J* **22**, 713-23.
- Zachos, G., Rainey, M. D. and Gillespie, D. A.** (2005). Chk1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cells is linked to maintenance of viable replication structures. *Mol Cell Biol* **25**, 563-74.

Zhang, Y. and Hunter, T. (2013). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer*.

Zhao, H. and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**, 4129-39.

Zhao, H., Watkins, J. L. and Piwnica-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14795-800.

Ελένη Πετσαλάκη, 2013

11. Δημοσιεύσεις

Chk1 and Mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments

Eleni Petsalaki and George Zachos*

Department of Biology, University of Crete, Vassilika Vouton, Heraklion 70013, Greece

*Author for correspondence (gzachos@biology.uoc.gr)

Accepted 10 December 2012

Journal of Cell Science 126, 1235–1246

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.119677

Summary

If uncorrected, merotelic kinetochore attachments can induce mis-segregated chromosomes in anaphase. We show that checkpoint kinase 1 (Chk1) protects vertebrate cells against merotelic attachments and lagging chromosomes and is required for correction of merotelic attachments during a prolonged metaphase. Decreased Chk1 activity leads to hyper-stable kinetochore microtubules, unstable binding of MCAK, Kif2b and Mps1 to centromeres or kinetochores and reduced phosphorylation of Hec1 by Aurora-B. Phosphorylation of Aurora-B at serine 331 (Ser331) by Chk1 is high in prometaphase and decreases significantly in metaphase cells. We propose that Ser331 phosphorylation is required for optimal localization of MCAK, Kif2b and Mps1 to centromeres or kinetochores and for Hec1 phosphorylation. Furthermore, inhibition of Mps1 activity diminishes initial recruitment of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores, impairs Hec1 phosphorylation and exacerbates merotelic attachments in Chk1-deficient cells. We propose that Chk1 and Mps1 jointly regulate Aurora-B, MCAK, Kif2b and Hec1 to correct merotelic attachments. These results suggest a role for Chk1 and Mps1 in error correction.

Key words: Chk1, Aurora-B, Mps1, Merotelic, Mitosis

Introduction

Accurate chromosome segregation during mitosis requires that sister kinetochores attach to microtubules emanating from opposite spindle poles [bipolar attachment or bi-orientation (Cimini, 2008; Tanaka, 2013)]. Merotelic attachments in which a single kinetochore binds to microtubules coming from both poles occur spontaneously in early mitosis and are not detected by the mitotic spindle checkpoint, the mechanism that prevents anaphase onset until all sister kinetochores bi-orient (Cimini, 2008; Tanaka, 2013). If uncorrected before anaphase, merotelic attachments will lead to lagging chromosomes, typically consisting of a single sister chromatid, and can result in chromosome mis-segregation and aneuploidy (Cimini et al., 2001; Cimini et al., 2003).

The chromosomal passenger complex (CPC), comprising Aurora-B kinase, INCENP, Survivin and Borealin, plays a central role in correction of kinetochore mis-attachments (Tanaka, 2013; van der Waal et al., 2012a). Inhibition of Aurora-B activity increases the frequency of merotelic and syntelic attachments, in which sister kinetochores are bound to microtubules coming from the same spindle pole, and leads to hyper-stable kinetochore microtubules (kMTs; Hauf et al., 2003; Cimini et al., 2006; Knowlton et al., 2006). It has been proposed that Aurora-B promotes detachment of incorrectly attached microtubules by phosphorylating kinetochore substrates to promote turnover of kMTs; however, the molecular pathways involved are a matter of active investigation (Cheeseman et al., 2002; Cimini et al., 2006; Pinsky et al., 2006; Akiyoshi et al., 2010).

The microtubule-depolymerising kinesins MCAK and Kif2b destabilize kMTs to correct mis-attachments (Kline-Smith et al.,

2004; Manning et al., 2007; Bakhomou et al., 2009). MCAK localizes to several mitotic structures including spindle poles, centromeres in the absence of tension or kinetochores in the presence of tension (Andrews et al., 2004; Manning et al., 2007). MCAK promotes turnover of kMTs in metaphase cells and depletion of MCAK correlates with chromosome mis-segregation (Kline-Smith et al., 2004; Bakhomou et al., 2009). Furthermore, Aurora-B phosphorylates MCAK to recruit it to centromeres and inhibits its microtubule depolymerization activity (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004; Knowlton et al., 2006; Tanenbaum et al., 2011).

Kif2b localizes to spindle poles, microtubules and kinetochores where it regulates kMT dynamics during prometaphase and Aurora-B promotes localization of Kif2b to kinetochores by an undescribed mechanism (Manning et al., 2007; Bakhomou et al., 2009). However, in metaphase, Kif2b is replaced by the astrin, SKAP and Ska protein complexes at kinetochores to promote kMT stability and chromosome alignment (Manning et al., 2010; Schmidt et al., 2010; Chan et al., 2012).

Furthermore, Aurora-B phosphorylates the kinetochore protein Hec1 on several N-terminal residues including serine 55 (Ser55) and serine 44 (Ser44) to promote detachment of kMTs (DeLuca et al., 2006; DeLuca et al., 2011). Hec1 mediates kMT attachments and expression of non phosphorylatable Hec1 increases merotelic attachments and anaphase lagging chromosomes (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2006). In addition, mitotic Hec1 phosphorylation is high in prometaphase and decreases significantly in metaphase cells (DeLuca et al., 2011).

Checkpoint kinase 1 (Chk1) is a well established component in the DNA damage and DNA replication pathways (Smith et al.,

2010). Chk1 is also required for optimal chromosome segregation and for spindle checkpoint signalling during unperturbed mitosis or treatment of cells with taxol (Zachos et al., 2007; Peddibhotla et al., 2009). Chk1 phosphorylates Aurora-B at Ser331 to induce Aurora-B kinase activity; however, a role for Chk1 in error correction has not been previously reported (Petsalaki et al., 2011).

Mps1 kinase is required for mitotic arrest in the presence of unattached kinetochores, proper chromosome alignment and segregation (Abrieu et al., 2001; Stucke et al., 2002; Jelluma et al., 2008a; Hewitt et al., 2010; Santaguida et al., 2010). Recent studies have shown that Mps1 phosphorylates Borealin to enhance Aurora-B kinase activity (Jelluma et al., 2008b; Saurin et al., 2011); however, other studies did not detect changes in Aurora-B activity upon Mps1 inhibition. Instead, Aurora-B activity was required for optimal localization of Mps1 to kinetochores (Hewitt et al., 2010; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010). However, a role for Mps1 in preventing merotelic attachments has not been previously described.

In the present study, using human cells depleted of Chk1 by small interfering RNA (siRNA) and DT40 avian B-lymphoma cells in which Chk1 was genetically ablated by gene targeting (Zachos et al., 2003), we show that Chk1 protects against anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes and is required for correction of merotelic attachments in metaphase-delayed cells. Reduced Chk1 activity leads to hyperstable kMTs and Chk1 is required for stable binding of MCAK, Kif2b and Mps1 to centromeres or kinetochores and for mitotic

phosphorylation of Hec1 on Ser55 and Ser44. Furthermore, Aurora-B phosphorylated at Ser331 localizes at kinetochores and this phosphorylation is high in prometaphase and decreases significantly in metaphase cells. Using cells overexpressing wild-type or non-phosphorylatable Ser331 to alanine (S331A) mutant Aurora-B (Petsalaki et al., 2011), we propose that Ser331 phosphorylation is required for optimal MCAK, Kif2b and Mps1 localization to centromeres or kinetochores and for Hec1 phosphorylation. Furthermore, inhibition of Mps1 activity or Mps1 depletion diminish initial recruitment of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores, impair mitotic Hec1 phosphorylation and exacerbate merotelic attachments and lagging chromosomes in Chk1-deficient cells. On the basis of those findings, we propose that Chk1 and Mps1 jointly regulate Aurora-B, MCAK, Kif2b and Hec1 functions to promote correction of merotelic attachments.

Results

Chk1-deficient cells exhibit high levels of anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes

To investigate a role for Chk1 in preventing anaphases with merotelic attachments, human colon carcinoma BE cells transiently transfected with negative siRNA (control), Chk1 siRNA (siChk1) or treated with the selective Chk1 inhibitor UCN-01 were analyzed by confocal microscopy. Depletion of Chk1 or inhibition of Chk1 activity by UCN-01 increased the frequency of anaphases with merotelic attachments (13.3% and 13.4%, respectively) compared to controls (3.9%; Fig. 1A,B).

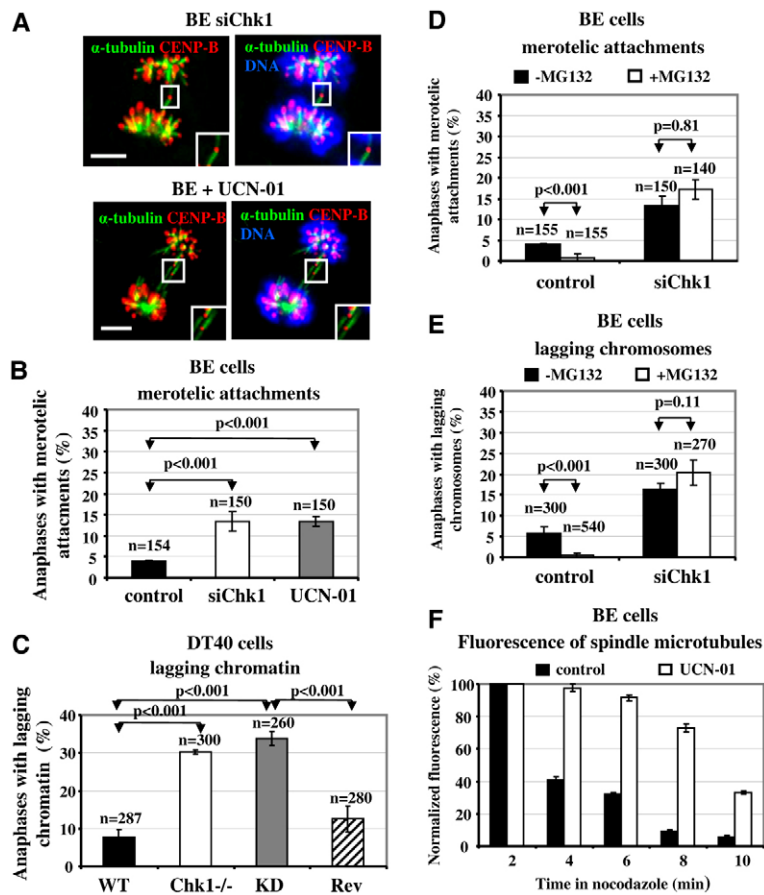


Fig. 1. Chk1 is required for correction of merotelic attachments in metaphase-delayed cells. (A,B) BE cells were transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) or were treated with UCN-01 for 3 hours. (A) Examples of anaphases. A single sister centromere is connected to microtubules from both spindle poles. Green, α -tubulin; red, CENP-B; blue, DNA. Insets show magnified centromeres. Scale bars: 5 μ m. (B) Frequencies of anaphases with merotelic attachments. A minimum of 50 anaphases were analyzed for each of three independent experiments. (C) Frequencies of anaphases with lagging chromatin in wild-type (WT), *Chk1*^{-/-}, kinase-dead (KD) or revertant (Rev) DT40 cells. A minimum of 80 anaphases were analyzed for each of three independent experiments. (D,E) Frequencies of anaphases with merotelic attachments (D) or lagging chromosomes (E) in BE cells transfected as in A and analyzed in anaphase in the absence of drug treatment (-MG132) or after recovery from a 3-hour MG132 treatment (+MG132). A minimum of 50 (D) or 90 (E) anaphases were analyzed for each of three independent experiments; *n*, total number of anaphases tested. (F) Inhibition of Chk1 reduces sensitivity of kMTs to nocodazole. BE cells were treated with MG132 for 3 hours in the absence (control) or presence of UCN-01 and exposed to high concentrations of nocodazole. Microtubule-associated fluorescence intensities were normalized to the 2-minute time point. A minimum of 10 mitotic cells were analyzed for each time point. Values are mean \pm s.d.

Furthermore, Chk1 depletion or treatment of cells with UCN-01 increased the frequency of anaphases with lagging chromosomes (15.1% and 14%, respectively) compared to controls (4.7%) and lagging chromosomes typically consisted of a single chromatid localized near the cell equator (supplementary material Fig. S1A,B).

To verify these observations in a different cell type, we used wild-type DT40 cells (WT), Chk1-deficient DT40 cells (*Chk1*^{-/-}), *Chk1*^{-/-} cells reconstituted with avian wild-type Chk1 protein (revertant cells, Rev), or *Chk1*^{-/-} cells reconstituted with mutant aspartic acid 130 to alanine (D130A) avian Chk1 protein (kinase-dead cells, KD; supplementary material Fig. S1C). *Chk1*^{-/-} or KD cells exhibited higher incidence of anaphases with lagging chromatin (30.3% and 33.8%, respectively) compared to WT (7.6%) or Rev (12.5%; Fig. 1C). Furthermore, 18/80 (22.5%) *Chk1*^{-/-} cells in anaphase exhibited merotelic attachments compared to 1/80 (1.3%) WT and 3/80 (3.8%) Rev (supplementary material Fig. S1D). Taken together, these results show that Chk1 activity prevents anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes in vertebrate cells.

Chk1 is required for correction of merotelic attachments in metaphase-arrested cells

Lagging chromosomes can be caused by inefficient correction of merotelic attachments before anaphase. To investigate a role for Chk1 in error correction, control or Chk1-deficient cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 for 3 hours to prolong metaphase (Cimini et al., 2003). At the end of this treatment, the drug was washed out and cells were released in fresh medium for the appropriate time to accomplish metaphase to anaphase transition, prior to fixation for analysis by confocal microscopy. In control BE cells, delayed anaphase onset by MG132 reduced the frequency of anaphases with merotelic attachments (0.6%) or lagging chromosomes (0.6%) compared to cells progressing into anaphase without MG132 delay (3.9% and 5.7%, respectively; Fig. 1D,E). In contrast, treatment of Chk1-depleted cells with MG132 did not reduce anaphases with merotelic attachments (17.2%) or lagging chromosomes (20.3%) compared to untreated (13.3% and 16.3%, respectively; Fig. 1D,E).

Furthermore, treatment of DT40 cells with MG132 reduced the frequency of anaphases with lagging chromatin in WT cells (1%) compared to untreated (6.7%), but not in *Chk1*^{-/-} cells compared to untreated (32.8% and 28.8%, respectively; supplementary material Fig. S1E). Collectively, these results suggest that Chk1 is required for correction of merotelic attachments before anaphase.

Inhibition of Chk1 leads to hyper-stable kinetochore microtubules

Hyper-stable kMTs associate with increased kinetochore mis-attachments (Cimini et al., 2006; Bakhom et al., 2009). Importantly, BE cells arrested in metaphase with MG132 and treated with UCN-01 exhibited delayed depolymerization of kMTs in the presence of high doses of nocodazole, indicating hyper-stable kMTs, compared to controls (Fig. 1F; supplementary material Fig. S2A). These results suggest that Chk1 kinase activity is required for optimal stability of kMTs.

Chk1 is required for localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores

MCAK and Kif2b destabilize kMTs. Confocal microscopy analysis of BE cells in prometaphase transiently expressing MCAK:GFP showed that depletion of Chk1 reduced MCAK:GFP staining at centromeres/kinetochores by ~78% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 2A). As a positive control, treatment of cells with the Aurora-B inhibitor VX680 (VX) reduced MCAK:GFP staining at centromeres/kinetochores by 91% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 2A). Also, in metaphase cells, depletion of Chk1 reduced MCAK:GFP staining at kinetochores by 86% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 2B).

Furthermore, BE cells in prometaphase transiently expressing Kif2b:GFP exhibited reduced localization of Kif2b:GFP to kinetochores after Chk1 depletion or VX680 treatment by, respectively, 81% and 94% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 2C). Significantly, MCAK:GFP or Kif2b:GFP levels per se were not affected by Chk1 depletion (Fig. 2D). Taken together, these results show that Chk1 is required for optimal localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores during unperturbed mitosis, i.e. in the absence of spindle poisons.

Chk1 is required for Hec1 Ser55 and Ser44 phosphorylation

Phosphorylation of Hec1 at Ser55 (pS55) and Ser44 (pS44) destabilises kinetochore-microtubule attachments. BE control cells in prometaphase exhibited phosphorylated Ser55 at kinetochores and this phosphorylation was reduced after Chk1 depletion or VX680 treatment by, respectively, 81% and 84% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 3A; supplementary material Fig. S2B). Furthermore, control cells in metaphase exhibited reduced phosphorylation of Ser55 at kinetochores by 55% compared to prometaphase controls ($P < 0.001$; Fig. 3B; supplementary material Fig. S2B). Significantly, depletion of Chk1 further reduced pS55 kinetochore staining in metaphase cells by 71% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 3B; supplementary material Fig. S2B). In addition, Chk1-depleted or VX680-treated cells in prometaphase exhibited reduced Hec1 Ser44 phosphorylation by, respectively, 86% and 89% compared to controls ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S2C). Of note, Ser55 and Ser44 phospho-antibodies cross-reacted with the spindle poles and this staining was non-specific (DeLuca et al., 2011). Taken together, these results show that Chk1 is required for optimal phosphorylation of Hec1 Ser55 and Ser44 in mitosis.

Phosphorylation of Aurora-B Ser331 at kinetochores is high in prometaphase and decreases in metaphase cells

Chk1 phosphorylates Aurora-B on Ser331. Phosphorylated Ser331 colocalized with CENP-A and Hec1 at kinetochores in prometaphase and metaphase cells (Fig. 3C; supplementary material Fig. S3A). Significantly, quantification of pS331/CENP-A and pS331/Hec1 kinetochore fluorescence intensities revealed a, respectively, 53% and 57% decrease in phospho-Ser331 kinetochore staining from prometaphase to metaphase cells ($P < 0.001$; Fig. 3C; supplementary material Fig. S3A). In comparison, depletion of Chk1 further diminished phospho-Ser331 kinetochore staining in metaphase cells by 94% compared to controls (Fig. 3C); however, it did not reduce total Aurora-B centromere staining ($P = 0.76$; supplementary material Fig. S3B). Please note that the Ser331 phospho-antibody cross-reacted with the spindle poles and this staining was non-specific (Petsalaki et al., 2011).

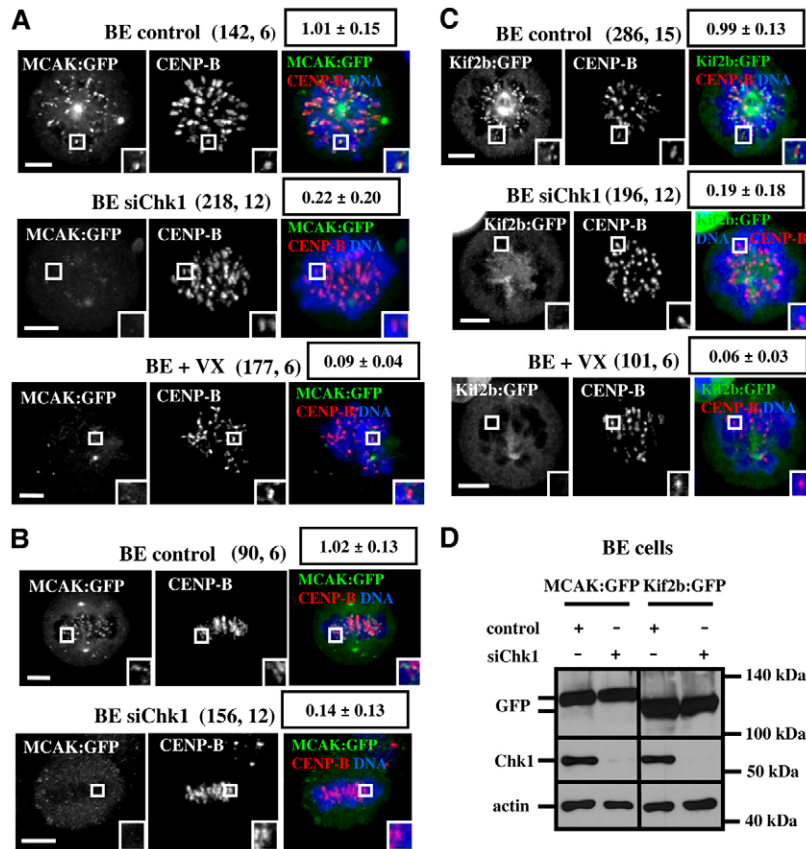


Fig. 2. Chk1 is required for localization of MCAK:GFP and Kif2b:GFP to centromeres or kinetochores.

(A,B) Localization of MCAK:GFP in prometaphase (A) and metaphase (B) cells. BE cells expressing MCAK:GFP were transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) or were treated with VX680 (VX) for 3 hours. Green, MCAK:GFP; red, CENP-B; blue, DNA. (C) Localization of Kif2b:GFP in prometaphase cells. BE cells expressing Kif2b:GFP were treated as in A. Green, Kif2b:GFP; red, CENP-B; blue, DNA. Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. (D) Western blot analysis of total GFP, Chk1 and actin in BE cells expressing MCAK:GFP or Kif2b:GFP and transfected as in A. Scale bars: 5 μ m.

Phosphorylation of Ser331 prevents merotelic attachments and lagging chromosomes in anaphase

To investigate a role for Ser331 phosphorylation in preventing merotelic attachments, CHO cells expressing 6 \times Myc-tagged wild-type or S331A Aurora-B under control of a Tetracycline-induced promoter were analyzed by confocal microscopy (Petsalaki et al., 2011). After induction with Tetracycline, 67/300 (22.3%) of CHO^{S331A} cells exhibited anaphases with merotelic kinetochore attachments compared to 3/300 (1%) of CHO^{WT} cells ($P < 0.001$; Fig. 3D). Furthermore, 109/300 (36.3%) of CHO^{S331A} cells exhibited anaphases with lagging chromosomes compared to 17/300 (5.7%) of CHO^{WT} cells ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S3C). Please note that CENP-B localizes to kinetochores in CHO cells (Cooke et al., 1990). These results suggest that phosphorylation of Aurora-B Ser331 prevents anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes.

Phosphorylation of Ser331 is required for localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores

To investigate the significance of Ser331 phosphorylation for MCAK and Kif2b localization, CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells transiently expressing MCAK:GFP or Kif2b:GFP were induced with Tetracycline and analysed by confocal microscopy. In prometaphase cells, expression of Aurora-B^{S331A} reduced localization of MCAK:GFP to centromeres or kinetochores by 72% compared to CHO^{WT} ($P < 0.001$; Fig. 4A). In comparison, treatment of CHO^{WT} cells with VX680 or UCN-01 reduced MCAK:GFP staining at centromeres/kinetochores by, respectively, 82% and 80% compared to controls ($P < 0.001$;

Fig. 4A; supplementary material Fig. S3D). Also, CHO^{S331A} cells in metaphase exhibited diminished localization of MCAK:GFP to kinetochores by 80% compared to CHO^{WT} ($P < 0.001$; Fig. 4B).

Furthermore, expression of Aurora-B^{S331A} or treatment of cells with VX680 reduced localization of Kif2b:GFP to kinetochores in prometaphase by, respectively, 84% and 92% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 4C). Taken together, these results suggest that Aurora-B Ser331 phosphorylation is required for optimal localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores.

Phosphorylation of Ser331 is required for Hec1 phosphorylation

Furthermore, after induction with Tetracycline, CHO^{S331A} cells in prometaphase exhibited reduced Hec1 Ser55 phosphorylation at kinetochores by 73% compared to CHO^{WT} ($P < 0.001$; Fig. 4D). In comparison, treatment of CHO^{WT} cells with VX680 or UCN-01 diminished phospho-Ser55 kinetochore staining by, respectively, 83% and 82% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 4D; supplementary material Fig. S4A,C).

In addition, CHO^{WT} cells in metaphase exhibited reduced phosphorylation of Ser55 at kinetochores by 56% compared to prometaphase CHO^{WT} ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S4B,C). Significantly, expression of Aurora-B^{S331A} further reduced phospho-Ser55 kinetochore staining in metaphase by 67% compared to CHO^{WT} ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S4B,C). Taken together, these results suggest that phosphorylation of Ser331 is required for optimal phosphorylation of Hec1 Ser55.

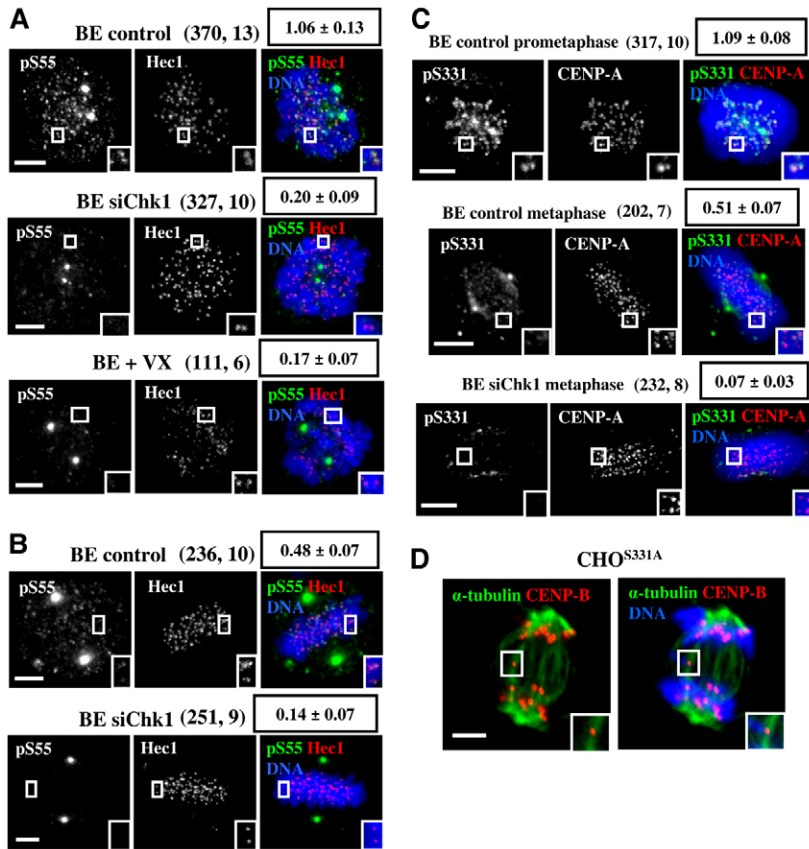


Fig. 3. Chk1 is required for optimal Hec1 Ser55 phosphorylation. (A,B) Phosphorylation of Hec1 Ser55 in prometaphase (A) or metaphase cells (B). BE cells were transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) or were treated with VX680 (VX) for 3 hours. Boxed values show mean pS55/Hec1 fluorescence intensity. Green, pS55; red, Hec1; blue, DNA. (C) Ser331 phosphorylation in BE cells transfected as in A. Boxed values show mean pS331/CENP-A fluorescence intensity. Green, pS331; red, CENP-A; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. (D) Example of an anaphase with merotelic kinetochore attachments in a CHO^{S331A} cell induced with Tetracycline. A single kinetochore is connected to microtubules from both spindle poles. Green, α -tubulin; red, CENP-B; blue, DNA. Insets show magnified kinetochores. Scale bars: 5 μ m.

