

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

**Γενετική και μοριακή ανάλυση ενός νέου ρόλου της πρωτεΐνης Chk1: Η πρωτεΐνη Chk1 απαιτείται για μείωση των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης**

ΕΛΕΝΗ ΠΕΤΣΑΛΑΚΗ

Επιβλέπων καθηγητής και επιστημονικά υπεύθυνος: καθ. Γεώργιος Ζάχος

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2010

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>2</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>3</b>
<b>ΜΕΡΟΣ Α</b>	
<b>ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</b>	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>6</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>9</b>
Κύτταρα στα οποία απουσιάζει η Chk1 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (lagging chromosomes) κατά την ανάφαση.	<b>9</b>
Κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων (merotelic attachments).	<b>11</b>
Η Chk1 απαιτείται για μείωση των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.	<b>12</b>
Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη ενεργότητα της Aurora-B έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.	<b>15</b>
Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Aurora-B στη Σερίνη 331 κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων.	<b>17</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>18</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>19</b>
<b>ΜΕΡΟΣ Β</b>	
<b>ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΤΑΣΗ</b>	<b>23</b>
Ο ρόλος της Chk1 απουσία φαρμάκων που δηλητηριάζουν τη μιτωτική άτρακτο.	<b>23</b>
Είναι απαραίτητη η καταλυτική ενεργότητα της Chk1 για προστασία από χρωμοσώματα που καθυστερούν κατά την ανάφαση;	<b>24</b>
Ο ρόλος της Chk1 στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων των κινητοχώρων.	<b>25</b>
Η σημασία της φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 331.	<b>27</b>
Μοριακοί μηχανισμοί λειτουργίας της Chk1.	<b>28</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>33</b>

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθ. Γεώργιο Ζάχο για τις πολύτιμες συμβουλές και τα σχόλια πάνω σε αυτή τη μελέτη. Επίσης ευχαριστώ θερμά την Τώνια Ακουμιανάκη, την Ιωάννα Περάκη καθώς και τους καθ. Ειρήνη Αθανασάκη, Δέσποινα Αλεξανδράκη, Χρήστο Δελιδάκη και Νεκτάριο Ταβερναράκη.*

## ΜΕΡΟΣ Α

### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους είναι πολύ σημαντική για τον ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Οι μεροτελικές προσδέσεις (merotelic attachments), στις οποίες ένας κινητόχωρος προσδένεται με μικροσωληνίσκους οι οποίοι προέρχονται από αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου συμβαίνουν συνήθως στα πρώτα στάδια της μίτωσης κι αν δεν διορθωθούν πριν την έναρξη της ανάφασης, μπορούν να οδηγήσουν σε χρωμοσώματα που καθυστερούν και ανευπλοειδία. Οι μεροτελικές προσδέσεις δεν γίνονται αντιληπτές από το μιτωτικό σημείο ελέγχου (mitotic spindle checkpoint) και ο μηχανισμός επιδιόρθωσής τους δεν είναι απόλυτα κατανοητός.

Στην παρούσα μελέτη, δείχνουμε ότι η συντηρημένη κινάση Chk1, ένα καλά εδραιωμένο μέλος της απόκρισης σε βλάβες του DNA, απαιτείται για μείωση των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση, κατά τη μιτωτική διαίρεση κυττάρων σπονδυλωτών οργανισμών. Προτείνουμε ότι η Chk1 ρυθμίζει την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης μετάφασης. Επίσης προτείνουμε ότι η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση και ενεργότητα της Auroga-B κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων σε μεταφασικά κύτταρα. Θα ερευνήσουμε περαιτέρω αυτό το νέο ρόλο της Chk1 στη ρύθμιση της πιστότητας της αλληλεπίδρασης των μικροσωληνίσκων με τους κινητοχώρους.

## **Abstract**

Correction of improper kinetochore-microtubule attachments is critical for accurate chromosome segregation. Merotelic attachments in which a single kinetochore binds to microtubules emanating from both spindle poles occur frequently during the early stages of mitosis, and if not corrected prior to anaphase, can lead to lagging chromosomes and aneuploidy. Merotelic attachments are not detected by the mitotic spindle checkpoint and the mechanism of their correction is not fully understood.

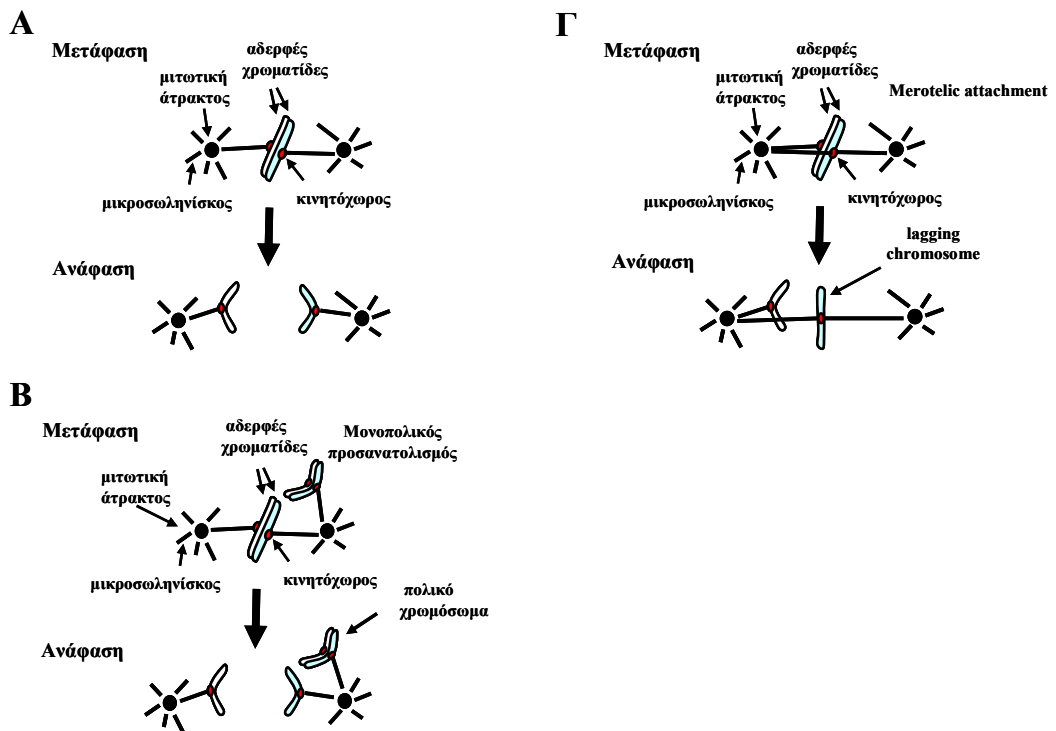
In the present study, we show that conserved protein kinase Chk1, a well-established component of the DNA damage response, is required to reduce merotelic kinetochore attachments and anaphase lagging chromosomes during mitotic cell division in vertebrate cells. We propose that Chk1 regulates correction of merotelic attachments during a prolonged metaphase. We also propose that Chk1 is required for optimal Aurora-B phosphorylation and activity during repair of merotelic attachments in metaphase cells. We will further investigate this novel role of Chk1 in regulating fidelity of kinetochore-microtubule interactions.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ακριβής διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων στη μίτωση είναι απαραίτητος για τη διατήρηση του σωστού αριθμού χρωμοσωμάτων στις θυγατρικές γενιές και προϋποθέτει πρόσδεση των αδερφών χρωματίδων με μικροσωληνίσκους που προέρχονται από αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου πριν την έναρξη της ανάφασης (Εικόνα 1A) (Rieder et al., 1994). Λανθασμένος διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανευπλοειδία δηλαδή κύτταρα που έχουν πάρει ή έχουν χάσει ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα, χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων (Kang and Yu, 2009).

