

Die Bedeutung des zentrosomalen Proteins TACC3 für die zelluläre Seneszenz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Schmidt
aus Wesel

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Priv. Doz. Dr. Reza Ahmadian
Koreferent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..I

Abbildungsverzeichnis ...III

1. Einleitung 1

1.1 Proliferation, Zellzyklus und mitotische Zellteilung 1

1.1.1 Zellzyklus und Zellzykluskontrollpunkte 1

1.1.2 Mitose und Zellteilung unter der Kontrolle des mitotischen Spindelapparats und des Spindelkontrollpunkts 4

1.1.3 Die zelluläre und biologische Funktion zentrosomaler TACC-Proteine 8

1.2 Zelluläre Seneszenz 12

1.2.1 Definition, Charakteristika und Auslöser zellulärer Seneszenz 12

1.2.2 Die molekulare Regulation zellulärer Seneszenz 14

1.3 Zielsetzung der Arbeit 17

2. Manuskripte 18

2.1 Publikation 1: The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program 19

2.2 Publikation 2: The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence 21

2.3 Publikation 3: TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division 22

3. Abschlussdiskussion 24

3.1 Malmitose kann Stress-induzierte prämature Seneszenz auslösen 24

3.1.1 TACC3-Depletion aktiviert ein zelluläres Seneszenzprogramm 25

3.1.2 Proteine des Kinetochors und des Spindelkontrollpunkts in der zellulären Seneszenzinduktion und vorzeitigen Alterung 30

3.2 Wie bewirkt Malmitose eine Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs als wesentlichen Induktor der zellulären Seneszenzantwort? 32

3.3 Die mögliche Bedeutung der TACC3-TSC2-Interaktion für die Zellteilung und Seneszenzinduktion 34

3.4 Die Bedeutung zellulärer Seneszenz für die Suppression und Promotion von Tumorentwicklung 37

4. Zusammenfassung 42

5. Abstract 44

6. Abkürzungsverzeichnis 46

7. Literaturverzeichnis 48

Lebenslauf 59

Danksagung 60

Eidesstattliche Erklärung 61

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Der Zellzyklus einer Säugerzelle und seine Regulation durch Cdk/Zyklin-Komplexe. 2

Abb. 2: Der G_1/S-Kontrollpunkt und seine Regulation. 3

Abb. 3: Darstellung der mitotischen Phasen einer Säugerzelle. 5

Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Chromosoms und Kinetochors mit der Mikrotubulibindung während der Metaphase. 6

Abb. 5: Die funktionelle Bindung des mitotischen Spindelapparats an die Kinetochoren. 7

Abb. 6: Die Familie der zentrosomalen und Spindel-lokalisierten TACC-Proteine. 8

Abb. 7: Subzelluläre Lokalisation von TACC3 am Zentrosom und Spindelapparat. 9

Abb. 8: Extrinsische und intrinsische Induktoren zellulärer Seneszenz. 13

Abb. 9: Der TSC2-mTOR-Signalweg. 15

Abb. 10: Regulation von Proliferation durch den Aurora-A-TACC3-Signalweg. 29

Abb. 11: Das „*mitotic clock model*“ 33

Abb. 12: Bedeutung der mitotischen TACC3-TSC2-Interaktion für die zelluläre Seneszenzinduktion (Arbeitsmodell). 36

Abb. 13: Die Bedeutung der zellulären Seneszenz für die Suppression und Promotion der Tumorentwicklung. 38

1. Einleitung

1.1 Proliferation, Zellzyklus und mitotische Zellteilung

Die Zellen aller Organismen, vom einzelligen Bakterium über einzellige Hefen bis hin zum vielzelligen Säugetier, sind darauf angewiesen zu proliferieren und sich selbst zu teilen, um den eigenen Organismus zu erhalten. Auf diesem Weg entsteht bei Bakterien oder Hefen mit jeder Zellteilung ein neuer Organismus, während die Proliferation in vielzelligen Organismen dem Aufbau und der Regeneration von Geweben dient. Zur Vorbereitung einer Zellteilung durchlaufen Zellen einen Zellzyklus, in welchem sie wachsen und ihre genetische Information, die DNS, replizieren. Diese wird in der abschließenden Phase des Zellzyklus, in der Mitose, gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt.

1.1.1 Zellzyklus und Zellzykluskontrollpunkte

Der Zellzyklus einer Säugerzelle besteht aus den vier differenzierbaren Phasen: Gap1 (G_1), DNS-Synthese-Phase (S), Gap2 (G_2) und Mitose (M) (Rieder, 2011). Intrinsisch wird der Zellzyklus durch Zykline und Cdks (*cyclin dependent kinases*) gesteuert. Cdks sind Serin/Threonin-Kinasen, die mit Zyklinen einen funktionellen Komplex eingehen und dadurch den Prozess des Zellzyklus durch Phosphorylierung von Zielproteinen entweder aktivieren oder deaktivieren.

Die Cdk-Zyklin-Komplexe besitzen eine wichtige Bedeutung in der Regulation von Zellzykluskontrollpunkten, an denen der korrekte Verlauf des Zellzyklus ständig überprüft wird (Hartwell & Weinert, 1989). Diese Kontrollpunkte stellen wichtige Sensoren dar, die unter Stresssituationen (z.B. Einwirkung ionisierender Strahlung, UV-Strahlung oder Behandlung mit zytotoxischen Agentien) Zellen im Zellzyklusverlauf stoppen. In der Folge unterbindet die Zelle die Aktivität der Cdk-Zyklin-Komplexe und hat die Möglichkeit Schäden zu reparieren, oder im Falle des Fehlschlagens Zelltod durch die Aktivierung des Apoptoseprogramms einzuleiten. Auf diese Weise wird verhindert, dass auftretende Replikations- oder Zellteilungsdefekte weiter propagiert werden (Rieder, 2011). Die Kontrollpunkte werden in jedem Zellzyklus abgefragt und werden im „Normalfall" als saturiert bewertet. Sie können aber den Zellzyklus stoppen, falls ein wichtiges Signal für das Fortschreiten im Zyklus fehlt oder entsprechende Schäden vorliegen und der Kontrollpunkt dadurch nicht saturiert werden kann. Wie in Abb. 1 dargestellt, sind in Säugerzellen vier

Kontrollpunkte bekannt, die als G_1/S-, S-, G_2-, und in der Mitose als Spindelkontrollpunkt (□*spindle-assembly-checkpoint*□, SAC) definiert sind.

Jeder Zellzyklus beginnt mit der G_1-Phase. In dieser Phase führt die Zelle wichtige transkriptionelle und translationelle Prozesse durch, welche für Stoffwechsel und Wachstum der Zelle entscheidend sind, insbesondere aber für die folgende Phase, in welcher die Zelle ihre DNS repliziert. Zum Übergang in die S-Phase bedarf es der Dephosphorylierung des Cdk4/6-Zyklin D-Komplexes durch die Phosphatase Cdc25A, welche im weiteren Verlauf Cdk2 im Cdk2-Zyklin E-Komplex dephosphoryliert und dadurch aktiviert (Sexl *et al.*, 1999).

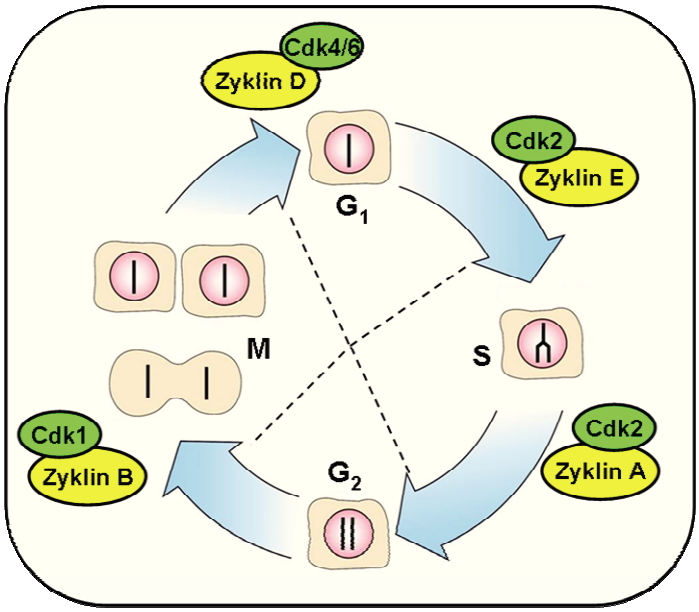


Abb. 1: Der Zellzyklus einer Säugerzelle und seine Regulation durch Cdk/Zyklin-Komplexe. Die Abbildung zeigt die vier Phasen im Zellzyklus humaner Zellen: die G_1-, die S-, die G_2-, sowie die Mitose-Phase. Modifiziert nach Currais *et al.*, 2009.

Die Komplexe Cdk4/6-Zyklin D und Cdk2-Zyklin E phosphorylieren im nächsten Schritt die Transkriptionsfaktoren der Retinoblastoma-(Rb)-Proteinfamilie, welche den Übergang der Zelle von der G_1-Phase in die S-Phase steuern, da sie nach ihrer Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor E2F freigeben (Abb. 2) (Kato *et al.*, 1993). E2F schließlich aktiviert die Transkription proliferationsfördernder Gene, wie z.B. Zyklin A, deren Expression für das Voranschreiten in die S-Phase des Zyklus essentiell ist (Abb. 2) (Qin *et al.*, 1995).

An dieser Stelle liegt auch der erste Kontrollpunkt (G_1/S-Kontrollpunkt) im Zellzyklus, der die Transition der Zellen aus der G_1-Phase in die S-Phase kontrolliert. In der G_1-Phase überprüft die Zelle, ob alle Voraussetzungen für eine fehlerfreie DNS-Replikation während der folgenden S-Phase gegeben sind. Detektiert die Zelle z.B. Schäden in ihrer DNS, wird der

Kontrollpunkt aktiviert, so dass der Zellzyklus an dieser Stelle vorerst gestoppt wird. Aufgrund der Bindung von Mdm2 und die dadurch vermitttelte Ubiquitinierung sowie den folgenden proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53 besitzt dieser unter normalen Bedingungen nur eine geringe Aktivität in der Zelle (Maya *et al.*, 2001). Sobald beispielsweise ein DNS-Schaden in der Zelle auftritt, wird Mdm2 durch ATM phosphoryliert und folglich inaktiviert (Khosravi *et al.*, 1999).

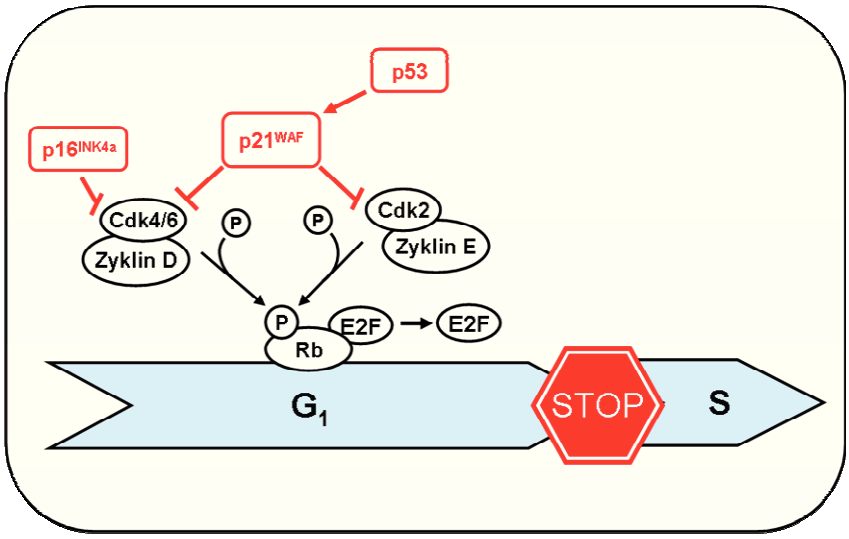


Abb. 2: Der G_1/S-Kontrollpunkt und seine Regulation. Wenn ein Schaden in der Zelle detektiert wird, wird u.a. der Tumorsuppressor p53 aktiviert, welcher die Expression von $p21^{WAF}$ initiiert. Letzteres inhibiert dann die Cdk4/6/Zyklin D- und Cdk2/Zyklin E-Komplexe, wodurch die Phosphorylierung des Rb-Proteins unterbunden wird. Rb löst sich damit nicht vom Transkriptionsfaktor E2F und die Transkription Zellzyklus-fördernder Gene wird verhindert. Desweiteren kann der Zellzyklus durch die verstärkte Expression von $p16^{INK4a}$ unterbunden werden, da dieses den Cdk4/6/Zyklin D-Komplex inhibiert und somit den Zellzyklus stoppt.

Dadurch kann p53 akkumulieren und im Folgenden eine erhöhte transkriptionelle Expression des Zellzyklusinhibitors $p21^{WAF}$ bewirken. $p21^{WAF}$ bindet an den Cdk2-Zyklin E-Komplex sowie Cdk4/6-Zyklin D-Komplex (Harper *et al.*, 1995) und verhindert dadurch die aktivierende Phosphorylierung von Rb (Abb. 2). Infolgedessen kann sich der Transkriptionsfaktor E2F nicht von Rb lösen und die Transkription essentieller Zellzyklus-fördernder Gene für den Übergang zur S-Phase findet nicht statt. Somit befindet sich die Zelle in einem G_1-Arrest.

Im Anschluss an die G_1-Phase gehen die Zellen in die S-Phase über, in welcher die Zelle ihre genetische Information, die DNS, repliziert. Während der S-Phase wird doppelsträngige DNS schrittweise kopiert, um ein identisches Abbild des maternalen Genoms zu erstellen. In dieser Phase kontrolliert Zyklin A im Komplex mit der Kinase Cdk2 den Fortschritt des Zellzyklus (Diederichs *et al.*, 2004). Auch hier überprüft die Zelle während der Replikation den Status

ihrer DNS. Tritt während der Replikation ein Schaden auf, wird der Zellzyklus gestoppt und es werden wichtige Moleküle zur Reparatur des Schadens aktiviert (z.B. Rad50, MRE11 oder NBS1) (Dupre *et al.*, 2006). Erst wenn der Schaden behoben und der Kontrollpunkt saturiert ist, kann der Zellzyklus in der G_2-Phase fortgesetzt werden.

Zum Zeitpunkt der vollständigen Replikation der DNS verlässt die Zelle die S-Phase und geht über in die G_2-Phase. Diese Phase zwischen S-Phase und Mitose nutzt die Zelle zur Überprüfung der korrekten und vollständigen Replikation ihrer genetischen Information. Vor der Einleitung der Mitose wird die Phosphatase Cdc25 durch die „*Polo like-Kinase1*“ (Plk1) phosphoryliert (Lobjois *et al.*, 2009) und aktiviert anschließend die Kinase Cdk1 durch Dephosphorylierung eines Tyrosins an der Aminosäureposition 15 (Timofeev *et al.*, 2010). Cdk1 bildet anschließend mit Zyklin B1 einen Komplex, ohne den die Initiierung der Mitose nicht erfolgen kann (Gavet & Pines, 2010). Dieser Komplex reguliert während der Mitose viele essentielle Prozesse, wie z.B. den Abbau der Kernhülle und den Aufbau des mitotischen Spindelapparats und steuert auf diesem Weg die gesamte mitotische Zellteilung.

1.1.2 Mitose und Zellteilung unter der Kontrolle des mitotischen Spindelapparats und des Spindelkontrollpunkts

Im Gegensatz zu der meist mehrere Stunden andauernden G_1- oder S-Phase ist die Phase der Zellteilung die kürzeste Phase im Zellzyklus von Säugerzellen. Diese Phase ist von essentieller Bedeutung für die Verteilung der zuvor kopierten genetischen Information und anschließende Verdopplung der Zelle. Wie in Abb. 3 dargestellt und im weiteren Verlauf dieses Kapitels erklärt, wird die Mitose in verschiedene, kurze Phasen gegliedert, welche jeweils wichtige Schritte der Chromosomensegregation und Zellteilung beinhalten.

Eine wichtige Rolle spielt hierbei der mitotische Spindelapparat, welcher zuerst an den Zentrosomen bzw. Spindelpolen ensteht und schließlich aus den Zentrosomen und Mikrotubuli besteht. Nach Akkumulation und Aktivierung des Cdk1-Zyklin B1-Komplexes in der G_2-Phase wandern die Zentrosomen, die aus den Zentriolen und dem „*Pericentriolar Material*“ (PCM) bestehen (Ou *et al.*, 2004), perinukleär an zwei gegenüberliegende Pole der Zelle. Während der Prophase beginnt die Zelle an den Zentrosomen den mitotischen Spindelapparat aus Tubulin-Protofilamenten für die spätere Segregation der identischen Chromatiden eines Chromosoms zu polymerisieren. Außerdem kondensiert im Zellkern die DNS zu kompakten Chromosomen, indem die DNS um Histone gewunden wird. In der

anschließenden Prometaphase löst sich die Zellkernmembran auf. In der darauffolgenden Metaphase arrangieren sich alle Chromosomen auf der Äquatorialplatte, so dass diese sich zentral zwischen den zwei Zentrosomen befinden.