Additive effects from inhibition of Mps1 and Chk1 depletion

Mps1 is required for chromosome segregation. Inhibition of Mps1 activity by AZ3146 (AZ) in BE cells transfected with negative siRNA (control + AZ) increased the frequency of anaphases with merotelic attachments (64.6%) and lagging chromosomes (70%) compared to controls (2.6% and 5.2%, respectively; Fig. 5A; supplementary material Fig. S4D–F). Importantly, combined Chk1 depletion with AZ3146 treatment (siChk1 + AZ) further increased anaphases with merotelic attachments (76.4%) and lagging chromosomes (83.8%) compared to control + AZ cells (Fig. 5A; supplementary material Fig. S4F). These results show that inhibition of Mps1 and Chk1 depletion exhibit an additive effect on anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes.

Inhibition of Mps1 impairs localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores

Treatment with AZ3146 or depletion of Mps1 by siRNA (siMps1; supplementary material Fig. S4G) reduced localization of MCAK:GFP to centromeres/kinetochores in prometaphase cells by 54% or 57%, respectively compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 5B; supplementary material Fig. S5A). Significantly, combined Chk1 depletion with AZ3146 or siMps1 treatment further diminished MCAK:GFP staining at centromeres/kinetochores by 88–89% compared to AZ3146 or siMps1 alone ($P < 0.001$; Fig. 5B; supplementary material Fig. S5A). Furthermore, cells treated with AZ3146 exhibited metaphases with misaligned chromosomes and MCAK:GFP staining at kinetochores was reduced by 61% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 5C). These results show that Chk1 and

Mps1 jointly regulate localization of MCAK to centromeres or kinetochores during unperturbed mitosis.

Furthermore, treatment of cells with AZ3146, siMps1 or combined Chk1 depletion with AZ3146 or siMps1 treatment reduced localization of Kif2b:GFP to kinetochores by 95–96% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 5D; supplementary material Fig. S5B). Importantly, MCAK:GFP or Kif2b:GFP levels per se were not affected by AZ3146 treatment in the absence or presence of Chk1 siRNA (Fig. 6A). Taken together, these results show that Mps1 activity is required for optimal localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores.

Mps1 activity is required for initial binding and Chk1 for maintenance of MCAK to centromeres

To investigate whether Chk1 and Mps1 are required for prolonged binding or initial recruitment of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores, cells were incubated with taxol, a spindle drug that stabilizes kinetochore–microtubule attachments and reduces tension at kinetochores (Schiff and Horwitz, 1980; Yang et al., 2009). MG132 was also added to the culture medium to prevent mitotic exit of cells after Chk1 depletion or AZ3146 treatment (Schmidt et al., 2005; Zachos et al., 2007).

After treatment with taxol and MG132 for 6 hours, localization of MCAK:GFP to centromeres in control + AZ cells was reduced by 52% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 6B,D). Furthermore, depletion of Chk1, combined Chk1 depletion with AZ3146 treatment, or combined transfection of negative siRNA with VX680 treatment (control + VX) reduced MCAK:GFP staining at centromeres by 90–96% compared to control cells ($P < 0.001$; Fig. 6B,D).

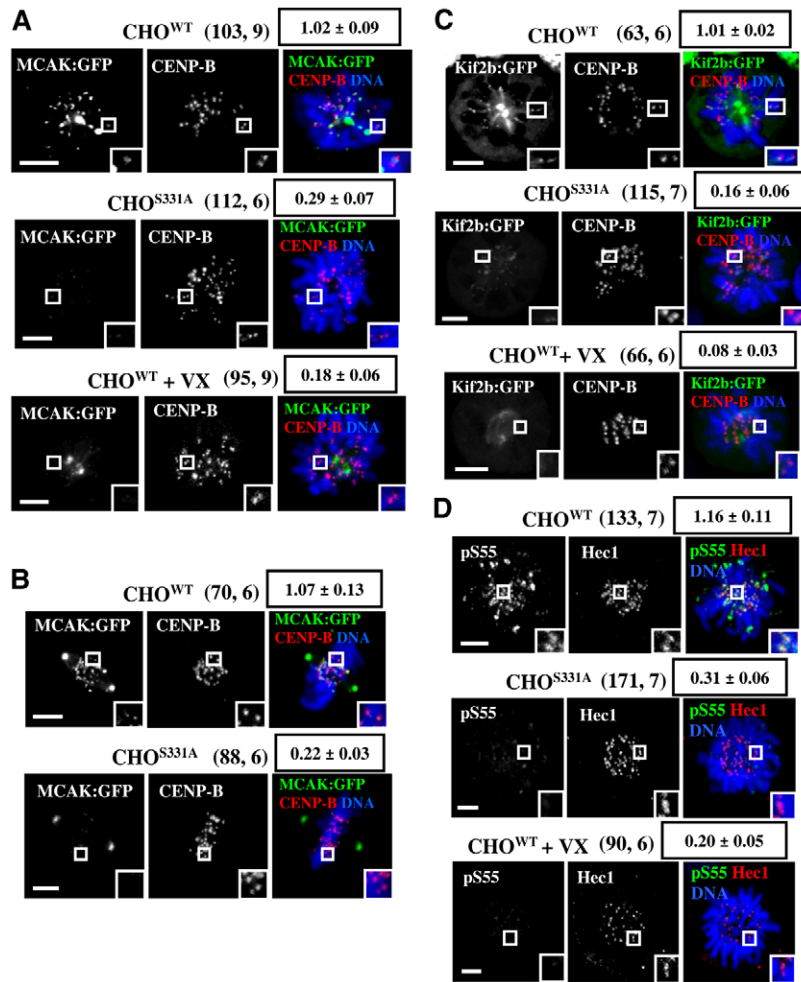


Fig. 4. Expression of S331A Aurora-B diminishes localization of MCAK:GFP and Kif2b:GFP to centromeres or kinetochores and reduces Hec1 Ser55 phosphorylation. (A,B) Localization of MCAK:GFP in prometaphase (A) or metaphase cells (B). Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells expressing MCAK:GFP were untreated or treated with VX680 (VX) for 3 hours. (C) Localization of Kif2b:GFP. Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells expressing Kif2b:GFP were as in A. Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green, GFP; red, CENP-B; blue, DNA. (D) Hec1 Ser55 phosphorylation. Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were as in A. Boxed values show mean pS55/Hec1 fluorescence intensity. Green, pS55; red, Hec1; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Scale bars: 5 μ m.

Surprisingly, after treatment with taxol and MG132 for 1 hour, Chk1-depleted and control cells exhibited similar levels of MCAK:GFP at centromeres ($P=0.48$; Fig. 6C,D). These results show that Chk1-depleted cells treated with taxol are capable of MCAK:GFP binding and that it is MCAK maintenance at centromeres, rather than its initial recruitment, that is affected in Chk1-depleted cells. In contrast, control + AZ, control + VX or siChk1 + VX cells treated with taxol and MG132 for 1 hour exhibited diminished MCAK:GFP staining at centromeres by 53–57% compared to controls ($P<0.001$; Fig. 6C,D). These results suggest that Mps1 activity is required for optimal initial binding of MCAK to centromeres in the presence of taxol.

Mps1 activity is required for initial recruitment and Chk1 for maintenance of Kif2b to kinetochores

Furthermore, after treatment with taxol and MG132 for 6 hours, localization of Kif2b:GFP to kinetochores in Chk1-depleted, control + AZ, control + VX, or siChk1 + AZ cells was reduced by 89–93% compared to controls ($P<0.001$; Fig. 7A,C). Significantly, after treatment with taxol and MG132 for 1 hour, Chk1-depleted and control cells exhibited similar levels of Kif2b:GFP at kinetochores ($P=0.71$; Fig. 7B,C). However, treatment of cells with AZ3146, VX680 or combined Chk1 depletion with AZ3146 treatment diminished Kif2b:GFP kinetochore staining by 89–93% compared to controls

($P<0.001$; Fig. 7B,C). These results show that Chk1 is required for maintenance, but not initial binding of Kif2b to kinetochores in the presence of taxol. These results also show that Mps1 activity is required for initial recruitment of Kif2b to kinetochores.

Mps1 is required for Hec1 Ser55 phosphorylation

Furthermore, treatment of BE cells with AZ3146 or combined Chk1 depletion with AZ3146 treatment reduced Hec1 Ser55 phosphorylation at kinetochores by 74% in prometaphase and by 65–69% in metaphase compared to controls ($P<0.001$; Fig. 8A; supplementary material Fig. S5C). In addition, in the presence of taxol and MG132 for 1 hour, phospho-Ser55 kinetochore staining in Chk1-depleted, control + AZ, or siChk1 + AZ cells was reduced by 78–81% compared to controls ($P<0.001$; supplementary material Fig. S5D). Collectively, these results show that Mps1 activity is required for optimal phosphorylation of Hec1 at Ser55 during unperturbed mitosis or treatment with taxol.

Chk1 is required for stable binding of Mps1 to kinetochores

Inhibition of Mps1 significantly increases its own abundance at kinetochores (Hewitt et al., 2010). To investigate a role for Chk1 in Mps1 localization, BE cells were treated with AZ3146 and analyzed in prometaphase by confocal microscopy. Depletion of

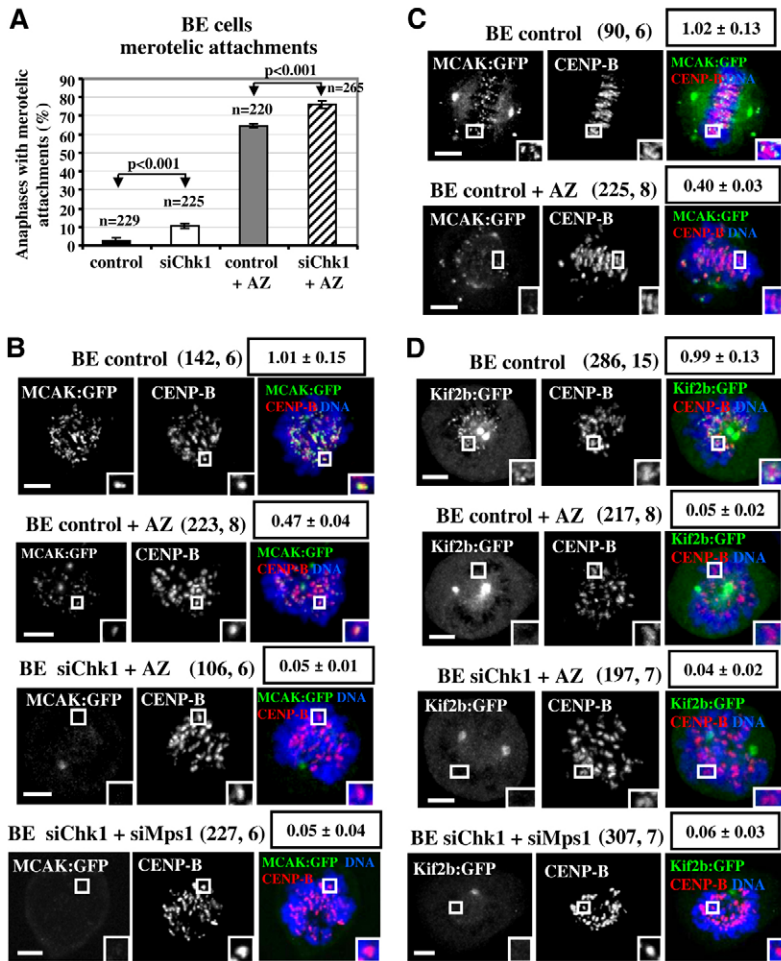


Fig. 5. Additive effects from inhibition of Mps1 and Chk1. (A) Frequencies of anaphases with merotelic attachments. BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were untreated or treated with AZ3146 (AZ) for 3 hours and analyzed in anaphase. Values are mean \pm s.d. from three independent experiments. A minimum of 60 anaphases were analyzed for each experiment. *n*, total number of anaphases tested. (B–D) Localization of MCAK:GFP (B,C) or Kif2b:GFP (D). BE cells expressing MCAK:GFP or Kif2b:GFP were treated as in A in the absence or presence of Mps1 siRNA (siMps1). Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green, GFP; red, CENP-B; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Scale bars: 5 μ m.

Chk1 reduced Mps1 staining at kinetochores by 84% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 8B). In comparison, treatment with VX680 diminished Mps1 staining at kinetochores by 90% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 8B). These results show that Chk1 is required for optimal localization of Mps1 to kinetochores in the absence of spindle poisons.

Furthermore, after treatment with taxol, MG132 and AZ3146 for 1 hour, Chk1-depleted cells exhibited reduced Mps1 staining at kinetochores by 58% compared to controls ($P < 0.001$; Fig. 8C) thus showing that kinetochores in Chk1-depleted cells are capable of weakened Mps1 binding. Significantly, treatment with taxol, MG132 and AZ3146 for 6 hours, diminished Mps1 kinetochore staining in Chk1-depleted cells by 94% compared to controls ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S5E). These results indicate that Chk1 is required for stable binding of Mps1 to kinetochores in the presence of taxol.

Phosphorylation of Ser331 is required for Mps1 localization to kinetochores

Furthermore, after induction with Tetracycline and treatment with AZ3146, CHO^{S331A} cells transiently expressing Mps1:GFP exhibited reduced Mps1:GFP staining at kinetochores by 79% compared to CHO^{WT} ($P < 0.001$; Fig. 8D). These results suggest that Aurora-B Ser331 phosphorylation is required for optimal localization of Mps1 to kinetochores. In contrast, treatment of BE cells with AZ3146 did not significantly alter Ser331

phosphorylation at kinetochores compared to controls ($P = 0.44$; supplementary material Fig. S6). In comparison, UCN-01 treatment reduced phospho-Ser331 kinetochore staining by 89% compared to controls ($P < 0.001$; supplementary material Fig. S6).

Discussion

Recent studies in yeast (Pinsky et al., 2009; Vanoosthuyse and Hardwick, 2009) and vertebrate cells (Maldonado and Kapoor, 2011; Santaguida et al., 2011; Saurin et al., 2011) have shown that potent inhibition of Aurora-B weakens the mitotic arrest in the presence of many unattached kinetochores and suggest that Aurora-B contributes to spindle checkpoint signalling independently of error correction. This is an actively debated issue (Yang et al., 2009), it is therefore important to understand Aurora-B regulation and downstream signalling during error correction. We previously showed that Chk1 phosphorylates Aurora-B at Ser331 and this phosphorylation is required for optimal spindle checkpoint function (Zachos et al., 2007; Petsalaki et al., 2011). In the present study, we show that Chk1 protects against anaphases with merotelic attachments and lagging chromosomes and is required for correction of merotelic attachments in metaphase-delayed cells. Spindle checkpoint defects can result in anaphases with mono-attached or syntelically attached chromosomes and both sister chromatids delivered to one daughter cell (Kops et al., 2005). It is therefore

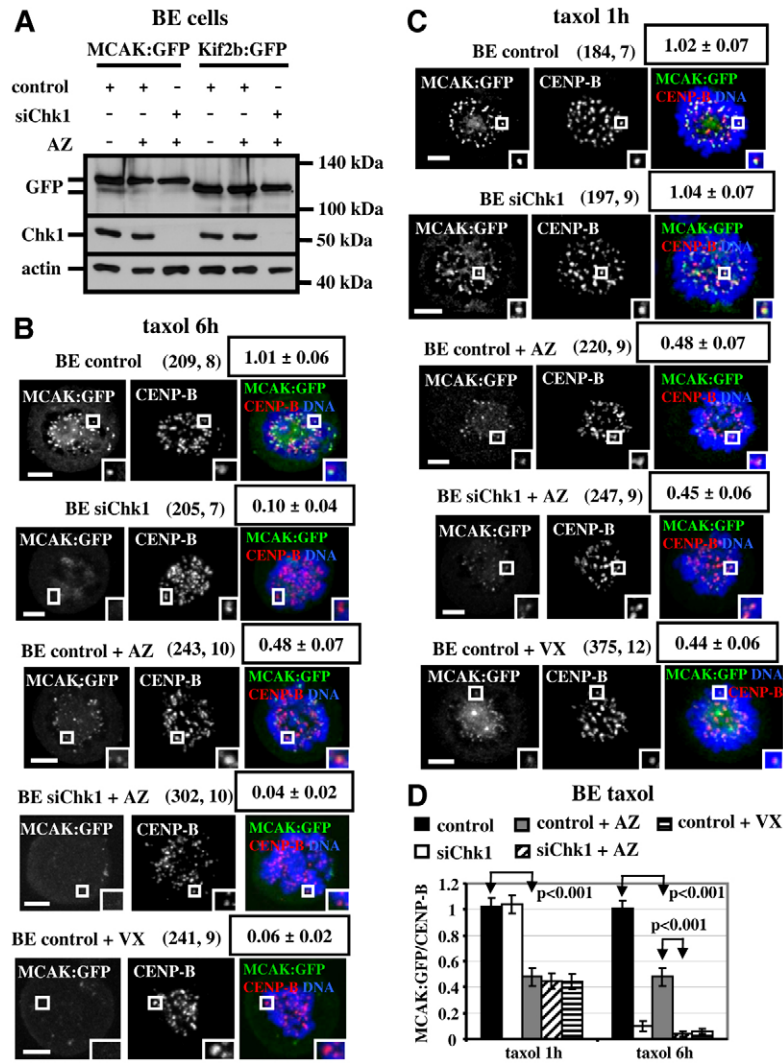


Fig. 6. Mps1 activity is required for initial binding and Chk1 for maintenance of MCAK:GFP to centromeres. (A) Western blot analysis of total GFP, Chk1 and actin. BE cells expressing MCAK:GFP or Kif2b:GFP were transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) and treated with AZ3146 for 3 hours. (B,C) Localization of MCAK:GFP. BE cells expressing MCAK:GFP were transfected as in A and treated with taxol and MG132 in the absence or presence of AZ3146 (AZ) or VX680 (VX) for 6 hours (B) or for 1 hour (C). Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green, GFP; red, CENP-B; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochores pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified centromeres. Scale bars: 5 μ m. (D) GFP/CENP-B fluorescence intensity at centromeres in cells from B and C. Values are mean + s.d.

unlikely that spindle checkpoint failure accounts for anaphases with merotelic attachments in Chk1-deficient cells. Instead, our data suggest a novel role for Chk1 in correction of mis-attached kinetochores. Furthermore, we show that Chk1 activity is required for optimal stability of KMTs, for localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores and for Hecl Ser55 and Ser44 phosphorylation.

Aurora-B phosphorylated at Ser331 colocalizes with CENP-A and Hecl at kinetochores, in agreement with recent studies showing a small population of Aurora-B at kinetochores (Posch et al., 2010; DeLuca et al., 2011; Petsalaki et al., 2011). Significantly, Aurora-B Ser331 phosphorylation is high in prometaphase and decreases in metaphase cells, thus suggesting a role for Ser331 phosphorylation in chromosome bi-orientation (DeLuca et al., 2011). Furthermore, using cells overexpressing wild-type or non-phosphorylatable mutant S331A Aurora-B we propose that Ser331 phosphorylation and complete Aurora-B activation is required for optimal localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores and mitotic Hecl phosphorylation during correction of merotelic attachments (Petsalaki et al., 2011).

We also show that inhibition of Mps1 induces merotelic attachments and anaphase lagging chromosomes and exhibits an

additive effect with Chk1 depletion. To our knowledge, this is the first report describing a role for Mps1 in preventing merotelic attachments. Furthermore, inhibition of Mps1 diminishes localization of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores and reduces Hecl Ser55 phosphorylation during unperturbed mitosis. Aurora-B phosphorylates Hecl Ser55 and MCAK and Kif2b localization depend on Aurora-B kinase activity (Andrews et al., 2004; DeLuca et al., 2006; Bakhoum et al., 2009). One possibility is that Mps1 phosphorylates Borealin to enhance Aurora-B activity towards specific substrates (such as Hecl) or after certain treatments (Jelluma et al., 2008b; Slidrecht et al., 2010) but not others (Hewitt et al., 2010; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010); however, further experiments are required to fully support this idea.

Furthermore, using taxol, a drug that stabilizes kinetochore-microtubule attachments, we demonstrate that Mps1 activity is required for initial recruitment and Chk1 for sustained, but not initial, binding of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores in prometaphase cells (Schiff and Horwitz, 1980; Yang et al., 2009). This is consistent with our findings that a population of Chk1-depleted cells is capable of weakened binding of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores during unperturbed mitosis. In addition, we propose that Chk1

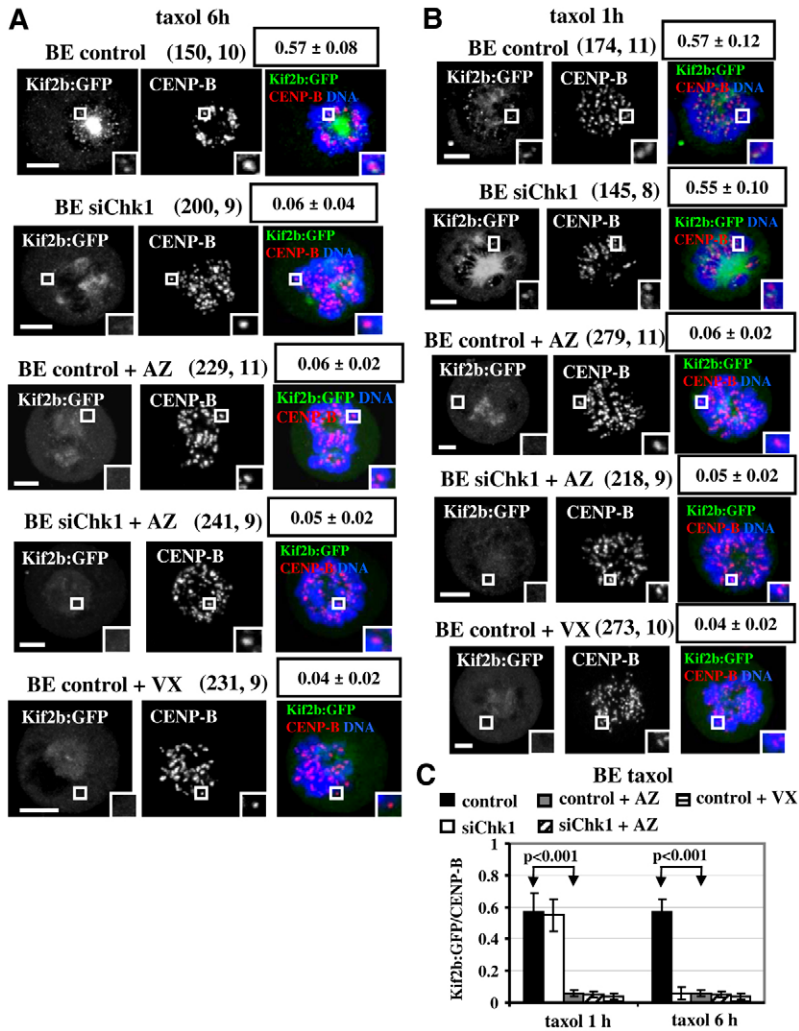


Fig. 7. Mps1 activity is required for initial binding and Chk1 for maintenance of Kif2b:GFP to kinetochores.

(A,B) Localization of Kif2b:GFP. BE cells expressing Kif2b:GFP were transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) and treated with taxol and MG132 in the absence or presence of AZ3146 (AZ) or VX680 (VX) for 6 hours (A) or 1 hour (B). Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green, GFP; red, CENP-B; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Scale bars: 5 μ m. (C) GFP/CENP-B fluorescence intensity at kinetochores in cells from A and B. Values are mean \pm s.d.

activity and Aurora-B Ser331 phosphorylation are required for stable binding of Mps1 to kinetochores, in agreement with recent findings that Aurora-B regulates localization of Mps1 (Hewitt et al., 2010; Santaguida et al., 2010). Our results are consistent with a feedback mechanism between Mps1 and Aurora-B rather than a strictly linear pathway in which one kinase is upstream of the other (Jelluma et al., 2008b; Hewitt et al., 2010; Santaguida et al., 2010). Significantly, inhibition of Mps1 did not reduce phosphorylated Ser331 at kinetochores (Jelluma et al., 2008b; Santaguida et al., 2010; van der Waal et al., 2012b).

On the basis of those findings, we propose the following model for the role of Chk1 and Mps1 in correction of merotelic attachments (Fig. 8E). Chk1 phosphorylates Aurora-B Ser331 and this phosphorylation is required for sustained binding of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores, optimal phosphorylation of Hec1 at Ser44 and Ser55 and correction of merotelic attachments before anaphase. Furthermore, Chk1 promotes stable binding of Mps1 to kinetochores by phosphorylating Aurora-B Ser331. In turn, Mps1 is required for initial recruitment of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores and mitotic Hec1 phosphorylation, perhaps through phosphorylating Borealin. Our model raises several important questions regarding regulation of MCAK and Kif2b by Mps1 and Chk1, the significance of Ser331 phosphorylation for specific

correction of kinetochore mis-attachments and the potential role of Chk1 and Mps1 in tumour cell killing by anti-mitotic agents.

Mps1 and Chk1 regulate initial binding and maintenance, respectively, of MCAK and Kif2b to centromeres or kinetochores. One possibility is that Chk1 and Mps1 regulate MCAK/Kif2b localization through modulating Aurora-B catalytic activity (Jelluma et al., 2008b; Petsalaki et al., 2011) and that different levels of Aurora-B activity are required for recruitment versus maintenance of MCAK and Kif2b. However, inhibition of Mps1, Chk1 or simultaneous inhibition of both kinases resulted in similar levels of Aurora-B activity as judged by Hec1 Ser55 or CENP-A Ser7 phosphorylation in the presence of taxol (Petsalaki et al., 2011). Alternatively, phosphorylation of Borealin by Mps1 and increased binding of Survivin to the CPC by Ser331 phosphorylation may influence substrate affinity of Aurora-B (Vader et al., 2006; Petsalaki et al., 2011). Furthermore, an Aurora-B-independent role for Mps1 in MCAK/Kif2b localization and error correction cannot be formally excluded. Mps1 phosphorylation targets include yeast Mad1 (Hardwick et al., 1996), yeast Ndc80/Hec1 (Kemmler et al., 2009) and vertebrate CENP-E mitotic proteins (Kim et al., 2010); however, a role for these phosphorylations in error correction has not been established.