Το μιτωτικό σημείο ελέγχου (mitotic spindle checkpoint) είναι ένας μηχανισμός προστασίας των κυττάρων, ο οποίος εξασφαλίζει το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων ελέγχοντας την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (Bharadwaj and Yu, 2004). Το spindle checkpoint αισθάνεται την έλλειψη πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (Yu, 2002) και καθυστερεί το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μέχρι όλες οι αδερφές χρωματίδες να αποκτήσουν διπολική πρόσδεση (Kops et al., 2005). Στο spindle checkpoint συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Mad (Mad1, Mad2 και BubR1), Bub (Bub1 και Bub3) και οι πρωτεΐνες του Συμπλόκου Χρωμοσωμικών Επιβατών (Chromosomal Passenger Complex-CPC). Όταν ενεργοποιείται το spindle checkpoint, οι πρωτεΐνες Mad και Bub μεταφέρονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων που δεν έχουν διαταχθεί σωστά. Οι BubR1 και Mad2 εντοπίζονται σε κινητοχώρους στους οποίους δεν υπάρχει πρόσδεση μικροσωληνίσκων ενώ μόνο η BubR1 εντοπίζεται σε κινητοχώρους στους οποίους δεν υπάρχει η κατάλληλη τάση (Kops et al., 2005). Η Aurora-B αποτελεί μέλος του Chromosomal Passenger Complex (CPC) μαζί με τις πρωτεΐνες INCENP, Survivin και Borealin και η καταλυτική της ενεργότητα είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση και τον εντοπισμό της BubR1 στους κινητοχώρους (Ditchfield et al., 2003). Στη συνέχεια, απενεργοποιείται το Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), μια E3 λιγάση ουβικιτίνης, με δέσμευση της καταλυτικής της υπομονάδας Cdc20 από τις Mad2 και BubR1 και φωσφορυλίωσή της από την Bub1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην αποικοδομείται η securin μέσω του πρωτεασώματος, η separase είναι ανενεργή οπότε δεν κόβει την cohesin που συγκρατεί τις αδερφές χρωματίδες μεταξύ τους ενώ ταυτόχρονα δεν αποικοδομείται η κυκλίνη B και η Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) παραμένει ενεργή οπότε το κύτταρο δεν περνά στην ανάφαση (Kops et al., 2005). Όταν όλες οι αδελφές χρωματίδες είναι διπολικά προσδεδεμένες, ενεργοποιείται το APC/C, γίνεται αποικοδόμηση της securin, απελευθερώνεται η separase, η οποία κόβει την cohesin ενώ ταυτόχρονα αποικοδομείται η κυκλίνη B, απενεργοποιείται η CDK1 και το κύτταρο προχωρά στην ανάφαση (Kops et al., 2005).

Προβλήματα στο spindle checkpoint μπορεί να οδηγήσουν σε ανευπλοειδία και καρκινογένεση (Kops et al., 2005). Αποτυχία του spindle checkpoint μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσώματα τα οποία δεν έχουν διαταχθεί στο ισημερινό επίπεδο κατά τη μετάφαση και σε πολικά χρωμοσώματα (polar chromosomes), δηλαδή χρωμοσώματα που βρίσκονται πιο κοντά σε έναν από τους δυο πόλους σε σχέση με τις υπόλοιπες αδερφές χρωματίδες, κατά την ανάφαση (Εικόνα 1B) (Kops et al., 2005).



**Εικόνα 1.** Λανθασμένος τρόπος πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους μπορεί να οδηγήσει σε διάφορους τύπους λανθασμένου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων.

(A) Φυσιολογική μετάβαση από μετάφαση σε ανάφαση. (B) Ο μονοπολικός προσανατολισμός αν δεν διορθωθεί πριν την ανάφαση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολικού χρωμοσώματος. (Γ) Οι μεροτελικές προσδέσεις (merotelic attachments) αν δεν διορθωθούν πριν την ανάφαση μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση (lagging chromosomes).

Οι κινητόχωροι των σπονδυλωτών έχουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης μικροσωληνίσκων (Salmon et al., 2005). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων είναι απαραίτητο όλες οι θέσεις πρόσδεσης του κινητόχωρου μιας αδερφής χρωματίδας να είναι προσδεδεμένες με μικροσωληνίσκους οι οποίοι προέρχονται από τον ένα πόλο της ατράκτου ενώ όλες οι θέσεις πρόσδεσης της άλλης αδερφής χρωματίδας ενός χρωμοσώματος πρέπει να καταλαμβάνονται από μικροσωληνίσκους οι οποίοι προέρχονται από τον αντίθετο πόλο (αμφιτελική πρόσδεση) (Cimini, 2007).

Οι μεροτελικές προσδέσεις συμβαίνουν αυθόρμητα κατά τη διάρκεια του μηχανισμού αναζήτησης και σύλληψης (search and capture mechanism) νωρίς στη μίτωση και συγκεκριμένα κατά την προμετάφαση και η συχνότητά τους αυξάνεται σημαντικά, μετά από απελευθέρωση των κυττάρων σε φρέσκο θρεπτικό υλικό έπειτα από επώαση με φάρμακα που αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου όπως το nocodazole (Cimini et al., 2001). Οι μεροτελικές προσδέσεις δεν επηρεάζουν τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο κατά τη μετάφαση (Cimini, 2007). Κύτταρα με μεροτελικές προσδέσεις προχωρούν στην ανάφαση διότι υπάρχει διπολική πρόσδεση μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους και δεν ενεργοποιείται το spindle checkpoint (Cimini et al., 2001). Η μεροτελική πρόσδεση επηρεάζει την κίνηση της αδερφής χρωματίδας προς τον πόλο της ατράκτου και η απομάκρυνσή της τελικά από το ισημερινό επίπεδο εξαρτάται από την αναλογία του

αριθμού των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το σωστό πόλο προς τον αριθμό των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο (Cimini et al., 2004). Εάν η μεροτελική πρόσδεση επιμείνει κατά την ανάφαση και η παραπάνω αναλογία είναι περίπου 1, τότε δημιουργείται ένα χρωμόσωμα που καθυστερεί (lagging chromosome) (Cimini, 2007). Το χρωμόσωμα που καθυστερεί συνήθως είναι μια αδερφή χρωματίδα η οποία παραμένει κοντά στο ισημερινό επίπεδο κατά την ανάφαση ενώ οι υπόλοιπες αδερφές χρωματίδες προχωρούν προς τους πόλους της ατράκτου (Εικόνα 1Γ) (Cimini et al., 2001). Αν τελικά το κύτταρο καταφέρει να διαιρεθεί παρουσία χρωμοσώματος που καθυστερεί, τότε μπορεί να προκύψει ένα θυγατρικό κύτταρο με μονοσωμία κι ένα με τρισωμία (Chandhok and Pellman, 2009).

Οι μεροτελικές προσδέσεις επιδιορθώνονται σε μεγάλο βαθμό πριν την ανάφαση μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος απελευθερώνει τους μικροσωληνίσκους οι οποίοι προέρχονται από το λανθασμένο πόλο και επιτρέπει την πρόσδεση μικροσωληνίσκων από το σωστό πόλο στις ελεύθερες θέσεις πρόσδεσης (Cimini, 2007). Η Aurora-B, μια κινάση Σερίνης-Θρεονίνης, είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων (Cimini et al., 2006). Η Aurora-B εντοπίζεται στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων κατά την προμετάφαση και μετάφαση, στο midzone κατά την ανάφαση και στο midbody, όπου συντελεί στην ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Κατά την επιδιόρθωση μεροτελικών προσδέσεων, τα θετικά άκρα των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο έλκονται προς το εσωτερικό κεντρομερές (inner centromere), όπου η συγκέντρωση της Aurora-B είναι αυξημένη. Το γεγονός αυτό προκαλεί αποπολυμερισμό των λανθασμένων μικροσωληνίσκων και αποσταθεροποίηση των μεροτελικών προσδέσεων (Cimini et al., 2006; Salmon et al., 2005).

Επιπλέον, οι κινεσίνες Kif2b και Mitotic Centromeric-Associated Kinesin (MCAK) είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση μεροτελικών προσδέσεων καθώς αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο (Bakhoun et al., 2009). Η Aurora-B φωσφορυλιώνει την MCAK στη Σερίνη 95 και ρυθμίζει τόσο την ενεργότητα όσο και τον εντοπισμό της στα κεντρομερή και τους κινητοχώρους (Andrews et al., 2004). Η MCAK συσσωρεύεται σε θέσεις μεροτελικής πρόσδεσης διότι έχει μεγάλη ενεργότητα αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το λανθασμένο πόλο (Knowlton et al., 2006). Αναστολή της Aurora-B ή της MCAK οδηγεί σε αυξημένο αριθμό μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (Cimini, 2007).

Το σύμπλοκο Ndc80 αποτελείται από τις πρωτεΐνες Hec1, Nuf2, Spc24 και Spc25 κι έχει την ικανότητα να δεσμεύει μικροσωληνίσκους των κινητοχώρων (DeLuca et al., 2006). Η Aurora-B φωσφορυλιώνει τη Hec1 στο αμινοτελικό άκρο προκαλώντας την απελευθέρωση των λανθασμένων μικροσωληνίσκων (DeLuca et al., 2006). Κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Hec1, η οποία δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την Aurora-B, παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (DeLuca et al., 2006).