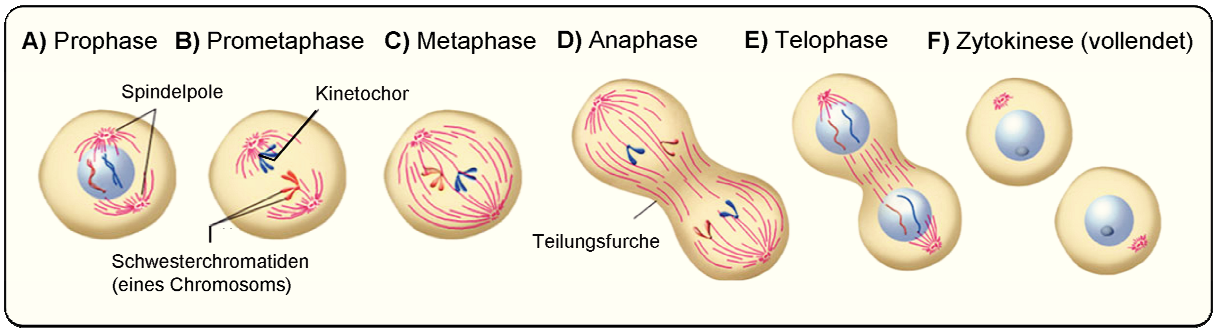


Abb. 3: Darstellung der mitotischen Phasen einer Säugerzelle. (A) In der Prophase positionieren sich die Spindelpole an den gegenüberliegenden Seiten einer Zelle. (B) In der Prometaphase löst sich die Zellkernmembran auf und die Kinetochoren der Schwesterchromatiden eines Chromosoms binden an die Mikrotubuli des Spindelapparats. (C) In der Metaphase arrangieren sich alle Chromosomen an der Äquatorialplatte. Anschließend werden die Chromosomen in der Anaphase (D) segregiert und durch den Spindelapparat zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen werden. (E) In der Telophase bildet sich eine neue Zellkernmembran und die Zellteilung wird durch die Zytokinese (F) abgeschlossen. Modifiziert nach Lodish *et al.*, 2000.

Dies ist eine Voraussetzung für eine fehlerfreie Bindung der Chromosomen an den Spindelapparat. Wie in Abb. 4 dargestellt findet die Bindung des mitotischen Spindelapparats an den Chromosomen durch Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli statt. Diese repräsentieren Multiproteinkomplexe, die an den Zentromeren der Schwesterchromatiden eines Chromosoms assembliert werden (Santaguida & Musacchio, 2009). Dabei wird je ein Mikrotubulus der gegenüberliegenden Zentrosomen mit je einem Kinetochor der Schwesterchromatiden eines Chromosoms amphitelisch (bipolar) verbunden, um die Chromatiden während der anschließenden Anaphase voneinander zu trennen und auf die beiden Tochterzellen zu verteilen. Die Bindung der Mikrotubuli durch die Kinetochoren der zu trennenden Chromatiden ist von großer struktureller und regulatorischer Bedeutung (Przewloka & Glover, 2009). Das Kinetochor besteht aus mehreren Bereichen. Das innere Kinetochor bildet dabei eine feste Verbindung zur Zentromerregion des Chromosoms. Diese Verbindung wird z.B. durch das Protein CENP-A (*centromere protein A*), einer Proteinvariante des Histones H3, gewährleistet, welche das Kinetochor an der DNS verankert (Musacchio & Salmon, 2007). Im äußeren Kinetochor sind dagegen essentielle Mikrotubuli-bindende Proteine wie MIS12 (*Protein MIS12 homolog*) und Ndc80 (*Hec1*) oder die Proteine des Spindelkontrollpunkts wie Mad2 (*mitotic arrest deficient 2*), BubR1 (*budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta*) oder Bub3 (*budding uninhibited*

by benzimidazole□) lokalisiert (Musacchio & Salmon, 2007). Nachdem jedes Kinetochor einen Mikrotubulus gebunden hat, wird Cdc20 (□*cell-division cycle protein 20*□) aktiviert, indem sich die Kinetochorproteine Mad2 und BubR1, die Cdc20 inhibieren, von Cdc20 lösen und dieses freigeben. Cdc20 aktiviert anschließend den APC/C (□*Anaphase Promoting Complex/Cyclosom*□), welcher in der Zelle als E3-Ubiquitinligase fungiert und den proteasomalen Abbau von Zyklin B1 und Securin nach der Metaphase einleitet. Durch die proteasomale Degradation des Securins wird das Enzym Separase nicht mehr durch Securin gebunden, d.h. inhibiert, und kann damit die verbundenen Schwesterchromatiden enzymatisch voneinander trennen (Waizenegger *et al.*, 2002). Im Anschluß werden diese vom mitotischen Spindelapparat segregiert und zu den gegenüberliegenden Polen befördert.

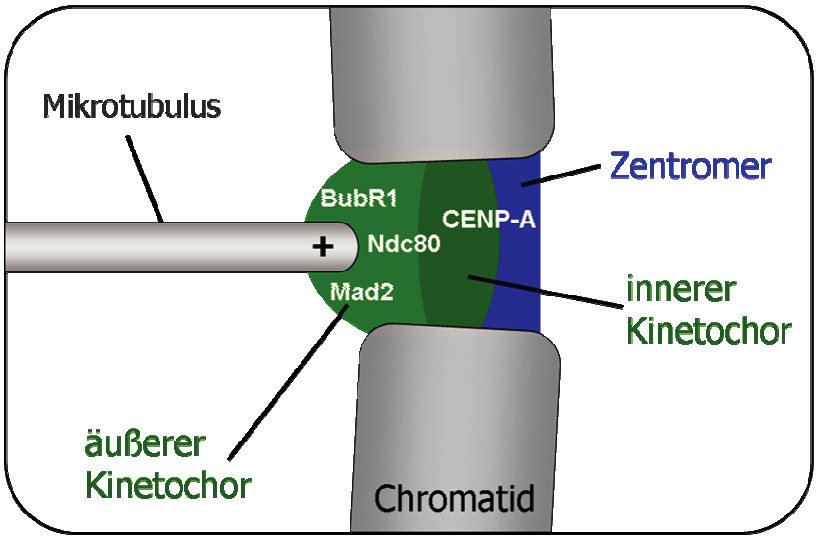


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Chromosoms und Kinetochors mit der Mikrotubulibindung während der Metaphase. Am Zentromer der Chromosomen liegt das Kinetochor, bestehend aus einem inneren und äußeren Kinetochor, welches zur Chromosomensegregation an die Plus-Enden der Mikrotubuli bindet. Modifiziert nach Musacchio & Salmon, 2007.

Wenn auch nur ein einziger Mikrotubulus, wie in Abb. 5 gezeigt, ein Kinetochor nicht bindet (monotelisch) oder zwei Mikrotubuli eines Zentrosoms beide Kinetochore desselben Chromosoms binden (syntelisch), kann ein mitotischer Arrest ausgelöst werden. Diese Inhibition der Metaphase-Anaphase-Transition wird durch den Spindelkontrollpunkt initiiert, da dieser im Falle einer fehlerhaften Kinetochor-Mikrotubuli-Bindung nicht mehr saturiert wird. Durch die fehlende Bindung des Kinetochors zum Mikrotubulus wird Mad2 vom Kinetochor gelöst und bindet zusammen mit BubR1 an Cdc20, was in dessen Inhibition resultiert. Dadurch unterbleibt eine Aktivierung des APC/C durch Cdc20, Zyklin B1 und Securin werden nicht durch APC/C proteasomal degradiert. Als Konsequenz wird die Anaphase nicht initiiert (Musacchio & Salmon, 2007).

Die Funktion des Spindelkontrollpunkt kann dabei durch verschiedene Stresseinflüsse verändert werden, so dass die Zelle ihn als nicht saturiert bewertet und die Metaphase-Anaphase-Transition stoppt. Zu diesen Einflüssen gehören Spindelgifte, wie z.B. das Chemotherapeutikum Paclitaxel (Taxol®), welches die Depolymerisation der Mikrotubuli in der Metaphase verhindert und somit die Mikrotubulidynamik irreversibel blockiert (Hari *et al.*, 2006).

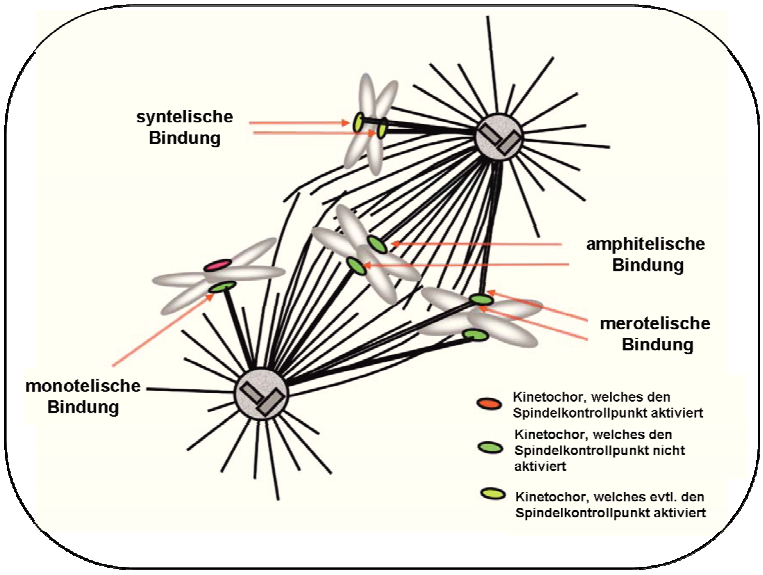


Abb. 5: Die funktionelle Bindung des mitotischen Spindelapparats an die Kinetochoren. Die amphitelische Bindung der Kinetochore ist notwendig für eine korrekte Segregation der Chromosomen. Findet diese nicht statt, da die Kinetochor-Mikrotubuli-Bindung irrtümlich syntelisch, monotelisch oder merotelisch stattfindet, führt dies zum mitotischen Arrest, da der SAC nicht saturiert wird. Modifiziert nach Rieder & Maiato, 2004.

Im Gegensatz dazu inhibiert z.B. Nocodazol reversibel die Polymerisation von Mikrotubuli in der Prophase, so dass der mitotische Spindelapparat nicht ausgebildet werden kann. Als Resultat beider Spindelgiftwirkungen kann die Kinetochor-Mikrotubuli-Bindung nicht stattfinden und der Spindelkontrollpunkt wird nicht saturiert. Je länger eine Zelle durch einen nicht saturierten Spindelkontrollpunkt arretiert ist, desto höher ist das Risiko einer fehlerhaften Zellteilung. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass Zellen trotz des Arrests die Mitose verlassen ohne die Zellteilung zu beenden (*„mitotic slippage“*) (Brito & Rieder, 2006) und damit oftmals postmitotische Aneuploidie hervorrufen. Andererseits können arretierte Zellen durch Apoptose aus der Mitose nach Aktivierung der Caspasen 9 und 3 versterben (Gascoigne & Taylor, 2009).

1.1.3 Die zelluläre und biologische Funktion zentrosomaler TACC-Proteine

Die korrekt verlaufende Mitose wird zu einem großen Teil durch Zentrosomen gesteuert. Das Zentrosom reguliert während der Mitose den Aufbau und die Dynamik des mitotischen Spindelapparats. Zentrosomen bestehen aus den gepaarten Zentriolen und dem PCM, welches die Zentriolen umgibt. Das PCM des Zentrosoms wird u.a. aus Pericentrin und γ-Tubulin gebildet, welches eine starke Bindung der Mikrotubuli am Zentrosom gewährleistet. Dadurch wird eine Polarität der Mikrotubuli gewährleistet, wobei die Minus-Enden im PCM des Zentrosoms verankert werden, während die Mikrotubuli an ihren Plus-Enden polymerisiert werden und den Spindelapparat bilden (Peset & Vernos, 2008).

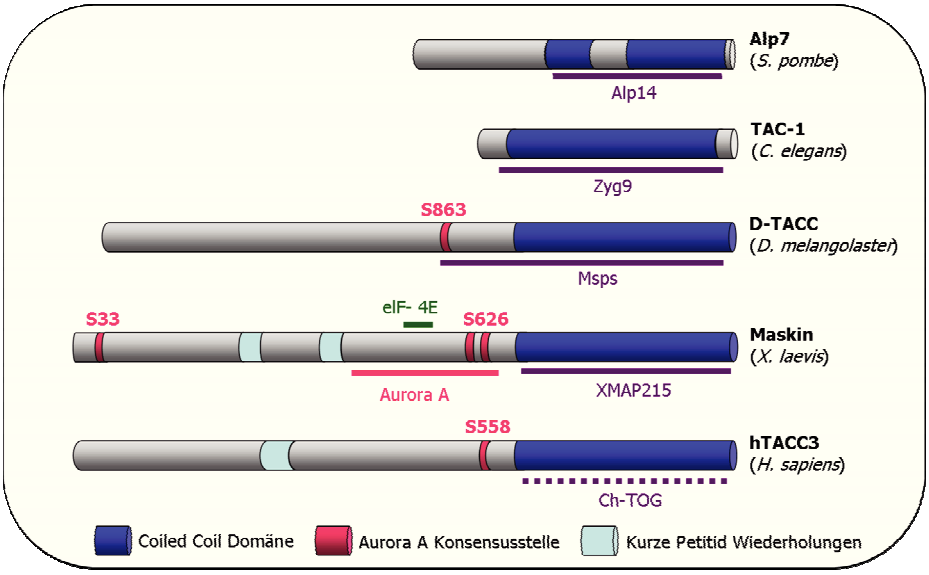


Abb. 6: Die Familie der zentrosomalen und Spindel-lokalisierten TACC-Proteine. Alle TACC-Proteine zeichnen sich durch eine konservierte „coiled coil"-Domäne am C-Terminus aus, während die Funktionen des N-Terminus und der zentralen Peptid-Wiederholungen derzeit noch ungeklärt sind. Modifiziert nach Peset & Vernos, 2008.

Neben γ-Tubulin gehören auch die Mitglieder der „*Transforming Acidic Coiled Coil*" (TACC)-Proteine zu den zentrosomalen Proteinen, die durch eine konservierte, strukturgebende „*coiled coil*"-Domäne am Carboxy-Terminus charakterisiert sind. Wie in Abb. 6 dargestellt, sind TACC-Proteine evolutionär in verschiedenen Spezies konserviert. Zu den Mitgliedern der TACC-Proteinfamilie gehören Alp7 (*S. pombe*), Mia1 (*S. cerevisiae*), TAC-1 (*C. elegans*), D-TACC (*D. melanogaster*) und Maskin (*X. laevis*) (Peset & Vernos, 2008). Während in diesen Spezies jeweils nur eine TACC-Isoform gefunden wurde, werden in Säugetieren jeweils drei Isoformen (TACC1, TACC2 und TACC3) exprimiert. TACC3 ist hierbei strukturell und funktionell den einzelnen TACC-Homologen der niederen Spezies am ähnlichsten.

Zelluläre Funktion und Regulation zentrosomaler TACC-Proteine

Für die in Abb. 6 aufgeführten Mitglieder der TACC-Proteinfamilie sind in den verschiedenen Spezies zumeist ähnliche zelluläre Funktionen beschrieben worden. So regulieren Alp7 und Mia1 in *S. pombe* und *S. cerevisiae*, sowie TAC-1 in *C. elegans* und D-TACC in *D. melanogaster*, die Dynamik und Stabilität des mitotischen Spindelapparats (Peset & Vernos, 2008). Hierfür interagieren TACC-Proteine mit Mitgliedern der ch-TOG/XMAP215-Proteinfamilie (Gergely *et al.*, 2003), welche als putative Mikrotubuli-Polymerasen direkt die Dynamik des mitotischen Spindelapparats vermitteln und regulieren (Brouhard *et al.*, 2008). In *S. pombe* bindet Alp7 an Alp14, in *C. elegans* TAC-1 an Zyg9, und in *D. melanogaster* D-TACC an Msps. Auch in *X. laevis* bindet und reguliert das TACC3-Homolog Maskin das ch-TOG-Homolog XMAP215, um die Stabilisierung und Funktion der Mikrotubuli des Spindelapparats zu gewährleisten.

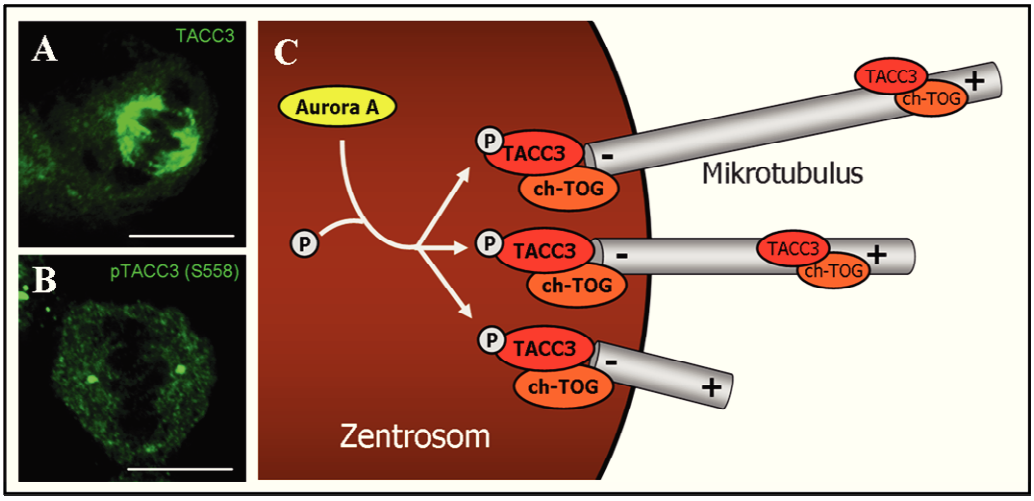


Abb. 7: Subzelluläre Lokalisation von TACC3 am Zentrosom und Spindelapparat. Die Immunofluoreszenzfärbung von nicht phosphoryliertem TACC3 zeigt dessen Lokalisation am gesamten mitotischen Spindelapparat (B), während phosphoryliertes TACC3 (pS558) nur an den Zentrosomen detektierbar ist. (C) Phosphoryliertes TACC3 stabilisiert über ch-TOG die Minus-Enden der Mikrotubuli, während nicht-phosphoryliertes TACC3 gebunden an ch-TOG die Polymerisation der Mikrotubuli an den Plus-Enden fördert. Modell modifiziert nach Peset & Vernos, 2008.