Furthermore, Chk1-deficient cells treated with taxol for 1 hour exhibit MCAK and Kif2b staining at centromeres and

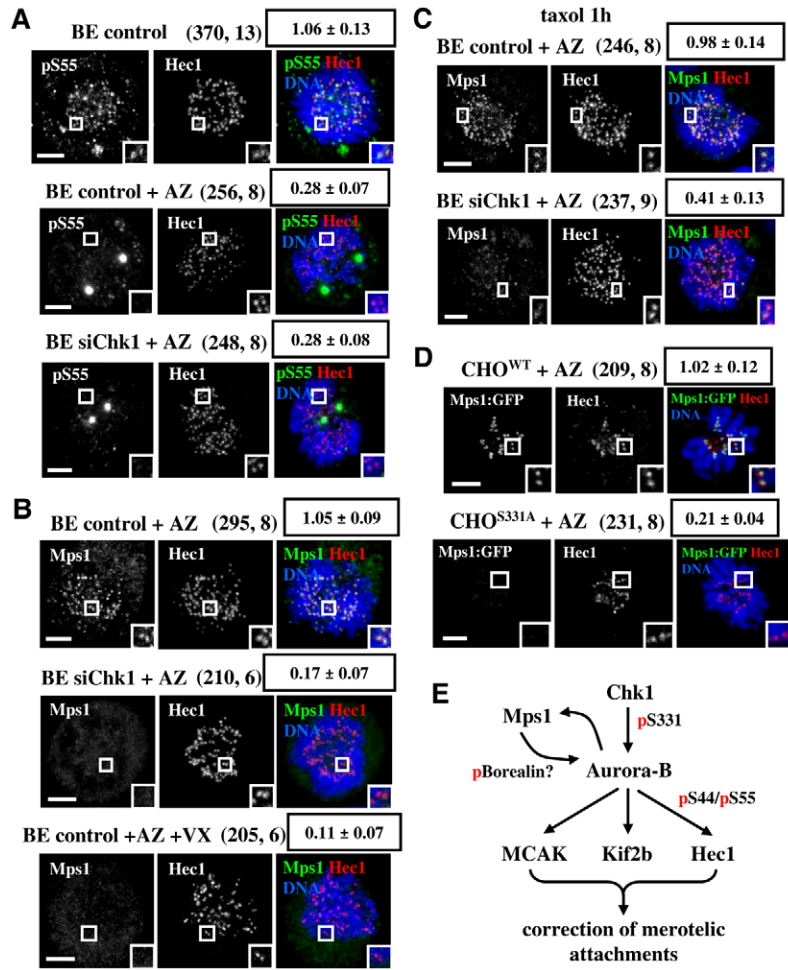


Fig. 8. Chk1 is required for stable binding of Mps1 to kinetochores. (A) Inhibition of Mps1 reduces Hec1 Ser55 phosphorylation. BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were untreated or treated with AZ3146 (AZ) for 3 hours. Boxed values show mean pS55/Hec1 fluorescence intensity. Green, pS55; red, Hec1; blue, DNA. (B–D) Localization of Mps1. (B) BE cells transfected as in A were treated with AZ3146 (AZ) or VX680 for 3 hours. (C) BE cells transfected as in A were treated with taxol, AZ3146 (AZ) and MG132 for 1 hour. Boxed values show mean Mps1/Hec1 fluorescence intensity. Green, Mps1; red, Hec1; blue, DNA. (D) CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells expressing Mps1:GFP were induced with Tetracycline and treated with AZ3146 (AZ) for 3 hours. Boxed values show mean GFP/Hec1 fluorescence intensity. Green, GFP; red, Hec1; blue, DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified, followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Scale bars: 5 μ m. (E) Model for correction of merotelic attachments by Chk1 and Mps1 (see Discussion for details). p indicates phosphorylation.

kinetochores despite reduced Mps1 kinetochore levels. One possibility is that the amount of Mps1 that remains bound to kinetochores is sufficient to recruit MCAK and Kif2b. Alternatively, Mps1 may regulate MCAK and Kif2b localization without being present at the kinetochore (Maciejowski et al., 2010; Liu and Winey, 2012).

How does Aurora-B specifically destabilize erroneous kMT attachments? One model proposes that Aurora-B creates a phosphorylation gradient by diffusing away from the centromere and can only reach its outer kinetochore substrates when sister kinetochores are under reduced tension (Cheeseman et al., 2002; Pinsky et al., 2006; Liu et al., 2009; Wang et al., 2011). Phosphorylation at Ser331 may therefore contribute to formation of a steep Aurora-B activity gradient between inner and outer kinetochore to fine-tune regulation of kinetochore–microtubule interactions (van der Waal et al., 2012a). Furthermore, reduced phosphorylation of Ser331 from prometaphase to metaphase may facilitate formation of amphitelic attachments by reducing phosphorylation of outer kinetochore Aurora-B substrates such as Hec1, while still allowing some levels of kMT turnover to ensure error correction late in mitosis, for example by diminishing the inhibitory phosphorylation of MCAK (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004; DeLuca et al., 2011).

Several kinases including Chk1, Mps1 and Aurora-B are required for error correction and optimal spindle checkpoint

signalling, thus suggesting that mechanisms that regulate and monitor kinetochore–microtubule attachments are intertwined at the molecular level (Ditchfield et al., 2003; Santaguida et al., 2010; Elowe, 2011). Importantly, reducing the levels of certain proteins that have dual roles in checkpoint activation and chromosome bi-orientation can sensitize tumour cells to low levels of anti-mitotic drugs by enhancing chromosome mis-segregation (Kops et al., 2005; Janssen et al., 2009). Further understanding of the role of Chk1 and Mps1 in error correction may provide new prospects for improving cancer treatment.

Materials and Methods

Antibodies and plasmids

Monoclonal antibody against Chk1 (G-4) and polyclonal antibodies against CENP-B, GFP (FL) and TTK (Mps1; C-19) were from Santa Cruz Biotechnology. Monoclonal anti-Hec1 (9G3) and polyclonal anti-Aurora-B (ab2254) antibodies were from Abcam. Monoclonal antibodies against α -tubulin (DM1A) and actin (AC-40) were from Sigma, polyclonal antibody against avian CENP-O was from MBL and monoclonal anti-CENP-A (3-19) was from GeneTex. Anti-pS331 rabbit polyclonal antiserum against phosphorylated Ser331 of human Aurora-B was previously described (Petsalaki et al., 2011). Anti-pS55 and anti-pS44 rabbit polyclonal antibodies against phosphorylated Ser55 and Ser44 of Hec1 were gifts from J. DeLuca (DeLuca et al., 2011) and SMP1.1 sheep polyclonal antiserum against Mps1 was from S. Taylor (Tighe et al., 2008).

Plasmid MCAK:GFP coding for human MCAK fused to GFP was a gift from J. Swedlow (Andrews et al., 2004) and Kif2b:GFP plasmid coding for human Kif2b fused to GFP was from B. Orr and D. Compton (Bakhoum et al., 2009). Plasmid Mps1:GFP coding for human Mps1 fused to GFP was a gift from S. Taylor (Hewitt et al., 2010).

Cell culture and treatments

Chk1-deficient avian B-lymphoma DT40 cells (*Chk1*^{-/-}), *Chk1*^{-/-} cells expressing exogenous avian wild-type Chk1 encoded by a transfected transgene (revertant cells) or *Chk1*^{-/-} cells reconstituted with D130A avian Chk1 (kinase-dead cells) were as described (Zachos et al., 2003). The D130A mutant Chk1 protein shows an altered electrophoretic mobility but sequencing of the expression construct has confirmed that the D130A is the only mutation (Bourke et al., 2007). Chinese hamster ovary CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells expressing 6×Myc-tagged human wild-type or S331A mutant Aurora-B respectively under control of Tetracycline-induced transgenes were previously described (Petsalaki et al., 2011).

Human colon carcinoma BE cells were grown in DMEM (GIBCO) containing 10% foetal bovine serum and CHO cells in Ham's F12 (GIBCO) supplemented with 10% foetal bovine serum, at 37°C, 5% CO₂. DT40 cells were cultured in DMEM containing 10% foetal bovine serum, 1% chicken serum, 10⁻⁵ M β-mercaptoethanol, at 39.5°C, 5% CO₂.

Cells were treated with 25 nM taxol (AppliChem), 10 μg/ml MG132 (Merck), 300 nM VX680 (Selleckchem), 300 nM UCN-01 (Sigma), or 2 μM AZ3146 (Axon) as appropriate. To induce expression of Aurora-B transgenes, CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were treated with 17 ng/ml or 30 ng/ml Tetracycline (Sigma) respectively for 16 hours prior to analysis or further treatment with drugs (Petsalaki et al., 2011). Addition of Tetracycline stimulated accumulation of 6×Myc-Aurora-B^{WT} or 6×Myc-Aurora-B^{S331A} at approximate levels 10-fold-higher than the endogenous protein and this level of expression was shown to disrupt endogenous Aurora-B functions while maintaining correct localization of 6×Myc-Aurora-B to centromeres (Petsalaki et al., 2011).

Negative siRNA or siRNA duplexes designed to repress human TTK (Mps1) or Chk1 (Dharmacon) were transfected into BE cells 24–48 hours prior to analysis using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The siRNA sequences are available on request.

For expression of GFP proteins, plasmids were transfected into cells in the absence or presence of appropriate siRNA duplexes 48 hours prior to analysis or further treatment with drugs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Recovery from MG132

Cells were treated with 10 μg/ml MG132 (Merck) for 3 hours. At the end of the treatment, cells were washed three times for 5 minutes with 37°C medium, cultured in fresh medium for 30–60 minutes and fixed as described below. Preliminary experiments had shown that many of the cells had accomplished metaphase to anaphase transition in 30–60 minutes and were observed in anaphase.

Nocodazole sensitivity assay

Cells were treated with 10 μg/ml MG132 for 3 hours in the absence or presence of 300 nM UCN-01. At the end of the treatment, 500 ng/ml nocodazole was added to cells for various times, cells were fixed in paraformaldehyde in cytoskeleton buffer and analysed by confocal microscopy as described below. Images were collected at 0.2 μm stacks over 10-μm depth, merged using Leica LCS Lite software and microtubule-associated fluorescence for each mitotic cell was quantified by analyzing an equal image area using Image J (NIH). To investigate stability of kMTs, microtubule-associated fluorescence values were normalized to the 2 minute time point because, after 2 minutes in nocodazole, the majority of non-kinetochore-microtubules is depolymerized as determined by confocal microscopy (supplementary material Fig. S2A).

Indirect immunofluorescence microscopy

For phospho-Hec1 (pS55 or pS44) staining, cells were pre-fixed in pre-warmed (37°C) 4% paraformaldehyde in Hec1-PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ pH 6.9) for 10 seconds at room temperature, permeabilised in pre-warmed (37°C) Hec1-PHEM supplemented with 1% Triton X-100 and 100 nM microcystin (Sigma) for 5 minutes at room temperature, fixed in pre-warmed (37°C) 4% paraformaldehyde in Hec1-PHEM for 20 minutes at room temperature, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% Triton X-100 and immunostained (DeLuca et al., 2011).

For pS331 staining, cells were rinsed twice in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES pH 7.0, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO₄), extracted in PHEM supplemented with 0.5% CHAPS and 100 nM Microcystin (Sigma) for 5 minutes at room temperature, fixed with cold methanol for 5 minutes at -20°C, washed twice with PBS and immunostained (Petsalaki et al., 2011).

To depolymerise the majority of non-kinetochore-microtubules and visualize merotelic attachments, cells were incubated in ice-cold medium for 15 minutes at 4°C, pre-fixed in pre-warmed (37°C) 4% paraformaldehyde in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES pH 7.0, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO₄) for 10 seconds at room temperature, permeabilised in pre-warmed (37°C) PHEM supplemented with 0.5% Triton X-100 for 5 minutes at room temperature, fixed in pre-warmed (37°C) 4% paraformaldehyde in PHEM for 20 minutes at room temperature, washed twice with PBS and immunostained (Silkworth et al., 2009).

For all other fluorescence microscopy applications including nocodazole sensitivity assays, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in cytoskeleton buffer (1.1 M Na₂HPO₄, 0.4 M KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM PIPES, 5 mM Glucose, pH 6.1) for 5 minutes at 37°C, permeabilised in 0.5% Triton X-100 in cytoskeleton buffer at room temperature and immunostained as appropriate (Zachos et al., 2007).

Fluorescein- (FITC) or Rhodamine-TRITC-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used as appropriate, DNA was stained with 10 μM [TO-PRO-3 Iodide (642/661)] (Invitrogen) and cells were mounted in Vectashield medium (Vector laboratories). Images were collected using a Leica TCS SP2 laser scanning spectral confocal microscope, Leica LCS Lite software and a 63×Apochromat 1.40 NA oil objective. The Leica 11513859 low fluorescence immersion oil used was used and imaging was performed at room temperature. Average projections of image stacks were obtained using the Leica LCS Lite software.

To analyze fluorescence intensities, background readings were subtracted and fluorescence intensities quantified using Leica LCS Lite. The GFP values were normalized against the CENP-B or the Hec1 signal, the pS55 and pS44 against the Hec1 signal, the pS331 against the CENP-A signal and the Mps1 against the Hec1 signal. Several kinetochore pairs per cell from a minimum of three cells per experiment from two independent experiments were analyzed for each treatment.

Western blotting

Cells were lysed in ice-cold whole-cell extract buffer (20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.4 M KCl, 0.4% Triton X-100, 10% Glycerol, 5 mM NaF, 1 mM DTT, 5 μg/ml Leupeptin, 50 μg/ml PMSF, 1 mM Benzamide, 5 μg/ml Aprotinin, 1 mM Na₂VO₄) for 30 minutes on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 15,000 g for 10 minutes and analyzed by SDS PAGE.

Statistical analysis

The *P*-values were calculated using the Student's *t*-test.

Acknowledgements

We thank D. Gillespie for helpful discussions. We also thank J. DeLuca, B. Orr, J. Swedlow and S. Taylor for generously sharing reagents.

Author contributions

E.P. performed the experiments and analysed the results. G.Z. designed the experiments and wrote the paper.

Funding

This work was funded by the Association for International Cancer Research.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.119677/-/DC1>

References

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W. and Labbé, J. C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**, 83–93.
- Akiyoshi, B., Sarangapani, K. K., Powers, A. F., Nelson, C. R., Reichow, S. L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J. A., Asbury, C. L. and Biggins, S. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* **468**, 576–579.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J. R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev. Cell* **6**, 253–268.
- Bakhom, S. F., Thompson, S. L., Manning, A. L. and Compton, D. A. (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* **11**, 27–35.
- Bourke, E., Dodson, H., Merdes, A., Cuffe, L., Zachos, G., Walker, M., Gillespie, D. and Morrison, C. G. (2007). DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep.* **8**, 603–609.
- Chan, Y. W., Jeyaparakash, A. A., Nigg, E. A. and Santamaria, A. (2012). Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J. Cell Biol.* **196**, 563–571.
- Cheeseman, I. M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E. M., Kang, J., Yates, J. R., Chan, C. S., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* **111**, 163–172.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**, 983–997.
- Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 32–40.

- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degross, F. and Salmon, E. D. (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J. Cell Biol.* **153**, 517-528.
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J. C. and Salmon, E. D. (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J. Cell Sci.* **116**, 4213-4225.
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C. B. and Salmon, E. D. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr. Biol.* **16**, 1711-1718.
- Cooke, C. A., Bernat, R. L. and Earnshaw, W. C. (1990). CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J. Cell Biol.* **110**, 1475-1488.
- DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-982.
- DeLuca, K. F., Lens, S. M. and DeLuca, J. G. (2011). Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J. Cell Sci.* **124**, 622-634.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* **161**, 267-280.
- Elowe, S. (2011). Bub1 and BubR1: at the interface between chromosome attachment and the spindle checkpoint. *Mol. Cell Biol.* **31**, 3085-3093.
- Hardwick, K. G., Weiss, E., Luca, F. C., Winey, M. and Murray, A. W. (1996). Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* **273**, 953-956.
- Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L. and Peters, J. M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **161**, 281-294.
- Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A. M., Jones, C. D., Musacchio, A., Green, S. and Taylor, S. S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J. Cell Biol.* **190**, 25-34.
- Janssen, A., Kops, G. J. and Medema, R. H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19108-19113.
- Jelluma, N., Brenkman, A. B., McLeod, I., Yates, J. R., 3rd, Cleveland, D. W., Medema, R. H. and Kops, G. J. (2008a). Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS ONE* **3**, e2415.
- Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J., Cruijssen, C. W., van Osch, M. H., Lens, S. M., Medema, R. H. and Kops, G. J. (2008b). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* **132**, 233-246.
- Kemmler, S., Stach, M., Knapp, M., Ortiz, J., Pfanstiel, J., Ruppert, T. and Lechner, J. (2009). Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J.* **28**, 1099-1110.
- Kim, Y., Holland, A. J., Lan, W. and Cleveland, D. W. (2010). Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell* **142**, 444-455.
- Kline-Smith, S. L., Khodjakov, A., Hergert, P. and Walczak, C. E. (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1146-1159.
- Knowlton, A. L., Lan, W. and Stukenberg, P. T. (2006). Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr. Biol.* **16**, 1705-1710.
- Kops, G. J., Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 773-785.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E. and Stukenberg, P. T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol.* **14**, 273-286.
- Liu, X. and Winey, M. (2012). The MPS1 family of protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 561-585.
- Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J., Lampson, M. A. and Lens, S. M. (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**, 1350-1353.
- Maciejowski, J., George, K. A., Terret, M. E., Zhang, C., Shokat, K. M. and Jallepalli, P. V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* **190**, 89-100.
- Maldonado, M. and Kapoor, T. M. (2011). Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 475-482.
- Manning, A. L., Ganem, N. J., Bakhom, S. F., Wagenbach, M., Wordeman, L. and Compton, D. A. (2007). The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2970-2979.
- Manning, A. L., Bakhom, S. F., Maffini, S., Correia-Melo, C., Maiato, H. and Compton, D. A. (2010). CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity. *EMBO J.* **29**, 3531-3543.
- Peddibhotla, S., Lam, M. H., Gonzalez-Rimbau, M. and Rosen, J. M. (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5159-5164.
- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E. J., Gillespie, D. A. and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J. Cell Biol.* **195**, 449-466.
- Pinsky, B. A., Kung, C., Shokat, K. M. and Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat. Cell Biol.* **8**, 78-83.
- Pinsky, B. A., Nelson, C. R. and Biggins, S. (2009). Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol.* **19**, 1182-1187.
- Posch, M., Khoudoli, G. A., Swift, S., King, E. M., Deluca, J. G. and Swedlow, J. R. (2010). Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis. *J. Cell Biol.* **191**, 61-74.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A. M., Taylor, S. S. and Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J. Cell Biol.* **190**, 73-87.
- Santaguida, S., Vernieri, C., Villa, F., Ciliberto, A. and Musacchio, A. (2011). Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J.* **30**, 1508-1519.
- Saurin, A. T., van der Waal, M. S., Medema, R. H., Lens, S. M. and Kops, G. J. (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat. Commun.* **2**, 316.
- Schiff, P. B. and Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1561-1565.
- Schmidt, M., Budirahardja, Y., Klompaker, R. and Medema, R. H. (2005). Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Rep.* **6**, 866-872.
- Schmidt, J. C., Kiyomitsu, T., Hori, T., Backer, C. B., Fukagawa, T. and Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores. *J. Cell Biol.* **191**, 269-280.
- Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Scholl, L. M. and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS ONE* **4**, e6564.
- Sliedrecht, S., Zhang, C., Shokat, K. M. and Kops, G. J. (2010). Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PLoS ONE* **5**, e10251.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* **108**, 73-112.
- Stucke, V. M., Siljé, H. H., Arnaud, L. and Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* **21**, 1723-1732.
- Tanaka, K. (2013). Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 559-579.
- Tanenbaum, M. E., Macurek, L., van der Vaart, B., Galli, M., Akhmanova, A. and Medema, R. H. (2011). A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr. Biol.* **21**, 1356-1365.
- Tighe, A., Staples, O. and Taylor, S. (2008). Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J. Cell Biol.* **181**, 893-901.
- Vader, G., Medema, R. H. and Lens, S. M. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J. Cell Biol.* **173**, 833-837.
- van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C., van der Horst, A. and Lens, S. M. (2012a). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp. Cell Res.* **318**, 1407-1420.
- van der Waal, M. S., Saurin, A. T., Vromans, M. J., Vleugel, M., Wurzenberger, C., Gerlich, D. W., Medema, R. H., Kops, G. J. and Lens, S. M. (2012b). Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO Rep.* **13**, 847-854.
- Vanoosthuyse, V. and Hardwick, K. G. (2009). A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Curr. Biol.* **19**, 1176-1181.
- Wang, E., Ballister, E. R. and Lampson, M. A. (2011). Aurora B dynamics at centromeres create a diffusion-based phosphorylation gradient. *J. Cell Biol.* **194**, 539-549.
- Yang, Z., Kenny, A. E., Brito, D. A. and Rieder, C. L. (2009). Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. *J. Cell Biol.* **186**, 675-684.
- Zachos, G., Rainey, M. D. and Gillespie, D. A. (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J.* **22**, 713-723.
- Zachos, G., Black, E. J., Walker, M., Scott, M. T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W. C. and Gillespie, D. A. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev. Cell* **12**, 247-260.

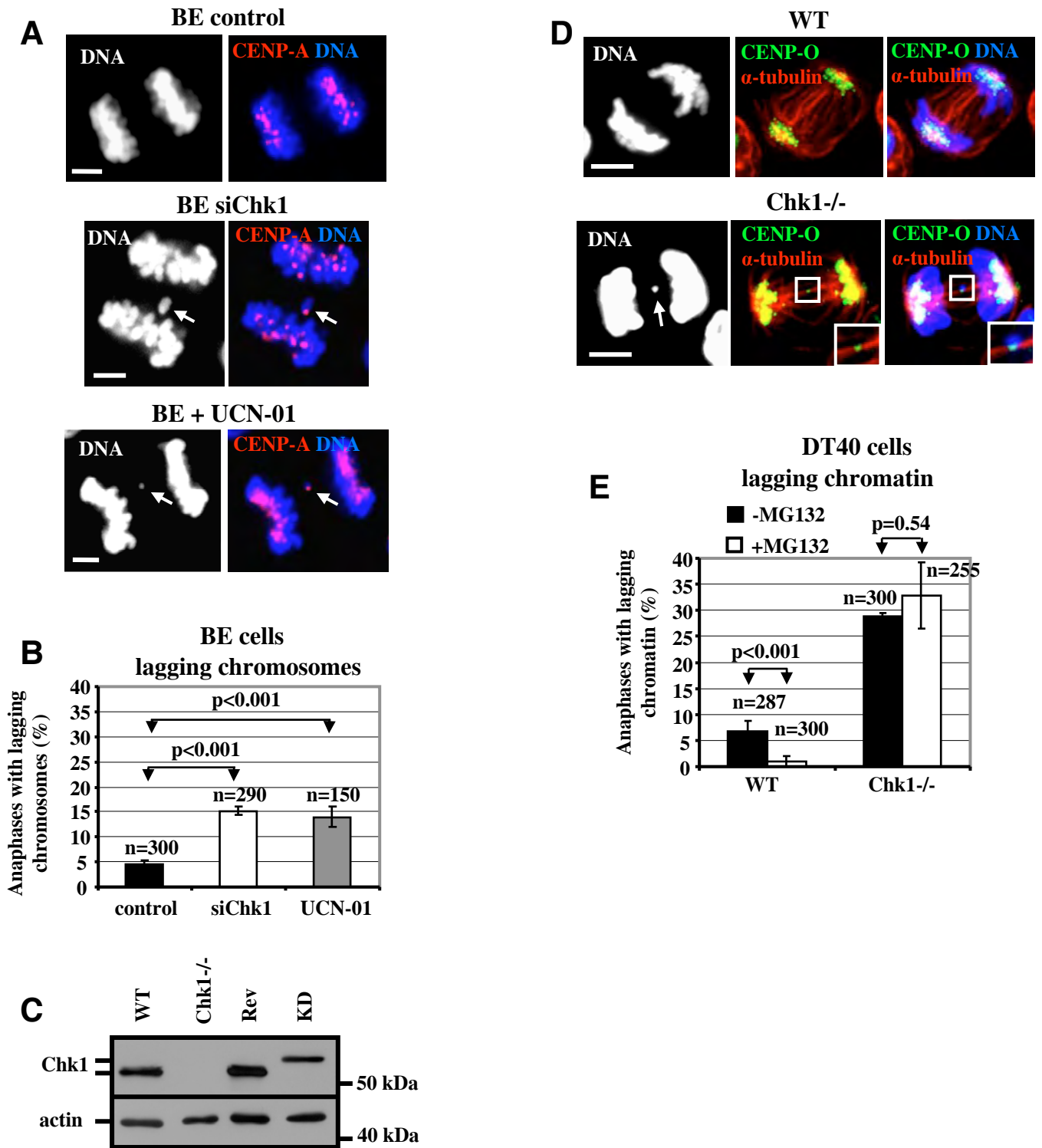


Fig. S1. Chk1-deficient cells exhibit anaphases with lagging chromosomes and merotelic attachments. (A) Examples of anaphases in BE cells transfected with negative siRNA (control), Chk1 siRNA (siChk1), or treated with UCN-01 for 3 h. Red: CENP-A; Blue: DNA. (B) Frequencies of anaphases with lagging chromosomes in BE cells treated as in (A). Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. A minimum of 50 anaphases were analyzed for each experiment. (C) Western blot analysis of total Chk1 or actin in wild-type (WT), Chk1^{-/-}, kinase-dead (KD) or revertant (Rev) DT40 cells. (D) Examples of anaphases in DT40 cells. In Chk1^{-/-}, a single kinetochore is connected to microtubules from both spindle poles. Green: CENP-O; Red: α -tubulin; Blue: DNA. Mis-segregated chromosomes are indicated by arrows. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m. (E) Frequencies of anaphases with lagging chromatin. Wild-type (WT) or Chk1^{-/-} DT40 cells were analyzed in anaphase in the absence of drug treatment (-MG132) or after recovery from a 3 hour MG132 treatment (+MG132). Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. A minimum of 80 anaphases were analyzed for each experiment. n, total number of anaphases tested.