Η Chk1 είναι μια καλά συντηρημένη κινάση Σερίνης-Θρεονίνης, η οποία ενεργοποιείται κατόπιν φωσφορυλίωσης από την ATR και εμποδίζει την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης όταν υπάρχουν βλάβες στο DNA που έχουν προκληθεί από υπεριώδη (UV) ή ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) (G2-M checkpoint) (Takai et al., 2000; Zachos et al., 2005). Όταν η Chk1 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη φωσφατάση Cdc25, η οποία δεν μπορεί πλέον να αποφωσφορυλιώσει τη Cdc2 και να ξεκινήσει η κυτταρική διαίρεση (Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997). Επιπλέον, η



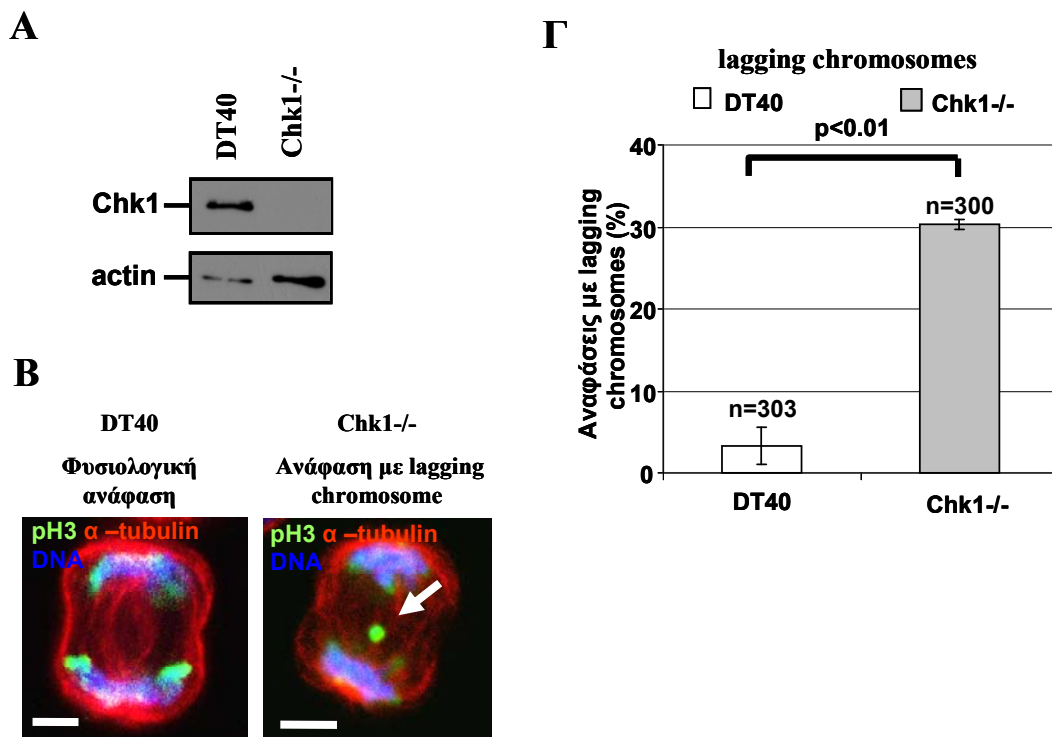
Chk1 συμμετέχει στο S-M checkpoint, το οποίο καθυστερεί την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης όταν δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA (Zachos et al., 2005).

Επιπλέον, ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι η Chk1 απαιτείται για τη βέλτιστη λειτουργία του spindle checkpoint (Zachos et al., 2007). Συγκεκριμένα, η Chk1 είναι απαραίτητη και στη μίτωση για διατήρηση της παραμονής των κυττάρων στη μίτωση κατά τη διάρκεια επώασης με ταξόλη, ένα φάρμακο το οποίο σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους αλλά όχι με nocodazole (Zachos et al., 2007). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B in vitro και είναι απαραίτητη για βέλτιστη ενεργότητα της Aurora-B κατά τη διάρκεια επώασης με ταξόλη αλλά όχι με nocodazole (Zachos et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη, δείχνουμε ένα νέο ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη μετάφαση.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Κύτταρα στα οποία απουσιάζει η Chk1 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (lagging chromosomes) κατά την ανάφαση.**

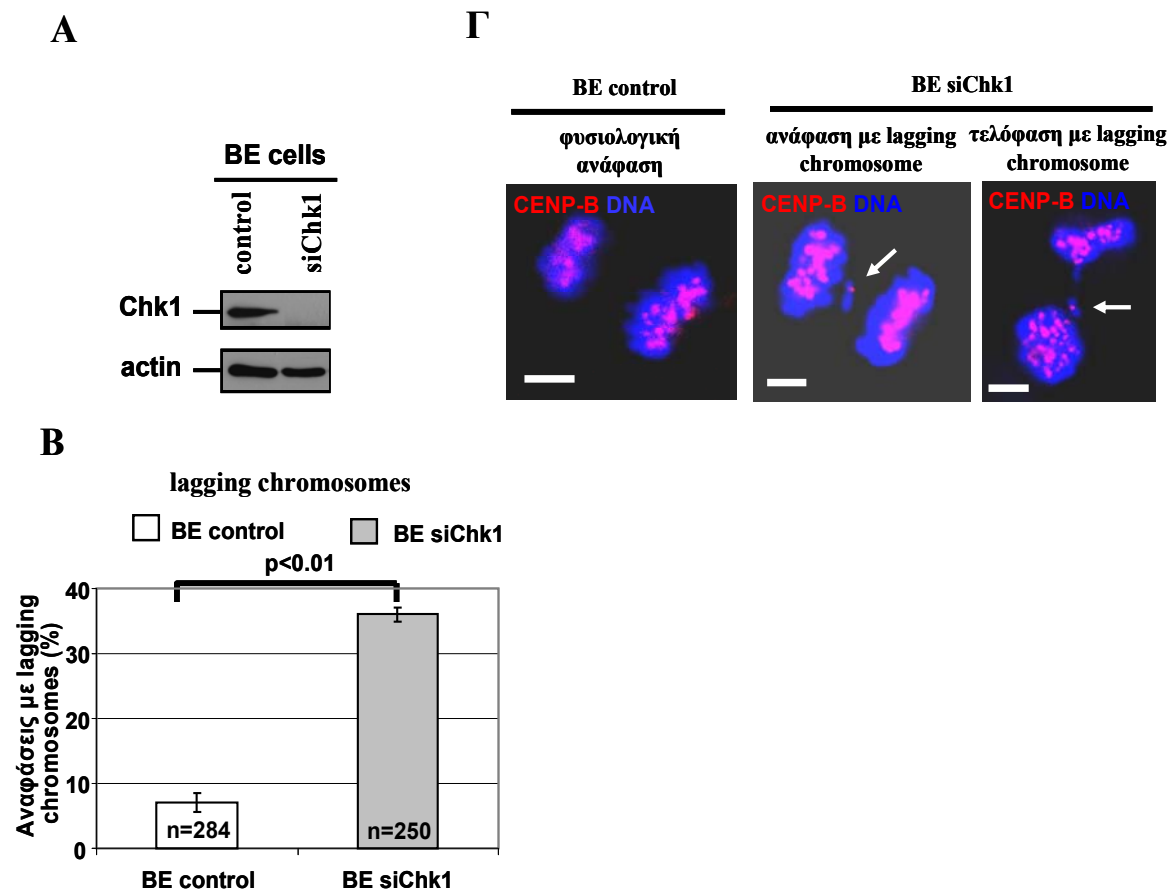
Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της Chk1 στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση, χρησιμοποιήθηκαν Chk1<sup>-/-</sup> DT40 κύτταρα (Zachos et al., 2003), στα οποία έχει απαλειφθεί γενετικά η Chk1 (genetic knockout) και αγρίου τύπου DT40 κύτταρα (Εικόνα 2Α) και μελετήθηκαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Ανάλυση των αναφάσεων στα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα έδειξε ότι 91/300 κύτταρα (30,3%) παρουσιάζουν ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα που καθυστερούν σε σχέση με 10/303 (3,3%) των αναφάσεων στα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνες 2Β και 2Γ).