Darüber hinaus wurde für Maskin eine weitere zelluläre Funktion beschrieben, die bisher nur in *X. laevis* nachgewiesen werden konnte. Demnach kann Maskin über die Bindung des Translationsfaktors elF-4E, welcher auch in Säugerzellen vorkommt, die Translation von Proteinen wie z.B. Zyklin B1 während der Reifung von Oozyten regulieren (Barnard *et al.*, 2005).

Obwohl in Säugetieren drei TACC-Isoformen bekannt sind, ist TACC3 nach bisheriger Datenlage in seiner Sequenz und Funktion den Homologen der niederen Spezies am

ähnlichsten (Peset & Vernos, 2008). Eine Interaktion aller drei Isoformen mit der Mikrotubuli-Polymerase ch-TOG wurde beschrieben, doch konnte bisher nur für den TACC3-ch-TOG-Komplex gezeigt werden, dass, wie in Abb. 7 schematisch dargestellt, diese Interaktion eine essentielle Funktion in der Regulation der Dynamik des mitotischen Spindelapparats einnimmt (Schneider *et al.*, 2007; Booth *et al.*, 2011).

Die subzelluläre Lokalisation von TACC-Proteinen während der Mitose, insbesondere an den Spindelpolen, wird durch deren Phosphorylierung gewährleistet. In *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. sapiens* wurde hierbei die zentrosomale Aurora-A-Kinase als essentieller Regulator von TACC-Proteinen identifiziert (Giet *et al.*, 2002; Kinoshita *et al.*, 2005; LeRoy *et al.*, 2007). Aurora-A ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche z.B. D-TACC in *D. melanogaster* an Serin 863 phosphoryliert und somit am Zentrosom lokalisiert. Analog dazu wird humanes TACC3 durch Aurora-A an Serin 558 phosphoryliert, wodurch die in Abb. 7 dargestellte Lokalisation des phosphorylierten TACC3 am Zentrosom gewährleistet wird, während die nicht-phosphorylierte Form am gesamten Spindelapparat detektierbar ist (LeRoy *et al.*, 2007). Somit unterscheidet sich die Lokalisation der phosphorylierten von der nicht phosphorylierten Form der TACC-Proteine deutlich. Funktionell reguliert pTACC3 (S558) in Verbindung mit ch-TOG die Stabilität der Mikrotubuli an den Minus-Enden, während die nicht-phosphorylierte Form möglicherweise die Dynamik des Spindelapparats an den Plus-Enden der Mikrotubuli und möglicherweise eine Interaktion mit Kinetochor-Komponenten unterstützt (Peset & Vernos, 2008).

Die (patho)biologische Rolle der TACC-Proteine

Die Familie der humanen und murinen TACC-Proteine umfasst drei Mitglieder, deren Isoform-spezifische Funktionen derzeit weitgehend unklar sind. TACC3 ist in seiner Funktion als Regulator der Dynamik des mitotischen Spindelapparats am besten charakterisiert, während die biologischen Funktionen von TACC1 und TACC2 bisher nicht bekannt sind. Defizienz von TACC2, welches vor allem in postmitotischen Geweben exprimiert wird, führt im Knockout-Mausmodell zu keinem erkennbaren Phänotyp (Schuendeln *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu wird TACC3 prädominant in proliferierenden Geweben (hämatopoetisches System, Testis, Haut, Stammzellen), sowie während der Embryonalentwicklung in hohem Maße exprimiert (Piekorz *et al.*, 2002). Hierbei wird TACC3 am stärksten während der G_2-Phase und zu Beginn der Mitose transkribiert und translatiert und am Ende der Mitose (Piekorz *et al.*, 2002), während der Telophase, in Abhängigkeit von Cdh1 durch den APC/C-

Komplex proteasomal degradiert (Jeng *et al.*, 2009). Die Deletion des *TACC3*-Gens in Mäusen führt zu einer massiven Wachstumsretardierung, Apoptose und letztendlich zu embryonaler Letalität (Piekorz *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2007). Zusätzlich zeigten *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs), welche aus TACC3-deletierten Embryonen isoliert wurden, Proliferationsdefekte und konnten vor allem *ex vivo* nicht expandiert werden.

Die Etablierung eines induzierbaren shRNA-Systems zur zellulären Inhibition der TACC3-Expression war daher notwendig, um die zellbiologische Funktion von TACC3 in Säugerzellen zu charakterisieren. Auf diese Weise wurde durch die verminderte Expression von TACC3 gezeigt, dass diese die mitotische Progression und somit die Proliferation sowohl muriner als auch humaner Zellen hemmt (Schneider *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2008). In den hier verwendeten Zellsystemen ließ sich u.a. eine abnormale Spindelmorphologie detektieren sowie Aneuploidie nachweisen (Schneider *et al.*, 2007). Diese Befunde unterstreichen die funktionelle Bedeutung von TACC3 für die Stabilität und Dynamik des mitotischen Spindelapparats und somit für den korrekten Verlauf der Mitose.

Trotz der bisher unbekannten zellulären Funktionen von TACC1 und TACC2 gibt es Hinweise, dass diese analog zu TACC3 in humanen Tumoren differentiell exprimiert werden. Dabei wurde TACC1 als erste der drei Isoformen in Brusttumoren in erhöhten Mengen gefunden (Still *et al.*, 1999a). Der Genlokus von TACC1 befindet sich in der chromosomalen Region 8p11, welche analog zu der Region 10q26 des TACC2-Genlokus und der Region 4p16.3 des TACC3-Genlokus durch mögliche chromosomale Translokationen mit Brustkrebs, multiplem Myelom (Plasmazelltumor) und Harnblasenkrebs in Verbindung gebracht wurde (Still *et al.*, 1999b; Kiemeney *et al.*, 2010). Tatsächlich wurden TACC1 und TACC2 dereguliert, in der Regel überexprimiert, in Geweben von Tumorpatienten vorgefunden (Still *et al.*, 1999a; Lauffart *et al.*, 2005). TACC3 wurde ebenfalls bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorarten in der Regel überexprimiert nachgewiesen (Lauffart *et al.*, 2005; Ulisse *et al.*, 2007). TACC3 gilt insbesondere in *non-small-lung-cancers* oder Blasentumoren aufgrund seiner veränderten Expression als neuer prognostischer Marker (Jung *et al.*, 2006; Golka *et al.*, 2011).

1.2 Zelluläre Seneszenz

1.2.1 Definition, Charakteristika und Auslöser zellulärer Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist als ein permanenter Zellzyklusarrest in der G_1-Phase definiert. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass die betroffenen Zellen weder ihre DNS replizieren noch Zellteilung vollziehen, aber dennoch metabolisch aktiv und lebensfähig bleiben.

Hayflick und Kollegen gelang es als erste bei humanen Fibroblasten zelluläre Seneszenz als markante Form der zellulären Alterung zu definieren. Die untersuchten Zellen konnten nur eine limitierte Anzahl von Zellteilungen vollziehen, wenn sie *ex vivo* kultiviert wurden. Nach einiger Zeit teilten sich die Fibroblasten nicht mehr, starben allerdings auch nicht ab (Hayflick, 1965). Die limitierte Anzahl der Zellteilungen lag darin begründet, dass die Telomere, d.h. die DNS Abschnitte an den Enden jedes Chromosoms, nicht bei jeder DNS-Replikation vollständig kopiert werden und damit im Laufe der Zeit eine Verkürzung der Telomere in der Zelle erfolgt. Diese hat in letzter Konsequenz eine Induktion zellulärer Seneszenz zufolge (Herbig *et al.*, 2004). Dieses Modell der zellulären Alterung wurde im Folgenden als „replikative Seneszenz" definiert, da sich der permanente, irreversible Zellzyklusarrest aus der limitierten Anzahl an Zellteilungen ergab.

Neben der replikativen Seneszenz, deren Auslöser die Telomerverkürzung darstellt, ist inzwischen auch der Phänotyp der „Stress-induzierten, prämaturen Seneszenz" (SIPS) bekannt. Diese kann insbesondere durch extrinsische Faktoren induziert werden und tritt nicht nur in primären Zellen, sondern auch in transformierten Zelllinien auf (Campisi, 2010). Zu den auslösenden Faktoren von SIPS zählt DNS-Schädigung, der Einfluss zytotoxischer Agentien und insbesondere oxidativer Stress (Abb. 8) (Collado & Serrano, 2006). Durch z.B. ionisierende Strahlung kann Seneszenz in Folge der durch die Strahlung initiierten DNS-Doppelstrangbrüche induziert werden. Auch die Behandlung mit DNS-schädigenden Agentien wie Doxorubucin oder Adriamycin in niedrigen, subzytotoxischen Konzentrationen kann zelluläre Seneszenz zur Folge haben (Abb. 8). Darüber hinaus löst oxidativer Stress auf Basis von Sauerstoffradikalen und sekundär auftretender Schäden prämature Seneszenz in Zellen aus. Dabei entstehen Sauerstoffradikale entweder durch Defekte in der Atmungskette der Mitochondrien oder durch extrinsische Einflüsse, wie z.B. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV).

Eine weitere intrinsisch induzierte Form von SIPS ist die „Onkogen-induzierte-Seneszenz" (OIS) (Collado & Serrano, 2006). Der auslösende Faktor für OIS ist dabei z.B. das

Ras-Onkogen, welches einen zentralen Regulator von Proliferation und Zellwachstum darstellt und in vielen Tumoren an der Position 12 der Aminosäurensequenz von einem Glycin (G) zu einem Valin (V) mutiert ist (Collado & Serrano, 2006). Dadurch liegt Ras in einer konstitutiv-aktiven und „hyperproliferativen" Form (Ras G12V) vor und fördert so das Wachstum transformierter Zellen (Solomon *et al.*, 2010). Gleichermaßen kann konstitutiv-aktives Ras aber auch, wie in Abb. 8 gezeigt, Seneszenz (Spyridopoulos *et al.*, 2002), und damit den Proliferationsarrest als Schutzmechanismus in nicht transformierten Zellen initiieren.

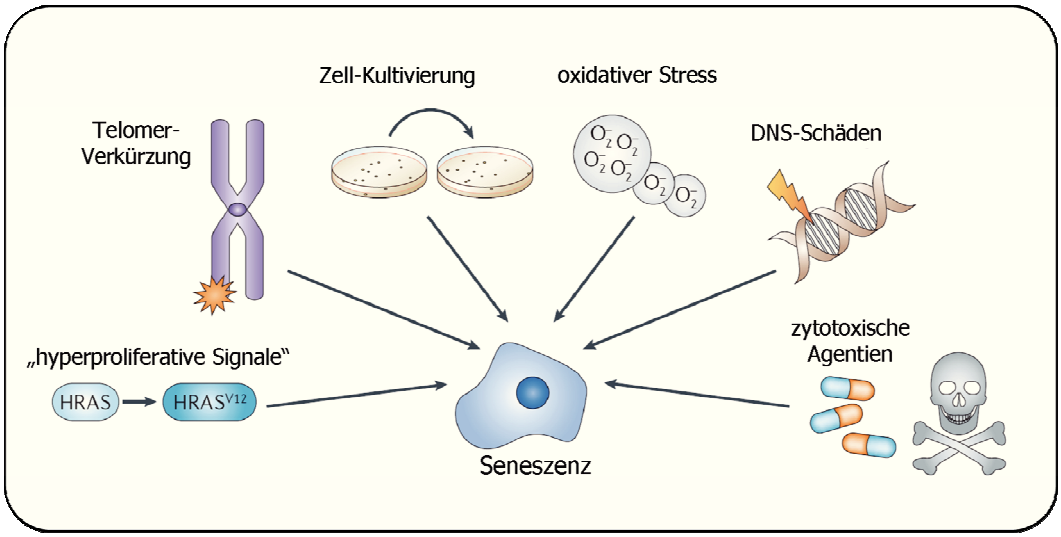


Abb. 8: Extrinsische und intrinsische Induktoren zellulärer Seneszenz. Bei der Definition der zellulären Seneszenz wird zwischen replikativer Seneszenz (RS), ausgelöst durch Telomerverkürzung, und „Stress-induzierter, prämaturer Seneszenz" (SIPS), ausgelöst z.B. durch DNS-Schäden oder zytotoxische Agentien, unterschieden. Zusätzlich kann „Onkogen-induzierte Seneszenz" (OIS) als Form der SIPS durch die Expression von onkogenem Ras ausgelöst werden. Modifiziert nach Collado & Serano, 2006.

Ein typisches Charakteristikum einer seneszenten Zelle ist in erster Linie eine flache, ausgedehnte Morphologie. Außerdem ist die Induktion von zellulärer Seneszenz durch eine erhöhte Aktivität der lysosomalen SA-βGalaktosidase (SA-βGal) bei einem pH-Optimum von 6.0 und die gleichzeitig deutlich erhöhte Anzahl von Lysosomen charakterisiert (Dimri *et al.*, 1995). Die Messung der SA-βGal-Aktivität ist die am häufigsten angewandte Methode, um seneszente von nicht seneszenten Zellen zu differenzieren (Dimri *et al.*, 1995; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Rodier & Campisi, 2011). Zusätzlich kann zur Charakterisierung seneszenter Zellen die Akkumulation von „Seneszenz-assoziierten-heterochromatischen Foci" (SAHF) im Zellkern bestimmt werden (Zhang *et al.*, 2007). Diese spiegeln eine Umstrukturierung von Heterochromatin im Kern wider, wodurch unter anderem die Transkription von Zellzyklusgenen, wie z.B. Zyklin A, verhindert wird. Ein Marker für

SAHFs ist die am Serin 83 phosphorylierte Form des „*Heterochromatic Protein 1γ*" (HP1γ), welches im HP1-Proteinkomplex als Transkriptionsrepressor in die SAHFs eingebunden wird und dort nachweisbar ist (Zhang *et al.*, 2007).

Eines der wesentlichen molekularen Merkmale einer seneszenten Zelle ist die Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs und in der Regel die Induktion des p16^{INK4a}-Proteins (Abb. 2). Beide Signalwege bzw. Zellzyklusinhibitoren hemmen die Phosphorylierung von Rb-Proteinen und induzieren dadurch einen Zellzyklusarrest in der G_1-Phase (Narita *et al.*, 2003; Bond *et al.*, 2004).

1.2.2 Die molekulare Regulation zellulärer Seneszenz

Neben dem p53-p21^{WAF}-Effektorweg (Abb. 2) nimmt der mTOR-Signalweg eine wichtige regulatorische Rolle in der Induktion von Seneszenz ein (Demidenko *et al.*, 2009).

mTOR (mammalian target of Rapamycin) ist eine von der Hefe bis zum Menschen funktionell konservierte Serin/Threonin-Kinase mit weitläufigen Funktionen in der Zelle, die insbesondere die Steuerung von Zellwachstum und -proliferation beinhaltet. Dabei wird zwischen zwei funktionellen mTOR-Subkomplexen differenziert. Auf der einen Seite steht der Rapamycin-sensitive Komplex mTORC1, in dem die Kinase mTOR einen Komplex mit den Proteinen Raptor und FKBP12 eingeht (Abb. 9). Auf der anderen Seite ist der Rapamycin-insensitive mTORC2-Komplex definiert, in welchem mTOR in einen Komplex mit Rictor und mLST8 vorliegt (Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2006).

mTORC1 reguliert die Translation wachstumsfördernder Gene in der Zelle als Reaktion auf Signalwege, die durch Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, den Energiestatus oder Stress stimuliert werden (Kim *et al.*, 2002). Wachstumsfaktoren, deren Bindung an spezifische Rezeptoren die Aktivität von mTOR erhöhen kann, sind Insulin und „*insulin-like-growth factor 1*" (IGF1). Dadurch wird der PI3K-Signalweg aktiviert, indem die rekrutierte PI3-Kinase die Phosphorylierung von Akt durch „*Phosphoinositide-dependent kinase 1*" (PDK1) stimuliert (Wullschleger *et al.*, 2006). Die Aktivierung von Akt hat zur Folge, dass diese Kinase den zentralen Regulator des mTORC1-Signalwegs, den TSC1-TSC2-Komplex, durch Phosphorylierung von TSC2 deaktiviert (Abb. 9) (Inoki *et al.*, 2002). Das Protein TSC2 inhibiert normalerweise im Komplex mit TSC1 die Aktivität der GTPase Rheb. Dafür besitzt TSC2 eine GAP-Domäne („*GTPase Activating Domain*") am C-Terminus, durch die die

Hydrolyse von GTP zu GDP am Rheb beschleunigt und Rheb inaktiviert wird. Dies resultiert in einer verringerten mTORC1-Aktivität, da Rheb direkt an die Kinasedomäne von mTORC1 bindet und diesen aktiviert (Abb. 9) (Inoki *et al.*, 2003). So führt eine verstärkte Aktivierung des TSC1-TSC2-Komplexes über Rheb zu einer verringerten mTORC1-Aktivität und umgekehrt. Nach seiner Aktivierung stimuliert mTORC1 die Translation in der Zelle unter anderem über seine Effektoren S6-Kinase (S6K) und 4E-BP1. Darüber hinaus wird durch mTORC1 in geringerem Maße auch Transkription stimuliert oder Autophagie inhibiert (Wullschleger *et al.*, 2006).