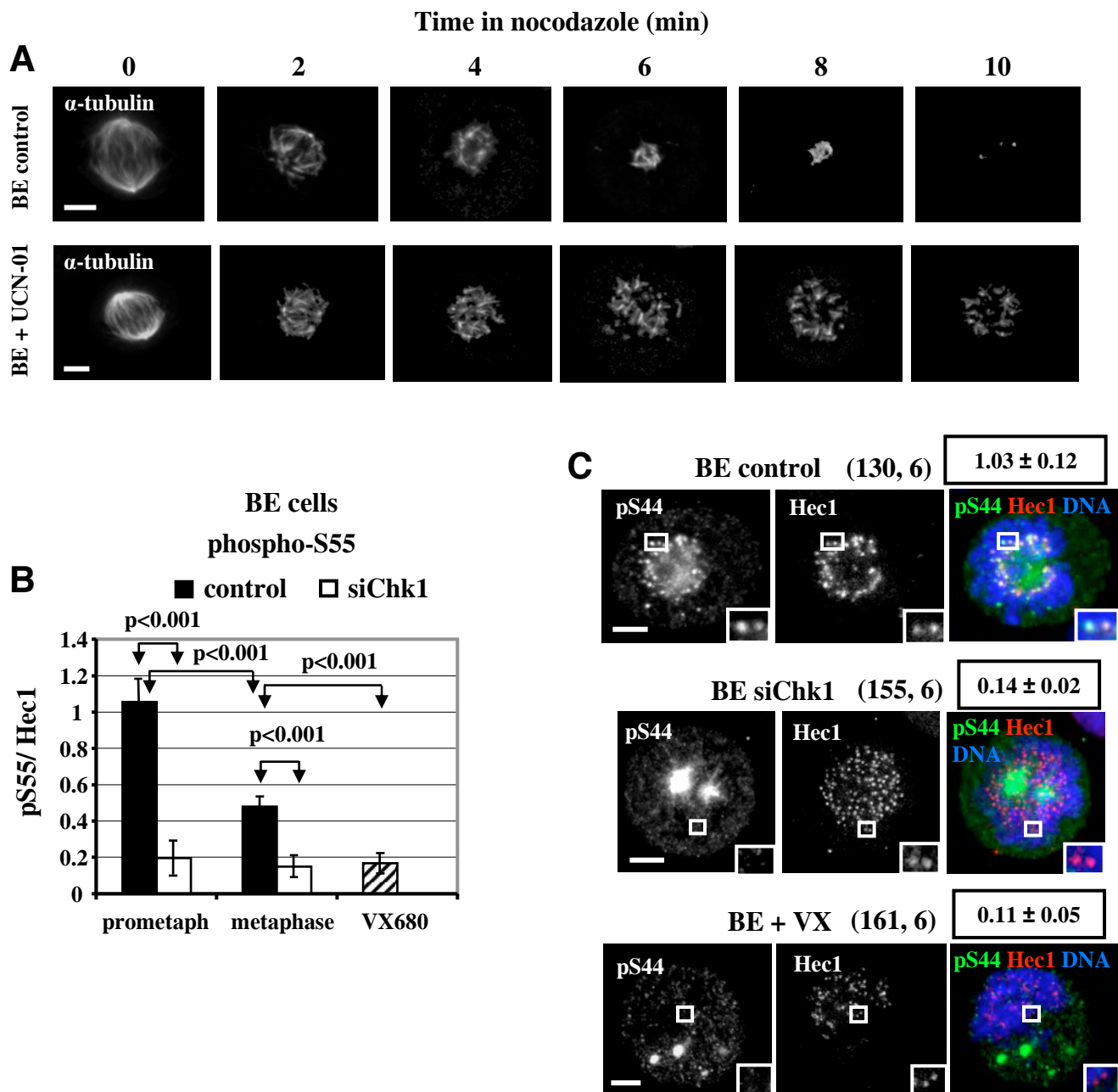


Fig. S2. Inhibition of Chk1 reduces sensitivity of kMTs to nocodazole and diminishes Hec1 Ser55 and Ser44 phosphorylations. (A) BE cells were treated with MG132 for 3 h in the absence (control) or presence of UCN-01 and exposed to high concentrations of nocodazole for the indicated times. (B) Mean pS55/Hec1 fluorescence intensity values in prometaphase (prometaph) and metaphase kinetochores in cells transfected with negative siRNA (control), Chk1 siRNA (siChk1), or treated with VX680 (VX) for 3 h. Error bars show the standard deviation from the mean. (C) Phosphorylation of Hec1 Ser44 in BE cells treated as in (B). Boxed values show mean pS44/Hec1 fluorescence intensity. Green: pS44; Red: Hec1; Blue: DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

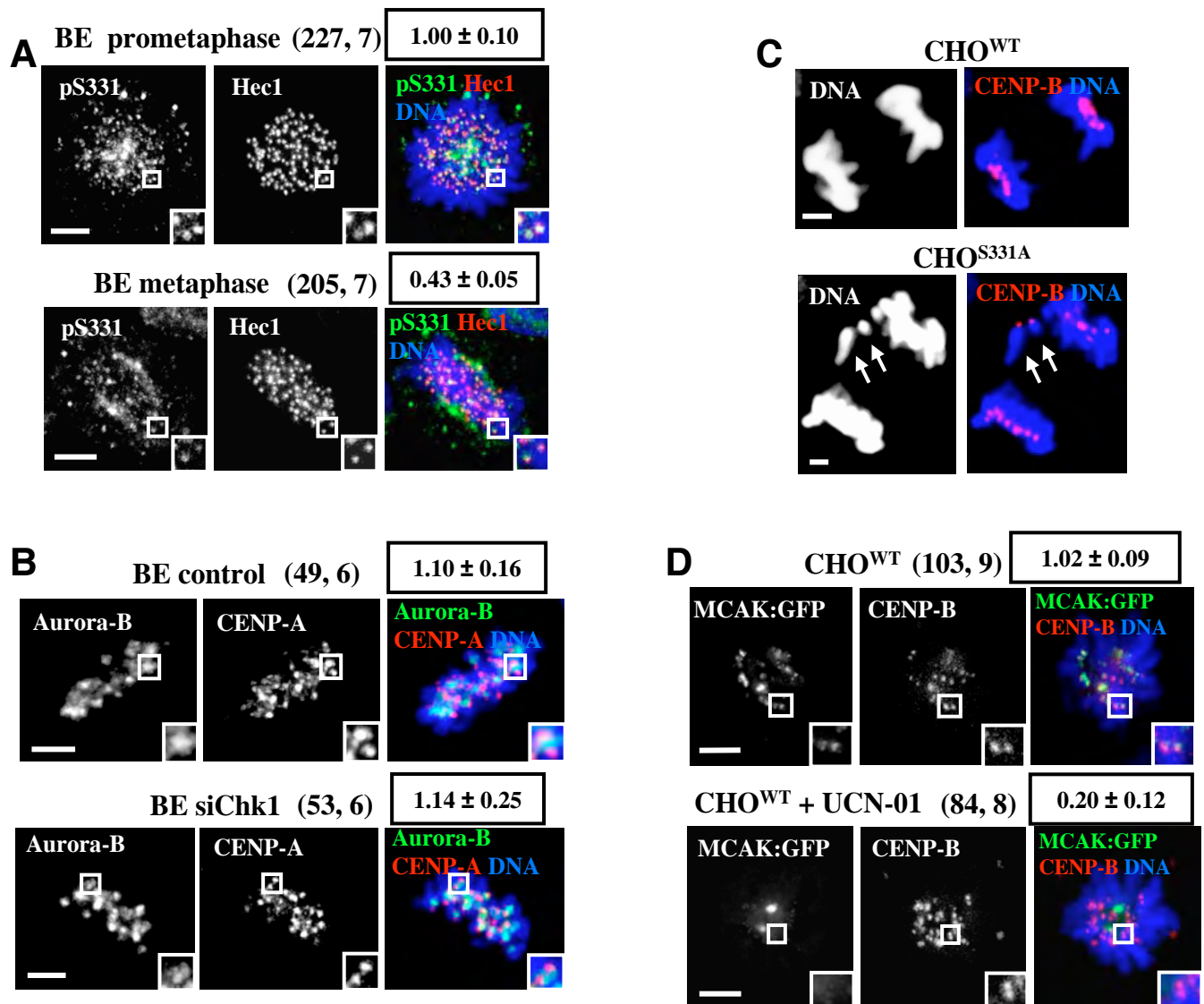


Fig. S3. Phosphorylation of Aurora-B Ser331 at kinetochores is high in prometaphase and decreases in metaphase cells. (A) Ser331 phosphorylation. Boxed values show mean pS331/Hec1 fluorescence intensity. Green: pS331; Red: Hec1; Blue: DNA. **(B)** Aurora-B localization. Boxed values show mean Aurora-B/CENP-A fluorescence intensity. Green: Aurora-B; Red: CENP-A; Blue: DNA. **(C)** Mis-segregated chromosomes. Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells in anaphase are shown. Mis-segregated chromosomes are indicated by arrows. Red: CENP-B; Blue: DNA. **(D)** Localization of MCAK:GFP. Tetracycline-induced CHO^{WT} expressing MCAK:GFP were untreated or treated with UCN-01 for 3 h. Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green: GFP; Red: CENP-B; Blue: DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

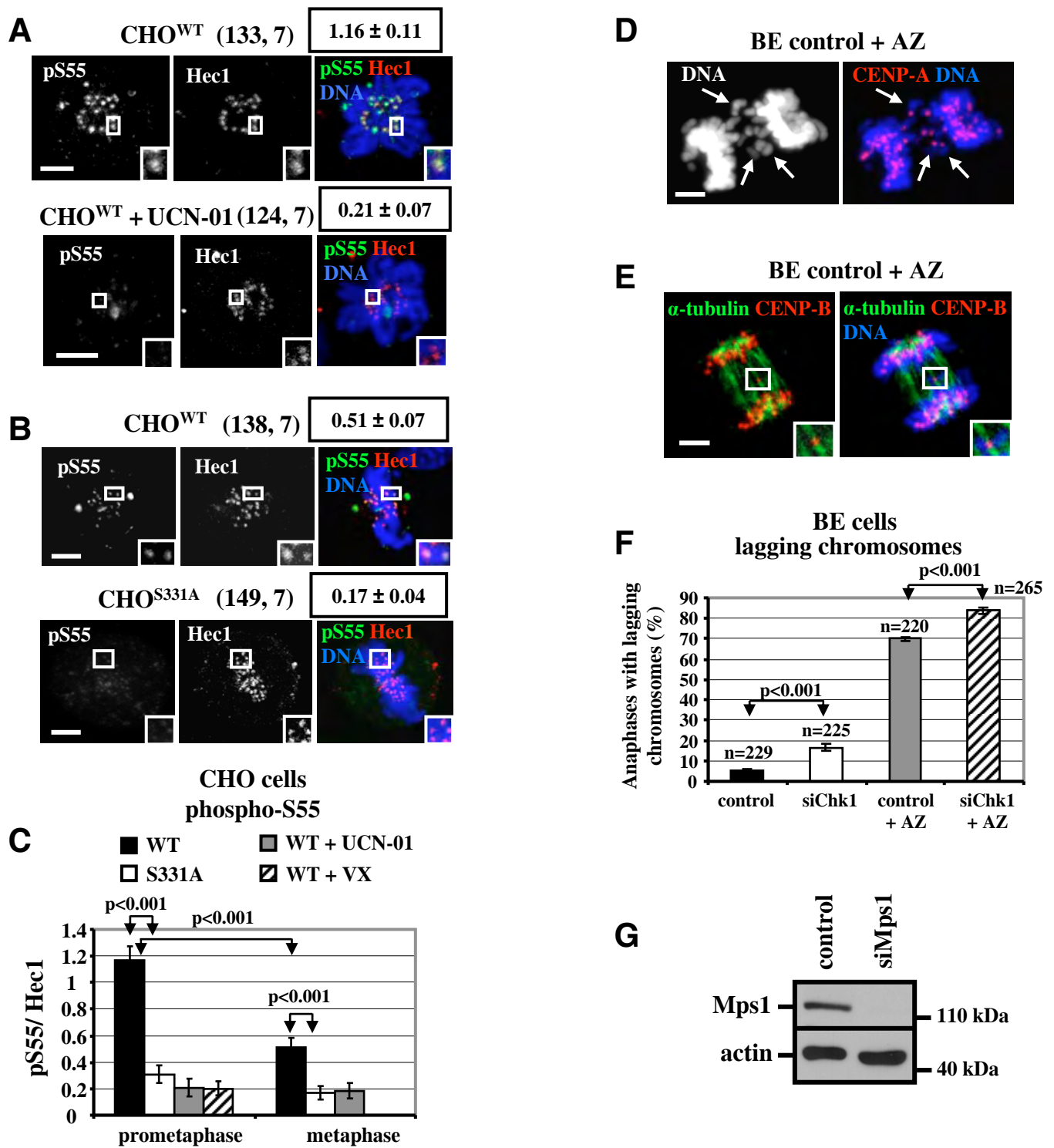


Fig. S4. Expression of S331A Aurora-B diminishes phosphorylation of Hec1 Ser55. (A,B) Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were untreated or treated with UCN-01 for 3 h. Hec1 Ser55 phosphorylation in prometaphase (A) and metaphase (B) cells is shown. Boxed values show mean pS55/Hec1 fluorescence intensity. Green: pS55; Red: Hec1; Blue: DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. (C) Mean pS55/Hec1 fluorescence intensity values at kinetochores. Tetracycline-induced CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were untreated, treated with UCN-01 or VX680 (VX) for 3 h. Error bars show the standard deviation from the mean. (D,E) Example of anaphases with lagging chromosomes (D) and a merotelic attachment (E) in BE cells transfected with negative siRNA (control) and treated with AZ3146 (AZ) for 3 h. (D) Lagging chromosomes are indicated by arrows. Red: CENP-A; Blue: DNA. (E) Green: α -tubulin; Red: CENP-B; Blue: DNA. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m. (F) Frequencies of anaphases with lagging chromosomes. BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were untreated or treated with AZ3146 (AZ) for 3 h and analyzed in anaphase. Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. A minimum of 60 anaphases were analyzed for each experiment. n, total number of anaphases tested. (G) Western blot analysis of total Mps1 and actin in BE cells transfected with negative siRNA (control) or Mps1 siRNA (siMps1).

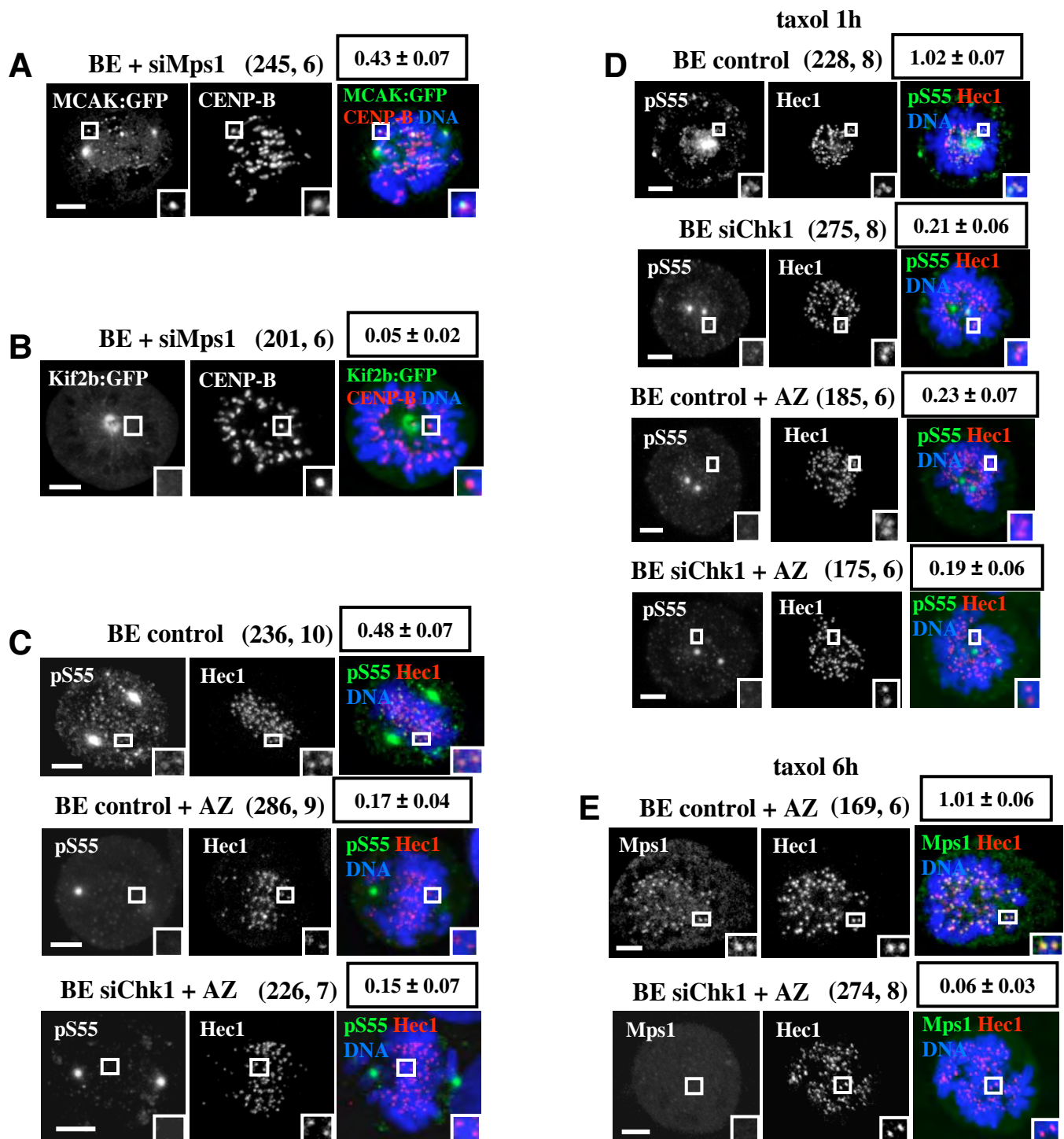


Fig. S5. Inhibition of Mps1 diminishes Hec1 Ser55 phosphorylation. (A,B) Localisation of MCAK:GFP (A) and Kif2b:GFP (B) in BE cells transfected with Mps1 siRNA (siMps1). Boxed values show mean GFP/CENP-B fluorescence intensity. Green: GFP; Red: CENP-B; Blue: DNA. (C,D) Hec1 Ser55 phosphorylation. (C) BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were treated with AZ3146 (AZ) for 3 h and analysed in metaphase. (D) BE cells transfected as in (C) were treated with AZ3146 (AZ), taxol and MG132 for 1 h. Boxed values show mean pS55/Hec1 fluorescence intensity. Green: pS55; Red: Hec1; Blue: DNA. (E) Localization of Mps1. BE cells transfected as in (C) were treated with AZ3146 (AZ), taxol and MG132 for 6 h. Boxed values show mean Mps1/Hec1 fluorescence intensity. Green: Mps1; Red: Hec1; Blue: DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

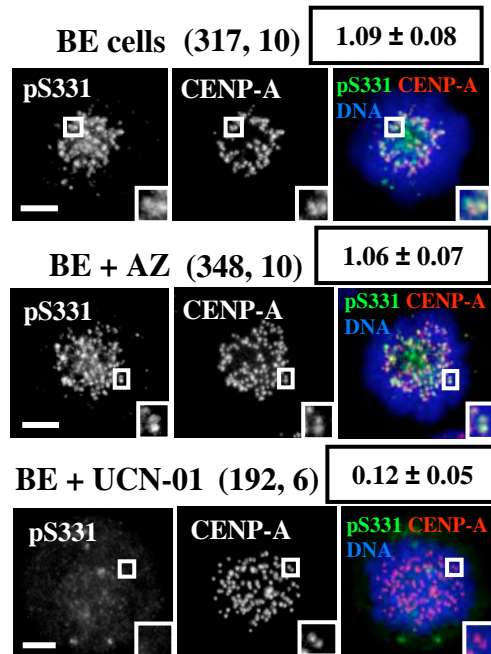


Fig. S6. Inhibition of Mps1 does not reduce Ser331 phosphorylation. BE cells were untreated, treated with AZ3146 (AZ) or UCN-01 for 3 h. Boxed values show mean pS331/CENP-A fluorescence intensity. Green: pS331; Red: CENP-A; Blue: DNA. Values in brackets represent kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation

Eleni Petsalaki,¹ Tonia Akoumianaki,¹ Elizabeth J. Black,² David A.F. Gillespie,² and George Zachos¹

¹Department of Biology, University of Crete, Heraklion 71409, Greece

²The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow G61 1BD, Scotland, UK

Aurora B kinase activity is required for successful cell division. In this paper, we show that Aurora B is phosphorylated at serine 331 (Ser331) during mitosis and that phosphorylated Aurora B localizes to kinetochores in prometaphase cells. Chk1 kinase is essential for Ser331 phosphorylation during unperturbed prometaphase or during spindle disruption by taxol but not nocodazole. Phosphorylation at Ser331 is required for optimal phosphorylation of INCENP at TSS residues, for Survivin association with the chromosomal passenger complex, and for complete Aurora B activation, but it is

dispensable for Aurora B localization to centromeres, for autophosphorylation at threonine 232, and for association with INCENP. Overexpression of Aurora B^{S331A}, in which Ser331 is mutated to alanine, results in spontaneous chromosome missegregation, cell multinucleation, unstable binding of BubR1 to kinetochores, and impaired mitotic delay in the presence of taxol. We propose that Chk1 phosphorylates Aurora B at Ser331 to fully induce Aurora B kinase activity. These results indicate that phosphorylation at Ser331 is an essential mechanism for Aurora B activation.

Introduction

The conserved kinase Aurora B is an important regulator of mitotic cell division (Carmena et al., 2009). Aurora B forms the catalytic core of the chromosomal passenger complex (CPC), which includes the regulatory proteins INCENP, Survivin, and Borealin (Carmena et al., 2009). The CPC associates with the centromere from prophase until metaphase and transfers to the spindle midzone in anaphase and the midbody in late cytokinesis, and Aurora B localization requires all three regulatory subunits of the CPC (Carvalho et al., 2003; Honda et al., 2003; Jeyaprasath et al., 2007). Furthermore, Survivin directly interacts with Aurora B and the N terminus of INCENP and mediates targeting of the CPC to chromosomes (Wheatley et al., 2001; Vader et al., 2006; Kelly et al., 2010).

Aurora B has a well-established function in promoting release of misattached kinetochore microtubules until bipolar attachment is achieved (Tanaka et al., 2002; Liu et al., 2009). Furthermore, Aurora B is required for cleavage furrow ingression (Fuller et al., 2008), and impaired Aurora B activity correlates with chromosome misalignment in metaphase, missegregated chromosomes during anaphase, and failure of cytokinesis (Adams et al., 2001; Ditchfield et al., 2003).

Aurora B is also involved in the spindle checkpoint, a surveillance mechanism that delays anaphase until all chromosomes are correctly bioriented; however, its precise role is a matter of active investigation (Nezi and Musacchio, 2009). In budding yeast, Ipl1/Aurora is required for spindle checkpoint function in response to a lack of tension across attached kinetochores (Biggins and Murray, 2001; Cheeseman et al., 2002). In higher eukaryotic cells, catalytic activity of Aurora B is required for recruitment of checkpoint protein BubR1 to kinetochores and sustained mitotic arrest in the absence of tension (Ditchfield et al., 2003; Lampson and Kapoor, 2004). Furthermore, recent studies in yeast (Pinsky et al., 2009; Vanoosthuyse and Hardwick, 2009) and vertebrate cells (Maldonado and Kapoor, 2011; Santaguida et al., 2011; Saurin et al., 2011) have shown that potent inhibition of Aurora B activity weakens the mitotic arrest in the presence of many unattached kinetochores.

Aurora B is associated with INCENP throughout the cell cycle; however, Aurora B kinase activity peaks in mitosis (Bolton et al., 2002). Activation of Aurora B occurs through a two-step mechanism: in the first step, Aurora B binds to the

Correspondence to George Zachos: gzachos@biology.uoc.gr

Abbreviation used in this paper: CPC, chromosomal passenger complex.

© 2011 Petsalaki et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/10/20/jcb.201104023.DC1.html>

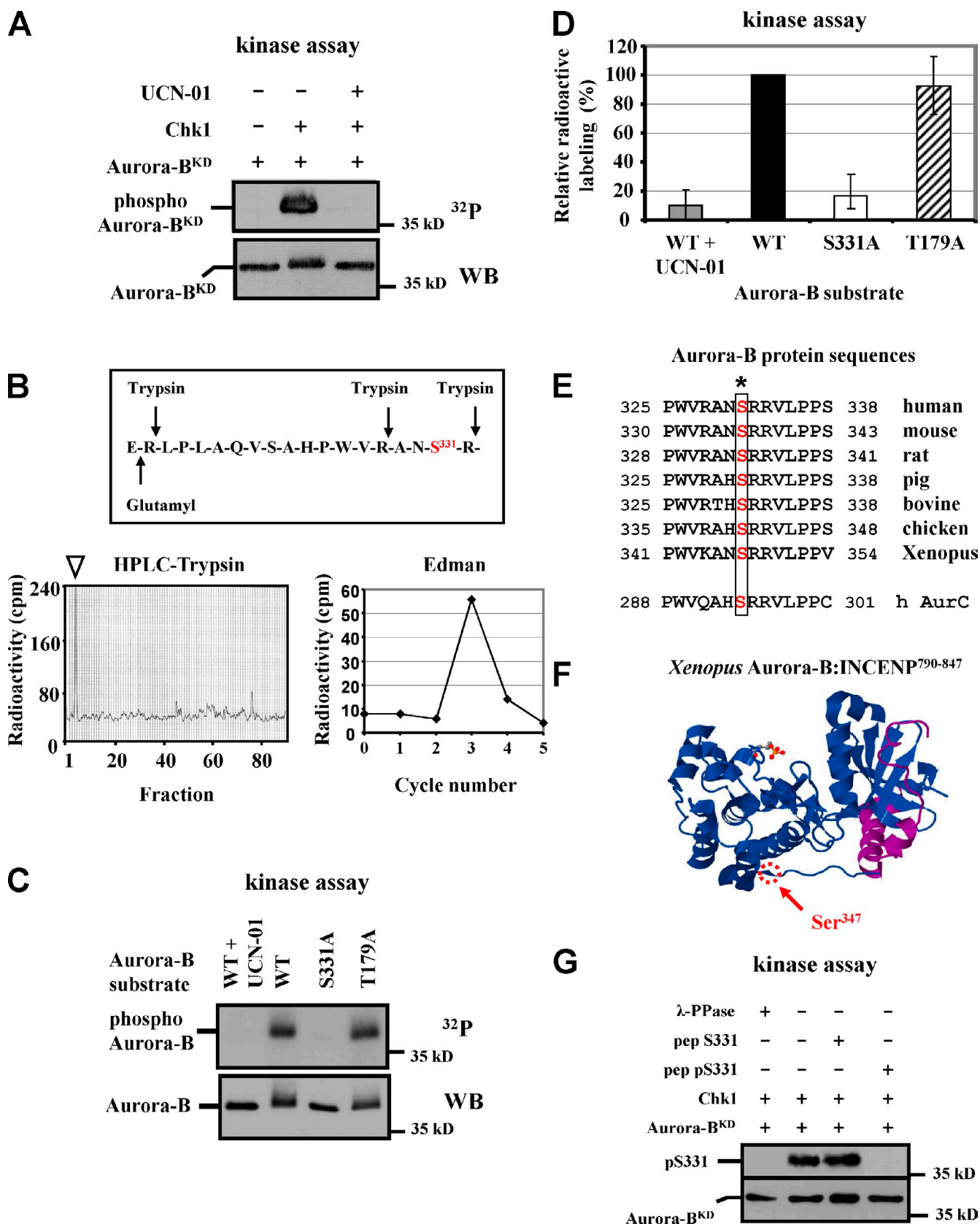


Figure 1. Chk1 phosphorylates Aurora B at Ser331. (A) Chk1 in vitro kinase assay. (top) Autoradiography analysis (³²P) of phosphorylated (phospho) Aurora B^{KD}. (bottom) Western blot (WB) analysis of total Aurora B^{KD}. (B) Mapping the Chk1 phosphorylation site. (top) Amino acids inclusive and surrounding Ser331 (S³³¹) showing N terminal trypsin and glutamyl endopeptidase cleavage sites. (bottom left) HPLC analysis of radiolabeled Aurora B^{KD} after digestion with trypsin. The main radioactive fraction is indicated by an arrowhead. (bottom right) Edman degradation analysis of the phosphopeptide from the main radioactive fraction. The graph shows radioactivity released from the membrane. (C) Chk1 in vitro kinase assay using purified proteins Aurora B^{WT}

C-terminal IN box sequence of INCENP spanning amino acids 822–900 (human numbering) and is autophosphorylated at threonine 232 (Thr232) within its activation loop (Honda et al., 2003; Yasui et al., 2004). This step represents an intermediate state of Aurora B activation in which the Aurora B C-terminal tail stabilizes an open conformation of the catalytic cleft (Sessa et al., 2005). In the second step, Aurora B phosphorylates INCENP in trans at two adjacent serine residues of the conserved TSS sequence (Bishop and Schumacher, 2002; Honda et al., 2003). Phosphorylation of the TSS motif and release of the Aurora B C-terminal tail through an undescribed mechanism generate the fully active kinase (Sessa et al., 2005). TD-60, microtubules, and priming phosphorylation of Aurora B substrates by Plk1 and haspin catalyze the first step of Aurora B activation in vitro (Rosasco-Nitcher et al., 2008). Furthermore, local clustering at chromosomes stimulates Aurora B autoactivation, and Mps1 kinase phosphorylates Borealin to enhance Aurora B activity by an unknown mechanism (Kelly et al., 2007; Jelluma et al., 2008).