**Εικόνα 2. Τα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (lagging chromosomes) στην ανάφαση σε σχέση με τα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα.**

(A) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Chk1 και ακτίνης (B) Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία σε Chk1<sup>-/-</sup> και αγρίου τύπου DT40 κύτταρα. Το βέλος δείχνει ένα χρωμόσωμα που καθυστερεί (lagging chromosome). Πράσινο: φωσφορυλιωμένη Σερίνη 10 της ιστόνης H3 (pH3), κόκκινο:  $\alpha$ -tubulin, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5  $\mu$ m. (Γ) Η συχνότητα των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) σε Chk1<sup>-/-</sup> και αγρίου τύπου DT40 κύτταρα. Τα error bars δείχνουν την τυπική απόκλιση του μέσου τριών πειραμάτων. Το p-value υπολογίστηκε με χρήση του Student's t-test.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τις παρατηρήσεις μας σε μια διαφορετική κυτταρική σειρά, ελαττώσαμε την έκφραση της Chk1 με παροδική επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) σε κύτταρα BE, καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου του ανθρώπου (Εικόνες 3A και 7Γ). Ανάλυση κυττάρων με μειωμένη έκφραση της Chk1 έδειξε 90/250 (36%) αναφάσεις/τελοφάσεις οι οποίες παρουσιάζουν ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα που καθυστερούν σε σχέση με 16/284 (5,6%) των αναφάσεων/τελοφάσεων στα control BE κύτταρα, στα οποία έχει γίνει παροδική επιμόλυνση με αρνητικό siRNA (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 3B). Τα χρωμοσώματα που καθυστερούν τυπικά αποτελούν μια αδερφή χρωματίδα στην οποία ανιχνεύεται ένας κινητόχωρος όπως φαίνεται έπειτα από χρώση με αντίσωμα εναντίον της πρωτεΐνης CENP-B, μια από τις πρωτεΐνες των κινητοχώρων (Εικόνα 3Γ) (Cimini et al., 2001). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 προστατεύει τα κύτταρα σπονδυλωτών οργανισμών από χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) κατά την ανάφαση.

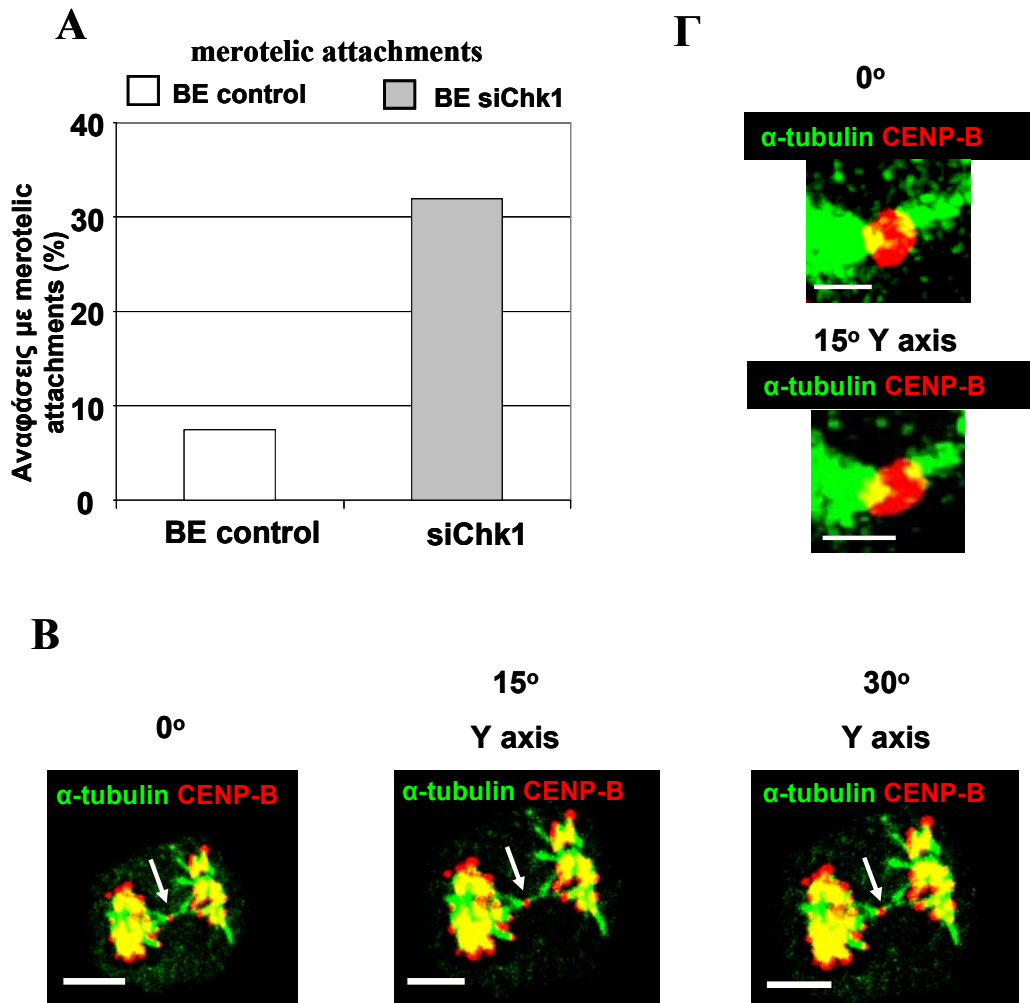


### **Εικόνα 3. ΒΕ κύτταρα με ελαττωμένη Chk1, παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση (lagging chromosomes).**

(A) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Chk1 και ακτίνης (B) Η συχνότητα των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) σε κύτταρα ΒΕ έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1). Τα error bars δείχνουν την τυπική απόκλιση του μέσου τριών πειραμάτων. Το p-value υπολογίστηκε με χρήση του Student's t-test. (Γ) Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία σε ΒΕ control και siChk1 κύτταρα. Τα χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) στην ανάφαση και στην τελόφαση είναι χρωματίδες στις οποίες υπάρχει μόνο ένα σήμα CENP-B και δείχνονται με βέλος. Κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5  $\mu\text{m}$ .

### **Κύτταρα με μειωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων (merotelic attachments).**

Αυθόρμητες μεροτελικές προσδέσεις συμβαίνουν συχνά στη μίτωση κι αν δεν διορθωθούν πριν την ανάφαση, μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (Cimini, 2007; Thompson and Compton, 2008). Προκειμένου να μελετήσουμε την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση, κύτταρα ΒΕ έπειτα από παροδική επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1 επώαστηκαν με κρύο θρεπτικό υλικό ώστε να αποπολυμεριστεί το μεγαλύτερο ποσοστό των μικροσωληνίσκων οι οποίοι δεν προσδέονται στους κινητοχώρους και να διατηρηθούν μόνο οι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων ( $\kappa$ -μικροσωληνίσκοι) (Silkworth et al., 2009). Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν πρωτεΐνες των κινητοχώρων (CENP-B) και μικροσωληνίσκοι ( $\alpha$ -tubulin) με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Ανάλυση οπτικών τομών έδειξε ότι 16/50 (32%) των αναφάσεων στα κύτταρα ΒΕ με ελαττωμένη Chk1 (siChk1) παρουσιάζουν μεροτελικές προσδέσεις σε σχέση με 4/54 (7,4%) στα control κύτταρα (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 4A). Παράδειγμα μεροτελικής πρόσδεσης φαίνεται στις εικόνες 4B και 4Γ: Ο κινητόχωρος φαίνεται προσδεδεμένος με μικροσωληνίσκους που προέρχονται κι από τους δύο πόλους ακόμα κι αν περιστραφεί κατά 15° ή 30° κατά τον Ψ άξονα (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνες 4B και 4Γ). Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 προστατεύει τα κύτταρα από μεροτελικές προσδέσεις κατά την ανάφαση.



**Εικόνα 4.** BE κύτταρα με ελαττωμένη Chk1 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων (merotelic attachments).