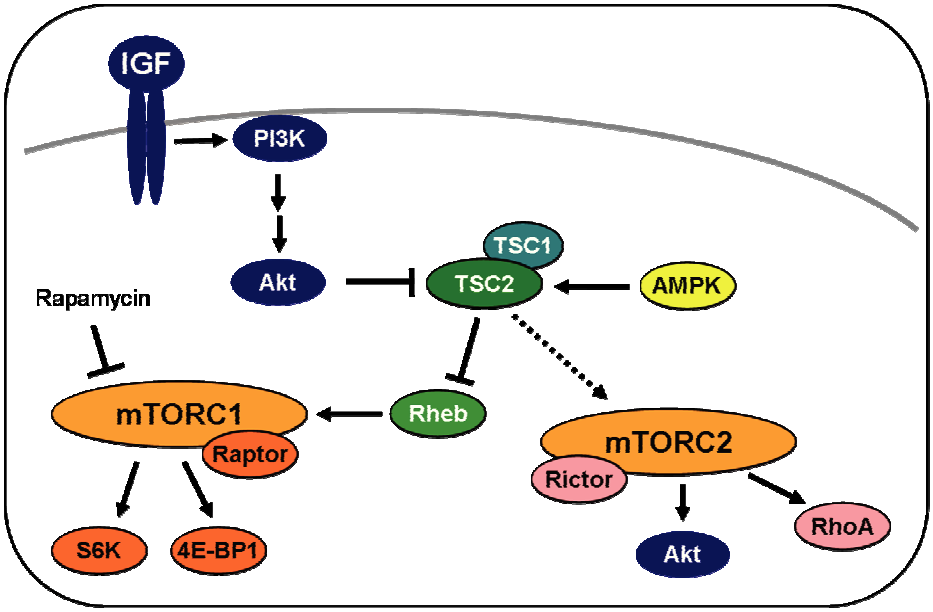


Abb. 9: Der TSC2-mTOR-Signalweg. Abhängig von Wachstumsfaktoren wird z.B. durch den IGF-Rezeptor die PI3-Kinase aktiviert, welche anschließend die Aktivierung von Akt vermittelt und somit den TSC1-TSC2-Komplex hemmt. Dies führt zur Enthemmung von Rheb und Aktivierung von mTORC1, wodurch als Primärantwort S6K- und 4E-BP1-abhängig die zelluläre Translation stimuliert wird. Auf der anderen Seite kann der TSC1-TSC2-Komplex die Aktivität des mTORC2-Komplexes stimulieren, welcher wiederum Akt und RhoA aktiviert. Darstellung des Signalwegs modifiziert nach Wullschleger *et al.*, 2006.

Den zentralen Regulator von mTORC1 stellt der TSC1-TSC2-Komplex dar. Dieser wird aus den Proteinen TSC1 und TSC2 gebildet und kann nur als Komplex seine regulatorische Funktion erfüllen (Zhang *et al.*, 2003), da TSC2 ohne TSC1-Bindung instabil ist und proteasomal degradiert wird (Chong-Kopera *et al.*, 2006). Eine Fehlfunktion dieser Signalwege kann in Zellen und Geweben zu Defekten und Krankheiten führen. Tuberöse Sklerose (*tuberous sclerosis*) z.B. wird durch Mutationen im Gen des TSC1 bzw. des TSC2 ausgelöst (Langkau *et al.*, 2002). Dieses seltene Krankheitsbild ist eine genetische Multiorgan-Erkrankung, die mit Fehlbildungen und Tumoren des Gehirns,

Hautveränderungen (Angiofibromen) und gutartigen Tumoren in anderen Organen einhergeht (Zhao, 2008).

Anders als mTORC1 ist der mTORC2-Komplex weder Rapamycin-sensitiv noch primär an der Translationskontrolle in der Zelle beteiligt (Wullschleger *et al.*, 2006; David, 2011). Durch zelluläre Depletion von Rictor konnte erstmals die Beteiligung von mTORC2 an der Organisation des Aktinzytoskeletts gezeigt werden, da die Aktin-Polymerisation und die Migration der Zellen stark inhibiert war (Sarbassov *et al.*, 2004). Über die Regulation von mTORC2 ist bisher nur wenig bekannt. Doch zeigte sich überraschenderweise in TSC2-defizienten Fibroblasten, dass die mTORC2-abhängige Aktivierung von RhoA deutlich vermindert war (Goncharova *et al.*, 2011). Dies lässt darauf schließen, dass mTORC2 im Gegensatz zu mTORC1 durch TSC2 aktiviert wird. In biochemischen Analysen wurde dafür kürzlich gezeigt, dass mTORC2 direkt mit dem TSC1-TSC2-Komplex interagiert und von diesem positiv reguliert wird (Huang *et al.*, 2008).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Protein TACC3 (*Transforming Acidic Coiled Coil 3*) wird in hohem Maße während der G_2/M-Phase im Zellzyklus exprimiert, wo es an den Zentrosomen und entlang der mitotischen Spindel lokalisiert und deren Stabilität und Dynamik über die Mikrotubuli-Polymerase ch-TOG steuert.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Literaturbefunde vor, dass Malmitose hervorgerufen durch zelluläre Depletion einzelner zentrosomaler Proteine wie z.B. Pericentrin in G_1-Kontrollpunkt(d.h. p53)-profizienten Zelllinien antiproliferativ wirkt und hierbei eine vorzeitige zelluläre Seneszenzantwort auslöst. Interessanterweise stellt *TACC3* vergleichbar mit zahlreichen zentrosomalen Proteinen beim Menschen ein tumorassoziiertes und in transformierten Zellen oft verstärkt exprimiertes Gen dar. In diesem Zusammenhang war ungeklärt, (i) ob eine verminderte Expression und Funktion von TACC3 ebenfalls mit zellulärer Seneszenz assoziiert ist und (ii) inwiefern hierbei TACC3 direkt oder indirekt mit mitotisch relevanten Effektorproteinen interagiert, die neben dem p53-$p21^{WAF}$-Tumorsuppressorweg eine wesentliche Funktion in der Seneszenzantwort einnehmen können. Daher sollten in dieser Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Löst shRNA-vermittelte TACC3-Depletion in Brustepithel-Zelllinien als Primärantwort prämature Seneszenz aus, und was sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen? Ist diese Seneszenzantwort vergleichbar mit Seneszenzantworten hervorgerufen z.B. durch bekannte DNS-schädigende Einflüsse wie ionisierende γ-Strahlung?

- Zeigt die gleichzeitige Behandlung TACC3-depletierter Zellen mit subtoxischen Mengen des Spindelgifts Paclitaxel eine synergistische antiproliferative Antwort?

- Gibt es bisher unbekannte TACC3-Bindungspartner, die wesentlich sein können für die Kontrolle von mitotischer Zellteilung und zellulärer Seneszenz?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte zum besseren mechanistischen Verständnis der Funktion des zentrosomalen Proteins TACC3 in der Proliferationskontrolle beitragen und dieses als mögliches antineoplastisches Zielprotein charakterisieren.

2. Manuskripte

Im Folgenden sind die Publikationen als Erst- und Ko-Autor zusammengefasst. Bei der ersten Publikation (2.1) handelt es sich um das Manuskript mit dem Titel „*The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program*“. Chemoresistenzen und Nebenwirkungen von Spindelgiften stellen nach wie vor ein Problem in der Tumortherapie dar. In dieser Publikation wurde daher das zentrosomale und mitotisch exprimierte Protein TACC3, welches in vielen Tumorarten in erhöhten Mengen nachweisbar ist, als neues, möglicherweise antineoplastisch relevantes Zielprotein charakterisiert. Durch zelluläre TACC3-Depletion konnte in Brustepithel-Zelllinien der Tumorsuppressor p53 aktiviert, prämature Seneszenz ausgelöst und somit die Zellproliferation gestoppt werden. Dieser Seneszenzphänotyp konnte durch Behandlung mit niedrigen Dosen des Spindelgifts Paclitaxel synergistisch verstärkt werden. Die Befunde dieses Manuskripts demonstrieren, dass humane Tumorzellen durch die verminderte Expression bereits eines einzelnen zentrosomalen Proteins, welches die Dynamik des mitotischen Spindelapparats entscheidend reguliert, für die Behandlung mit subzytotoxischen Dosen von Paclitaxel sensibilisiert werden können. Somit könnte die Behandlung von Tumorzellen mit Spindelgiften in Kombination mit Inhibitoren gegen strukturelle oder regulatorische mitotische Proteine eine effektive Form der Anti-Tumortherapie darstellen. Dieser Gedanke wird im zweiten Manuskript (2.2), bei dem es sich um einen Übersichtsartikel („*Perspective*“) mit dem Titel „*The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence*“ handelt, mechanistisch vertieft. Hierbei wird auch die molekulare Verbindung von Proteinen des Zentrosoms und Spindelkontrollpunkts mit dem p53-p21^{WAF}-Tumorsuppressorweg diskutiert.

Mit dem Ziel, die durch TACC3-Depletion und den resultierenden mitotischen Spindelstress ausgelöste Seneszenz auf molekularer Ebene besser zu verstehen, wurde in einer „*Yeast-Two-Hybrid*“-basierten Interaktomanalyse nach neuen Bindungspartnern für das humane TACC3-Protein gesucht. Die molekularen und zellulären Befunde dieser Untersuchung wurden im dritten Manuskript (2.3) mit dem Titel „*TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division*“ eingehend beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde als neuer TACC3-Interaktionspartner der mTOR-Regulator TSC2 identifiziert, der zusammen mit p53 eine wesentliche Kontrollfunktion in der Seneszenzinduktion einnimmt.

2.1 The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program

Schmidt S*, Schneider L*, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, Jänicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nürnberg B, and Piekorz RP

Oncogene, 2010, Nov 18;29(46):6184-92

In der Behandlung von Tumoren sind Spindelgifte wie Paclitaxel potente Therapeutika, da sie die Proliferation transformierter Zellen durch die Inhibition der Mitose und Induktion von Apoptose hemmen können. In einigen Fällen jedoch zeigen Tumorzellen aus Patienten Resistenzen gegen die Therapie oder Spindelgifte haben neurotoxische Nebenwirkungen zur Folge, da sie unter anderem den axonalen Transport neuronaler Zellen hemmen können. Um diese Nebeneffekte in der Therapie mit Spindelgiften zu minimieren, sind zentrosomale und Mikrotubuli-assoziierte Proteine von großem Interesse, da sie als neue therapeutische Zielstrukturen dienen können. Zu diesen gehört das zentrosomale Protein TACC3, welches in proliferativen, nicht aber in postmitotischen Geweben wie dem ZNS gefunden wird. TACC3 wird hierbei nur in der G_2/M-Phase exprimiert und spielt hierbei eine wesentliche Rolle in der Regulation der Dynamik des mitotischen Spindelapparats während der Zellteilung.

In dieser Publikation konnte demonstriert werden, dass TACC3 als potentielles Zielprotein zur Inhibition der Proliferation transformierter Zellen dienen könnte. Die Reduktion der TACC3-Expression durch ein lentiviral-basiertes und induzierbares shRNA-System hatte in humanen Brusttumorzellen einen vollständigen Zellzyklusarrest in der G_1-Phase zur Folge. Interessanterweise wurden hierbei in den untersuchten Zellmodellen keine Anzeichen für eine apoptotische Antwort nach TACC3 „*knockdown*“ beobachtet. Der nach TACC3-Depletion induzierte Zellzyklusarrest wurde im Verlauf der Studie als Form der „Stress-induzierten, prämturen Seneszenz“ (SIPS) charakterisiert. Seneszente Zellen zeichneten sich nach TACC3-Depletion durch eine flache, ausgedehnte Morphologie und eine vergrößerte Zelloberfläche aus. Darüber hinaus wurde nach TACC3-Depletion ein deutlich erhöhter Prozentsatz von Zellen detektiert, die den Seneszenzmarker SA-β-Gal exprimierten und „Seneszenz-assoziierte heterochromatische Foci“ (SAHF) im Zellkern bildeten. Auf molekularer Ebene wurde die Aktivierung von Proteinen des G_1-Kontrollpunkts, p53 und $p21^{WAF}$, nachgewiesen. Hierbei kristallisierte sich die Kombination der Marker „SAHF“ (phospho-HP1γ^+) & $p21^{WAF}$ (nukleär lokalisiert) als robuster qualitativer und quantitativer Seneszenzmarker aus, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die SA-β-Gal-Aktivität auch

bei einer erhöhten Zelldichte erhöht sein kann, ohne dass zelluläre Seneszenz vorliegt. Somit ist die zelluläre Depletion eines einzelnen zentrosomalen Proteins ausreichend, um in Tumorzellen prämature Seneszenz auszulösen.

Die Induktion der zellulären Senesezenz nach TACC3-Depletion konnte durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit niedrigen subzytotoxischen Dosen an Paclitaxel deutlich beschleunigt werden. Dieser wichtige Befund lässt darauf schließen, dass eine verminderte TACC3-Expression Tumorzellen bereits gegen geringe Mengen des Spindelgifts Paclitaxel sensibilisiert. Dadurch ergeben sich in Zukunft möglicherweise neue Ansätze für eine kombinierte Anti-Tumortherapie, in der zur Unterstützung der Wirkung von Spindelgiften weitere tumorassoziierte Proteine wie TACC3 oder dessen regulierende mitotische Kinase Aurora-A gezielt inhibiert werden. Ziel wäre es, toxische Nebenwirkungen durch eine kombinierte Therapie bei möglichst gleicher Wirksamkeit zu vermindern.

Der Verfasser dieser Dissertation etablierte für dieses Manuskript zelluläre Seneszenzmodelle und führte biochemische, zellbiologische und konfokal-mikroskopische Analysen durch. Darüber hinaus wurde die zelluläre Seneszenzantwort charakterisiert und hierbei eine neue Markerkombination zur Bestimmung der Seneszenz etabliert. Außerdem hat der Verfasser dieser Dissertation das Konzept des Manuskripts mitentworfen und war an der Entstehung maßgeblich beteiligt.

Oncogene (2010) 29, 6184–6192
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10
www.nature.com/onc

SHORT COMMUNICATION

The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program

S Schmidt[1,7], L Schneider[1,7,8], F Essmann[2], IC Cirstea[1], F Kuck[1], A Kletke[1], RU Jänicke[3], C Wiek[4], H Hanenberg[4,5], MR Ahmadian[1], K Schulze-Osthoff[2], B Nürnberg[1,6] and RP Piekorz[1]

[1]*Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany;* [2]*Abteilung für Molekulare Medizin, Interfakultäres Institut für Biochemie (IFIB), Eberhard Karls Universität, Tübingen, Germany;* [3]*Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany;* [4]*Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Klinische Immunologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany;* [5]*Department of Pediatrics, Wells Center for Pediatric Research, Riley Hospital for Children, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA and* [6]*Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie und Interfakultäres Zentrum für Pharmakogenomik und Arzneimittelforschung (ICePhA), Klinikum der Eberhard Karls Universität, Tübingen, Germany*

Microtubule-interfering cancer drugs such as paclitaxel (PTX) often cause chemoresistance and severe side effects, including neurotoxicity. To explore potentially novel antineoplastic molecular targets, we investigated the cellular response of breast carcinoma cells to short hairpin(sh)RNA-mediated depletion of the centrosomal protein transforming acidic coiled coil (TACC) 3, an Aurora A kinase target expressed during mitosis. Unlike PTX, knockdown of TACC3 did not trigger a cell death response, but instead resulted in a progressive loss of the pro-apoptotic Bcl-2 protein Bim that links microtubule integrity to spindle poison-induced cell death. Interestingly, TACC3-depleted cells arrested in G_1 through a cellular senescence program characterized by the up-regulation of nuclear $p21^{WAF}$, downregulation of the retinoblastoma protein and extracellular signal-regulated kinase 1/2, formation of HP1γ (phospho-Ser83)-positive senescence-associated heterochromatic foci and increased senescence-associated β-galactosidase activity. Remarkably, the onset of senescence following TACC3 knockdown was strongly accelerated in the presence of non-toxic PTX concentrations. Thus, we conclude that mitotic spindle stress is a major trigger of premature senescence and propose that the combined targeting of the centrosomal Aurora A–TACC3 axis together with drugs interfering with microtubule dynamics may efficiently improve the chemosensitivity of cancer cells.
Oncogene (2010) **29,** 6184–6192; doi:10.1038/onc.2010.354; published online 23 August 2010

Keywords: centrosome; mitosis; paclitaxel; $p21^{WAF}$; premature senescence; TACC3

Correspondence: Dr RP Piekorz, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf D-40225, Germany.
E-mail: roland.piekorz@uni-duesseldorf.de
[7]These authors contributed equally to this work.
[8]Current address: IFOM Foundation—FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milan 20139, Italy.
Received 31 January 2008; revised 11 July 2010; accepted 12 July 2010; published online 23 August 2010

Introduction

The mitotic spindle apparatus is a major target in chemotherapy. Mitotic stress evoked through spindle poisons such as paclitaxel (PTX) can impair proper chromosome capture by microtubules and arrest cell cycle progression through the activation of the spindle assembly checkpoint (Kadura and Sazer, 2005). This checkpoint monitors the occurrence of unattached kinetochores (Khodjakov and Rieder, 2009). Although entry into anaphase is delayed through the impaired degradation of cyclin B, cells can evade the spindle assembly checkpoint through mitotic slippage, resulting in aneuploidy and chromosomal instability (Brito and Rieder, 2006). These cells then become arrested in G_1 through the activity of the post-mitotic checkpoint that depends on prolonged mitosis and stabilization of the tumor suppressor protein p53 (Blagosklonny, 2006b; Demidenko *et al*., 2008).