Chk1 kinase is a well-established component in the DNA damage and DNA replication checkpoints (Smith et al., 2010). Furthermore, Chk1 protects cells against spontaneous chromosome missegregation and is required for sustained mitotic arrest in the presence of taxol, a drug that dampens microtubule dynamics and primarily interferes with kinetochore tension but not when microtubules are completely depolymerized by nocodazole (Zachos et al., 2007; Peddibhotla et al., 2009). Spindle checkpoint failure in Chk1-deficient cells is associated with impaired localization of BubR1 to kinetochores and reduced Aurora B kinase activity. However, the mechanism of Aurora B regulation by Chk1 has not been previously described (Zachos et al., 2007).

In the present study, we identify the conserved residue serine 331 (Ser331) of human Aurora B as the Chk1 phosphorylation site in vitro and, using a phosphospecific antibody raised against this site, we show that Chk1 is required for Ser331 phosphorylation during unperturbed prometaphase or spindle disruption by taxol but not during prophase, cytokinesis, or treatment of cells with nocodazole. Furthermore, using cells overexpressing wild-type or nonphosphorylatable S331A mutant Aurora B, we propose that Ser331 phosphorylation is required for optimal phosphorylation of INCENP at the TSS motif, Survivin association with the CPC, and complete Aurora B activation but not for Aurora B localization to centromeres, phosphorylation at Thr232, or association with INCENP. In addition, overexpression of S331A Aurora B results in spontaneous chromosome missegregation, cell multinucleation, defective accumulation of BubR1 at kinetochores, and impaired mitotic delay in response to taxol. On the basis of these findings, we propose that Ser331 phosphorylation by Chk1 is an essential mechanism for Aurora B activation.

Results

Chk1 phosphorylates Aurora B at Ser331 in vitro

Chk1 phosphorylated kinase-dead human Aurora B (Aurora B^{KD}) in vitro, and this phosphorylation was abolished in the presence of the selective Chk1 inhibitor UCN-01 (Fig. 1 A). To map the Chk1 phosphoacceptor sites, Aurora B^{KD} was radiolabeled by Chk1 and digested with Trypsin, and the resulting peptides were resolved by HPLC (Fig. 1 B). The phosphopeptide from the main radioactive fraction was subjected to Edman degradation, and radioactivity was released after three cycles (Fig. 1 B). This process was repeated after digestion of radiolabeled Aurora B^{KD} with glutamyl endopeptidase and resulted in a main radioactive fraction that released radioactivity after 17 cycles (Fig. S1, A and B). Ser331 is the only residue on human Aurora B consistent with both phosphorylation patterns. Therefore, our results suggest Ser331 is the main Chk1 phosphorylation site in vitro (Fig. 1 B).

To verify this, bacterially expressed wild-type Aurora B (Aurora B^{WT}), Aurora B^{S331A} harboring a nonphosphorylatable mutation of Ser331 to alanine (S331A), or Aurora B^{T179A}, in which threonine 179 was changed to alanine (negative control) was used as a substrate in Chk1 in vitro kinase assays. Mutation of Ser331 to alanine or inhibition of Chk1 activity by UCN-01 markedly reduced substrate phosphorylation compared with Aurora B^{WT} (Fig. 1, C and D). In comparison, phosphorylation of Aurora B^{T179A} by Chk1 was similar to Aurora B^{WT} (Fig. 1, C and D). These results show that Chk1 phosphorylates human Aurora B at Ser331 in vitro.

Multiple sequence alignment demonstrated that Ser331 is conserved in Aurora B proteins from different species and also in human Aurora C, an Aurora parologue that exhibits structural properties similar to Aurora B and can perform related mitotic functions in the absence of Aurora B (Fig. 1 E; Han et al., 2007; Slattery et al., 2009). Ser331 is located at the foot of the Aurora B C-terminal tail, which interacts with the IN box of INCENP in the partially active complex (Fig. 1 F; Sessa et al., 2005).

To further investigate Ser331 phosphorylation, an antiphospho-Ser331 (anti-pS331) antiserum was raised against the human protein sequence. As shown in Fig. 1 G, this antiserum recognized Aurora B^{KD} phosphorylated by Chk1 in vitro, and immunoreactivity was abolished after substrate treatment with λ protein phosphatase (Fig. 1 G, λ -PPase) or incubation of the antiserum with the phosphorylated (Fig. 1 G, pep pS331) but not the unphosphorylated (Fig. 1 G, pep S331) synthetic peptides.

(wild type [WT]), Aurora B^{S331A} (S331A), or Aurora B^{T179A} (T179A) as substrates. (top) Autoradiography analysis. (bottom) Western blot analysis of the reactions. (D) Densitometric analysis of Chk1 in vitro kinase assay from C. Radioactive labeling of the wild-type protein was plotted as 100%. Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. (E) Alignment of Aurora B and human Aurora C (h AurC) protein sequences. Ser331 is marked by asterisk. (F) View of *Xenopus* Aurora B–INCENP^{790–847} (blue and magenta ribbons, respectively) in complex with hesperadine (ball and stick model). Ser³⁴⁷ of *Xenopus* Aurora B (equivalent of human Ser331) is circled and indicated by an arrow. (G) Chk1 in vitro kinase assay. Western blot analysis of phosphorylated (pS331) and total Aurora B^{KD} using the anti-pS331 antiserum. λ -PPase, λ protein phosphatase; pep S331, unphosphorylated Ser331 synthetic peptide; pep pS331, phospho-S331 synthetic peptide.

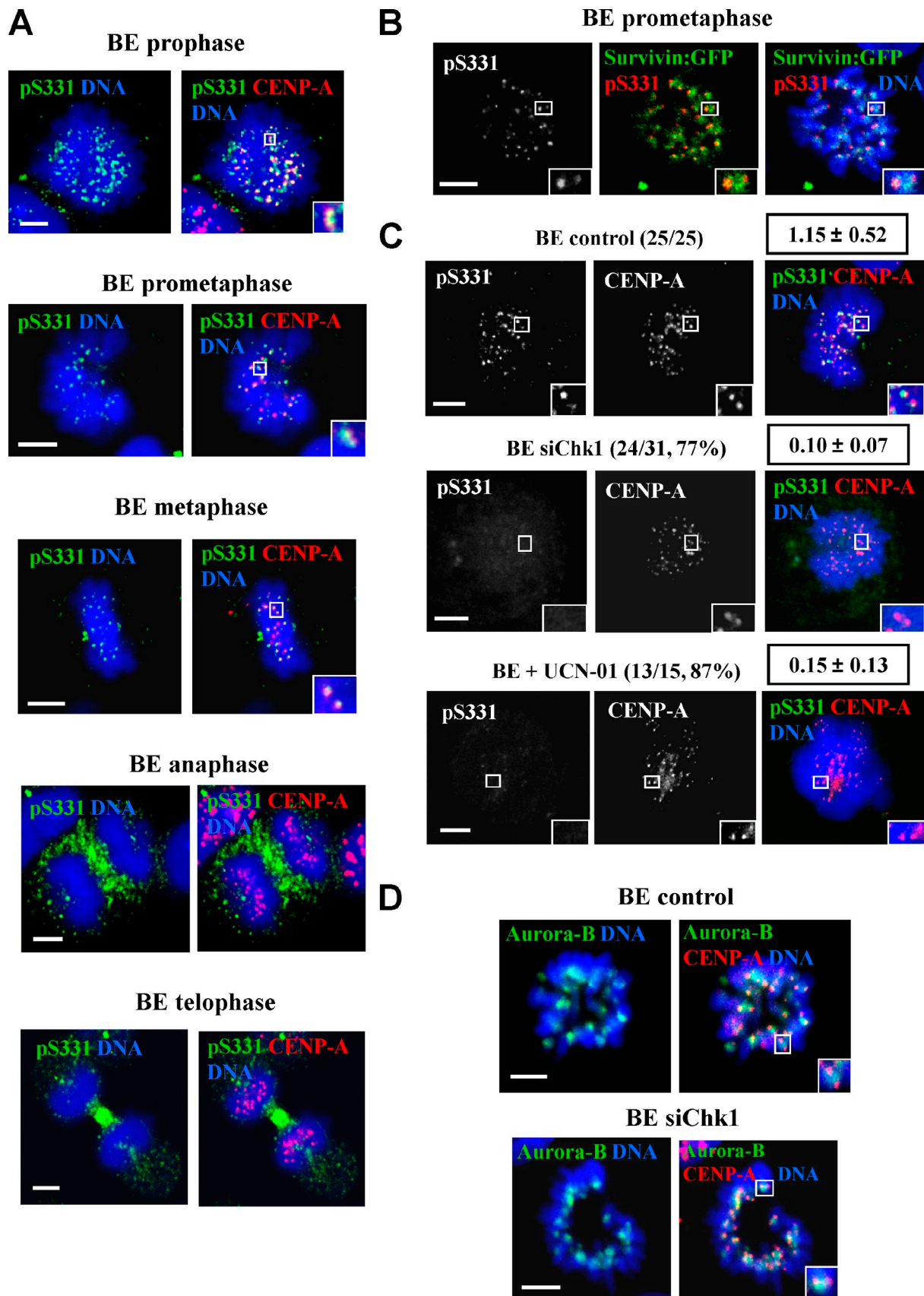


Figure 2. Chk1 is required for Ser331 phosphorylation during unperturbed prometaphase. (A) Ser331 phosphorylation (pS331) in BE cells during unperturbed mitosis. (B) Localization of pS331 and Survivin-GFP. (C) BE cells were transfected with negative siRNA (control) and Chk1 siRNA (siChk1) or treated with UCN-01 for 16 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pS331/CENP-A fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (D) Localization of total Aurora B in BE cells transfected as in C. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

Table I. pS331 fluorescence intensity values at prometaphase kinetochores

Treatment	BE control		BE siChk1		P-values
	Fluorescence intensity (pS331/CENP-A)	n (kinetochore pairs, cells)	Fluorescence intensity (pS331/CENP-A)	n (kinetochore pairs, cells)	
Unperturbed	1.15 ± 0.52	196, 12	0.10 ± 0.07	80, 12	P < 0.01
Taxol	0.87 ± 0.43	188, 12	0.08 ± 0.06	174, 12	P < 0.01
Nocodazole	0.88 ± 0.45	162, 12	0.92 ± 0.44	193, 12	P = 0.76

Mean fluorescence intensity values are normalized to CENP-A staining, and *n* represents the number of kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. The p-values were calculated using the Student's *t* test.

Aurora B is phosphorylated at Ser331 in mitosis

Confocal microscopy analysis of BE human colon carcinoma cells during unperturbed prometaphase showed that pS331 Aurora B was juxtaposed to CENP-A, near kinetochores (Fig. 2 A), whereas total Aurora B localized along the extended centromere as previously described (Fig. 2 D; Cooke et al., 1987). Importantly, pS331 staining was only detectable in the presence of the protein phosphatase inhibitor microcystin, thus suggesting that pS331 is sensitive to phosphatase activity (Gorbsky and Ricketts, 1993). Furthermore, pS331 localized to kinetochores during prophase and metaphase, to the midzone in anaphase and the midbody in telophase and late cytokinesis (Fig. 2 A). In addition, BE cells transiently expressing Survivin fused to GFP (Survivin-GFP) exhibited pS331 juxtaposed to Survivin-GFP, near kinetochores (Fig. 2 B). Depletion of Aurora B expression by transient transfection of BE cells with Aurora B siRNA (Fig. S1 C, siAurora B) impaired pS331 staining at prometaphase kinetochores (Fig. S1 D). In some cells, pS331 staining was also detectable at centrosomes; however, this signal persisted after depletion of Aurora B by siRNA and was likely spurious (Fig. S1 E; Posch et al., 2010). Furthermore, pS331 kinetochore staining was reduced after incubation of the anti-pS331 antiserum with the phosphorylated peptide pS331 compared with the unphosphorylated peptide S331 synthetic peptides (Fig. S1 F). These results show that pS331 localizes to kinetochores in unperturbed prometaphase, the midzone in anaphase, and the midbody in telophase and cytokinesis.

Chk1 is required for Ser331 phosphorylation during unperturbed prometaphase

To investigate the role of Chk1 for Ser331 phosphorylation, BE cells transiently transfected with negative siRNA (control), Chk1 siRNA (siChk1), or treated with UCN-01 were analyzed by confocal microscopy (Figs. 2 C and S2 A). Depletion of Chk1 or inhibition of Chk1 kinase activity by UCN-01 diminished pS331 staining at prometaphase kinetochores as indicated by reduced pS331/CENP-A fluorescence intensity compared with controls (Fig. 2 C and Tables I and S1). Significantly, impaired pS331 staining after Chk1 depletion was not caused by reduced levels of Aurora B expression (Fig. S2 B). Furthermore, total Aurora B localized to centromeres in all control (22/22) and Chk1-depleted (20/20) cells examined in prometaphase (Fig. 2 D). These results show that Chk1 activity is required for optimal phosphorylation of Aurora B at Ser331 during

unperturbed prometaphase. Remarkably, depletion of Chk1 did not detectably reduce pS331 staining compared with controls in prophase or cytokinesis (Fig. S2, C and D).

Chk1 is required for Ser331 phosphorylation in the presence of taxol

Treatment with taxol or nocodazole activates the spindle checkpoint in checkpoint-proficient cells (Zachos et al., 2007). In the presence of taxol, Chk1-depleted BE cells exhibited impaired pS331 staining at prometaphase kinetochores compared with controls (Fig. 3 A and Table I). In contrast, after treatment with nocodazole, Chk1-depleted and control BE cells exhibited similar levels of pS331 at kinetochores (Fig. 3 B and Table I). Importantly, total Aurora B localized to centromeres in the presence of taxol or nocodazole in all control (17/17) and Chk1-depleted (20/20) cells examined in prometaphase (Fig. 3 C). Collectively, these results show that Chk1 is required for Ser331 phosphorylation in the presence of taxol but not nocodazole.

Generation of CHO^{WT} and CHO^{S331A} cell lines

To investigate the significance of Ser331 phosphorylation for Aurora B functions, CHO cells expressing 6xMyc-tagged Aurora B^{WT} (CHO^{WT}) or Aurora B^{S331A} (CHO^{S331A}) under control of a tetracycline-induced promoter were generated. Addition of tetracycline for 8–24 h stimulated accumulation of 6xMyc–Aurora B^{WT} and 6xMyc–Aurora B^{S331A} at approximate levels 10-fold higher than the endogenous protein (Figs. 3 D and S2 E). This level of expression was selected to disrupt endogenous Aurora B functions while maintaining correct localization of wild-type 6xMyc–Aurora B to centromeres (Ditchfield et al., 2003). After induction with tetracycline, 6xMyc–Aurora B^{WT} and 6xMyc–Aurora B^{S331A} proteins localized to centromeres during unperturbed prometaphase in all (30/30) cells examined (Fig. 3 E). Similar results were obtained in the presence of taxol or nocodazole (Fig. 3 F) in all (30/30) cells examined. Please note that CENP-B localizes to sister kinetochores in CHO cells (Cooke et al., 1990; Wordeman and Mitchison, 1995). Furthermore, CHO cells expressing wild-type, but not the S331A mutant, Aurora B exhibited pS331 staining (Figs. 4 A and S2 F), and pS331 was juxtaposed to CENP-A–GFP in prometaphase (Fig. 4 A).

Phosphorylation at Ser331 is required for optimal Aurora B kinase activity

To investigate the significance of Ser331 phosphorylation for Aurora B catalytic activity, CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells induced with tetracycline were treated with taxol or nocodazole, and

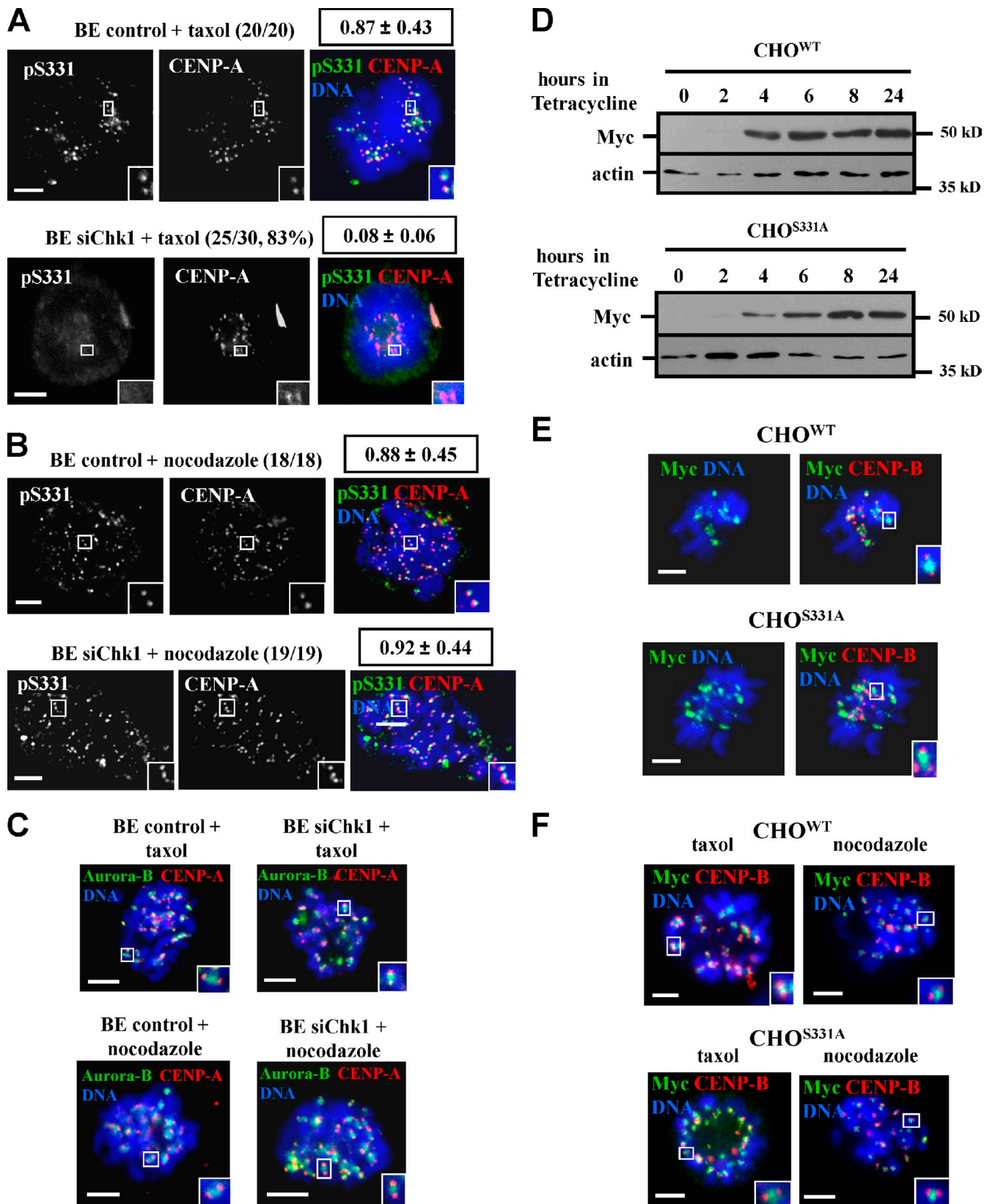


Figure 3. Chk1 is required for Ser331 phosphorylation in the presence of taxol. (A and B) BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were treated with taxol (A) or nocodazole (B) for 4 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pS331/CENP-A fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (C) Localization of total Aurora B. BE cells were transfected as in A and treated with taxol or nocodazole for 4 h. (D) Western blot analysis of 6×Myc–Aurora B (Myc) and actin in CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells after induction with tetracycline. (E and F) Localization of 6×Myc–Aurora B proteins. Tetracycline-induced CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were untreated (E) or treated with taxol or nocodazole (F) for 4 h. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μm.

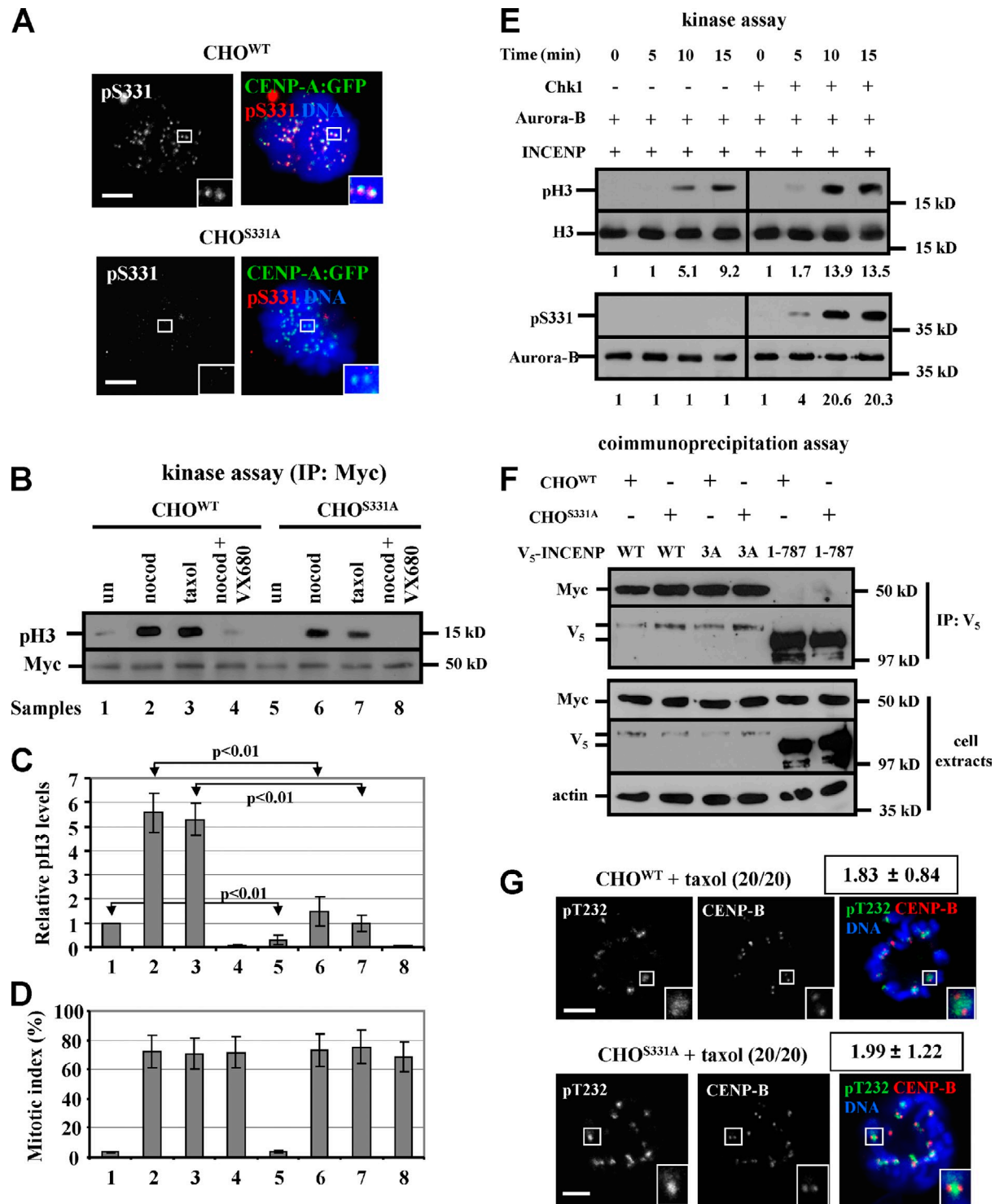


Figure 4. Phosphorylation of Ser331 is required for complete Aurora B activation. (A) Phosphorylation of Ser331 (pS331) during unperturbed prometaphase. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells expressing CENP-A-GFP were induced with tetracycline. (B) Immunoprecipitation kinase assay. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells induced with tetracycline were untreated (un) or treated with nocodazole (nocod) or taxol for 8 h in the absence or presence of VX-680. (top) Western blot analysis of Myc-associated phosphorylation of Ser10 of histone H3 (pH3). (bottom) Western blot of immunoprecipitated (IP) Myc. (C) Densitometric analysis of pH3 levels from B. pH3 levels in sample 1 were arbitrarily set to 1. Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. The p-values were calculated using the Student's *t* test. (D) Mitotic index of each sample from B at the time of harvesting (untreated or shake-off cells). (E) In vitro kinase assay. Complexes of purified Chk1, Aurora B, and GST-INCENP⁸²⁶⁻⁹¹⁹ were incubated with histone H3, and pH3 (top) or pS331 activities (bottom) were determined. Values show the relative levels of pH3 or pS331, and levels at 0 min were arbitrarily set to 1. Western blot analysis of total H3 and Aurora B is also shown. Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (F) Coimmunoprecipitation assay. (top) Western blot analysis of immunoprecipitated (IP) 6xMyc-Aurora B (Myc) and V₅-INCENP (V₅) after induction of CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells with tetracycline. (bottom) Western blot analysis of total Myc, V₅, and actin. (G) Phosphorylation of Thr232 (pT232). CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline and treated with taxol for 4 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pT232/CENP-B fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. Insets show magnified kinetochores. WT, wild type. Bars, 5 μ m.