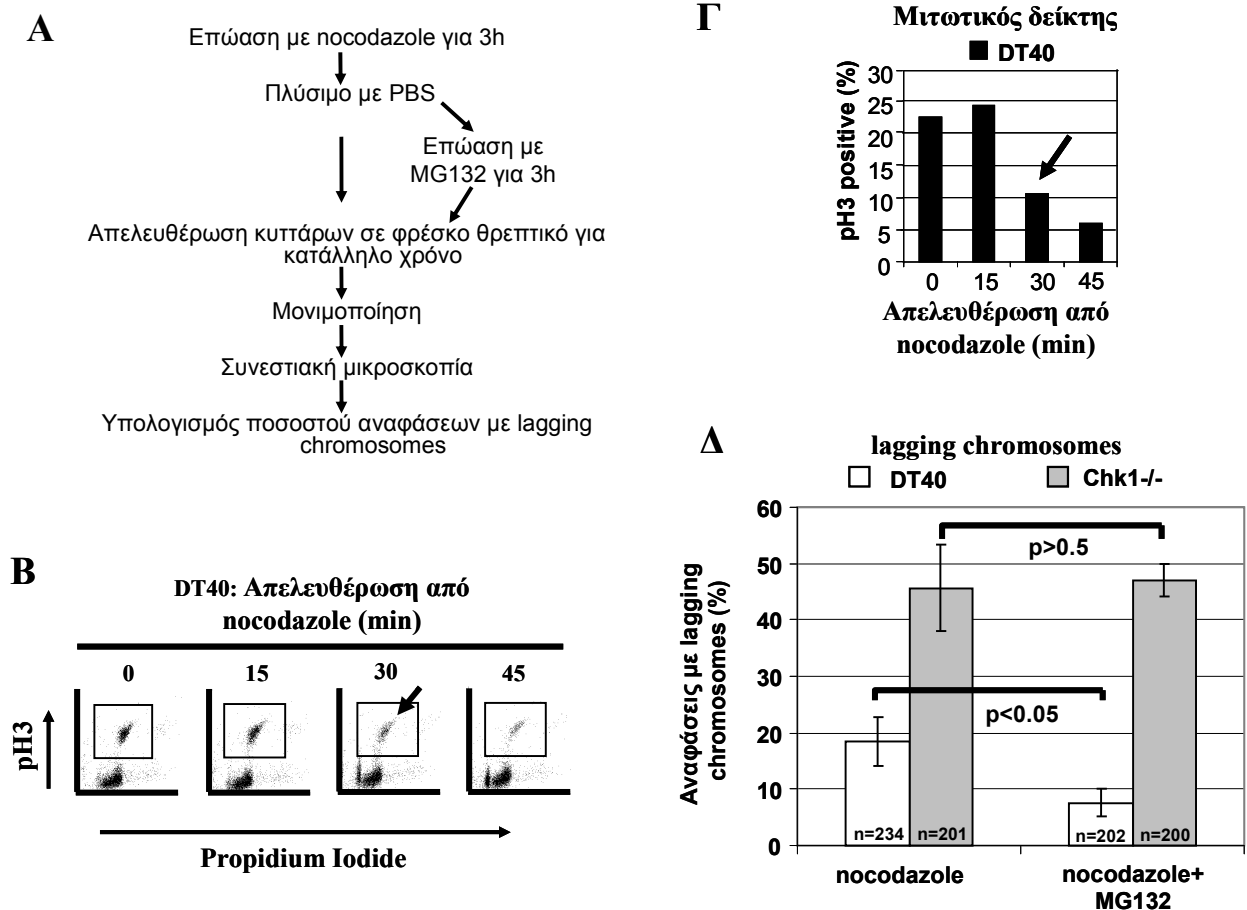
(A) Συχνότητα αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις σε κύτταρα BE έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) (B) Προβολή τομών συνεστιακού μικροσκοπίου από ένα κύτταρο BE έπειτα από παροδική επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1. Το βέλος δείχνει έναν κινητόχωρο ο οποίος έχει προσδεθεί με μικροσωληνίσκους που προέρχονται από αντίθετους πόλους (merotelic attachment). Ο κινητόχωρος φαίνεται προσδεδμένος ακόμα κι αν περιστραφεί 15° ή 30° κατά τον άξονα Ψ. Πράσινο: α-tubulin, κόκκινο: CENP-B. Η κλίμακα είναι 5 μm. (Γ) Μεγέθυνση της μεροτελικής πρόσδεσης που φαίνεται στην εικόνα B, 0° και 15° αντίστοιχα. Η κλίμακα είναι 1 μm. Διακρίνονται δύο δέσμες μικροσωληνίσκων που καταλήγουν στον κινητόχωρο, ο οποίος αν περιστραφεί 15° φαίνεται τεντωμένος.

**Η Chk1 απαιτείται για μείωση των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.**

Οι μεροτελικές προσδέσεις μπορεί να προκληθούν από μη αποτελεσματική επιδιόρθωση λανθασμένων προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (Cimini, 2007). Προκειμένου να ερευνησουμε το ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη μετάφαση, εμπλουτίσαμε τον πληθυσμό των κυττάρων με μεροτελικές προσδέσεις με χρήση του φαρμάκου nocodazole και μελετήσαμε τη συχνότητα χρωμοσωμάτων που καθυστερούν μετά από ανάκαμψη

έπειτα από εκτεταμένη παραμονή των κυττάρων στη μετάφαση με την ουσία MG132. Το φάρμακο nocodazole αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους, προκαλεί μεγέθυνση των κινητοχώρων σε σχήμα ημισέληνου γύρω από τα κεντρομερή και αυξάνει τη συχνότητα των μεροτελικών προσδέσεων και των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση έπειτα από απελευθέρωση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό υλικό (Cimini et al., 2001). Οι μεροτελικές προσδέσεις συμβαίνουν κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση κι αν δεν διορθωθούν παραμένουν στην ανάφαση. Αν όμως παραταθεί ο χρόνος τον οποίο τα κύτταρα περνούν στη μετάφαση τότε οι λανθασμένες προσδέσεις επιδιορθώνονται στα φυσιολογικά κύτταρα (Cimini et al., 2003). Παράταση της διάρκειας της μετάφασης επιτυγχάνεται με χρήση του MG132, ενός αναστολέα του πρωτεασώματος ο οποίος καθυστερεί τα κύτταρα στη μετάφαση λόγω αναστολής της διάσπασης των cohesins (πρωτεΐνες που συγκρατούν τις αδερφές χρωματίδες συνδεδεμένες) και παρεμπόδιση της αποικοδόμησης της κυκλίνης B.

Συγκεκριμένα, επώασαμε κύτταρα Chk1<sup>-/-</sup> και αγρίου τύπου DT40 κύτταρα με nocodazole για 3 ώρες και τα απελευθέρωσαμε σε φρέσκο θρεπτικό υλικό παρουσία ή απουσία MG132 για 3 ώρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στην εικόνα 5A. Στη συνέχεια τα κύτταρα απελευθερώθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό για κατάλληλο χρονικό διάστημα προκειμένου να εισέλθουν στην ανάφαση (ανάκαμψη), μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με κατάλληλα αντισώματα και μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Παράδειγμα υπολογισμού των χρόνων ανάκαμψης για τα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα φαίνεται στις Εικόνες 5B και 5Γ. Μετά από απελευθέρωση από nocodazole για διαφορετικούς χρόνους, τα DT40 κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για φωσφορυλίωση της Σερίνης 10 της ιστόνης H3 (μιτωτικός δείκτης- FITC φθορισμός) και περιεχόμενο DNA (Propidium Iodide) και προσδιορίστηκε ο αριθμός των pH3-θετικών κυττάρων (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 5B) (Zachos et al., 2005). Μείωση του ποσοστού των pH3-θετικών κυττάρων 30 λεπτά μετά την απελευθέρωση, συμβαδίζει με έναρξη της ανάφασης και ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 5Γ) (Ajiro et al., 1996). Ο χρόνος αυτός χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για πειράματα προσδιορισμού της συχνότητας των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν και των μεροτελικών προσδέσεων στην ανάφαση.

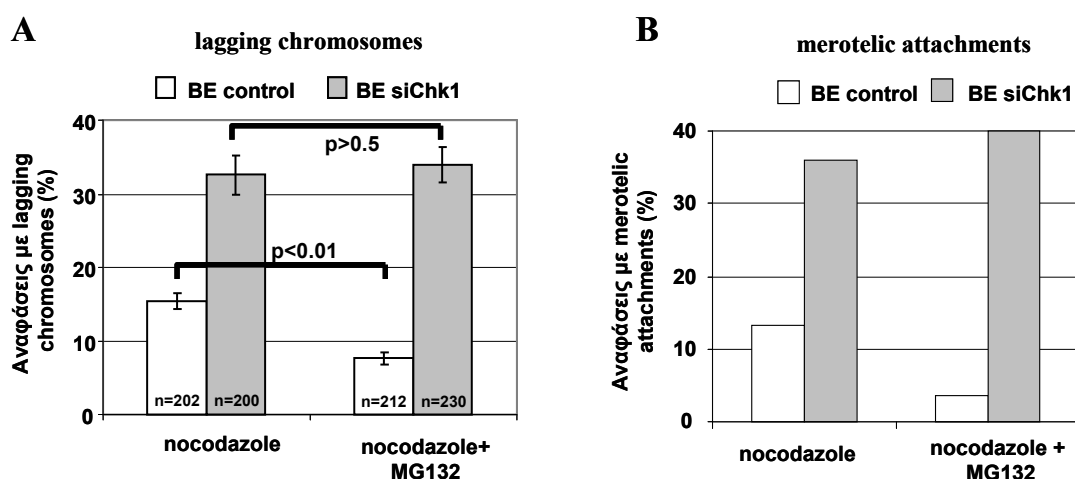


**Εικόνα 5. Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό χρωμοσωμάτων που καθυστερούν (lagging chromosomes) σε σχέση με τα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.**

(A) Πρωτόκολλο εμπλουτισμού των κυττάρων με μεροτελικές προσδέσεις (βλέπε κείμενο). (B) Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής φθορισμού ο οποίος σχετίζεται με τη φωσφορυλιωμένη Σερίνη 10 της ιστόνης H3 (pH3) και το περιεχόμενο του DNA σε κύτταρα DT40 έπειτα από επώαση με nocodazole και απελευθέρωση σε φρέσκο θρεπτικό. Τα πλαίσια δείχνουν τα pH3-θετικά κύτταρα. (Γ) Ανάλυση μιτωτικού δείκτη σε αγρίου τύπου DT40 από το (B). Μετά από 30 λεπτά απελευθέρωση από nocodazole, τα pH3-θετικά κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση (βέλος). (Δ) Συχνότητα αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) σε Chk1<sup>-/-</sup> και αγρίου τύπου DT40 κύτταρα μετά από ανάκαμψη από nocodazole ή nocodazole και MG132. Τα error bars δείχνουν την τυπική απόκλιση του μέσου τριών πειραμάτων. Το p-value υπολογίστηκε με χρήση του Student's t-test.