In aneuploid and tetraploid cells, p53 can induce either cell cycle arrest or apoptosis (Yu and Zhang, 2005). The former is controlled via p53-mediated transactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{WAF}$, whereas apoptosis often involves induction of several pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, including Puma and Noxa (Yu and Zhang, 2005). As an alternative to apoptosis, cells can undergo permanent cell cycle arrest by cellular senescence, which is typically characterized by growth arrest, apoptosis resistance and altered gene expression (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Cellular senescence can be either triggered through telomere shortening (intrinsic or replicative senescence) or initiated by various stress stimuli, for example, DNA damage, oxidative stress or oncogene activation (extrinsic or stress-induced premature senescence (SIPS)) (Roninson *et al*., 2001; Ben-Porath and Weinberg, 2005; Blagosklonny, 2006a). Although cells undergoing replicative or premature senescence are metabolically active, they are unable to synthesize DNA even in response to growth factors. Interestingly, pharmacological targeting of microtubule dynamics by PTX or microtubule disruptors can

efficiently elicit a premature senescence program (Blagosklonny *et al*., 2006; Tierno *et al*., 2009). Pro-senescent stimuli converge in the activation of the p53-p21^{WAF} and the p16^{INK4a}-retinoblastoma pathway (Roninson *et al*., 2001; Ben-Porath and Weinberg, 2005). However, as p16^{INK4a} is often mutated in tumor cells, its senescence-inducing function is mainly restricted to non-transformed cells (Kim and Sharpless, 2006). Senescent cells typically display a flattened, enlarged morphology and most prominently express the so-called senescence-associated β-galactosidase activity in their lysosomes, which serves as a surrogate marker for senescence (Collado and Serrano, 2006). In addition to these biochemical and morphological changes, senescent cells are characterized by the occurrence of chromatin changes, including focal HP1 recruitment and formation of senescence-associated heterochromatic foci (Zhang *et al*., 2007). Overall, premature senescence represents an important safeguard program that protects cells against exogenous and endogenous stress stimuli and thereby influences the development of cancer and aging (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

The MCF-7 breast carcinoma cell line is relatively insensitive toward many chemotherapeutic agents and represents a widely used model system for the analysis of chemoresistance in breast cancer (Simstein *et al*., 2003). As MCF-7 cells do not express a functional *caspase-3* gene product, DNA fragmentation and typical apoptotic alterations are reduced following exposure to DNA damage-inducing agents (Jänicke *et al*., 1998; Essmann *et al*., 2004). Consequently, high concentrations of chemotherapeutic agents are usually required to induce cell death through the sequential activation of caspase-9, -7 and -6 (Liang *et al*., 2001). Instead, MCF-7 cells readily undergo cellular senescence in response to DNA damage induced for instance by γ-irradiation (γIR) (Essmann *et al*., 2004).

The mammalian transforming acidic coiled coil (TACC) family of centrosomal proteins consists of three members (TACC1–3), which function as important structural components of the mitotic spindle apparatus (Gergely, 2002). TACC proteins are evolutionarily conserved and regulate centrosome integrity, centrosome-dependent assembly of microtubules and spindle stability during mitosis (Gergely *et al*., 2003; Cassimeris and Morabito, 2004; Schneider *et al*., 2007; Yao *et al*., 2007). Thereby, TACC3 is predominantly expressed during the G_2/M phase of the cell cycle, where it localizes to the centrosome and spindle apparatus (Piekorz *et al*., 2002). TACC3, but not the related isoform TACC2 (Schuendeln *et al*., 2004), is required for efficient cell proliferation and cell survival, as indicated by its crucial role during embryogenesis (Piekorz *et al*., 2002; Yao *et al*., 2007). Disturbances of centrosome function have also been implicated in tumorigenesis (Zyss and Gergely, 2009). Intriguingly, aberrations of TACC3 expression are associated with the etiology of ovarian, bladder and non-small-cell lung cancer (Lauffart *et al*., 2005; Jung *et al*., 2006; Kiemeney *et al*., 2010). Moreover, we have recently shown that the cellular outcome of mitotic stress induced by TACC3 depletion is decisively determined by the status of the post-mitotic G_1 checkpoint. Whereas TACC3-deficient murine fibroblasts with functional post-mitotic checkpoints enter a reversible G_1 and G_2 arrest, checkpoint-compromised cells rapidly succumb to mitotic cell death and polyploidization (Schneider *et al*., 2007, 2008). Given that centrosomal localization of human TACC3 requires its phosphorylation by Aurora A kinase at Ser558 (LeRoy *et al*., 2007) and because pharmacological inhibition of Aurora A kinase induces premature senescence (Huck *et al*., 2010), we explored here (i) whether senescence is the prevailing outcome of TACC3 reduction in G_1 checkpoint-proficient transformed and non-transformed breast epithelial cells and (ii) to which extent their chemosensitivity against PTX can be modulated by targeting TACC3 expression.

Results and discussion

We compared cellular stress responses of MCF-7 and MCF-7/caspase-3 cells toward treatments that interfere with microtubule assembly, such as the drug PTX and depletion of TACC3 that was achieved via an inducible RNA interference approach (Schneider *et al*., 2007). Both cell lines were engineered to express control or TACC3-specific shRNAs upon doxycycline (DOX) treatment (Supplementary Material & Methods). Consistent with earlier studies (Janssen *et al*., 2007), prolonged treatment with increasing doses of PTX (10 and 100 nM) elicited a strong cell-death response in both MCF-7 lines that was comparable to that induced by the topoisomerase inhibitor etoposide (Figures 1a and b). As demonstrated previously (Essmann *et al*., 2004), exposure of the cells to γIR, on the other hand, led to a reduced apoptotic response when DNA fragmentation was determined (Figure 1a). Interestingly, mimicking microtubule stress by short hairpin(sh)RNA-mediated silencing of TACC3 expression completely failed to induce death of either cell line even after the prolonged absence of TACC3 for up to 6 days (Figures 1a–c). Consistent with these findings, TACC3 depletion, but not PTX treatment, was associated with reduced levels of Bim, a pro-apoptotic BH3-only protein that is activated by microtubule-disrupting agents and that links microtubule integrity to spindle poison-induced cell death (Ley *et al*., 2005). All three isoforms of Bim were downregulated in MCF-7 cells upon TACC3 depletion for 4–6 days (Figure 1d), whereas the level of the anti-apoptotic protein Bcl-x_L remained unaltered at these time points (data not shown). Thus, these data imply that the reduction of Bim expression might be the reason for the apoptosis-resistant phenotype of TACC3-depleted cells. In agreement with this hypothesis are recent reports demonstrating that Bim is an important mediator of apoptosis induced by microtubule-interfering agents such as PTX (Janssen *et al*., 2007; Li *et al*., 2007), although contrary reports also exist (Czernick *et al*., 2009).

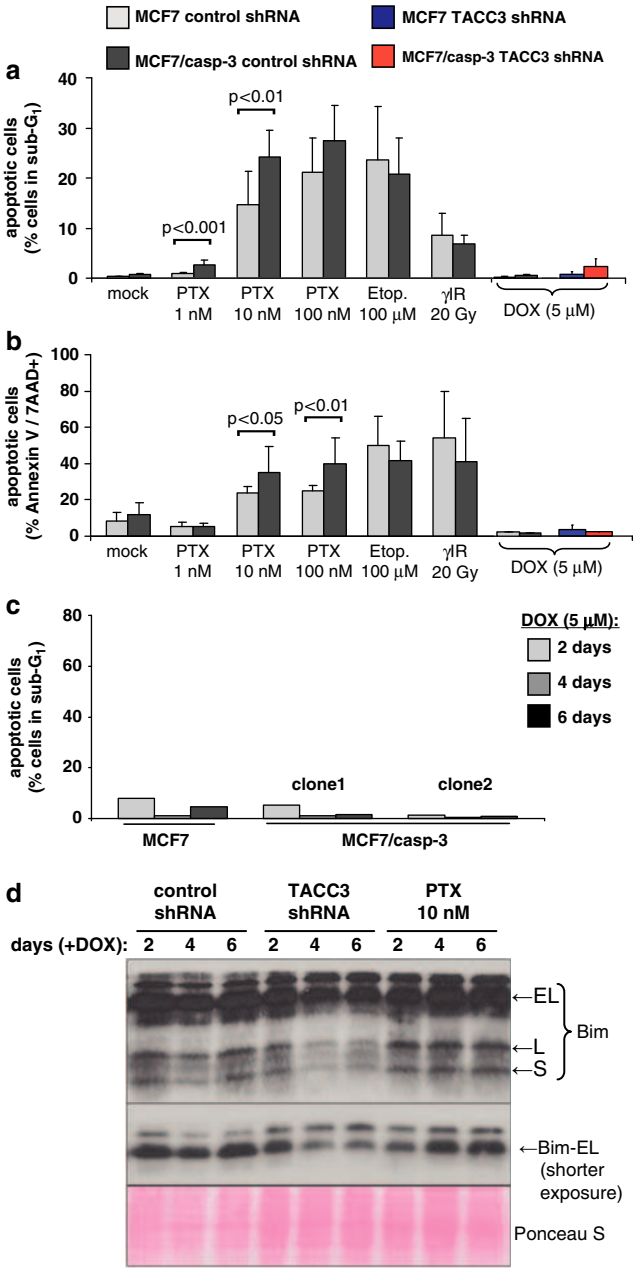


Figure 1 MCF-7 cells fail to undergo cell death upon transforming acidic coiled coil (TACC) 3 depletion and show a progressive loss of proapoptotic Bim protein level. MCF-7 and MCF-7/caspase-3 cells were either TACC3-depleted (blue/red bars) by incubation with DOX for 4 days, treated for 4 days with the indicated dose of PTX or etoposide (Etop), or γ-irradiated (γIR) and analyzed 4 days later. The percentage of apoptosis was measured by flow cytometric determination of cells with sub G_1-DNA content (**a**) or double staining for annexin V and 7-AAD (**b**). (**c**) Prolonged depletion of TACC3 for up to 6 days does not trigger death of wild-type and caspase-3-expressing MCF-7 cells as determined by DNA fragmentation in sub-G_1. (**d**) Western blot analysis showing decreased protein levels of all three Bim isoforms in TACC3-depleted MCF-7 cells after the indicated time of DOX treatment. No reduction of Bim expression was detected in cells expressing the control shRNA either in the absence or presence of 10 nM paclitaxel. As a loading control, the blot was stained with Ponceau S before antibody incubation.

Given the absence of a cell death response upon TACC3 depletion, we next addressed a possible role of TACC3 in regulating the commitment of cells to premature senescence. Within 2–4 days, shRNA-mediated depletion of TACC3 resulted in a strong inhibition of MCF-7 cell proliferation, as evidenced by the progressive accumulation of cells arrested in G_1 and a decline in bromodeoxyuridine incorporation as a marker for DNA synthesis (Supplementary Figure 1a). Consistently, these cells developed several signs of a senescent phenotype, including a flattened and enlarged morphology and increased expression of senescence-associated βgal activity, while these events were not evident in cells expressing the control shRNA (Supplementary Figure 1b). Furthermore, as MCF-7/caspase-3 cells became also senescent upon TACC3 depletion to a comparable extent as observed upon irradiation (Supplementary Figure 2), our results demonstrate that caspase-3 is not a decisive parameter in this stress response.

The cell cycle arrest of TACC3-depleted MCF-7 cells was accompanied by a strong induction of p53 followed by its nuclear translocation (data not shown). Accordingly, the p53 target gene *p21^{WAF}*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, was efficiently induced upon TACC3 depletion, whereas expression of the p53-independent cyclin-dependent kinase inhibitor, p27^{KIP}, remained unchanged (Supplementary Figure 3a). Furthermore, TACC3 depletion correlated with increased levels of cyclin D1 (Supplementary Figure 3a), which was predominantly confined to the cytoplasm (Schneider *et al*., 2008 and data not shown) and which is consistent with its function in G_1 arrest and senescence (Kortlever *et al*., 2006). In contrast, protein levels of the G_2/M-associated cyclins A and B1 were strongly reduced upon prolonged TACC3 depletion (Supplementary Figure 3a), thus excluding a major contribution of the G_2 checkpoint in the post-mitotic arrest caused by TACC3 depletion. Moreover, the induction of senescence in TACC3-depleted cells was associated with a rapid decrease of the retinoblastoma protein (pRb) (Supplementary Figure 3b). Inhibition of pRb is a typical event during progression of senescence and has been reported to be mediated by elevated levels of p21^{WAF} that promote pRb degradation in response to DNA damage (Broude *et al*., 2007). Another noticeable feature of TACC3-depleted MCF-7 cells was the strong increase of HP1γ (phospho-Ser83)-positive SAHF (Zhang *et al*., 2007) in addition to an abundant expression of nuclear p21^{WAF} (Supplementary Figure 4). Thus, senescence induced by the depletion of TACC3 is accompanied by the reduction of pro-apoptotic and mitogenic components, whereas proteins involved in cell cycle arrest were found to be upregulated.

We have recently shown that TACC3 depletion sensitizes NIH3T3 fibroblasts to PTX-induced cell death, indicating that spindle poisons and downregulation of TACC3 elicit similar signaling pathways in cellular stress responses (Schneider *et al*., 2008). Indeed, the onset of senescence of two independent TACC3 shRNA-expressing MCF-7 clones could be strongly

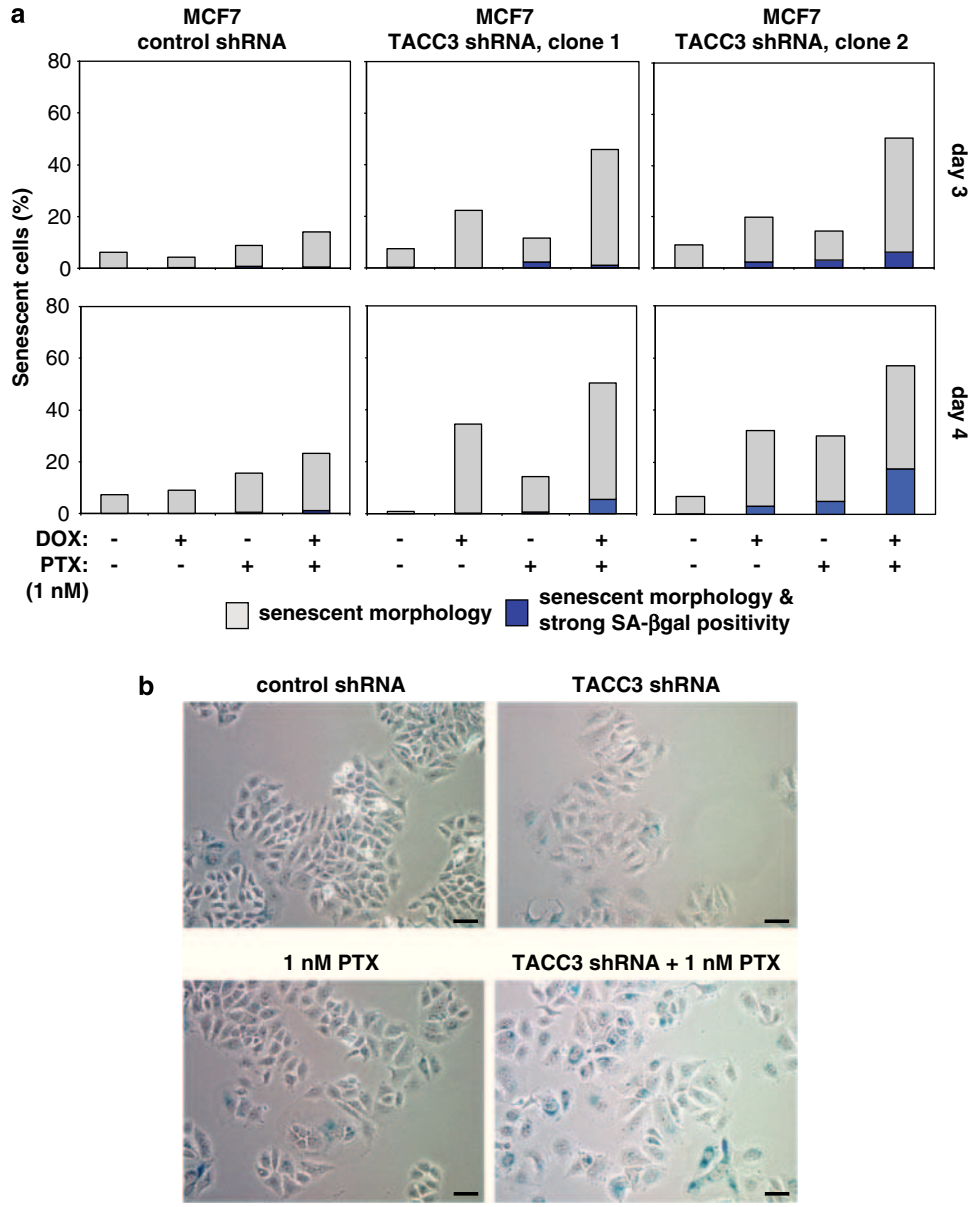


Figure 2 Treatment of MCF-7 cells with a low concentration of paclitaxel accelerates cellular senescence triggered upon TACC3 depletion. (**a**) On day 1 of DOX treatment, two independent TACC3 shRNA-expressing clones and control shRNA-expressing MCF-7 cells were incubated with 1 nM paclitaxel or dimethyl sulfoxide as a control. Two and three days later, the percentages of senescent cells were determined by scoring cells with a senescent morphology and strong SA-βgal staining (blue). In total, 500–1000 cells from two to three independent experiments were analyzed for each condition and time point. (**b**) Representative images of MCF-7 cells stained for SA-βgal on day 4 of TACC3 depletion and/or paclitaxel treatment. Bars: 50 μm.

accelerated by simultaneous treatment with a subtoxic dose of PTX (Figure 2). Thereby, 50–60% of TACC3 shRNA-expressing cells additionally treated with a low PTX dose of 1 nM showed after 3–4 days a prominent senescence-like morphology that was accompanied in up to one-third of the cells by a particular strong senescence-associated β-galactosidase activity (Figure 2a). On the other hand, cells subjected to TACC3 knockdown or PTX treatment alone showed a significantly weaker senescent phenotype. This cooperative effect of TACC3 depletion and a low PTX dose was also clearly evident from the quantitative characterization of cells using both nuclear $p21^{WAF}$ and HP1γ (phospho-Ser83)-positive senescence-associated heterochromatic foci formation as senescence markers (Supplementary Table 1). Thus, subtoxic levels of PTX strongly amplify senescence triggered by TACC3 depletion.

As extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2-dependent phosphorylation targets Bim for proteasomal degradation, thereby protecting cells from apoptosis (Mollinedo and Gajate, 2003), we investigated whether this pathway mediates the reduction of Bim upon TACC3 depletion. Inhibition of

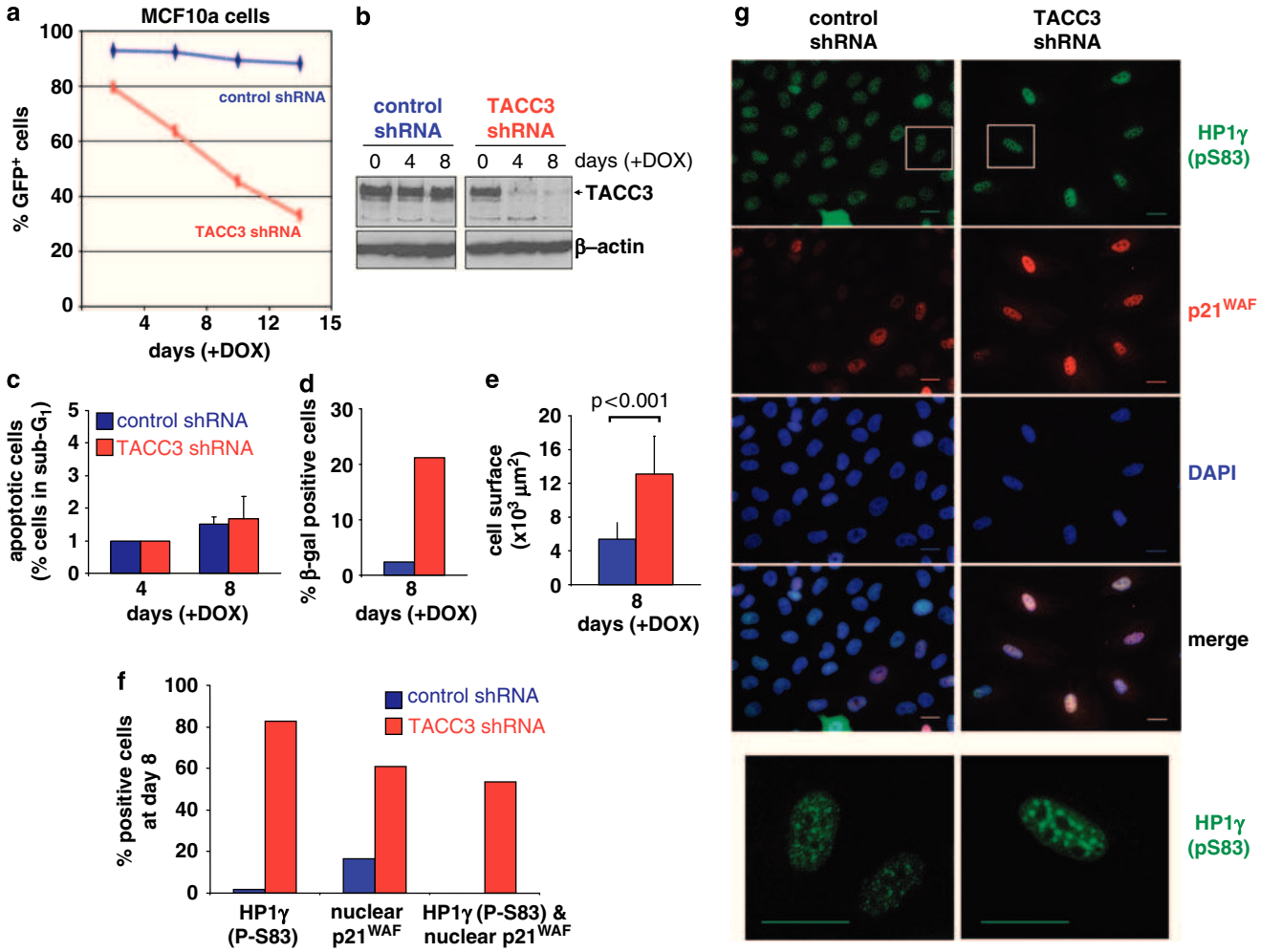


Figure 3 Downregulation of TACC3 inhibits cell expansion and drives immortalized MCF10a breast epithelial cells into premature senescence. (**a**) The percentages of control shRNA and TACC3 shRNA-expressing cells, both co-expressing GFP as marker upon DOX-mediated shRNA induction, were monitored for 15 days by flow cytometry. (**b**) Immunoblot analysis of TACC3 expression in control and TACC3 shRNA expressing cells. (**c**) Prolonged depletion of TACC3 in MCF10a cells does not trigger cell death as determined by DNA fragmentation in sub-G_1. (**d**) Determination of the percentage of SA-βgal positive MCF10a cells (at least 300 cells analyzed each) and (**e**) senescence-associated cell surface increase (120 cells analyzed each) upon TACC3 depletion. (**f**) Determination of the percentage of cells positive for HP1γ (P-S83) containing senescence-associated heterochromatic foci (SAHFs), nuclear $p21^{WAF}$, or the combination of both. A total of 150–180 cells were analyzed per condition. (**g**) Confocal microscopic detection of SAHFs and nuclear $p21^{WAF}$ in control and TACC3-depleted MCF10a cells. DNA was visualized by 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Bars: 20 µm.

ERK1/2 activity through the specific MAP kinase kinase (MEK) inhibitor, PD98059, however, failed to restore Bim protein levels in TACC3-depleted MCF-7 cells (data not shown), suggesting that an ERK1/2-independent mechanism was responsible for the loss of Bim. In agreement with this observation, we found that Bim mRNA levels were reduced upon TACC3 depletion (data not shown). Despite our observation that the MEK/ERK pathway was probably not involved in the decrease of Bim, we investigated the effect of TACC3 depletion on ERK1/2 activation, as MAP kinases are known to trigger opposing effects. For instance, upon spindle damage, MAP kinases regulate mitotic cell progression and cell survival (Mollinedo and Gajate, 2003), whereas the Ras/Raf/MEK/ERK pathway has also anti-proliferative functions (Cagnol and Chambard, 2009). Unexpectedly, MCF-7 cells undergoing senescence upon TACC3 depletion displayed strongly reduced protein levels of ERK1/2 (Supplementary Figure 5a). At the same time, and in accordance with high phospho-EGFR and Ras_{GTP} as well as elevated phospho-MEK1/2 levels, the amount of phospho-ERK1/2 remained high upon TACC3 knockdown (Supplementary Figure 5a). However, *in vitro* kinase assays using immunoprecipitated ERK1/2 failed to detect an overall increase of ERK1/2 activity upon TACC3 depletion when compared with the ERK1/2 activity from control cells (Supplementary Figures 5b and c).

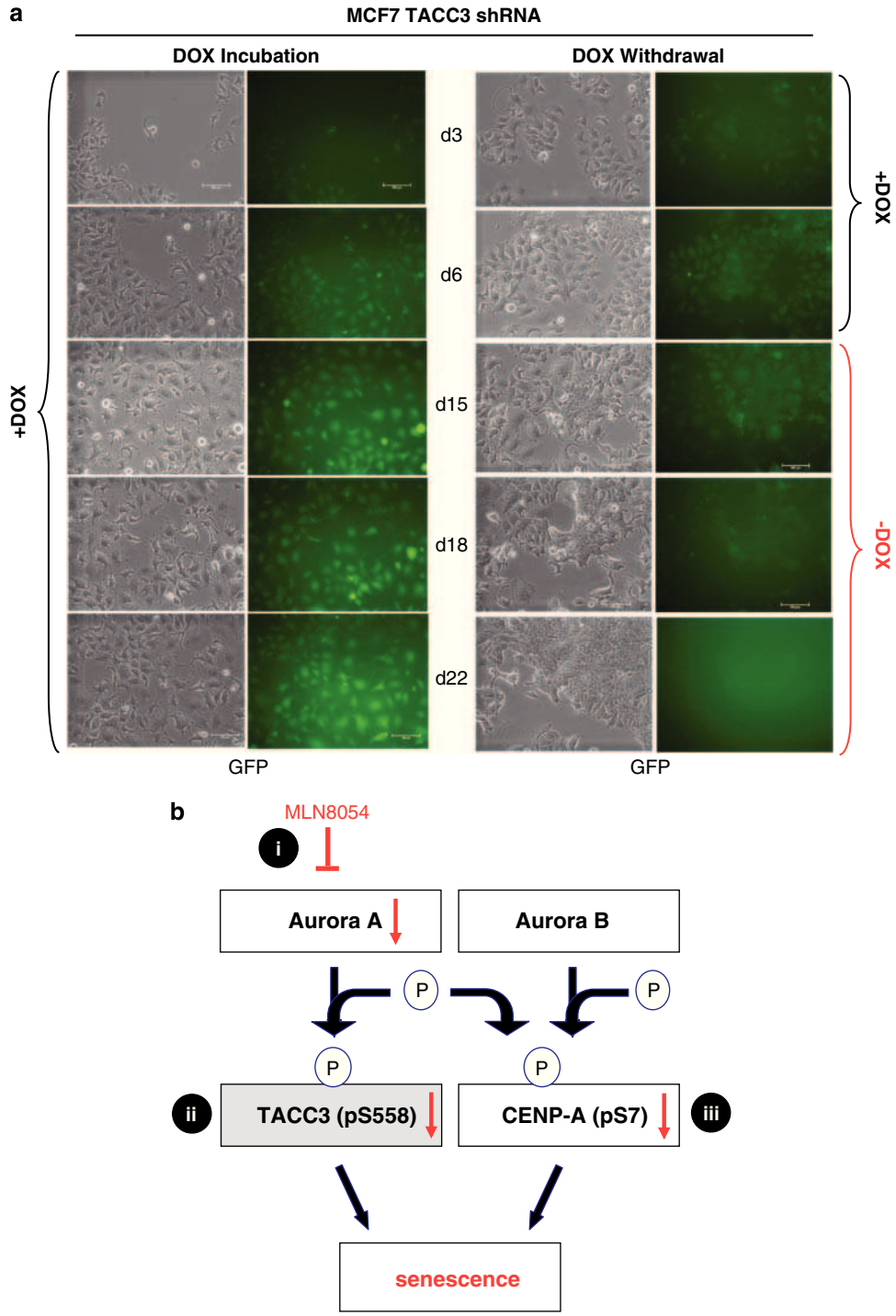


Figure 4 Reversible nature of the senescent phenotype upon TACC3 depletion. **(a)** Microscopic analysis of MCF-7 cells co-expressing TACC3 shRNA and green fluorescent protein (GFP) after the indicated time points of DOX treatment or its withdrawal. At day 6 (d6), cells were either further treated with DOX (media change every other day; left panels) or cultured in DOX-free media (right panels). Identical microscopic fields were repeatedly imaged throughout the experiment. **(b)** Model summarizing the role of the Aurora A–TACC3 axis in regulating commitment to premature senescence. Aurora A kinase phosphorylates TACC3 and thereby regulates its mitotic localization (LeRoy *et al*., 2007). Interestingly, (i) small molecule-mediated inhibition of Aurora A by MLN8054 or Aurora A depletion (Huck *et al*.), (ii) knockdown of TACC3 (this study), and (iii) reduction of the centromeric protein CENP-A (Maehara *et al*.), all trigger a comparable premature senescence response preventing propagation of defective mitoses. CENP-A itself is regulated by phosphorylation in a cell cycle-dependent manner through both Aurora A in prophase and Aurora B in metaphase (Kunitoku *et al*., 2003).

Phosphorylation of ERK1/2 normally leads to its translocation into the nucleus and transactivation of proliferation-relevant genes (Torii *et al*., 2006), an event that is terminated by the subsequent export of phospho-ERK1/2 into the cytosol (Horgan and Stork, 2003). Interestingly, while the relative distribution of ERK1/2

in the cytoplasm and nucleus was comparable in TACC3-depleted and control cells, suppression of TACC3 expression led to a profound increase of phospho-ERK1/2 in the cytosolic fraction (Supplementary Figure 5d). This finding is in line with the observation that elevated cytosolic levels of phosphorylated ERK1/2 are required for Ras-induced senescence (Gaumont-Leclerc *et al*., 2004), whereas nuclear-targeted ERK1/2 delays the onset of senescence (Tresini *et al*., 2007). Retention of phospho-ERK1/2 in the cytoplasm might promote senescence through attenuating the phosphorylation of nuclear ERK targets, thus explaining why increased ERK activation is associated with induction of senescence (Blagosklonny, 2006a; Cagnol and Chambard, 2009).

Recent studies using time-lapse microscopy have revealed profound intra- and interline variations of cancer cell lines in their response to antimitotic drugs (Gascoigne and Taylor, 2008; Shi *et al*., 2008). Given this observation, we expanded our work and assessed the role of TACC3 in regulating senescence in an alternative cell system, namely immortalized MCF10a breast epithelial cells expressing either an inducible control or TACC3 shRNA. Strikingly, and comparable to MCF-7 cells subjected to TACC3 knockdown, TACC3-depleted MCF10a cells displayed a very strong antiproliferative response, failed to undergo cell death, and instead were driven into cellular senescence (Figures 3a–e and data not shown). This response was characterized by the appearance of typical senescence markers, that is, senescence-associated β-galactosidase staining, increased cell size, and in particular a strong staining for nuclear $p21^{WAF}$/HP1γ (phospho-Ser83)-positive senescence-associated heterochromatic foci (Figures 3f–g).

It is debated whether and under which conditions senescence might be irreversible and which molecular features are required to maintain senescence growth arrest. To investigate whether premature senescence could be eventually reverted, we treated MCF-7 cells with DOX for 6 days in order to deplete TACC3 and to trigger senescence. Thereafter, cells were either continued to grow with DOX or further cultured in DOX-free medium. Interestingly, TACC3 depletion-induced cellular senescence of MCF-7 cells seemed to be indeed reversible, since upon DOX withdrawal a clear cell accumulation was observed (Figure 4a). Thus, cells kept in the absence of DOX apparently resumed proliferation, in contrast to cells maintained under DOX incubation. It is noteworthy that there are also reports in the literature indicating that different forms of senescence might be reversible. For instance, a previous study demonstrated that non-proliferating cells can be mitotically reactivated by the sole suppression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) in the absence of exogenous mitogens (Pajalunga *et al*., 2007). RNA interference-mediated suppression of CKIs efficiently triggered mitosis in terminally differentiated skeletal muscle cells, quiescent fibroblasts and senescent embryo kidney cells. Similarly, it has been shown that injection of anti-p53 antibodies or the acute removal of pRb can reactivate the cell cycle in senescent cells (Gire and Wynford-Thomas, 1998; Sage *et al*., 2003). Thus, these findings implicate that senescent growth arrest can not be reversed by known physiological signals, but upon restoration of TACC3 expression or depletion of mediators involved in checkpoint control, although Aurora-A kinase inhibition was reported to cause irreversible cell cycle arrest (Huck *et al*., 2010).

Altogether, our results demonstrate that downregulation of TACC3 enhances the chemosensitivity to PTX and thereby provides a rationale for the combined targeting of centrosomal proteins and microtubule dynamics in the treatment of breast cancer through induction of cellular senescence. Such a growth-inhibiting effect was also reported recently following downregulation of other centrosome-associated proteins, including PCM-1 (pericentriolar material 1 protein) and pericentrin, that also predisposes cells to senescence without the induction of cell death (Srsen *et al*., 2006; Mikule *et al*., 2007). In addition, reduction of centromeric protein A (CENP-A) and mitotic arrest deficient-like 1 (Mad2), a key checkpoint protein localized at inner kinetochores, triggers premature senescence (Prencipe *et al*., 2009; Maehara *et al*., 2010). Based on the recent observation that pharmacological targeting of Aurora-A kinase by MLN8054 mimics cellular senescence induced by the knockdown of TACC3 (Huck *et al*., 2010; Figure 4b), the Aurora A/TACC3 axis might be a decisive sensor of the mitotic spindle apparatus regulating commitment to premature senescence in order to prevent propagation of defective mitotic cells.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Didier Trono (Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne) and Jim Ihle (St Jude Children's Research Hospital, Memphis) for kindly providing viral constructs for RNA interference and retroviral transduction. Thanks to Aliaksei Shymanets for help with densitometric evaluation and to Chris Wichmann, Veronika Sexl, Richard Moriggl, Olga Modlich, Holger Bastians, Ute Fischer, Miguel Pujana, Aris Astrinidis, and members of the department for input and critical comments. We thank the Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V. for a generous contribution to the confocal laser scanning microscope core facility.