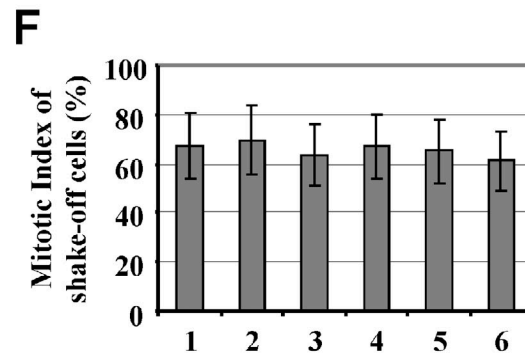
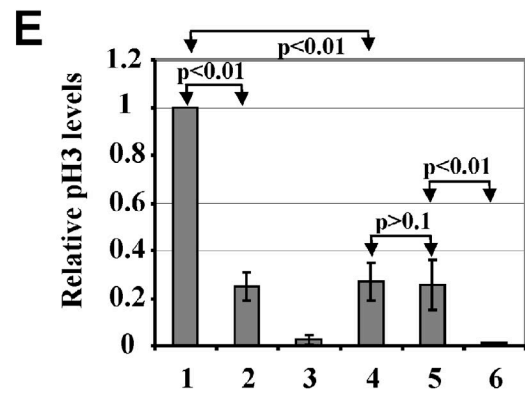
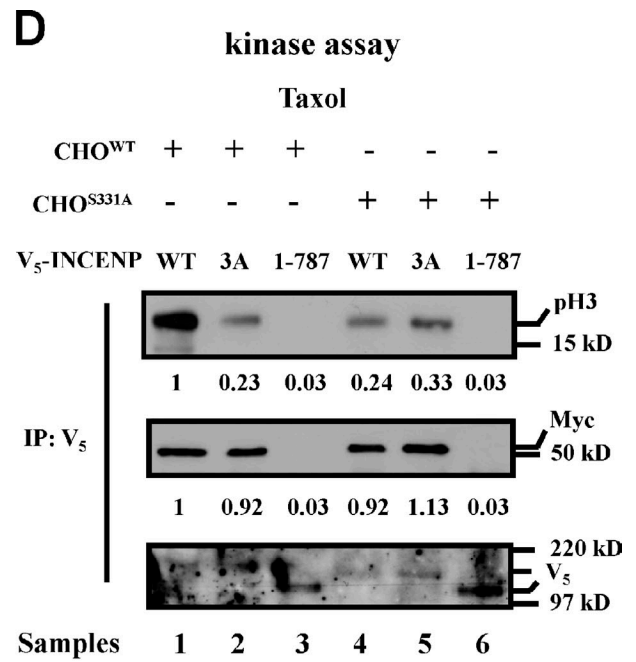
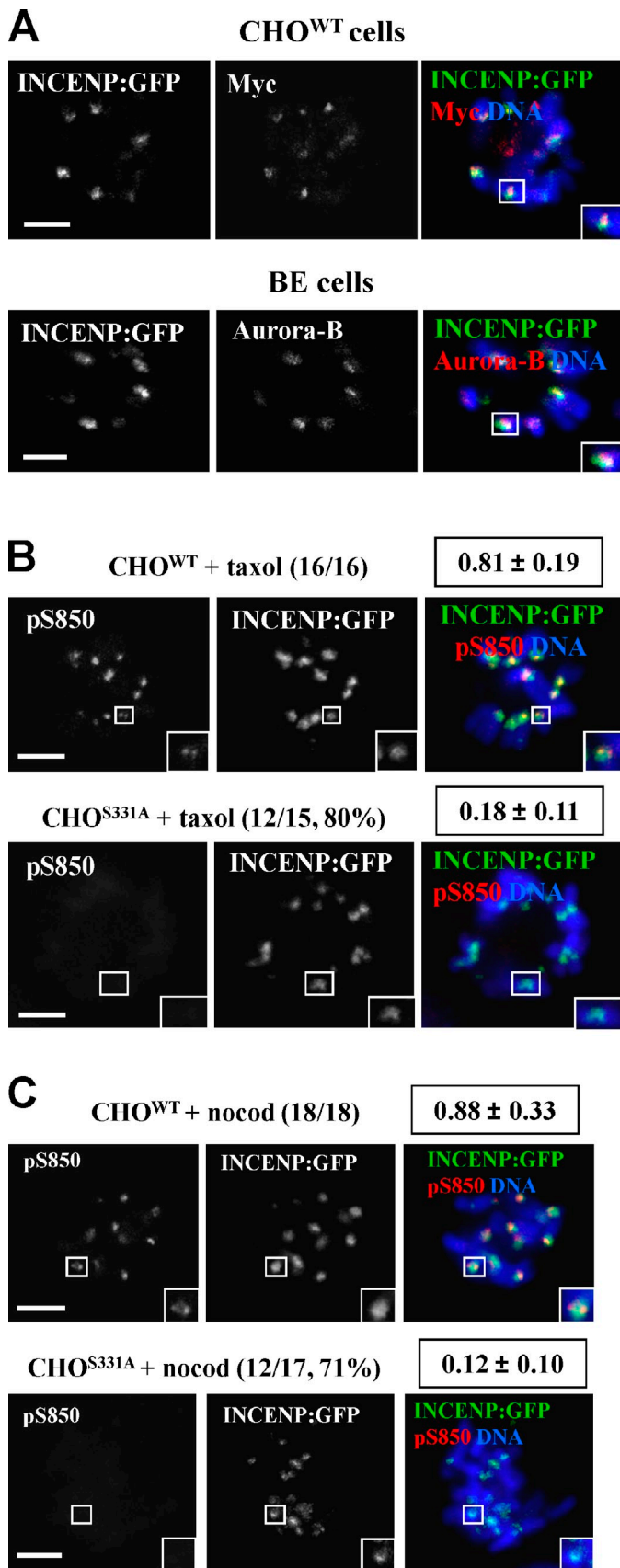


Figure 5. Phosphorylation of Ser331 is required for TSS phosphorylation. (A) Localization of INCENP-GFP. (top) CHO^{WT} cells expressing INCENP-GFP were induced with tetracycline. (bottom) BE cells expressing INCENP-GFP. (B and C) Phosphorylation of INCENP at Ser850 (pS850). CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells expressing INCENP-GFP were induced with tetracycline and treated with taxol (B) or nocodazole (nocod, C) for 4 h. The frequency of cells

Table II. pS850 fluorescence intensity values at prometaphase kinetochores

Treatment	CHO ^{WT} cells		CHO ^{S331A} cells		P-values
	Fluorescence intensity (pS850/GFP)	n (kinetochore pairs, cells)	Fluorescence intensity (pS850/GFP)	n (kinetochore pairs, cells)	
Taxol	0.81 ± 0.19	89, 10	0.18 ± 0.11	81, 10	P < 0.01
Nocodazole	0.88 ± 0.33	88, 11	0.12 ± 0.10	74, 10	P < 0.01

Mean fluorescence intensity values are normalized to GFP staining, and *n* represents the number of kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. The p-values were calculated using the Student's *t* test.

mitotic cells were selectively isolated by shake off or left untreated and harvested without shake off. Cell extracts were analyzed for Myc-associated kinase activity against histone H3 serine 10, a physiological substrate of Aurora B, by immunoprecipitation kinase assays (Adams et al., 2001). As shown in Fig. 4 B and quantified in Fig. 4 C, treatment with taxol or nocodazole induced H3 serine 10 phosphorylation (pH3) compared with untreated cells. However, pH3 activity was decreased in CHO^{S331A} compared with CHO^{WT} cells (Fig. 4, B and C) despite similar mitotic indices in the respective samples (untreated or shake-off cells) in both cell lines (Fig. 4 D). In comparison, VX-680 almost completely inhibited pH3 activity (Fig. 4, B and C).

Furthermore, we analyzed the ability of Chk1 to enhance Aurora B catalytic activity, indicated by pH3, in vitro (Zachos et al., 2007). Chk1 stimulated pH3 activity in the presence or absence of GST-INCENP⁸²⁶⁻⁹¹⁹, and this coincided with Aurora B phosphorylation at Ser331 (Figs. 4 E and S3 A). Collectively, these results suggest that Ser331 phosphorylation is required for optimal Aurora B activation. Mutation of Ser331 to aspartate did not restore Aurora B kinase activity in immunoprecipitation kinase assays, thus suggesting that this mutation doesn't effectively mimic Ser331 phosphorylation in this case (unpublished data).

Ser331 phosphorylation is not essential for Aurora B binding to INCENP or Thr232 phosphorylation

Binding to INCENP and phosphorylation at Thr232 stimulate Aurora B activity. To investigate the significance of Ser331 phosphorylation for Aurora B association with INCENP, CHO^{WT}, or CHO^{S331A}, cells transiently expressing V₅-tagged human INCENP were induced with tetracycline, V₅-INCENP was precipitated from cell extracts using an antibody against V₅, and associated 6xMyc-Aurora B was detected by Western blotting against Myc. As shown in Fig. 4 F, similar levels of wild-type or S331A Aurora B precipitated with wild-type V₅-INCENP^{WT} or mutant V₅-INCENP^{3A}, in which the TSS motif was changed to AAA (Honda et al., 2003). In comparison, 6xMyc-Aurora B proteins did not associate with truncated V₅-INCENP¹⁻⁷⁸⁷ lacking the

C-terminal segment for binding to Aurora B (Fig. 4 F). Furthermore, similar levels of wild-type or S331A Aurora B precipitated with V₅-INCENP^{WT} after treatment of cells with taxol or nocodazole (Fig. S3 B). These results suggest that phosphorylation at Ser331 is not required for Aurora B association with INCENP.

Furthermore, CHO cells expressing wild-type or S331A Aurora B exhibited similar levels of phospho-Thr232 (pT232) Aurora B at centromeres in the presence of taxol (Fig. 4 G and Table S1) or nocodazole (Fig. S3 C and Table S1) as determined by pT232/CENP-B fluorescence intensity levels. Collectively, these results suggest that phosphorylation at Ser331 is not required for Aurora B binding to INCENP or phosphorylation at Thr232.

Ser331 phosphorylation is required for INCENP phosphorylation at TSS residues

Phosphorylation of the TSS motif is required for full Aurora B activation. To investigate phosphorylation at TSS residues, CHO^{WT}, CHO^{S331A}, or BE cells transiently expressing *Xenopus laevis* INCENP fused to GFP (INCENP-GFP) were examined for phosphorylation at Ser850 (pS850) inside the *Xenopus* TSS motif by confocal microscopy (Knowlton et al., 2006). INCENP-GFP colocalized with 6xMyc-Aurora B in CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells and also with endogenous Aurora B in BE cells (Fig. 5 A and not depicted).

After induction with tetracycline and treatment with taxol or nocodazole, CHO^{WT} prometaphase cells exhibited pS850 staining, and pS850 partially colocalized with INCENP-GFP near kinetochores (Fig. 5, B and C). In contrast, CHO^{S331A} cells exhibited diminished pS850 staining compared with controls as shown by pS850/INCENP-GFP fluorescence intensity (Fig. 5, B and C; and Table II).

Furthermore, BE cells expressing INCENP-GFP and treated with UCN-01 exhibited reduced pS850 staining compared with controls in the presence of taxol (Fig. S3 D and Table S1). Remarkably, in the presence of nocodazole, both control and UCN-01-treated BE cells exhibited similar levels of pS850 staining (Fig. S3 E and Table S1), and this is consistent with Chk1 being required for Ser331 phosphorylation in

exhibiting the respective phenotype and mean pS850/INCENP-GFP fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (D) Immunoprecipitation kinase assay. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells expressing V₅-INCENP were induced with tetracycline and treated with taxol for 8 h. (top) Western blot analysis of V₅-associated phosphorylation of Ser10 of histone H3 (pH3). (middle and bottom) Western blot analysis of immunoprecipitated Myc and V₅. Values show the relative pH3 and Myc levels with levels at sample 1 arbitrarily set to 1. (E) Densitometric analysis of pH3 levels from D. The p-values were calculated using the Student's *t* test. (F) Mitotic index of each sample from D at the time of harvesting. Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. Insets show magnified kinetochores. WT, wild type. Bars, 5 μm.

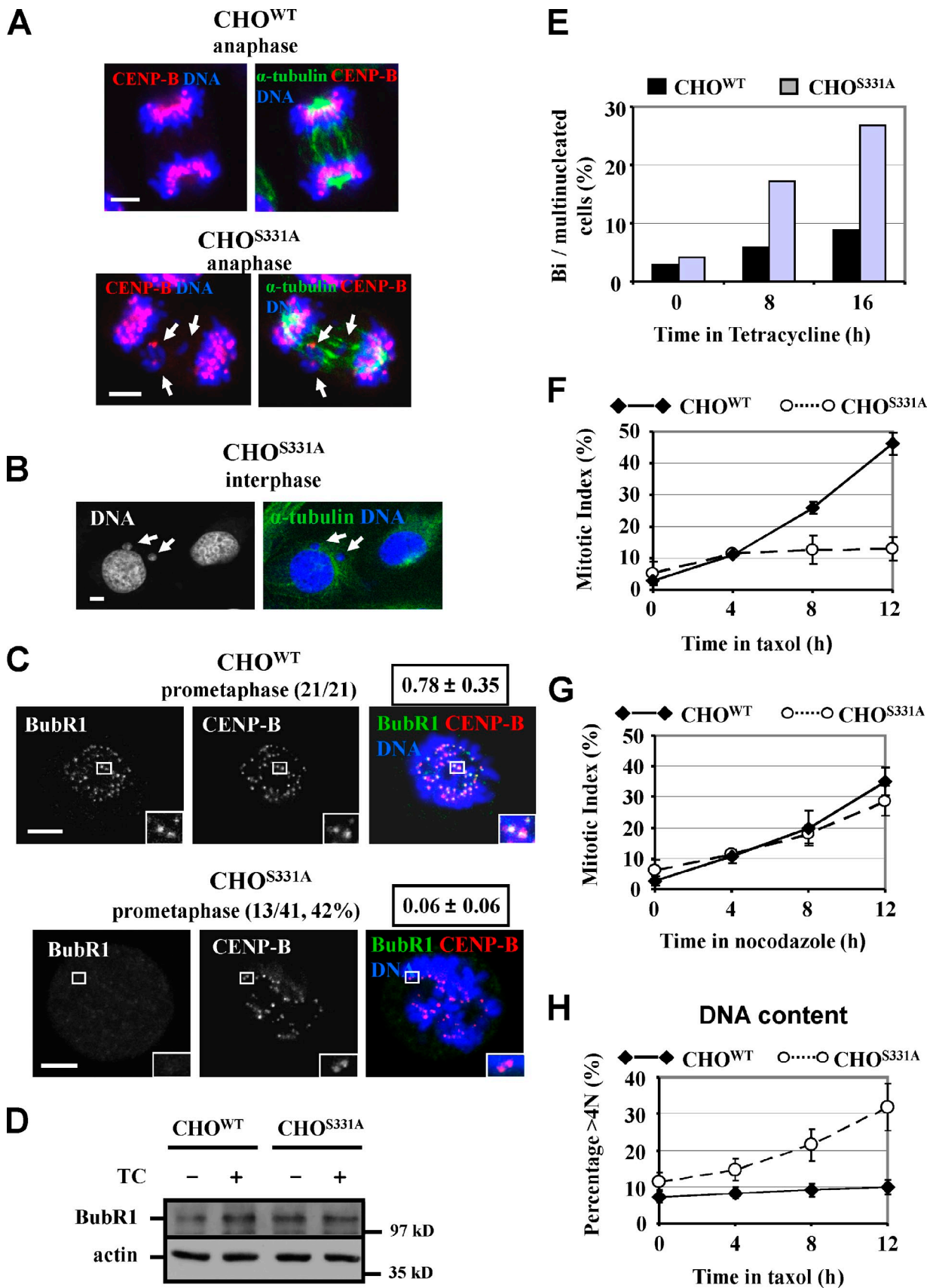


Figure 6. Expression of S331A Aurora B correlates with chromosome missegregation and impaired accumulation of BubR1 at kinetochores. (A–E) CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline. (A) Missegregated chromosomes are indicated by arrows. (B) Micronuclei are indicated by arrows. A single image plane is shown. (C) Localization of BubR1. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean BubR1/CENPB fluorescence

the presence of taxol but not nocodazole. Collectively, these results suggest that phosphorylation at Ser331 is required for optimal phosphorylation of INCENP at TSS residues.

Phosphorylations at Ser331 and TSS stimulate complete Aurora B activation

To further investigate the mechanism of Aurora B activation, CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells transiently expressing V₅-INCENP were treated with tetracycline and taxol, mitotic cells were selectively isolated by shake off, and V₅-associated pH3 activity was determined by immunoprecipitation kinase assay. As shown in Fig. 5 D and quantified in Fig. 5 E, cells expressing 6×Myc–Aurora B^{WT}/V₅-INCENP^{3A} or 6×Myc–Aurora B^{S331A}/V₅-INCENP^{WT} exhibited reduced levels of pH3 activity compared with those expressing the wild-type complex despite similar mitotic indices in shake-off cells in all samples (Fig. 5 F). Significantly, mutation of both Ser331 and TSS to alanine did not further reduce pH3 activity (Fig. 5, D and E), and this is consistent with Ser331 being required for TSS phosphorylation. In comparison, V₅-associated pH3 activity was almost undetectable in cells expressing truncated V₅-INCENP¹⁻⁷⁸⁷ (Fig. 5, D and E). These results show that phosphorylations at Ser331 and TSS are required for complete Aurora B activation.

Expression of S331A Aurora B correlates with spontaneous chromosome missegregation, impaired accumulation of BubR1 at kinetochores, and cell multinucleation

Reduced Aurora B activity is associated with defects in chromosome alignment, segregation, and cytokinesis. Microscopic examination of CHO^{S331A} cells after induction with tetracycline revealed that 20/50 (40%) of metaphases exhibited misaligned chromatin (Fig. S4 A), and 23/50 (46%) of anaphases showed one or few missegregated chromosomes (Fig. 6 A) compared with only 5/50 (10%) and 4/50 (8%), respectively, in CHO^{WT} cells. Missegregated chromosomes can give rise to micronuclei (Gisselsson, 2008). After induction with tetracycline for 16 h, 26/136 (19%) of CHO^{S331A} cells in interphase exhibited one or few micronuclei compared with 4/121 (3%) of CHO^{WT} cells (Fig. 6 B).

Furthermore, CHO^{S331A} cells induced with tetracycline exhibited impaired accumulation of BubR1 at prometaphase kinetochores as shown by reduced BubR1/CENP-B fluorescence intensity compared with controls (Fig. 6 C and Table S1). However, BubR1 levels per se were not diminished by overexpression of Aurora B transgenes (Fig. 6 D).

Incomplete cytokinesis can cause bi- or multinucleation (Xu et al., 2010). In the presence of tetracycline, CHO^{S331A} cells exhibit a rapid increase in the bi/multinucleation index compared with CHO^{WT} cells (Figs. 6 E and S4 B). Collectively, these

results suggest that phosphorylation of Aurora B at Ser331 is required for optimal chromosome alignment and segregation, accumulation of BubR1 at kinetochores, and successful cytokinesis in the absence of spindle poisons.

Phosphorylation of Ser331 is required for sustained mitotic delay and BubR1 maintenance to kinetochores in the presence of taxol

Furthermore, treatment with tetracycline and taxol induced accumulation of CHO^{WT} cells in mitosis as determined by microscopic examination of condensed chromatin (Fig. 6 F). In contrast, although the proportion of mitotic cells in CHO^{S331A} cultures treated with taxol initially increased, this increase was not sustained, and the mitotic index was significantly reduced after 8–12 h compared with CHO^{WT} cells (Fig. 6 F). Importantly, CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells treated with tetracycline and nocodazole accumulated in mitosis with similar kinetics (Fig. 6 G). Also, after prolonged treatment with taxol, ~30% of CHO^{S331A} cells accumulated DNA content greater than 4N as determined by flow cytometry (Fig. 6 H).

After treatment with taxol for 4 h, CHO^{S331A} cells exhibit reduced staining of BubR1 at kinetochores by approximately ninefold compared with CHO^{WT} cells as determined by BubR1/CENP-B fluorescence intensity (Fig. 7 A and Table S1). In contrast, after treatment with nocodazole for 4 h, CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells exhibit similar levels of BubR1 staining at kinetochores (Fig. 7 B and Table S1), therefore showing that kinetochores in CHO^{S331A} cells are capable of BubR1 binding. Importantly, after treatment with taxol for 1 h, BubR1 was readily detectable at kinetochores in CHO^{S331A} cells, and BubR1/CENP-B fluorescence intensity was reduced by only 1.3-fold compared with CHO^{WT} cells ($P = 0.036$; Fig. 7 C and Table S1). These results show that BubR1 is recruited to kinetochores in CHO^{S331A} cells in the presence of taxol and that it is BubR1 maintenance at kinetochores rather than its initial recruitment that is affected in CHO^{S331A} cells. Collectively, these results suggest that phosphorylation of Aurora B at Ser331 is required for sustained mitotic delay and BubR1 maintenance at kinetochores in the presence of taxol.

Inhibition of Mps1 does not further reduce Aurora B activity in Chk1-depleted cells

Mps1 enhances Aurora B activity. Depletion of Chk1 by siRNA or inhibition of Mps1 activity by AZ3146 in BE cells treated with taxol diminished Aurora B kinase activity by approximately threefold ($P < 0.001$) and 1.9-fold ($P < 0.001$), respectively, compared with controls, as indicated by lower levels of phosphorylated serine 7 (pS7) of CENP-A (Fig. 7 D and Table S1; Zeitlin et al., 2001; Hewitt et al., 2010). Significantly, treatment of Chk1-depleted cells with AZ3146 did not further

intensity values (boxed numbers) are shown. Insets show magnified kinetochores. (D) Western blot analysis of BubR1 and actin. (E) Bi/multinucleation indices of interphase cells. A minimum of 300 cells per sample from one experiment was analyzed. TC, tetracycline. (F and G) Mitotic index analysis of CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells after induction with tetracycline and treatment with taxol (F) or nocodazole (G). (H) Polyploidy in CHO^{S331A} cells. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were treated with tetracycline and taxol, and DNA content greater than 4N was determined. Error bars show the standard deviation from the mean from three experiments. Bars, 5 μ m.

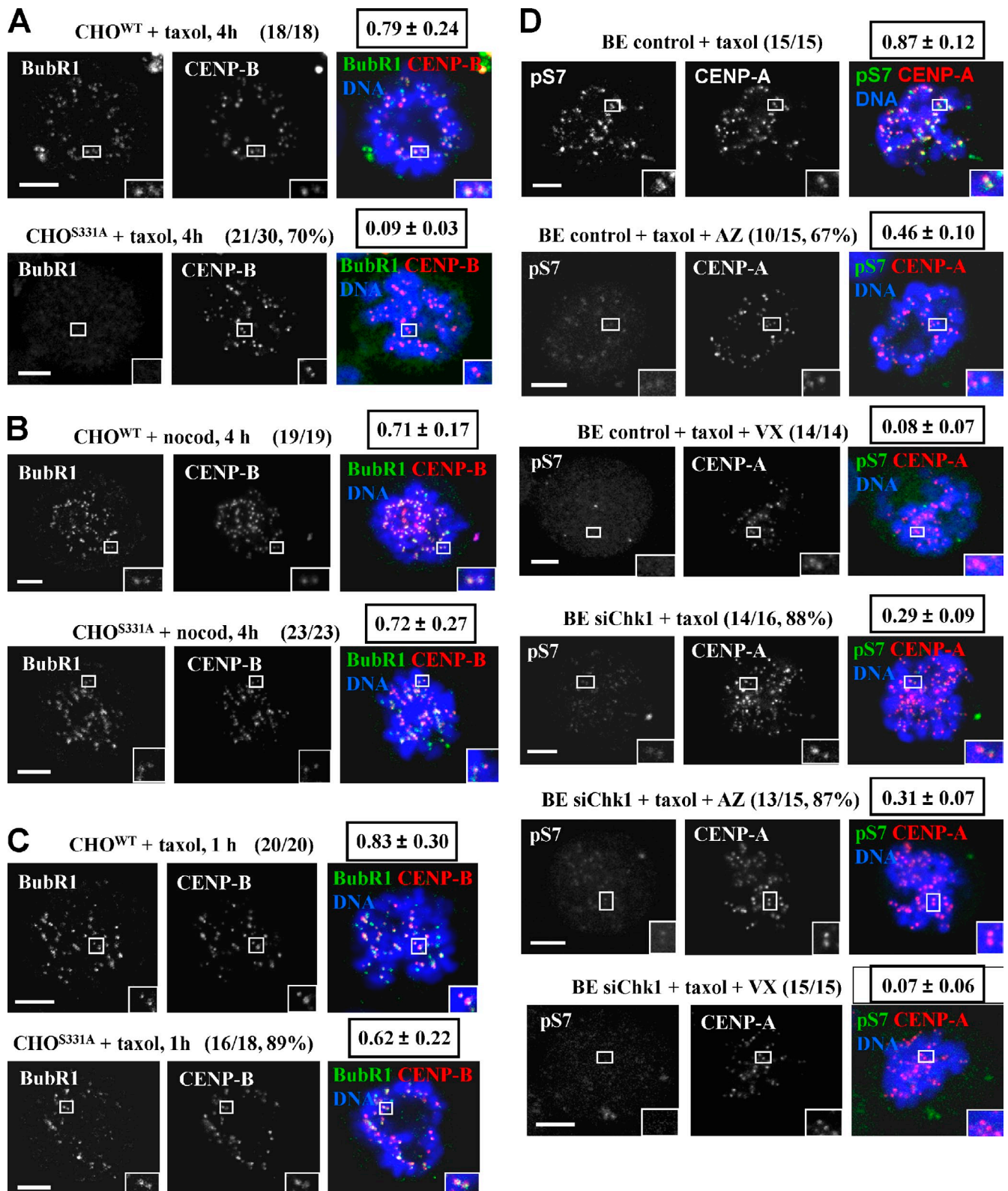


Figure 7. Cells expressing S331A Aurora B exhibit unstable binding of BubR1 to kinetochores in response to taxol. (A–C) Localization of BubR1. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline and treated with taxol (A and C) or nocodazole (nocod, B) for the indicated times. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean BubR1/CENP-B fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (D) Phosphorylation of Ser7 of CENP-A (pS7). BE cells transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1) were treated with taxol for 4 h in the absence or presence of AZ3146 (AZ) or VX-680 (VX). The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pS7/CENP-A fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

reduce Aurora B activity (Fig. 7 D). In comparison, VX-680 further diminished Aurora B activity in Chk1-depleted cells by approximately fourfold ($P < 0.001$; Fig. 7 D). These results show that combining inhibition of Mps1 with Chk1 depletion does not exhibit an additive effect on Aurora B activity.

Phosphorylation of Ser331 is required for optimal Survivin association with the CPC

The phenotype described for CHO^{S331A} cells is similar to the phenotype reported after depletion of Survivin in human cells (Carvalho et al., 2003). As shown in Fig. 8 (A and B), Survivin associated with 6×Myc–Aurora B was reduced in CHO^{S331A} compared with CHO^{WT} cells after treatment with tetracycline and taxol. However, Survivin-GFP localized to centromeres in all CHO^{WT} (20/20) and CHO^{S331A} (25/25) cells transiently expressing Survivin-GFP in the presence of taxol (Fig. 8 C). These results suggest that Ser331 phosphorylation is required for optimal association of Survivin with the CPC but not for Survivin localization to centromeres. Furthermore, depletion of Survivin by siRNA (Fig. S4 C, siSurvivin) reduced accumulation of wild-type or S331A 6×Myc–Aurora B to centromeres compared with controls (Figs. 8 D and S4 D).

Discussion

Complete Aurora B activation occurs through a two-step mechanism: in the first step, Aurora B binds to INCENP and is partially activated, and in the second step, Aurora B phosphorylates INCENP at the TSS motif and becomes fully active (Bishop and Schumacher, 2002). In the present study, we show that human Aurora B is phosphorylated at the conserved residue Ser331 during unperturbed mitosis or treatment of cells with spindle poisons. Aurora B phosphorylated at Ser331 localizes to kinetochores in prometaphase, the midzone in anaphase, and the midbody in telophase and cytokinesis. Chk1 is required for Ser331 phosphorylation during unperturbed prometaphase or treatment of cells with taxol, a drug that stabilizes microtubules and primarily interferes with tension at kinetochores; however, Chk1 is dispensable for Ser331 phosphorylation during prophase, cytokinesis, or complete microtubule depolymerization by nocodazole. To our knowledge, this is the first non-T-loop phosphorylation reported for Aurora B, and Chk1 is the first kinase known to phosphorylate Aurora B (Yasui et al., 2004).

To investigate the significance of Ser331 phosphorylation, we generated CHO cells expressing wild-type or S331A Aurora B, in which Ser331 was mutated to alanine, under control of a tetracycline-induced promoter. Using the aforementioned cell lines, we proposed that phosphorylation at Ser331 is required for efficient phosphorylation of INCENP at TSS residues and complete Aurora B activation (Honda et al., 2003). However, it is not essential for Aurora B localization to centromeres, autophosphorylation at Thr232, or association with INCENP (Yasui et al., 2004; Rosasco-Nitcher et al., 2008).