Έπειτα από επώαση με nocodazole και απελευθέρωση σε φρέσκο θρεπτικό, το ποσοστό των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν στα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα είναι 18,5% και μειώνεται στο 7,6% μετά από ανάκαμψη έπειτα από παράταση της μετάφασης με χρήση MG132 (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 5Δ). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο επιπλέον χρόνος που δίνεται στα κύτταρα στη μετάφαση οδηγεί σε επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους και μείωση του ποσοστού των χρωμοσωμάτων που καθυστερούν στην ανάφαση. Αντίθετα, στα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα το ποσοστό των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν είναι 45,7% με χρήση nocodazole έναντι 47% με χρήση του MG132 (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 5Δ), δηλαδή δεν μειώνεται με χρήση του MG132.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας σε μια άλλη κυτταρική σειρά, υπολογίσαμε τη συχνότητα των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις σε κύτταρα BE μετά από ανάκαμψη από nocodazole ή nocodazole και MG132. Παρατεταμένη μετάφαση με χρήση MG132 σε κύτταρα που ανακάμπτουν από nocodazole έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό siRNA (control), οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν μετά από ανάκαμψη από MG132 (από 15,4% σε 7,6%) (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 6A). Αντίθετα, σε κύτταρα BE με ελαττωμένη Chk1, η συχνότητα των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν δεν μειώνεται (από 32,6% σε 34%) (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 6A). Επιπλέον σε control κύτταρα που ανακάμπτουν από nocodazole και MG132 παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των μεροτελικών προσδέσεων σε σχέση με ανάκαμψη από nocodazole μόνο (από 13,3% σε 3,6%) σε αντίθεση με κύτταρα με μειωμένη Chk1 (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 6B). Συμπερασματικά, η Chk1 είναι απαραίτητη για μείωση των μεροτελικών συνδέσεων και των αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν μετά από ανάκαμψη από nocodazole και MG132. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα νέο ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη διάρκεια της μετάφασης.



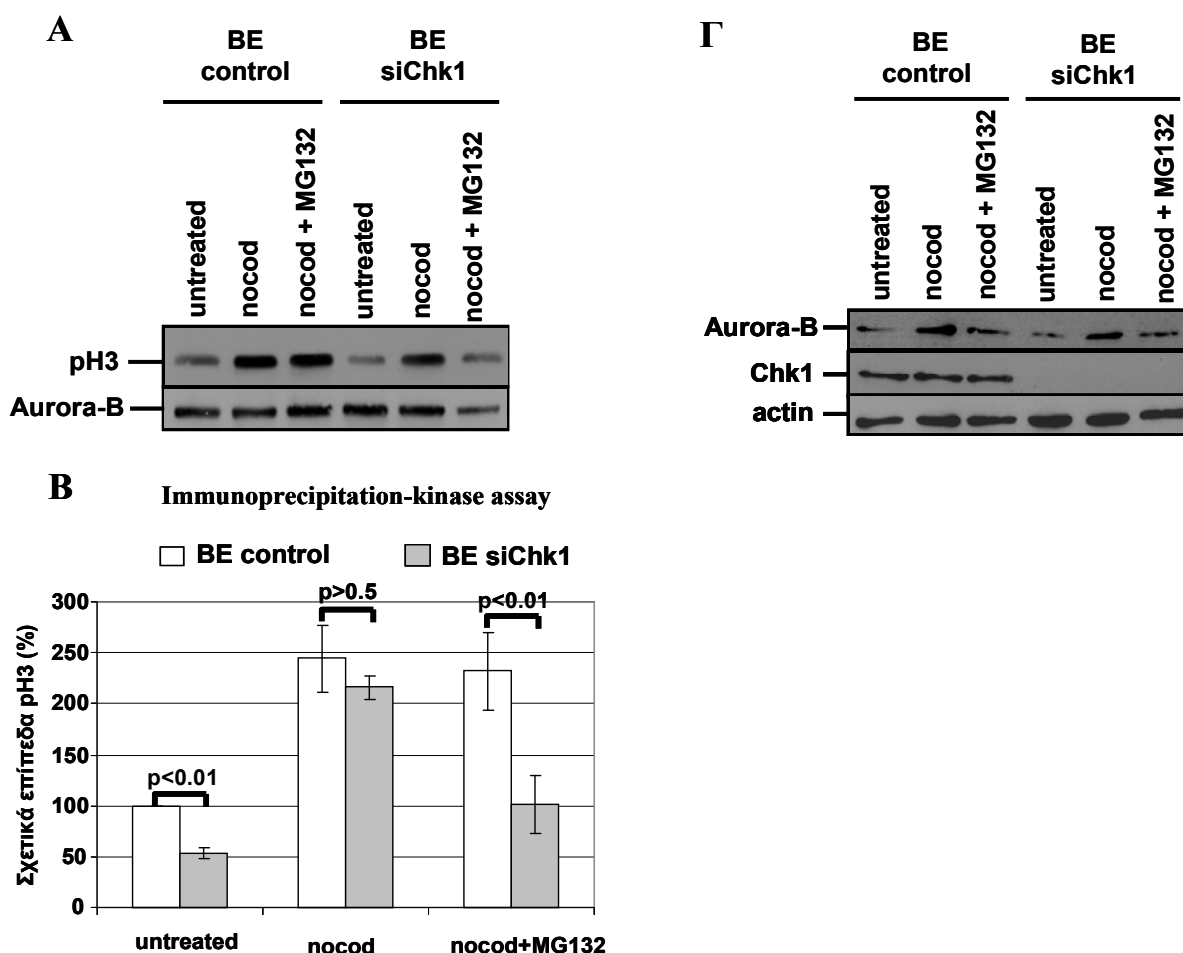
**Εικόνα 6. Η Chk1 απαιτείται για μείωση του ποσοστού των αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (merotelic attachments) και χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.**

(A) Συχνότητα αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν (lagging chromosomes) σε BE κύτταρα έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) μετά από ανάκαμψη από nocodazole ή nocodazole και MG132. (B) Συχνότητα αναφάσεων με μεροτελικές προσδέσεις (merotelic attachments) σε BE κύτταρα control ή siChk1 μετά από ανάκαμψη από nocodazole ή nocodazole και MG132. Τα error bars δείχνουν την τυπική απόκλιση του μέσου τριών πειραμάτων. Το p-value υπολογίστηκε με χρήση του Student's t-test.

### **Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη ενεργότητα της Aurora-B έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.**

Η καταλυτική ενεργότητα της Aurora-B είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων (Cimini et al., 2006). Προκειμένου να μελετήσουμε τη

ρύθμιση της ενεργότητας της Aurora-B από την Chk1, ανοσοκατακρημνίστηκε η Aurora-B από κύτταρα BE έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κινάσης με υπόστρωμα την ιστόνη H3 και υπολογίστηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 10 της ιστόνης H3 (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 7) (Zachos et al., 2007). Απουσία φαρμάκων, η ενεργότητα της Aurora-B μειώνεται στο μισό σε κύτταρα με ελαττωμένη Chk1 σε σχέση με control κύτταρα και η μείωση είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,01$ ). Παρουσία nocodazole, ελάττωση της Chk1 δεν επιφέρει σημαντική μείωση της Aurora-B ( $p > 0,5$ ) (Zachos et al., 2007) ενώ όταν τα κύτταρα απελευθερώνονται σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσία MG132 για 3 ώρες έπειτα από επώαση με nocodazole, η ενεργότητα της Aurora-B μειώνεται 2,5 φορές στα κύτταρα με μειωμένη Chk1 σε σχέση με τα control κύτταρα ( $p < 0,01$ ) (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνα 7B). Ωστόσο, τα συνολικά επίπεδα της Aurora-B είναι παρόμοια σε BE κύτταρα παρουσία ή απουσία Chk1 (Εικόνα 7Γ). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη ενεργότητα της Aurora-B κατά την παρατεταμένη μετάφαση σε κύτταρα που ανακάμπτουν από nocodazole.



**Εικόνα 7.** Κύτταρα με ελαττωμένη Chk1 εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα της Aurora-B έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132 ενώ τα επίπεδα της Aurora-B είναι παρόμοια παρουσία ή απουσία Chk1.