Grant support: Collaborative Research Centers SFB728 (RUJ, RPP), SFB773 (FE, KSO), and SPP1230 (HH) of the Deutsche Forschungsgemeinschaft; Forschungskommission (Medizinische Fakultät) of the Heinrich-Heine-Universität (ICC, MRA, RUJ, RPP); and the NGFNplus program (grant 01GS08100 to MRA) and the network for bone marrow failure syndromes (bmfs to HH) of the Bundesministerium für Bildung und Forschung.

References

Ben-Porath I, Weinberg RA. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 961–976.

Blagosklonny MV. (2006a). Cell senescence: hypertrophic arrest beyond the restriction point. *J Cell Physiol* **209**: 592–597.

Blagosklonny MV. (2006b). Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint: how p53 measures the duration of mitosis. *Cell Cycle* **5**: 971–975.

Blagosklonny MV, Demidenko ZN, Giovino M, Szynal C, Donskoy E, Herrmann RA *et al*. (2006). Cytostatic activity of paclitaxel in coronary artery smooth muscle cells is mediated through transient mitotic arrest followed by permanent post-mitotic arrest: comparison with cancer cells. *Cell Cycle* **5**: 1574–1579.

Brito DA, Rieder CL. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* **16**: 1194–1200.

Broude EV, Swift ME, Vivo C, Chang BD, Davis BM, Kalurupalle S *et al*. (2007). p21(Waf1/Cip1/Sdi1) mediates retinoblastoma protein degradation. *Oncogene* **26**: 6954–6958.

Cagnol S, Chambard JC. (2009). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death–apoptosis, autophagy and senescence. *Febs J* **277**: 2–21.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729–740.

Cassimeris L, Morabito J. (2004). TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* **15**: 1580–1590.

Collado M, Serrano M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6**: 472–476.

Czernick M, Rieger A, Goping IS. (2009). Bim is reversibly phosphorylated but plays a limited role in paclitaxel cytotoxicity of breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **379**: 145–150.

Demidenko ZN, Kalurupalle S, Hanko C, Lim CU, Broude E, Blagosklonny MV. (2008). Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis. *Oncogene* **27**: 4402–4410.

Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. (2004). Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* **64**: 7065–7072.

Gascoigne KE, Taylor SS. (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell* **14**: 111–122.

Gaumont-Leclerc MF, Mukhopadhyay UK, Goumard S, Ferbeyre G. (2004). PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* **279**: 46802–46809.

Gergely F. (2002). Centrosomal TACCtics. *Bioessays* **24**: 915–925.

Gergely F, Draviam VM, Raff JW. (2003). The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. *Genes Dev* **17**: 336–341.

Gire V, Wynford-Thomas D. (1998). Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol* **18**: 1611–1621.

Horgan AM, Stork PJS. (2003). Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Experimental Cell Research* **285**: 208–220.

Huck JJ, Zhang M, McDonald A, Bowman D, Hoar KM, Stringer B *et al*. (2010). MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Res* **8**: 373–384.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**: 9357–9360.

Janssen K, Pohlmann S, Janicke RU, Schulze-Osthoff K, Fischer U. (2007). Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. *Blood* **110**: 3662–3672.

Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY. (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Pathol Int* **56**: 503–509.

Kadura S, Sazer S. (2005). SAC-ing mitotic errors: how the spindle assembly checkpoint (SAC) plays defense against chromosome mis-segregation. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**: 145–160.

Khodjakov A, Rieder CL. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol* **8**: 88.

Kiemeney LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G *et al*. (2010). A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* **42**: 415–419.

Kim WY, Sharpless NE. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**: 265–275.

Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**: 877–884.

Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O *et al*. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* **5**: 853–864.

Lauffart B, Vaughan MM, Eddy R, Chervinsky D, DiCioccio RA, Black JD *et al*. (2005). Aberrations of TACC1 and TACC3 are associated with ovarian cancer. *BMC Womens Health* **5**: 8.

LeRoy PJ, Hunter JJ, Hoar KM, Burke KE, Shinde V, Ruan J *et al*. (2007). Localization of human TACC3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on Ser558 by Aurora A: a novel pharmacodynamic method for measuring Aurora A activity. *Cancer Res* **67**: 5362–5370.

Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* **12**: 1008–1014.

Li Z, Zhang J, Liu Z, Woo CW, Thiele CJ. (2007). Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ* **14**: 318–326.

Liang Y, Yan C, Schor NF. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* **20**: 6570–6578.

Maehara K, Takahashi K, Saitoh S. (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* **30**: 2090–2104.

Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurcyzk A, Hergert P, Doxsey S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat Cell Biol* **9**: 160–170.

Mollinedo F, Gajate C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8**: 413–450.

Pajalunga D, Mazzola A, Salzano AM, Biferi MG, De Luca G, Crescenzi M. (2007). Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol* **176**: 807–818.

Piekorz RP, Hoffmeyer A, Duntsch CD, McKay C, Nakajima H, Sexl V *et al*. (2002). The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. *Embo J* **21**: 653–664.

Prencipe M, Fitzpatrick P, Gorman S, Tosetto M, Klinger R, Furlong F *et al*. (2009). Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness *in vitro*. *Br J Cancer* **101**: 1900–1908.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**: 303–313.

Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**: 223–228.

Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Schulze-Osthoff K *et al*. (2008). TACC3 depletion sensitizes to paclitaxel-induced cell death and overrides p21(WAF)-mediated cell cycle arrest. *Oncogene* **27**: 116–125.

Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W *et al*. (2007). The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. *J Biol Chem* **282**: 29273–29283.

Schuendeln MM, Piekorz RP, Wichmann C, Lee Y, McKinnon PJ, Boyd K *et al*. (2004). The centrosomal, putative tumor suppressor protein TACC2 is dispensable for normal development, and deficiency does not lead to cancer. *Mol Cell Biol* **24**: 6403–6409.

Shi J, Orth JD, Mitchison T. (2008). Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res* **68**: 3269–3276.

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 995–1003.

Srsen V, Gnadt N, Dammermann A, Merdes A. (2006). Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *J Cell Biol* **174**: 625–630.

Tierno MB, Kitchens CA, Petrik B, Graham TH, Wipf P, Xu FL *et al*. (2009). Microtubule binding and disruption and induction of premature senescence by disorazole C(1). *J Pharmacol Exp Ther* **328**: 715–722.

Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* **97**: 697–702.

Tresini M, Lorenzini A, Torres C, Cristofalo VJ. (2007). Modulation of replicative senescence of diploid human cells by nuclear ERK signaling. *J Biol Chem* **282**: 4136–4151.

Yao R, Natsume Y, Noda T. (2007). TACC3 is required for the proper mitosis of sclerotome mesenchymal cells during formation of the axial skeleton. *Cancer Sci* **98**: 555–562.

Yu J, Zhang L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 851–858.

Zhang R, Liu ST, Chen W, Bonner M, Pehrson J, Yen TJ *et al*. (2007). HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Mol Cell Biol* **27**: 949–962.

Zyss D, Gergely F. (2009). Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends Cell Biol* **19**: 334–346.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

Supplemental Information

Material and methods

Cloning of retroviral and lentiviral constructs for conditional gene suppression of TACC3. Conditional doxycycline (DOX)-dependent Tet-On shRNA expression was enabled through the tTR-KRAB transrepressor (Wiznerowicz and Trono, 2003). Its cDNA was subcloned into the retroviral expression vector S11IP upstream of the IRES-puro cassette. The original lentiviral vectors for shRNA expression and the method of generation of tTR-KRAB transrepressor-positive target cells lines have been described (Schneider *et al.*, 2007, Wiznerowicz and Trono, 2003). Complementary synthetic shRNA oligos consisting of sense-loop-antisense sequences (Operon, Cologne, Germany) were cloned into the pLVTH vector downstream of the H1-promoter as instructed on http://tronolab.epfl.ch. The RNAi sequences targeting TACC3 were selected using the shRNA prediction software from the Whitehead Institute for Biomedical Research (Boston, MA, USA). In particular, the control shRNA2m is directed against nucleotides 495-513 of murine TACC3 (5'-TCTTGACTTCCTCAAGCCT-3'; BC003252) and has seven mismatches towards human TACC3, whereas shRNA2h precisely and functionally targets nucleotides 1728-1746 of human TACC3 cDNA (5'-GTGGATTACCTGGAGCAGT-3'; BC106071).

Cell culture and viral transductions. 293T and MCF-7 breast carcinoma cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FCS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml of streptomycin. Immortalized MCF10a breast epithelial cells were kindly provided by Miguel Pujana (ICO, Barcelona) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium/Ham's F12 (1:1) High Glucose, supplemented with 10% FCS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 20 ng/ml EGF, 0.5 μg/ml hydrocortisone, 10 μg/ml insulin, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml of streptomycin. Cells were transduced with retro- and lentiviruses essentially as described (Leurs *et al.*, 2003). In brief, viruses were generated by transfection of 293T cells plated at a density of $4.5x10^6$ cells per 10 cm dish. The following day, cells were co-transfected with 10 μg each of

the retroviral vectors tTR-KRAB-S11IP (this study) and helper vector (pEQ-PAM3; provided by Jim Ihle, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN) resp. lentiviral vectors pLVTH, packaging vector (psPAX2; provided by Didier Trono, Lausanne) and a vector coding for viral envelope components (pCR-VSV-G) using the calcium phosphate precipitation method. Viral supernatants were harvested 24 hrs later, supplied with 7 μg/ml polybrene (Sigma, Munich, Germany) and used to transduce target cells at a density of $3.5x10^4$ cells per 3.5 cm plate. Puromycin-selected MCF-7 cells stably expressing the tTR-KRAB transrepressor were used to generate lines which express shRNAs in a doxycycline (DOX)-dependent manner. DOX was purchased from MP Biomedicals (Eschwege, Germany) and used at a concentration of 5 μg/ml. For each shRNA various subclones were cloned and analyzed throughout this study.

Flow cytometrical BrdU assay. For proliferation studies, cells were pulsed with 10 μM bromodeoxyuridine (BrdU; Applichem, Darmstadt, Germany) for 30 min prior to harvesting by trypsination and fixation with 70% ethanol. Cells were then treated with a pepsin solution (0.4 mg/ml in 0.1 M HCl) followed by incubation in 2 M HCl at 37°C for 20 min each. Residual acid was neutralized by borax buffer (0.1 M $Na_2B_4O_7$, pH 8.5), before cells were stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-BrdU antibody (Biomeda, Foster City, CA). DNA was counterstained with propidium iodide (20 μg/ml in 0.5% bovine serum albumin/PBS containing 40 μg/ml RNAse). BrdU-positive cells were assessed in a logarithmic mode (FL1-H), DNA content in a linear mode (FL2-A). Analysis was performed on a Becton-Dickinson FACScalibur using CellQuest and winMDI software (Joseph Trotter, Scripps Institute, CA).

Cell death determination by flow cytometry. For determination of cell cycle distribution, cells were stained with propidium iodide (50 μg/ml in 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100) and treated with 40 μg/ml RNase on ice. The percentage of cells undergoing apoptotic DNA fragmentation (DNA content <2N, sub-G1) was determined in a logarithmic mode (FL3-H) using winMDI software. Apoptosis was further assessed with the apoptosis detection kit I (BD Biosciences) using phycoerythrin-coupled annexin V and 7-aminoactinomycin D (7-AAD).

Confocal laser scanning microscopy. Cells were seeded at a density of $5x10^3$ cells/cm^2 on coverslips and grown in media containing 5 µg/ml DOX. After the indicated periods of time, cells were fixed with ice-cold methanol/acetone (1:1) for 20 min at -20 °C and subsequently incubated in IF buffer (4% bovine serum albumin, 0.05% saponin in PBS) for 1 h. Cells were stained in IF buffer with anti-$p21^{WAF}$ (BD Biosciences, 1:500) or anti-HP1γ (P-S83) (Abcam, 1:500). Thereafter, cells were washed and labeled with secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, or Alexa Fluor 594 (Invitrogen; 1:500). DNA was detected using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg/ml; Calbiochem). Analyses were performed with a Leica TCS SP2/AOBS microscope equipped with a HCX PL APO x63 immersion objective. Alternatively, cells were analyzed on an LSM510-Meta confocal microscope (Zeiss) equipped with 40/1.3 or 63/1.4 immersion objectives.

Senescence-associated β-galactosidase (SA-βgal) staining. Cells were fixed for 4 min with 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde in PBS and stained with βgal staining solution (2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 40 mM citric acid pH 6.0, 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α-D-galactopyranoside) at 37°C for 24 hrs. A senescence cell staining kit (Sigma-Aldrich) was used as indicated by the supplier. Senescent cells were scored according to their characteristic flattened morphology and strong SA-βgal staining by standard microscopy using a Nikon 2000-E microscope or Zeiss imaging system.

Subcellular fractionation. Frozen cell pellets were homogenized ice-cold extraction buffer (EB) containing 10 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM DNase, 1 mM PMSF and protease inhibitors. Crude nuclear pellets were isolated by centrifugation (600 *g*, 10 min), re-suspended in 3 ml nuclear buffer 1 (NE1; 0.25 M sucrose, 10 mM $MgCl_2$), transferred onto 3 ml NE2 (0. 35M sucrose, 0.5 mM $MgCl_2$), and centrifuged (1450 *g*, 5 min). Pellets were resuspended in 300-400 µl EB containing 2% CHAPS and retained as the nuclear fraction. The cytosolic supernatant containing mitochondria from the initial centrifugation step (600 *g*, 10 min) was centrifuged at 10000 *g* for 30 min. The crude mitochondrial (pellet) fraction was washed in EB, centrifuged (10000 *g*, 30 min) and resuspended in 100 µl EB containing 2% CHAPS. The

crude cytosolic (supernatant) fraction was centrifuged (10000 *g*, 30 min) to pellet residual mitochondria. The resulting supernatant was retained as the cytosolic fraction.

Immunoblotting. Total cell lysates were prepared in lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2 mM EDTA. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C, GE Healthcare, Freiburg, Germany). Membranes were probed with the indicated primary antibodies at a final concentration of 1 µg/ml or according to the manufacturers' instructions. Signals were visualized with the ECL detection system (GE Healthcare) following incubation with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Cell Systems, St. Katharinen, Germany). The following primary antibodies were used: Bim/BOD (Assay Designs, Ann Harbor, Michigan, USA), cyclin D1 (Ab3; Labvision, Fremont, CA, USA), $p27^{KIP}$ (Ab1; Labvision), phospho-EGF receptor (EGFR; Tyr1068, Abcam), ERK1/2 and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Cell Signaling), MEK1/2 and phospho-MEK1/2 (Ser217/221; Cell Signaling) and β-actin (C4; MP Biomedicals). Antibodies against TACC3 (H300), cyclin A (C19) and cyclin B1 (H-433) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and antibodies against $p21^{WAF}$, Bcl-x_L, pRb from BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Germany). Antibodies against lamin A/C and α-tubulin were from Cell Signaling and Sigma-Aldrich, respectively.

Ras activity assay. Pulldown assays for active RAS were performed essentially as described (Cirstea *et al.,* 2010).

ERK kinase assays using MBP as substrate. ERK kinases were immunoprecipitated from total cell lysates using antibodies against ERK1/2 (Cell Signaling). Thereafter, immune complexes were subjected to *in vitro* kinase reaction essentially as described (Silvany *et al*. 2000). Samples were resolved by SDS-PAGE and ^{32}P-MBP/MBP ratios were determined by densitometric analysis.

Statistical analysis. To evaluate statistical significance, we have performed Student's t-tests. Results are given as means ± S.D. P-values below 0.05 were considered significant.

References in the supplemental information

Cirstea I, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C et al. (2010). A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet* **40**: 27-29.

Leurs C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, Wissler M *et al.* (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* **14:** 509-519.

Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W *et al.* (2007). The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. *J Biol Chem* **282:** 29273-29283.

Silvany RE, Eliazer S, Wolf NC, Ilaria RL Jr. (2000). Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS FLI-1-dependent transformation. *Oncogene* **19:** 4523-4530.

Wiznerowicz M, Trono D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77:** 8957-8961.

Suppl. Figure legends

Suppl. Figure 1 TACC3-depleted MCF-7 cells exit the cell cycle into G_1 and become senescent. (**a**) Two and four days following induction of the TACC3 or the control shRNA by DOX, MCF-7 cells were pulsed with 10 µM bromodeoxyuridine (BrdU) for 30 min prior to harvesting. Cells were then stained with FITC-coupled anti-BrdU antibodies and the DNA dye propidium iodide and analyzed by flow cytometry. A representative flow chart is shown. (**b**) Six days post DOX treatment, control and TACC3 shRNA-expressing MCF-7 cells were stained for SA-βgal activity.