In agreement with previous findings, reduced Aurora B activity in CHO^{S331A} cells correlates with chromosome missegregation and impaired accumulation of BubR1 at kinetochores during unperturbed mitosis (Kaitna et al., 2000; Ditchfield

et al., 2003). Furthermore, CHO^{S331A} cells exhibit multinucleation and phenocopy DT40 cells expressing TAA mutant INCENP, which is consistent with Ser331 being required for TSS phosphorylation (Xu et al., 2010). In addition, overexpression of Aurora B^{S331A} impaired mitotic delay and BubR1 maintenance to kinetochores during treatment of cells with taxol. However, it did not diminish mitotic accumulation induced by nocodazole. It is possible that low Aurora B activity in cells expressing Aurora B^{S331A} is sufficient for spindle checkpoint response when microtubules are absent, whereas phosphorylation at Ser331 and higher levels of kinase activity are required for a robust response against taxol (Xu et al., 2009; Santaguida et al., 2011).

Combining inhibition of Mps1 with Chk1 depletion did not exhibit an additive effect on Aurora B activity, thus suggesting that Mps1 and Chk1 are involved in the same step of Aurora B activation. Mps1 phosphorylates Borealin to enhance Aurora B activity (Jelluma et al., 2008; Sliedrecht et al., 2010). One possibility is that phosphorylation of Borealin by Mps1 facilitates Ser331 or TSS phosphorylation, for example by stabilizing interactions between CPC proteins (Vader et al., 2006). Clarifying how Borealin contributes to stimulation of Aurora B activity is required to test this idea.

CHO^{S331A} exhibits lower levels of Survivin associated with the CPC compared with CHO^{WT} cells. Because Survivin binds to the CPC as a monomer, we propose that Survivin association with the partially active complex is weaker compared with the fully active complex (Jeyaprakash et al., 2007). Furthermore, depletion of Survivin reduced accumulation of wild-type and S331A Aurora B to centromeres, consistent with a role for Survivin in mediating targeting of the CPC to chromosomes (Vader et al., 2006; Kelly et al., 2010). Our preliminary results suggest that depletion of Survivin in CHO^{S331A} cells further impairs the checkpoint response to taxol by reducing localization of Aurora B^{S331A} to centromeres, thus further diminishing Aurora B activity at centromeres and kinetochores.

On the basis of those findings, we propose the following model for Aurora B activation (Fig. 8 E). Aurora B associated with INCENP and Survivin is autophosphorylated at Thr232 and partially active. During unperturbed prometaphase or treatment of cells with taxol, Chk1 phosphorylates Aurora B at Ser331, and this phosphorylation is required for phosphorylation of INCENP at the TSS motif and complete kinase activation. In contrast, cells in prophase, anaphase, and cytokinesis or treated with nocodazole, can phosphorylate Ser331 through an unidentified kinase (Fig. 8 E, question mark) and achieve full Aurora B activity independently of Chk1. Furthermore, Survivin binding to the CPC is stronger in the fully active compared with the partially active complex, and Mps1 contributes to full Aurora B activation, presumably by phosphorylating Borealin (for simplicity not depicted in the complex). Our model raises several important questions regarding the significance of Ser331 phosphorylation for Aurora B protein conformation, the role of this phosphorylation in modulating Survivin association with the CPC, and the potential role of protein phosphatases and kinases in regulating phosphorylation of Ser331.

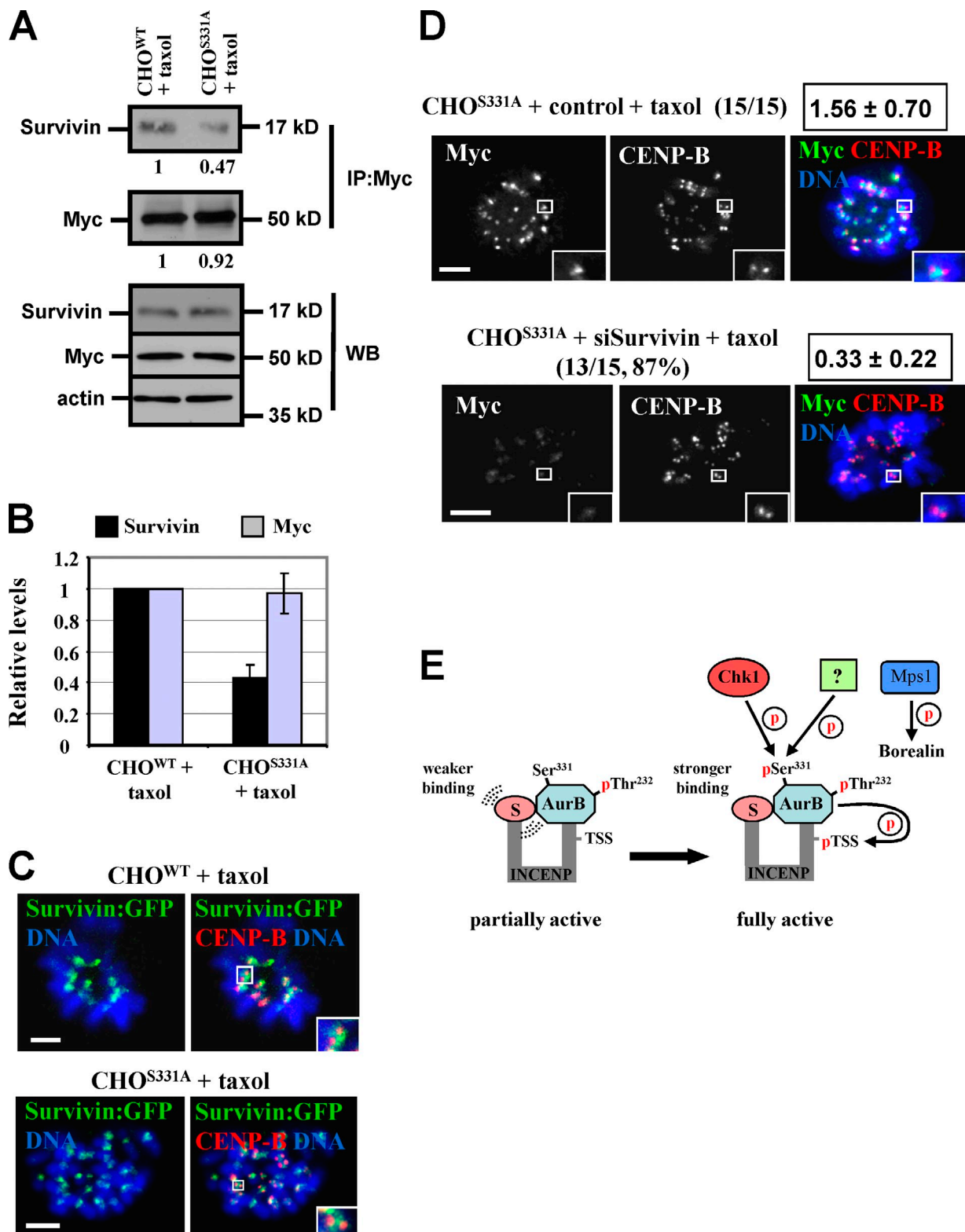


Figure 8. Expression of S331A Aurora B correlates with reduced association of Survivin with the CPC. (A) Coimmunoprecipitation assay. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline and treated with taxol for 4 h. (top and middle) Western blot analysis of immunoprecipitated (IP) Survivin and 6×Myc–Aurora B (Myc). Values show the relative levels of Survivin and Myc with levels at CHO^{WT} cells set to 1. (bottom) Western blot (WB) analysis of total Survivin, Myc, and actin. (B) Densitometric analysis of immunoprecipitated Survivin and Myc levels from A. Error bars show the standard deviation from the mean from three independent experiments. (C) Localization of Survivin-GFP. CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells expressing Survivin-GFP were treated as in A. (D) Localization of 6×Myc–Aurora B (Myc). CHO^{S331A} cells were transfected with control or Survivin siRNA (siSurvivin), induced with tetracycline, and treated with taxol for 4 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean Myc/CENP-B fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (E) Model for Aurora B (AurB) activation (see Discussion for details). P, phosphorylation; S, Survivin; question mark shows an unidentified kinase. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

Serine 331 is at the foot of the Aurora B C-terminal tail inside a sequence essential for Aurora B activation (Scrittore et al., 2005). Phosphorylation of Ser331 may trigger release of the Aurora B C-terminal tail, phosphorylation of the TSS sequence, and complete Aurora B activation. Alternatively, phosphorylation of Aurora B at Ser331 may change INCENP conformation through an allosteric mechanism to make TSS residues more accessible to Aurora B, and the release of the C-terminal tail may be a consequence of TSS phosphorylation (Sessa et al., 2005). Crystallographic analysis of an Aurora B–INCENP complex harboring phosphorylated Ser331 is required to distinguish between these possibilities.

Aurora B phosphorylates Survivin at threonine 117 (Thr117), and mutation of Thr117 to alanine prevented immunoprecipitation of Survivin with INCENP (Wheatley et al., 2004, 2007). It is possible that Survivin is inefficiently phosphorylated at Thr117 in CHO^{S331A} compared with wild-type cells. Alternatively, phosphorylation at Ser331 may regulate Survivin association with the CPC indirectly, through changes in conformation of Aurora B–INCENP. Increased binding of Survivin to the fully active complex may facilitate interactions with Aurora B substrates and enhance Aurora B catalytic activity (Bolton et al., 2002).

Ser331 appears constitutively phosphorylated under all conditions examined. This is in agreement with a recent study showing that Aurora B activity does not significantly change during mitosis, based on phosphorylation of an artificial fluorescence resonance energy transfer probe substrate targeted to CENP-B (Liu et al., 2009). Furthermore, Aurora B phosphorylated at Ser331 localizes to kinetochores, where it is presumably near its substrates. This is consistent with findings that active Aurora B efficiently promotes microtubule detachment if tethered within the kinetochore but not the centromere (Liu et al., 2009) and also with a recent study showing a small population of pT232 Aurora B at kinetochores (Posch et al., 2010). Interestingly, pS331 and pT232 proteins are only detectable at kinetochores under conditions that inhibit protein phosphatase activity (Gorbsky and Ricketts, 1993; Posch et al., 2010). Protein phosphatases are known to oppose Aurora B–mediated signaling (Emanuele et al., 2008; Meadows et al., 2011), and Sds22, a conserved regulator of Protein Phosphatase 1, was recently shown to regulate Aurora B activity (Posch et al., 2010). Identifying phosphatases that reverse Ser331 phosphorylation and reduce Aurora B kinase activity will provide new insight into mechanisms that silence the spindle checkpoint (Meadows et al., 2011; Rosenberg et al., 2011).

In the absence of Chk1, other kinases mediate Ser331 phosphorylation during prophase, cytokinesis, or treatment of cells with nocodazole. Phosphorylation of Ser331 by as yet unidentified kinases may accelerate phosphorylated group formation when increased counteracting protein phosphatase activity has to be overcome, for example, during assembly of the outer kinetochore in prophase, or when Aurora B regulates large scale events, such as formation of the cleavage furrow in cytokinesis (Emanuele et al., 2008; Fuller et al., 2008). Identifying the full panel of Ser331 kinases will improve our understanding of how CPC functions are controlled in mitosis.

Materials and methods

Antibodies and peptides

Anti-pS331 antiserum was generated in rabbits by immunization against the phosphorylated peptide pS331 (H2N-CPWVVRANS[PO3H2]RRVLPPS-CONH2) of human Aurora B (Eurogentec). The unphosphorylated peptide S331 (H2N-CPWVVRANSRRVLPPS-CONH2) was used in competition experiments as appropriate.

Monoclonal antibodies against Chk1 (G-4), Myc (9E10), and Survivin (D-8) and polyclonal antibodies against CENP-B and pH3 were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Monoclonal antibodies against α -tubulin (DM1A), γ -tubulin (GTU-88), and actin (AC-40) were obtained from Sigma-Aldrich. Monoclonal antibody to CENP-A (3–19) and polyclonal antibodies against human Aurora B (ab2254) and murine BubR1 (ab28193) were obtained from Abcam. Monoclonal (AIM-1) antibody to Aurora B was purchased from BD, polyclonal antibody against V₅ (ab3792) was purchased from Millipore, polyclonal phospho–CENP-A (Ser7) antibody was purchased from Cell Signaling Technology, and polyclonal antibody against histone H3 (pan) was obtained from Millipore. Monoclonal antibody against pT232 (pAB2.1) was a gift from M. Inagaki (Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan), and rabbit polyclonal antiserum against phosphorylated Ser850 of *Xenopus* INCENP was a gift from T. Stukenberg (University of Virginia, Charlottesville, VA).

Purified proteins

Recombinant proteins histone H1, histone H3, Chk1, GST-INCENP^{826–916}, kinase-active Aurora B, and Aurora B^{KD} (D200A) were obtained from Millipore. Human Aurora B^{WT}, Aurora B^{S331A}, and Aurora B^{T179A} proteins were expressed in BL21 (DE3) cells (Agilent Technologies), purified using the 6xHis purification kit (B-PER; Thermo Fisher Scientific), and used as substrates in kinase reactions.

Mutagenesis, cloning, and generation of cell lines

Human Aurora B cDNA was obtained by reverse transcription PCR by using total RNA from human fibroblasts. The PCR product was introduced as a EcoRI–NotI fragment into the pET-28a(+) vector (EMD) and completely sequenced. Point mutations T1052G (changing Ser331 to alanine) and A535G (changing Thr179 to alanine) were generated by site-directed mutagenesis using the site-directed mutagenesis kit (QuikChange; Agilent Technologies).

To produce inducible CHO^{WT} and CHO^{S331A} cell lines, wild-type or T1052G Aurora B cDNAs were subcloned as EcoRI–NotI fragments into the 6xMyc-pcDNA3 vector (a gift from D. Kardassis, University of Crete, Heraklion, Greece), excised with BamHI–NotI, and introduced into the pcDNA5/FRT/TO plasmid (Invitrogen). These vectors were then transfected into CHO cells (T-REx; Invitrogen) stably expressing the tetracycline repressor together with the pTK-Hyg selection vector (Agilent Technologies) conferring resistance to hygromycin (Invitrogen).

To generate the V₅-INCENP^{WT} and V₅-INCENP^{3A} expression plasmids, human INCENP cDNA was excised with BamHI–XhoI from RH100/pBSK INCENP or RH100/pBSK INCENP (TSS-AAA) plasmids, respectively (gifts from E. Nigg, Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland), and cloned into the pcDNA3.1/V₅-His vector (Invitrogen). Truncated V₅-INCENP^{1–787} was amplified by PCR from the RH100/pBSK INCENP plasmid and cloned as a BamHI–XhoI fragment into the pcDNA3.1/V₅-His vector.

Plasmid pCS2+ GFP INCENP coding GFP fused to *Xenopus* INCENP was obtained from T. Stukenberg (Knowlton et al., 2006). Plasmid CENP-A–GFP coding for human CENP-A fused to GFP in the pBos vector was obtained from K. Sullivan (Centre for Chromosome Biology, University of Ireland, Galway, Ireland; Kanda et al., 1998), and human Survivin–GFP plasmid was obtained from W. Earnshaw (Wellcome Centre for Cell Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK; Wheatley et al., 2001).

Cell culture, treatments, and RNA interference

Human colon carcinoma BE cells were grown in DME (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum and CHO cells (T-REx CHO) in Ham's F12 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. All cells were cultured at 37°C and 5% CO₂.

Cells were treated with 1 μ M nocodazole (Sigma-Aldrich), 1 μ M taxol (Sigma-Aldrich), 3 μ M VX-680 (Kava Technology, Inc.), or 2 μ M AZ3146 (Axon) as appropriate. To induce expression of Aurora B transgenes, CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were treated with 17 or 30 ng/ml tetracycline (Sigma-Aldrich), respectively, for 16 h before analysis or further treatment with drugs.

Negative siRNA or siRNA duplexes designed to repress human Chk1 (Thermo Fisher Scientific), human Aurora B (Thermo Fisher Scientific), or rat Survivin (QIAGEN) was transfected into BE or CHO cells 48 h (siChk1), 24 h (Aurora B siRNA), or 72 h (Survivin siRNA) before analysis or treatment with drugs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For transient expression of V₅-INCENP or GFP proteins, plasmids were transfected into cells 24 h before analysis or treatment with drugs using Lipofectamine 2000.

Immunoprecipitations and kinase assays

For Myc immunoprecipitations shown in Fig. 8 A, cells were incubated in ice-cold E1A buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 30 µg/ml RNase, 10 mM sodium β-glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, and 0.1 µM microcystin) for 30 min (Harlow et al., 1986). Approximately 1 mg cell lysate was incubated with 1 µg anti-Myc (9E10) antibody for 2 h followed by addition of 20 µl protein A/G PLUS-agarose beads (Invitrogen) for 16 h at 4°C. Samples were spun down, washed twice with E1A buffer, and analyzed by SDS-PAGE.

For the Myc immunoprecipitations shown in Fig. 4 B, cells were sonicated 3× for 10 s in ice-cold radioimmunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 30 µg/ml RNase, 20 mM sodium β-glycerophosphate, and 0.3 mM sodium vanadate). 0.3–1 mg cell lysate was incubated with 0.5 µg anti-Myc antibody for 1 h followed by addition of 20 µl protein A/G PLUS-agarose beads for 16 h at 4°C. Samples were spun down and washed twice with radioimmunoprecipitation buffer, once with wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.4 M NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml aprotinin), and twice with Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1 mM PMSF) essentially as previously described (Honda et al., 2003).

For V₅ immunoprecipitations, cells were sonicated 3× for 10 s in ice-cold immunoprecipitation buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 10 mM sodium β-glycerophosphate, 0.1 mM Na₂VO₄, 1 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, and 10 µg/ml aprotinin). 0.3–1 mg cell lysate was incubated with 0.5 µg anti-V₅ antibody for 1 h followed by addition of 20 µl protein A/G PLUS-agarose beads for 16 h at 4°C. Samples were spun down, washed twice with immunoprecipitation buffer, and analyzed by SDS-PAGE (Figs. 4 F and S3 B) or included in kinase reactions (Fig. 5 D).

For Figs. 4 B and 5 D, immunoprecipitated proteins on agarose beads were included into a 20-µl reaction containing 1 µg histone H3, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM sodium β-glycerophosphate, 50 µM sodium vanadate, and 0.1 mM ATP (Honda et al., 2003). For Figs. 4 E and S3 A, 0.2 µg recombinant kinase-active Aurora B was included into a 20-µl reaction containing 1 µg histone H3, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM sodium β-glycerophosphate, 50 µM sodium vanadate, and 10 µM ATP. Where appropriate, 0.5 µg recombinant Chk1 and/or 0.2 µg GST-INCENP⁸²⁶⁻⁹¹⁶ was included in the kinase reaction. Unless otherwise stated, reactions were incubated for 20 min at 30°C, stopped by addition of 2 µl 10× gel sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using a polyclonal antibody against pH3.

For in vitro Chk1 kinase assays in Fig. 1, 0.5 µg recombinant Chk1 was incubated with 1 µg protein substrate in 20 µl kinase buffer (20 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 25 mM sodium β-glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, 1 mM DTT, 100 µM ATP, and 1 µCi γ-ATP) for 20 min at 30°C before analysis by SDS-PAGE. Radioactive labeling of Chk1 substrates was determined by autoradiography and densitometric analysis of the bands (Zachos et al., 2007). Where appropriate, 145 ng UCN-01 (Sigma-Aldrich) was included in the kinase reaction.

Indirect immunofluorescence microscopy

For pS331 staining, cells were rinsed twice in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, pH 7.0, 10 mM EGTA, and 4 mM MgSO₄) extracted in PHEM supplemented with 0.5% CHAPS and 100 nM microcystin (Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature, fixed with cold methanol for 5 min at -20°C, washed twice with PBS, and immunostained (Gorbsky and Ricketts, 1993). For all other fluorescence microscopy applications, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in cytoskeleton buffer (1.1 M Na₂HPO₄, 0.4 M KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM Pipes, and 5 mM glucose, pH 6.1) for 5 min at 37°C, permeabilized in 0.5% Triton X-100 in cytoskeleton buffer at room temperature, and immunostained as appropriate (Zachos et al., 2007).

FITC- or rhodamine-TRITC-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) were used, DNA was stained with 10 µM TO-PRO-3 iodide (642/661; Invitrogen), and cells were mounted in VECTASHIELD medium (Vector Laboratories). Images were collected using a laser-scanning spectral confocal microscope (TCS SP2; Leica), LCS Lite software (Leica), and a 63× Apochromat 1.40 NA oil objective except for Figs. 3 B, 6 (A and B), S1, S2, and S4 A, in which a 40× Apochromat 1.25 NA oil objective was used. A low fluorescence immersion oil (11513859; Leica) was used, and imaging was performed at room temperature. Unless otherwise stated, mean projections of image stacks were obtained using the LCS Lite software.

To analyze fluorescence intensities, background readings were subtracted, and fluorescence intensities were quantified using LCS Lite. The pS331 values were normalized against the CENP-A signal, and the pS850 was normalized against the GFP signal (also see Table S1). For Table I, four cells per experiment from three independent experiments were analyzed for each treatment. For Table II, three to four cells per experiment from three independent experiments were analyzed for each treatment. For Table S1, a minimum of three cells per experiment from at least two independent experiments were analyzed for each treatment.

Mitotic and bi/multinucleation indices

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in cytoskeleton buffer, permeabilized in 0.5% Triton X-100, stained, and examined for condensed chromatin or bi/multinucleation by fluorescence microscopy. For Fig. 6 E, a minimum of 300 cells per sample was analyzed. For Fig. 6 (F and G), a minimum of 100 cells per sample was analyzed.

DNA content

Cells were fixed in 70% ethanol-PBS at 4°C, stained with 20 µg/ml propidium iodide in PBS (Sigma-Aldrich) and analyzed for DNA content by use of a flow cytometer (FACScan; BD).

Western blotting and densitometry

Cells were lysed in ice-cold whole-cell extract buffer (20 mM Hepes, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.4 M KCl, 0.4% Triton X-100, 10% glycerol, 5 mM NaF, 50 ng/ml okadaic acid, 1 mM DTT, 5 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml PMSF, 1 mM benzamide, 5 µg/ml aprotinin, and 1 mM Na₂VO₄) for 30 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 15,000 g for 10 min. Densitometric analysis was performed using ImageJ (National Institutes of Health).

HPLC-Edman degradation

Radiolabeled Aurora B^{KD} was excised from an SDS-PAGE gel and digested with trypsin or glutamyl endopeptidase (ICN Pharmaceuticals, Inc.). Samples were acidified and loaded onto a C-18 column (Vydac) for HPLC essentially as previously described (Sanchez et al., 1997). Fractions were collected at 1-min intervals and counted for radioactivity, and selected fractions were immobilized on membrane discs for N-terminal sequencing (Sullivan and Wong, 1991).

Protein Data Bank image

The image of *Xenopus* Aurora B-INCENP⁷⁹⁰⁻⁸⁴⁷ in complex with hesperadine (Sessa et al., 2005) was downloaded from the Protein Data Bank using Jmol (accession no. 2BFY).

Online supplemental material

Fig. S1 shows HPLC-Edman analysis of radiolabeled Aurora B^{KD} after digestion with glutamyl endopeptidase, Aurora B expression levels after treatment of BE cells with Aurora B siRNA, and specificity of the anti-pS331 antiserum by immunofluorescence. Fig. S2 shows Chk1 and Aurora B expression levels after treatment of BE cells with Chk1 siRNA and Ser331 phosphorylation in prophase and cytokinesis as well as Aurora B expression levels and Ser331 phosphorylation in CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells. Fig. S3 shows Chk1 in vitro kinase assays, immunoprecipitation of 6×Myc-Aurora B with V₅-INCENP, Aurora B phosphorylation at Thr232, and INCENP phosphorylation at Ser850. Fig. S4 shows examples of CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells in metaphase and interphase, expression of Survivin, and localization of 6×Myc-Aurora B after treatment of CHO^{WT} cells with Survivin siRNA. Table S1 shows fluorescence intensity values at prometaphase kinetochores after various treatments. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201104023/DC1>.

We thank J. Papamatheakis and T. Stukenberg for comments on the manuscript and C. Ward (University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK) for technical help with HPLC-Edman. We also thank W. Earnshaw, M. Inagaki, P. Jallepalli,

D. Kardassis, E. Nigg, T. Stukenberg, K. Sullivan, and S. Taylor for generously sharing reagents.

This work was funded by the Association for International Cancer Research (to E. Petsalaki, T. Akoumianaki, and G. Zachos).