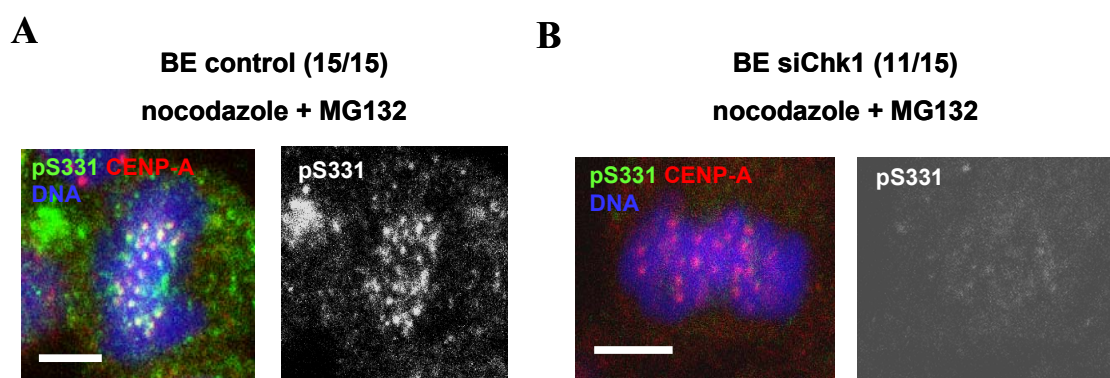


(A) BE κύτταρα έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) καλλιεργήθηκαν χωρίς φάρμακα (untreated), επώαστηκαν με nocodazole (nocod), ή nocodazole και MG132. Επάνω πλαίσια: Φωσφορυλίωση της Σερίνης 10 της ιστόνης H3 (pH3) από την Aurora-B. Κάτω πλαίσια: Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western της ανοσοκατακρημνισμένης Aurora-B. (B) Ανάλυση με πυκνομετρία τριών ανεξάρτητων πειραμάτων με χρήση του προγράμματος Image J. Τα επίπεδα pH3 στα untreated control BE κύτταρα ορίστηκαν ως 100%. (Γ) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της Chk1, Aurora-B και ακτίνης σε κύτταρα BE έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν χωρίς φάρμακα (untreated), επώαστηκαν με nocodazole (nocod), ή nocodazole και MG132.

### Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Aurora-B στη Σερίνη 331 κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων

Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora-B *in vitro* (Zachos et al., 2007). Εντοπίσαμε το συντηρημένο κατάλοιπο Σερίνης 331 της Aurora-B ως θέση φωσφορυλίωσης από την Chk1 και αναπτύξαμε ένα φωσφοαντίσωμα εναντίον της φωσφορυλιωμένης Σερίνης 331 της Aurora-B (pS331) (Αδημοσίευτα αποτελέσματα και αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται εδώ).

Προκειμένου να μελετήσουμε τη φωσφορυλίωση στη Σερίνη 331 της Aurora-B κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων στη μετάφαση, BE κύτταρα έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) επώαστηκαν με nocodazole για 3 ώρες και στη συνέχεια απελευθερώθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό παρουσία MG132 για 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών επώασης με MG132, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, βάφτηκαν με αντισώματα εναντίον της φωσφορυλιωμένης Σερίνης 331 και μιας πρωτεΐνης των κινητοχώρων (CENP-A) και μελετήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. 11/15 κύτταρα στη μετάφαση με ελαττωμένη Chk1 (siChk1) παρουσιάζουν μειωμένη φωσφορυλίωση στη Σερίνη 331 στους κινητοχώρους σε σχέση με τα control κύτταρα (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Εικόνες 8Α και 8B). Έπειτα από ποσοτικοποίηση, ο μέσος όρος έντασης φθορισμού pS331/CENP-A στα control κύτταρα ήταν  $1,12 \pm 0,29$  σε αντίθεση με τα siChk1 κύτταρα στα οποία ο μέσος όρος ήταν  $0,28 \pm 0,13$  (Αδημοσίευτα αποτελέσματα-Πίνακας 1). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Aurora-B στη Σερίνη 331 έπειτα από επώαση των κυττάρων με nocodazole και MG132.



Εικόνα 8. Η Chk1 απαιτείται για βέλτιστη φωσφορυλίωση της Aurora-B στη Σερίνη 331 κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132.

(A, B) Προβολή τομών συνεστιακού μικροσκοπίου από ένα BE κύτταρο έπειτα από παροδική επιμόλυνση με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαση με nocodazole και MG132. Η συχνότητα των μεταφασικών κυττάρων με το συγκεκριμένο φαινότυπο φαίνεται στην εικόνα. Πράσινο: φωσφορυλιωμένη Σερίνη 331 (pS331), κόκκινο: CENP-A, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5  $\mu$ m.

**Πίνακας I. Τιμές έντασης φθορισμού που σχετίζεται με τη φωσφορυλιωμένη Σερίνη 331 (pS331) σε μεταφασικούς κινητοχώρους έπειτα από παροδική επιμόλυνση κυττάρων BE με αρνητικό (control) ή siRNA εναντίον της Chk1 (siChk1) και επώαση με nocodazole και MG132.**

	BE control		BE siChk1	
	Ένταση φθορισμού (pS331/CENP-A)	<i>n</i> (ζεύγη κινητοχώρων, αριθμός κυττάρων)	Ένταση φθορισμού (pS331/CENP-A)	<i>n</i> (ζεύγη κινητοχώρων, αριθμός κυττάρων)
Nocodazole+ MG132	<b>1.12 ± 0.29</b>	43,3	<b>0.28 ± 0.13</b>	46,3

Οι μέσες τιμές έντασης φθορισμού έχουν προκύψει μετά από κανονικοποίηση με τη CENP-A και το *n* παριστάνει τον αριθμό των ζευγών κινητοχώρων ακολουθούμενο από τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν σε κάθε περίπτωση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Chk1 είναι μια κινάση που ενεργοποιείται παρουσία βλαβών στο DNA (Takai et al., 2000). Πρόσφατα δείχτηκε ότι η Chk1 συμμετέχει στο spindle checkpoint (Zachos et al., 2007) ωστόσο ο ρόλος της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως. Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι κύτταρα στα οποία απουσιάζει η Chk1 εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα μεροτελικών προσδέσεων και χρωμοσωμάτων που καθυστερούν κατά την ανάφαση σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη μετάφαση, εμπλουτίσαμε τον πληθυσμό των κυττάρων με μεροτελικές προσδέσεις. Έτσι χρησιμοποιήσαμε το φάρμακο nocodazole το οποίο αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους και είναι γνωστό ότι αυξάνει τη συχνότητα των μεροτελικών προσδέσεων (Cimini et al., 2003) κι αφού απομακρύνουμε το nocodazole παρατείναμε τη μετάφαση με τον MG132, έναν αντιστρεπτό αναστολέα του πρωτεασώματος. Μετά την απομάκρυνση του αναστολέα, αφήσαμε τα κύτταρα να περάσουν στην ανάφαση και υπολογίσαμε τη συχνότητα αναφάσεων με χρωμοσώματα που καθυστερούν και μεροτελικές προσδέσεις. Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι η Chk1 είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων κατά τη μετάφαση. Χρειάζονται κι άλλα πειράματα προκειμένου να εξετάσουμε το ρόλο της Chk1 στην επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων που συμβαίνουν αυθόρμητα χωρίς στη μίτωση απουσία φαρμάκων. Επίσης, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί αν η

καταλυτική ενεργότητα της Chk1 απαιτείται για προστασία των κυττάρων από χρωμοσώματα που καθυστερούν, παρουσία ή απουσία φαρμάκων.

Η καταλυτική ενεργότητα της Aurora-B απαιτείται για επιδιόρθωση των λανθασμένων προσδέσεων μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους (Cimini et al., 2006). Θελήσαμε να μελετήσουμε τη ρύθμιση της ενεργότητας της Aurora-B από την Chk1 κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων. Δείξαμε ότι κύτταρα με μειωμένη Chk1 εμφανίζουν μικρότερη ενεργότητα της Aurora-B κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132. Είναι απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω η λειτουργική αλληλεπίδραση της Chk1 με την Aurora-B κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων.

Προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητας της Aurora-B από την Chk1, εντοπίσαμε το κατάλοιπο Σερίνης 331 (pS331) ως θέση φωσφορυλίωσης της Aurora-B από την Chk1 (Αδημοσίευτα αποτελέσματα και αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται εδώ). Στην παρούσα μελέτη, κύτταρα με ελαττωμένη Chk1 εμφανίζουν μειωμένη φωσφορυλίωση στη Σερίνη 331 στους κινητοχώρους σε σχέση με τα control κύτταρα κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων έπειτα από επώαση με nocodazole και MG132. Χρειάζονται περαιτέρω πειράματα προκειμένου να μελετηθεί η σημασία της φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 331 και να διευκρινιστεί εάν αυτή είναι απαραίτητη για την καταλυτική ενεργότητα ή τον εντοπισμό της Aurora-B κατά την επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων.