Submitted: 6 April 2011

Accepted: 23 September 2011

References

- Adams, R.R., H. Maiato, W.C. Earnshaw, and M. Carmena. 2001. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 153:865–880. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.153.4.865>
- Biggins, S., and A.W. Murray. 2001. The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 15:3118–3129. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.934801>
- Bishop, J.D., and J.M. Schumacher. 2002. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J. Biol. Chem.* 277:27577–27580. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200307200>
- Bolton, M.A., W. Lan, S.E. Powers, M.L. McClelland, J. Kuang, and P.T. Stukenberg. 2002. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 13:3064–3077. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0092>
- Carmena, M., S. Ruchaud, and W.C. Earnshaw. 2009. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:796–805. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2009.09.008>
- Carvalho, A., M. Carmena, C. Sambade, W.C. Earnshaw, and S.P. Wheatley. 2003. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* 116:2987–2998. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00612>
- Cheeseman, I.M., S. Anderson, M. Jwa, E.M. Green, J. Kang, J.R. Yates III, C.S. Chan, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell.* 111:163–172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00973-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00973-X)
- Cooke, C.A., M.M. Heck, and W.C. Earnshaw. 1987. The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.* 105:2053–2067. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.105.5.2053>
- Cooke, C.A., R.L. Bernat, and W.C. Earnshaw. 1990. CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J. Cell Biol.* 110:1475–1488. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.110.5.1475>
- Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, and S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* 161:267–280. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200208091>
- Emanuele, M.J., W. Lan, M. Jwa, S.A. Miller, C.S. Chan, and P.T. Stukenberg. 2008. Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* 181:241–254. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200710019>
- Fuller, B.G., M.A. Lampson, E.A. Foley, S. Rosasco-Nitcher, K.V. Le, P. Tobelmann, D.L. Brautigan, P.T. Stukenberg, and T.M. Kapoor. 2008. Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature.* 453:1132–1136. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06923>
- Gisselsson, D. 2008. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma.* 117:511–519. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-008-0169-1>
- Gorbisky, G.J., and W.A. Ricketts. 1993. Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J. Cell Biol.* 122:1311–1321. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.122.6.1311>
- Han, W.W., Y.H. Zhou, Y. Yao, and Z.S. Li. 2007. The three-dimensional structure of human aurora-C kinase predicted by homology modeling. *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 815:87–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2007.03.020>
- Harlow, E., P. Whyte, B.R. Franza Jr., and C. Schley. 1986. Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell Biol.* 6:1579–1589.
- Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A.M. White, C.D. Jones, A. Musacchio, S. Green, and S.S. Taylor. 2010. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J. Cell Biol.* 190:25–34. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201002133>
- Honda, R., R. Körner, and E.A. Nigg. 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 14:3325–3341. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-11-0769>
- Jelluma, N., A.B. Brenkman, N.J. van den Broek, C.W. Crujisen, M.H. van Osch, S.M. Lens, R.H. Medema, and G.J. Kops. 2008. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell.* 132:233–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.046>
- Jeyaprakash, A.A., U.R. Klein, D. Lindner, J. Ebert, E.A. Nigg, and E. Conti. 2007. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 131:271–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.045>
- Kaitna, S., M. Mendoza, V. Jantsch-Plunger, and M. Glotzer. 2000. Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr. Biol.* 10:1172–1181. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00721-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00721-1)
- Kanda, T., K.F. Sullivan, and G.M. Wahl. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* 8:377–385. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70156-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70156-3)
- Kelly, A.E., S.C. Sampath, T.A. Maniar, E.M. Woo, B.T. Chait, and H. Funabiki. 2007. Chromosomal enrichment and activation of the aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev. Cell.* 12:31–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.11.001>
- Kelly, A.E., C. Ghenoiu, J.Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, and H. Funabiki. 2010. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science.* 330:235–239. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1189505>
- Knowlton, A.L., W. Lan, and P.T. Stukenberg. 2006. Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr. Biol.* 16:1705–1710. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.057>
- Lampson, M.A., and T.M. Kapoor. 2004. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat. Cell Biol.* 7:93–98. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1208>
- Liu, D., G. Vader, M.J. Vromans, M.A. Lampson, and S.M. Lens. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science.* 323:1350–1353. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1167000>
- Maldonado, M., and T.M. Kapoor. 2011. Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat. Cell Biol.* 13:475–482. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2223>
- Meadows, J.C., L.A. Shepperd, V. Vanoosthuyse, T.C. Lancaster, A.M. Sochaj, G.J. Buttrick, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2011. Spindle checkpoint silencing requires association of PP1 to both Spc7 and kinesin-8 motors. *Dev. Cell.* 20:739–750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.008>
- Nezi, L., and A. Musacchio. 2009. Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:785–795. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2009.09.007>
- Peddibhotla, S., M.H. Lam, M. Gonzalez-Rimbau, and J.M. Rosen. 2009. The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:5159–5164. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806671106>
- Pinsky, B.A., C.R. Nelson, and S. Biggins. 2009. Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol.* 19:1182–1187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.043>
- Posch, M., G.A. Khoudoli, S. Swift, E.M. King, J.G. Deluca, and J.R. Swedlow. 2010. Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis. *J. Cell Biol.* 191:61–74. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200912046>
- Rosasco-Nitcher, S.E., W. Lan, S. Khorasanizadeh, and P.T. Stukenberg. 2008. Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science.* 319:469–472. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1148980>
- Rosenberg, J.S., F.R. Cross, and H. Funabiki. 2011. KNL1/Spc105 recruits PP1 to silence the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 21:942–947. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.011>
- Sanchez, Y., C. Wong, R.S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnicka-Worms, and S.J. Elledge. 1997. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science.* 277:1497–1501. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5331.1497>
- Santaguida, S., C. Vernieri, F. Villa, A. Ciliberto, and A. Musacchio. 2011. Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J.* 30:1508–1519. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.70>
- Saurin, A.T., M.S. van der Waal, R.H. Medema, S.M. Lens, and G.J. Kops. 2011. Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat. Commun.* 2:316. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1319>

- Scrittore, L., D.A. Skoufias, F. Hans, V. Gerson, P. Sassone-Corsi, S. Dimitrov, and R.L. Margolis. 2005. A small C-terminal sequence of Aurora B is responsible for localization and function. *Mol. Biol. Cell.* 16:292–305. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-06-0447>
- Sessa, F., M. Mapelli, C. Ciferri, C. Tarricone, L.B. Areces, T.R. Schneider, P.T. Stukenberg, and A. Musacchio. 2005. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol. Cell.* 18:379–391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.031>
- Slattery, S.D., M.A. Mancini, B.R. Brinkley, and R.M. Hall. 2009. Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B. *Cell Cycle.* 8:2986–2994. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.18.9591>
- Sliedrecht, T., C. Zhang, K.M. Shokat, and G.J. Kops. 2010. Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PLoS ONE.* 5:e10251. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010251>
- Smith, J., L.M. Tho, N. Xu, and D.A. Gillespie. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* 108:73–112. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>
- Sullivan, S., and T.W. Wong. 1991. A manual sequencing method for identification of phosphorylated amino acids in phosphopeptides. *Anal. Biochem.* 197:65–68. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90356-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(91)90356-X)
- Tanaka, T.U., N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M.J. Stark, and K. Nasmyth. 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell.* 108:317–329. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00633-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00633-5)
- Vader, G., J.J. Kauw, R.H. Medema, and S.M. Lens. 2006. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep.* 7:85–92. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400562>
- Vanoosthuysse, V., and K.G. Hardwick. 2009. A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Curr. Biol.* 19:1176–1181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.060>
- Wheatley, S.P., A. Carvalho, P. Vagnarelli, and W.C. Earnshaw. 2001. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol.* 11:886–890. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00238-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00238-X)
- Wheatley, S.P., A.J. Henzing, H. Dodson, W. Khaled, and W.C. Earnshaw. 2004. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J. Biol. Chem.* 279:5655–5660. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311299200>
- Wheatley, S.P., R.M. Barrett, P.D. Andrews, R.H. Medema, S.J. Morley, J.R. Swedlow, and S.M. Lens. 2007. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. *Cell Cycle.* 6:1220–1230. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.10.4179>
- Wordeman, L., and T.J. Mitchison. 1995. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* 128:95–104. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.128.1.95>
- Xu, Z., H. Ogawa, P. Vagnarelli, J.H. Bergmann, D.F. Hudson, S. Ruchaud, T. Fukagawa, W.C. Earnshaw, and K. Samejima. 2009. INCENP-aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J. Cell Biol.* 187:637–653. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200906053>
- Xu, Z., P. Vagnarelli, H. Ogawa, K. Samejima, and W.C. Earnshaw. 2010. Gradient of increasing Aurora B kinase activity is required for cells to execute mitosis. *J. Biol. Chem.* 285:40163–40170. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.181545>
- Yasui, Y., T. Urano, A. Kawajiri, K. Nagata, M. Tatsuka, H. Saya, K. Furukawa, T. Takahashi, I. Izawa, and M. Inagaki. 2004. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279:12997–13003. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311128200>
- Zachos, G., E.J. Black, M. Walker, M.T. Scott, P. Vagnarelli, W.C. Earnshaw, and D.A. Gillespie. 2007. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev. Cell.* 12:247–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.003>
- Zeitlin, S.G., R.D. Shelby, and K.F. Sullivan. 2001. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 155:1147–1157. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200108125>

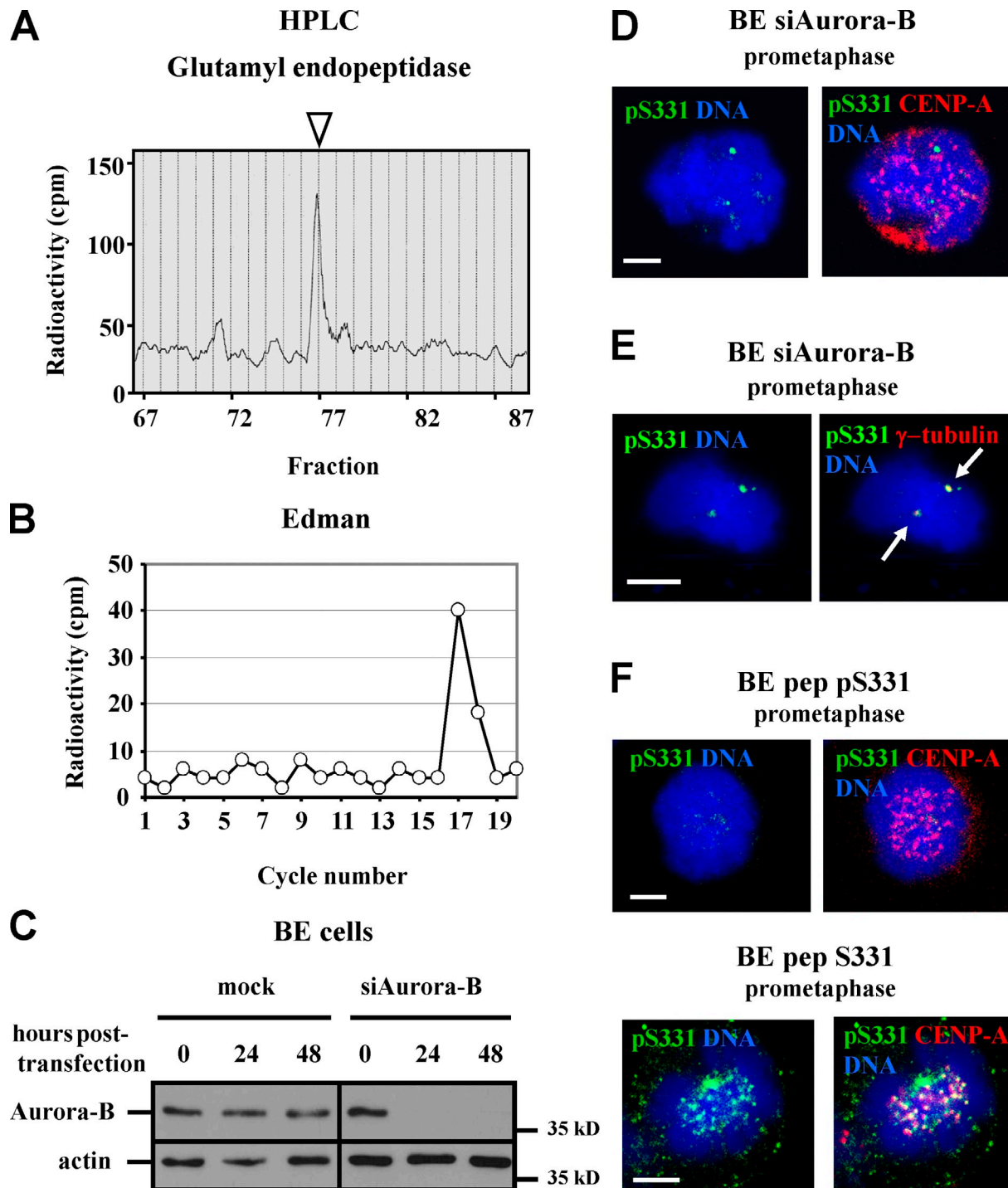


Figure S1. Mapping the Chk1 phosphorylation site on human Aurora B^{KD}. (A) HPLC analysis of radiolabeled Aurora B^{KD} after digestion with glutamyl endopeptidase. The main radioactive fraction is indicated by an arrowhead. (B) Edman degradation analysis of the phosphopeptide from the main radioactive fraction from A. The graph shows radioactivity released from the membrane. (C) Western blot analysis of total Aurora B and actin in BE cells mock transfected (mock) or transfected with Aurora B siRNA (siAurora B). (D and E) Ser331 phosphorylation (pS331) in BE cells transfected as in C. (E) Spurious pS331 staining localizes at centrosomes (marked by arrows). (F) BE cells were tested for specificity of the anti-pS331 antiserum. pep pS331, phospho-S331 synthetic peptide; pep S331, unphosphorylated Ser331 synthetic peptide. Bars, 5 μ m.

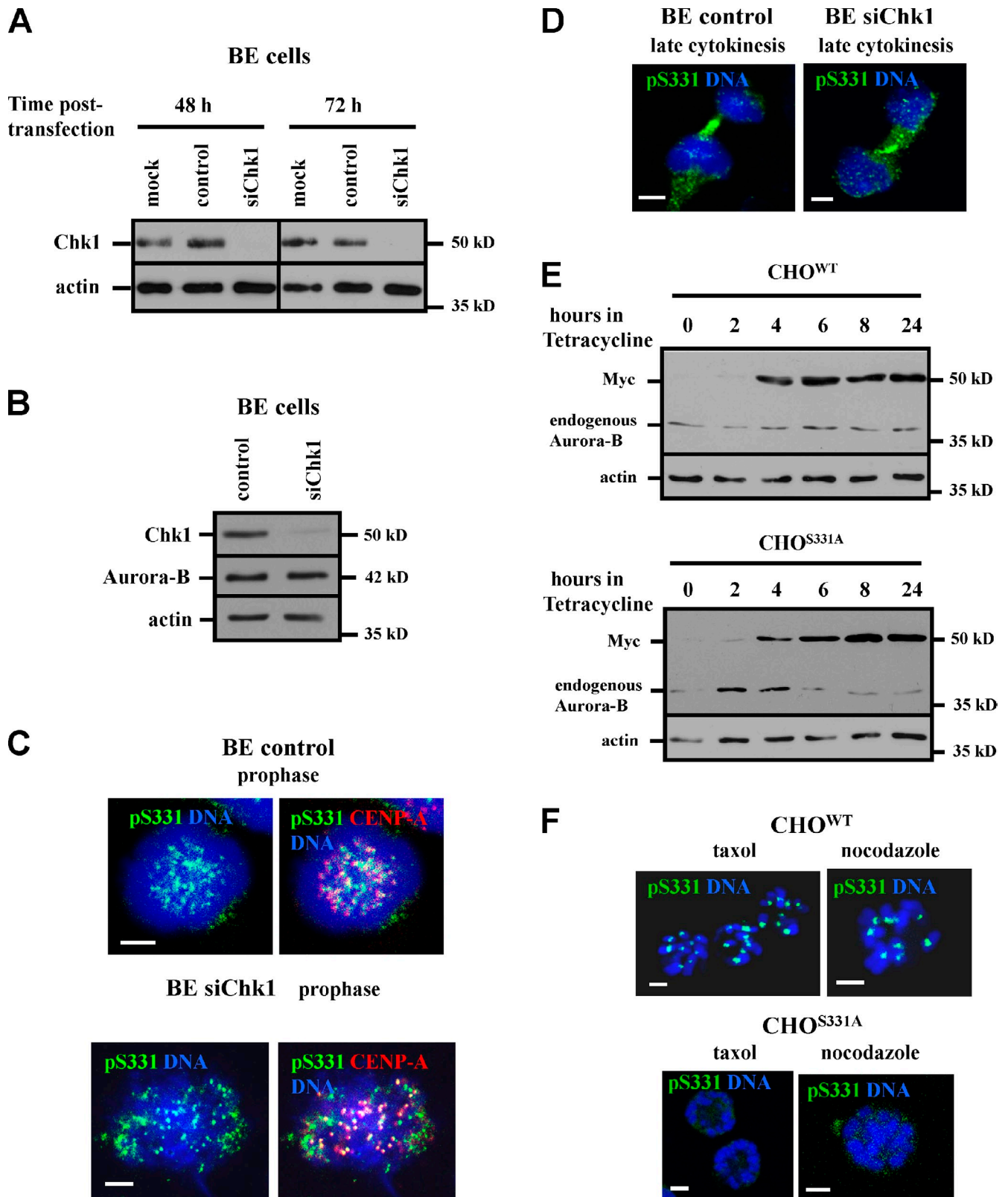


Figure S2. Chk1 is dispensable for Ser331 phosphorylation in prophase and late cytokinesis. (A and B) Western blot analysis of total Chk1, Aurora B, and actin in BE cells mock transfected (mock) or transfected with negative siRNA (control) or Chk1 siRNA (siChk1). Black lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (C and D) Phosphorylation at Ser331 (pS331) in BE cells transfected as in A. (E) Western blot analysis of 6xMyc-Aurora B (Myc), endogenous Aurora B, and actin after induction of CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells with tetracycline. (F) pS331 staining in CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells after induction with tetracycline and treatment with taxol or nocodazole for 4 h. Bars, 5 μ m.

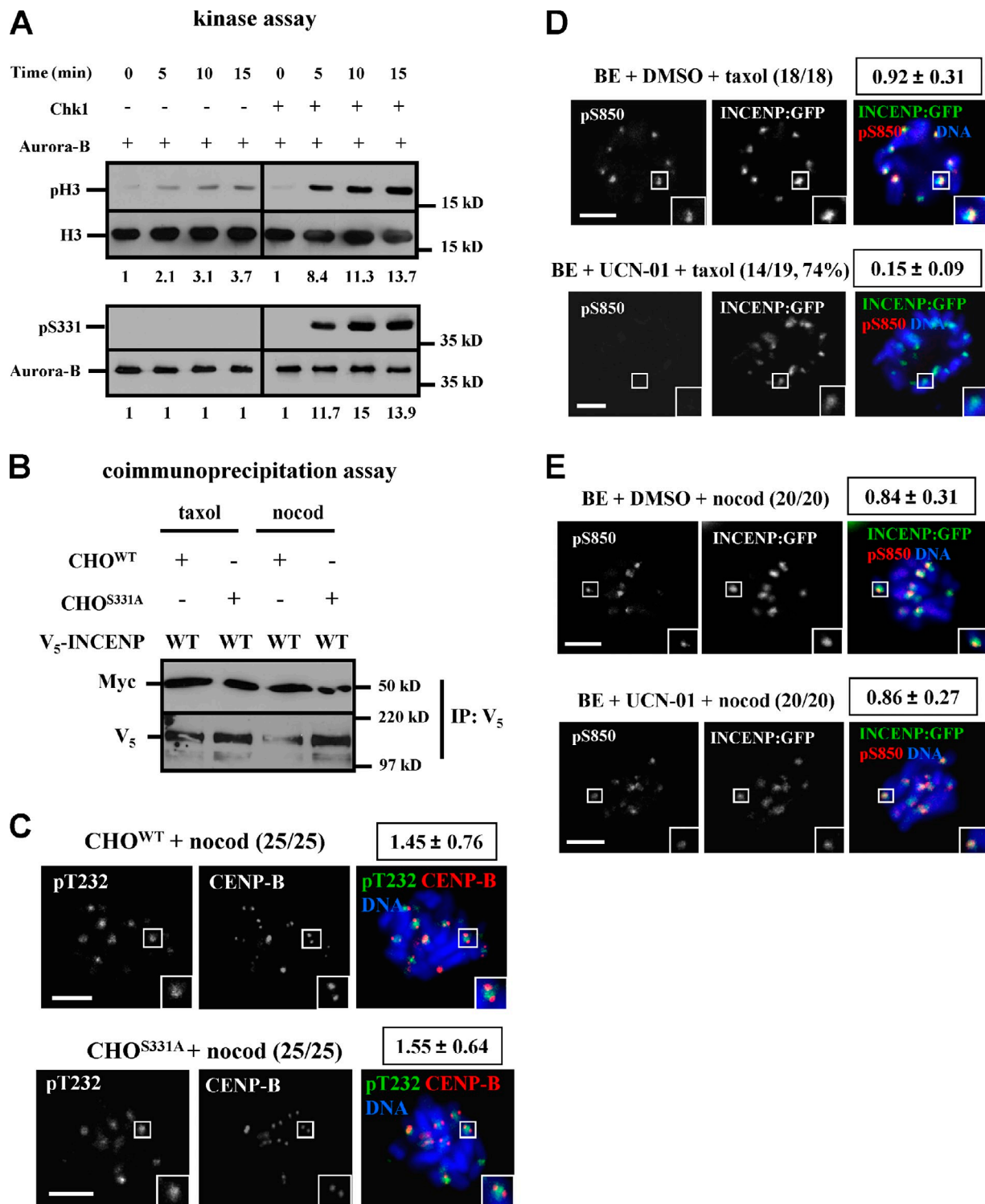


Figure S3. **Inhibition of Chk1 activity by UCN-01 diminishes phosphorylation at Ser850.** (A) In vitro kinase assay. Purified Chk1 and Aurora B proteins were incubated with histone H3, and phosphorylation of Ser10 of histone H3 (pH3, top) or Ser331 of Aurora B (pS331, bottom) was determined. Values show the relative levels of pH3 or pS331, and levels at 0 min were arbitrarily set to 1. Western blot analysis of total H3 and Aurora B is also shown. (B) Western blot analysis of immunoprecipitated (IP) δ -Myc-Aurora B (Myc) and V₅-INCENP^{WT} (V₅). CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline and treated with taxol or nocodazole (nocod) for 4 h. (C) Phosphorylation of Thr232 (pT232). CHO^{WT} and CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline and treated with nocodazole for 4 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pT232/CENP-B fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. (D and E) Phosphorylation of INCENP at Ser850 (pS850). BE cells expressing INCENP-GFP were treated with taxol (D) or nocodazole (E) for 4 h in the presence of DMSO or UCN-01. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean pS850/INCENP-GFP fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. Insets show magnified kinetochores. WT, wild type. Bars, 5 μ m.

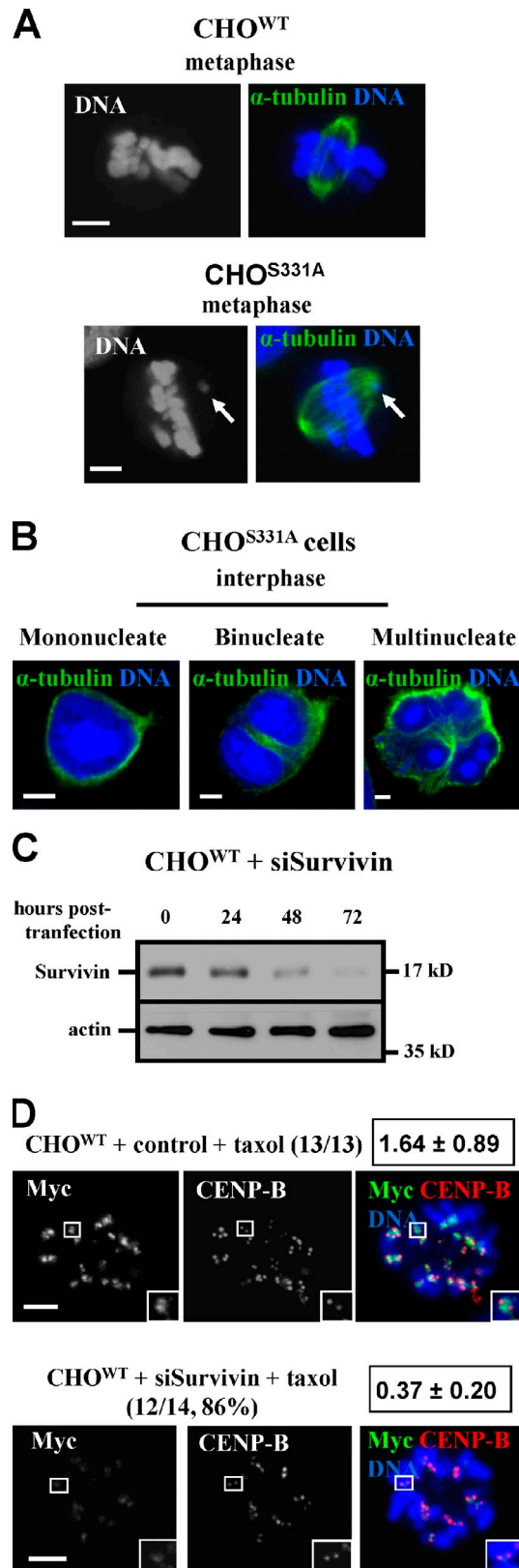


Figure S4. **Depletion of Survivin impairs localization of 6xMyc-Aurora B to kinetochores.** (A and B) CHO^{WT} or CHO^{S331A} cells were induced with tetracycline in the absence of spindle poisons. (A) Misaligned chromatin is indicated by arrows. (B) Images of mono-, bi-, and multinucleate cells. A single image plane is shown. (C) Western blot analysis of total Survivin and actin in CHO^{WT} cells transfected with Survivin siRNA (siSurvivin). (D) Localization of 6xMyc-Aurora B (Myc). CHO^{WT} cells transfected with negative (control) or Survivin siRNA were induced with tetracycline and treated with taxol for 4 h. The frequency of cells exhibiting the respective phenotype and mean Myc/CENP-B fluorescence intensity values (boxed numbers) are shown. Insets show magnified kinetochores. Bars, 5 μ m.

Table S1. Fluorescence intensity values at prometaphase kinetochores

Cells and treatments	Fluorescence intensity ratio	Normalized to:	Mean fluorescence intensity values	n (kinetochore pairs, cells)	Figure
BE + UCN-01	pS331/CENP-A	CENP-A	0.15 ± 0.13	75, 6	Fig. 2 C
CHO ^{WT} + taxol	pT232/CENP-B	CENP-B	1.83 ± 0.84	44, 6	Fig. 4 G
CHO ^{S331A} + taxol	pT232/CENP-B	CENP-B	1.99 ± 1.22	62, 6	Fig. 4 G
CHO ^{WT} + nocod	pT232/CENP-B	CENP-B	1.45 ± 0.76	42, 6	Fig. S3 C
CHO ^{S331A} + nocod	pT232/CENP-B	CENP-B	1.55 ± 0.64	43, 6	Fig. S3 C
BE + DMSO + taxol	pS850/INCENP-GFP	INCENP-GFP	0.92 ± 0.31	48, 6	Fig. S3 D
BE + UCN-01 + taxol	pS850/INCENP-GFP	INCENP-GFP	0.15 ± 0.09	36, 6	Fig. S3 D
BE + DMSO + nocod	pS850/INCENP-GFP	INCENP-GFP	0.84 ± 0.31	33, 6	Fig. S3 E
BE + UCN-01 + nocod	pS850/INCENP-GFP	INCENP-GFP	0.86 ± 0.27	37, 6	Fig. S3 E
CHO ^{WT}	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.78 ± 0.35	80, 6	Fig. 6 C
CHO ^{S331A}	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.06 ± 0.06	68, 6	Fig. 6 C
CHO ^{WT} + taxol, 4 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.79 ± 0.24	53, 6	Fig. 7 A
CHO ^{S331A} + taxol, 4 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.09 ± 0.03	71, 6	Fig. 7 A
CHO ^{WT} + nocod, 4 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.71 ± 0.17	57, 6	Fig. 7 B
CHO ^{S331A} + nocod, 4 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.72 ± 0.27	48, 6	Fig. 7 B
CHO ^{WT} + taxol, 1 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.83 ± 0.30	42, 6	Fig. 7 C
CHO ^{S331A} + taxol, 1 h	BubR1/CENP-B	CENP-B	0.62 ± 0.22	46, 6	Fig. 7 C
BE control + taxol	pS7/CENP-A	CENP-A	0.87 ± 0.12	151, 9	Fig. 7 D
BE control + taxol + AZ	pS7/CENP-A	CENP-A	0.46 ± 0.10	157, 10	Fig. 7 D
BE control + taxol + VX	pS7/CENP-A	CENP-A	0.08 ± 0.07	114, 7	Fig. 7 D
BE siChk1 + taxol	pS7/CENP-A	CENP-A	0.29 ± 0.09	182, 12	Fig. 7 D
BE siChk1 + taxol + AZ	pS7/CENP-A	CENP-A	0.31 ± 0.07	126, 8	Fig. 7 D
BE siChk1 + taxol + VX	pS7/CENP-A	CENP-A	0.07 ± 0.06	119, 8	Fig. 7 D
CHO ^{S331A} + control + taxol	Myc/CENP-B	CENP-B	1.56 ± 0.70	99, 8	Fig. 8 E
CHO ^{S331A} + siSurv + taxol	Myc/CENP-B	CENP-B	0.33 ± 0.22	66, 6	Fig. 8 E
CHO ^{WT} + control + taxol	Myc/CENP-B	CENP-B	1.64 ± 0.89	69, 6	Fig. S4 E
CHO ^{WT} + siSurv + taxol	Myc/CENP-B	CENP-B	0.37 ± 0.20	70, 6	Fig. S4 E

n represents the number of kinetochore pairs quantified followed by the number of cells analyzed. AZ, AZ3146; nocod, nocodazole; siChk1, Chk1 siRNA; siSurv, Survivin siRNA; VX, VX-680.