Η μελέτη μας προτείνει ένα νέο μηχανισμό με τον οποίο η Chk1 μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από ανευπλοειδία μέσα από το ρόλο της στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης των μεροτελικών προσδέσεων. Υπάρχουν ωστόσο πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν σχετικά με το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο δρα η Chk1. Χρειάζεται να ερευνηθεί εάν η επιδιόρθωση των μεροτελικών προσδέσεων πραγματοποιείται άμεσα από την Chk1 με αποπολυμερισμό των λανθασμένων μικροσωληνίσκων ή έμμεσα μέσω της φωσφορυλίωσης της Aurora-B στη Σερίνη 331. Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί πιθανή ρύθμιση της ενεργότητας αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων των κινεσίνων MCAK και Kif2b από την Chk1.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργεια**

Τα DT40 κύτταρα (B λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum, 1% chicken serum, 10  $\mu$ M  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη, 30  $\mu$ g/ml πενικιλίνη και 50  $\mu$ g/ml στρεπτομυκίνη στους 39.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια από τη Gibco). Τα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα προήλθαν από αγρίου τύπου DT40 με εξάλειψη των ενδογενών αλληλομόρφων του γονιδίου της Chk1 όπως περιγράφηκε (Zachos et al., 2003).

BE κύτταρα, καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου του ανθρώπου, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum, 30  $\mu$ g/ml πενικιλίνη and 50  $\mu$ g/ml στρεπτομυκίνη στους 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια από τη Gibco).

### **Αντισώματα-Φθορίζουσες χρωστικές-Πρωτεΐνες**

Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Chk1 (G-4) και τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της phospho-Ser<sup>10</sup> της ιστόνης H3 και της CENP-B (H-65) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της CENP-A (3-

19) και το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Aurora-B (AIM-1) ήταν από την Abcam. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ακτίνης (AC-40) και της  $\alpha$ -tubulin (DM1A) ήταν από τη Sigma και το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Aurora-B ήταν από την BD Biosciences.

Τα παρακάτω φθορίζοντα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν με διάφορους συνδυασμούς: anti-mouse FITC, anti-rabbit FITC και anti-rabbit TRITC (όλα από την Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 633 anti-mouse και Alexa Fluor 633 anti-rabbit (Invitrogen). Το πολυκλωνικό φωσφο-αντίσωμα έναντι της pS331 αναπτύχθηκε σε κουνέλι (EUROGENTEC, UK). Το DNA βάφτηκε με PI (Sigma) ή με Topro (Invitrogen).

Η ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 ήταν από την Upsate Biotechnology.

### **RNA παρεμβολή (RNAi)**

Το siRNA έναντι της Chk1 του ανθρώπου ή το αρνητικό siRNA (Thermo Scientific Dharmacon), εισήχθησαν με παροδική επιμόλυνση σε κύτταρα BE, 48 ώρες πριν την ανάλυση ή τη χρήση φαρμάκων, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Lipofectamin (Invitrogen). Οι αλληλουχίες των siRNAs είναι διαθέσιμες εφόσον ζητηθούν.

### **Επώσεις με φάρμακα**

*Επώαση με nocodazole.* Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία nocodazole, τα Chk1<sup>-/-</sup> DT40 κύτταρα, τα αγρίου τύπου DT40 κύτταρα και τα BE κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες με το φάρμακο. Μετά την επώαση, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν είτε με 70% αιθανόλη σε phosphate-buffered saline (PBS) με σκοπό να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής είτε με PFA (παραφορμαλδεΰδη) για μελέτη με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Τα DT40 κύτταρα επώαστηκαν με 1  $\mu$ g/ml nocodazole (Sigma) και 10  $\mu$ g/ml MG132 (Calbiochem). Τα BE κύτταρα επώαστηκαν με 50 ng/ml nocodazole και 10  $\mu$ g/ml MG132.

*Απελευθέρωση από nocodazole.* Μετά την επώαση με το φάρμακο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και επώαστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό προκειμένου να ανακάμψουν. Μετά από 30 λεπτά για τα αγρίου τύπου DT40, 1 ώρα για τα Chk1<sup>-/-</sup> και 1 ώρα για τα BE, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν είτε με 70% αιθανόλη σε PBS είτε με PFA.

*Απελευθέρωση από nocodazole και MG132.* Στα πειράματα απελευθέρωσης από nocodazole και MG-132, τα αγρίου τύπου DT40, Chk1<sup>-/-</sup> και BE κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες με nocodazole. Μετά την επώαση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και επώαστηκαν με MG-132 για 3 ώρες. Στο τέλος της επώασης, τα κύτταρα είτε μονιμοποιήθηκαν με PFA είτε ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και επώαστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό 75 λεπτά για τα αγρίου τύπου DT40, 5,5 ώρες για τα Chk1<sup>-/-</sup> και μια ώρα για τα BE ώστε να ανακάμψουν. Έπειτα μονιμοποιήθηκαν με 70% αιθανόλη σε PBS ή με PFA.

### **Συνεστιακή Μικροσκοπία**

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, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 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 αραιώσης 1:100 σε 1% BSA σε PBS για 1 ώρα στους 37 °C. 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 MgSO<sub>4</sub>) το οποίο περιείχε 100 nM Microcystin ώστε να απενεργοποιηθούν οι φωσφατάσες (Gorbsky and Ricketts, 1993). Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη και βάφτηκαν με πολυκλωνικό φωσφο-αντίσωμα anti-pS331 (EUROGENTEC) το οποίο παράχθηκε σε κουνέλι και χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο 1:40. Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού έγινε με το Leica Confocal Software και οι τιμές της pS331 κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την ένταση της CENP-A.

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

### **Λύση κυττάρων για ανοσοαποτύπωση κατά Western**

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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) για 30 λεπτά στον πάγο. Τα προϊόντα της κυτταρολύσεως φυγοκεντρήθηκαν σε 15000 g για 5 λεπτά. Για ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της Chk1 σε αραιώση 1:2000, της Aurora-B (AIM-1) 1:2000 και της ακτίνης σε αραιώση 1:5000.

### **Ανοσοκατακρήμνιση και δοκιμασία κινάσης**

Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν 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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 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 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM glycerophosphate, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) (Honda et al., 2003). Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν με Western blotting με πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της phospho-Ser<sup>10</sup> της ιστόνης H3. Η πυκνομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

### **Κυτταρομετρία ροής**

Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 70% αιθανόλη σε PBS στους 4 °C και βάφτηκαν με το πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της phospho-Ser<sup>10</sup> της ιστόνης H3. Τα κύτταρα βάφτηκαν επίσης με propidium iodide (PI) και υπολογίστηκε το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων (Zachos et al., 2005).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajiro, K., Yoda, K., Utsumi, K., and Nishikawa, Y. (1996). Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. *J Biol Chem* *271*, 13197-13201.
- 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.
- Bakhoun, 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.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* *23*, 2016-2027.
- Chandhok, N.S., and Pellman, D. (2009). A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* *19*, 74-81.
- 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. (2007). Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle* *6*, 1558-1564.
- Cimini, D., Cameron, L.A., and Salmon, E.D. (2004). Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr Biol* *14*, 2149-2155.
- 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*, 517-527.
- 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.
- 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, J.G., Moree, B., Hickey, J.M., Kilmartin, J.V., and Salmon, E.D. (2002). hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J Cell Biol* *159*, 549-555.
- 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. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* *161*, 267-280.
- Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* *277*, 1495-1497.
- Girdler, F., Gascoigne, K.E., Evers, P.A., Hartmuth, S., Crafter, C., Foote, K.M., Keen, N.J., and Taylor, S.S. (2006). Validating Aurora B as an anti-cancer drug target. *J Cell Sci* *119*, 3664-3675.

- Gorbsky, G.J., and Ricketts, W.A. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J Cell Biol* 122, 1311-1321.
- Green, R.A., and Kaplan, K.B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 163, 949-961.
- 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, 3325-3341.
- Kang, J., and Yu, H. (2009). Kinase signaling in the spindle checkpoint. *J Biol Chem* 284, 15359-15363.
- 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.
- Patterson, G.H., and Lippincott-Schwartz, J. (2002). A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873-1877.
- 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, 1301-1310.
- Salmon, E.D., Cimini, D., Cameron, L.A., and DeLuca, J.G. (2005). Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 553-568.
- 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, 1497-1501.
- 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.
- 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, 1439-1447.
- Thompson, S.L., and Compton, D.A. (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* 180, 665-672.
- Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211-222.
- Yu, H. (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 706-714.
- 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.
- 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., 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, 563-574.