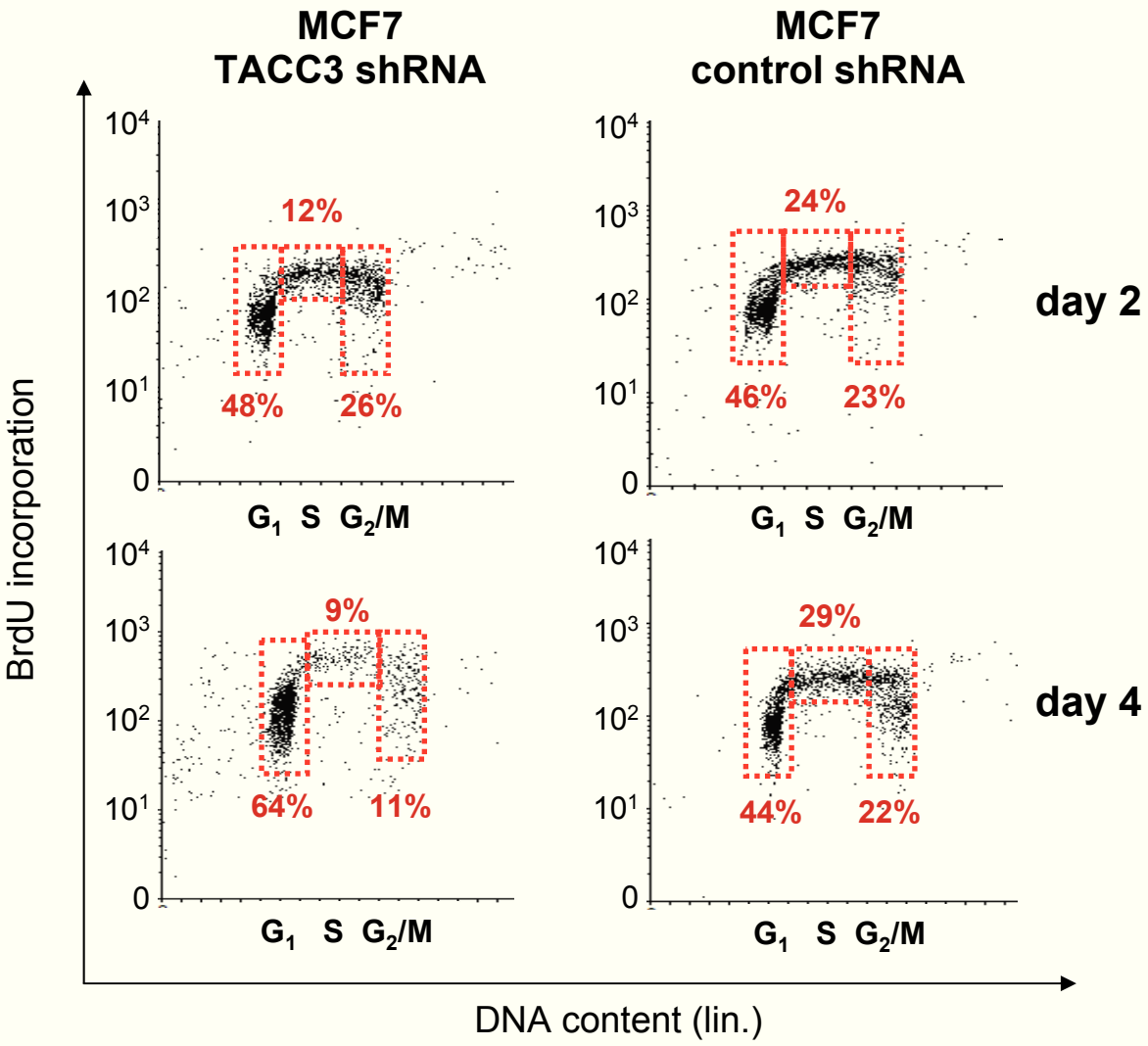
Suppl. Figure 2 Caspase-3 is not decisive in cellular stress responses. MCF-7 wild-type (WT) cells (**a**) and MCF-7/casp-3 cells (**b**) were either TACC3-depleted by DOX treatment or γ-irradiated with 20 Gy and analyzed for SA-βgal staining at day 6 (bars = 50µm). (**c**) Control experiments demonstrating caspase-3 expression (left panel) and staurosporine (STS)-induced DNA laddering (right panel) in caspase-3-transfected but not wildtype MCF-7 cells.

Suppl. Figure 3 TACC3 depletion alters expression of cell cycle-related proteins. Immunoblot analyses for the expression of the indicated cell cycle- and G_1-regulatory proteins **(a)** and pRB **(b)** in MCF-7 cells that were treated with DOX for the indicated days causing the expression of control or TACC3 shRNAs.

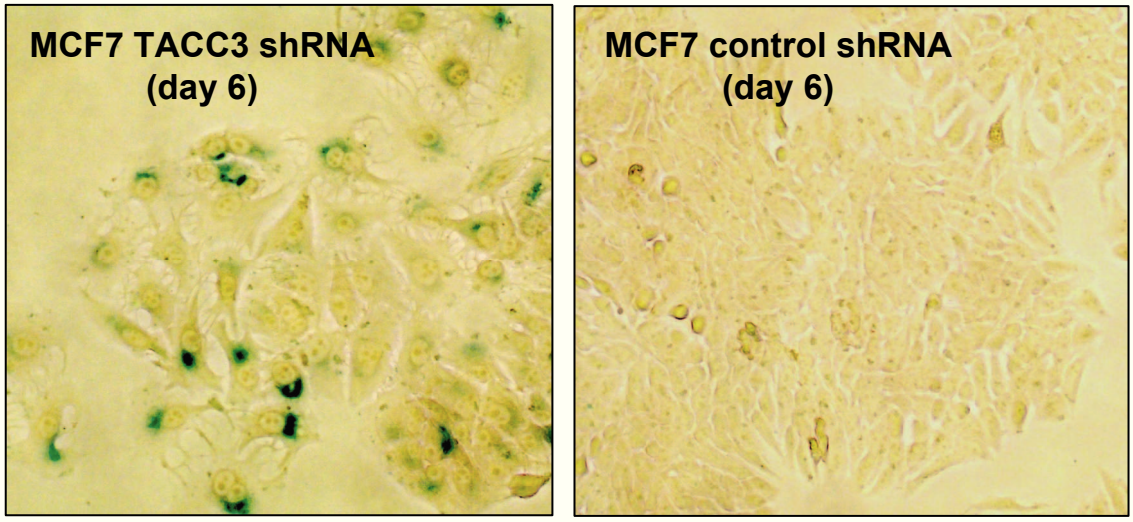
Suppl. Figure 4 Confocal microscopic detection (**a**) of HP1γ (P-S83)-positive SAHFs (magnified in **b**) and nuclear $p21^{WAF}$ in control and TACC3-depleted MCF-7 cells at the indicated days following DOX treatment. DNA was visualized by DAPI.

Suppl. Figure 5 Influence of TACC3 depletion on the ERK1/2 pathway. Cells were analyzed following DOX-triggered expression of control or TACC3 shRNAs for the indicated period of time. (**a**) Immunoblot analyses for the expression and phosphorylation of the indicated components of the MAPK pathway. Staining for β-actin served as loading control. (**b**) Determination and (**c**) quantification of relative ERK kinase activity using ERK immunoprecipitates from control and TACC3-depleted MCF-7 cells and myelin basic protein (MBP) as substrate. (**d**) Subcellular fractionation analysis of pERK/ERK levels in control and TACC3-depleted MCF-7 cells. Lamin A/C and α-tubulin served as nuclear and cytoplasmic markers, respectively.

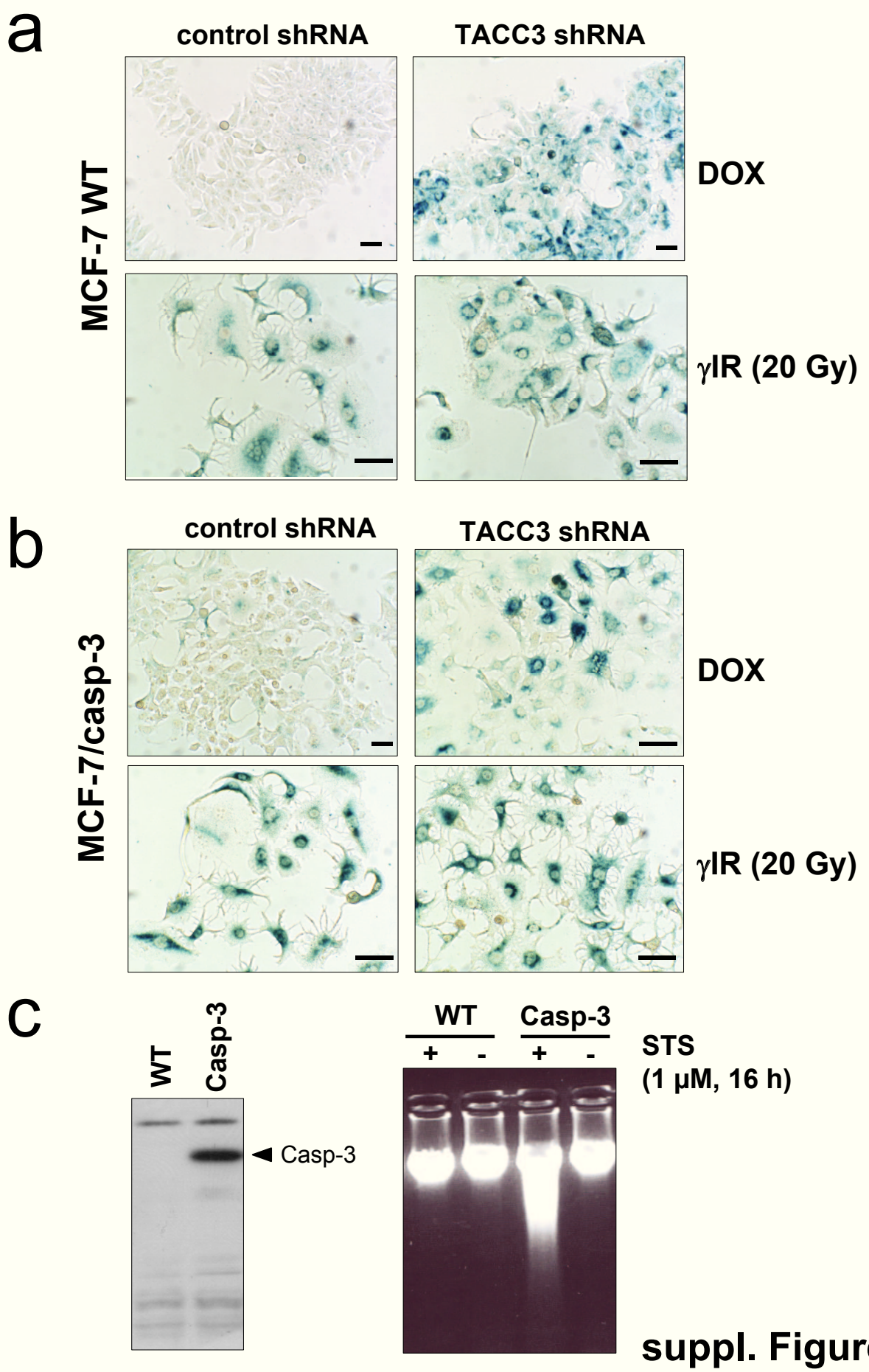
a



b

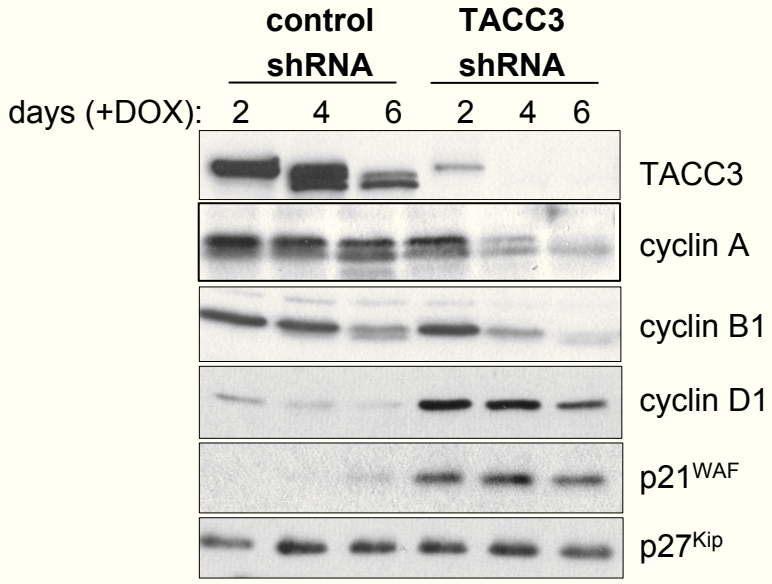


suppl. Figure 1

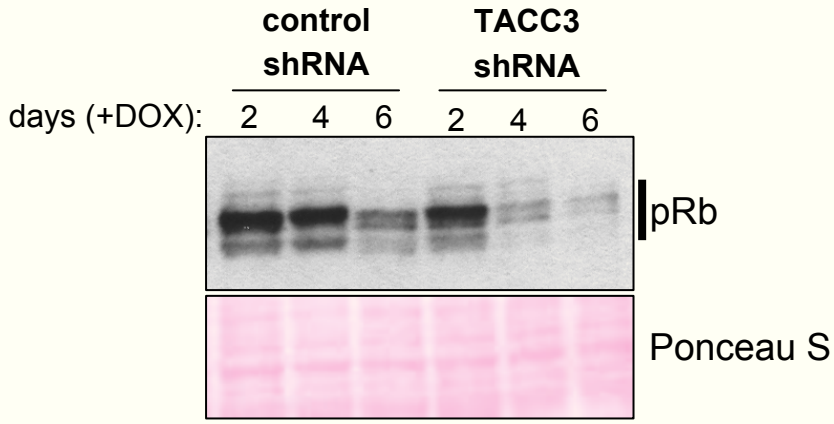


suppl. Figure 2

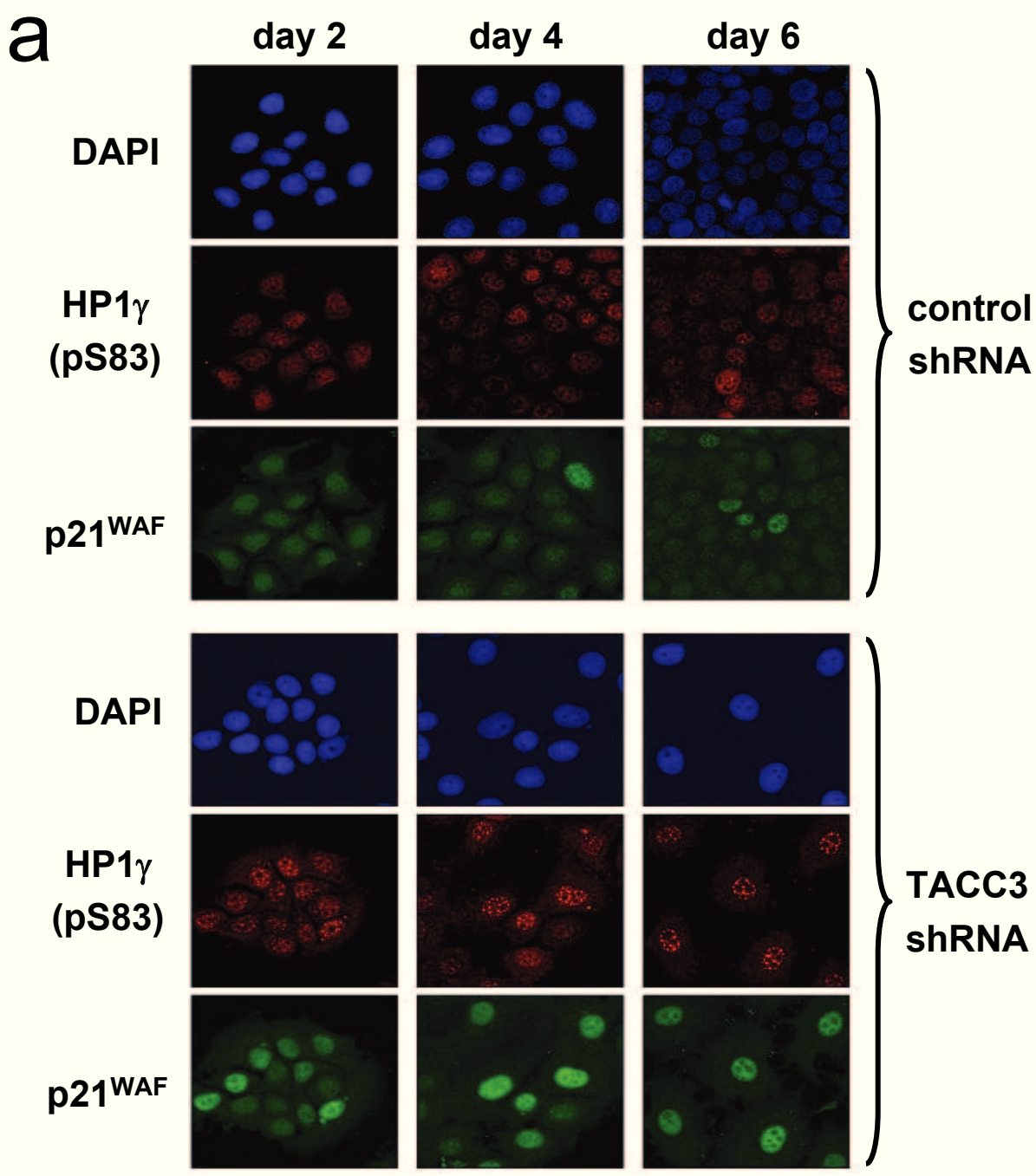
a

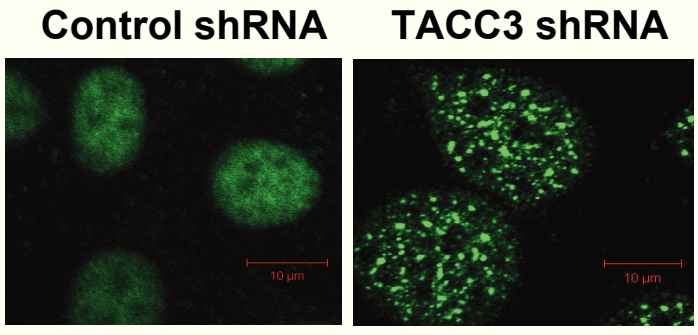


b

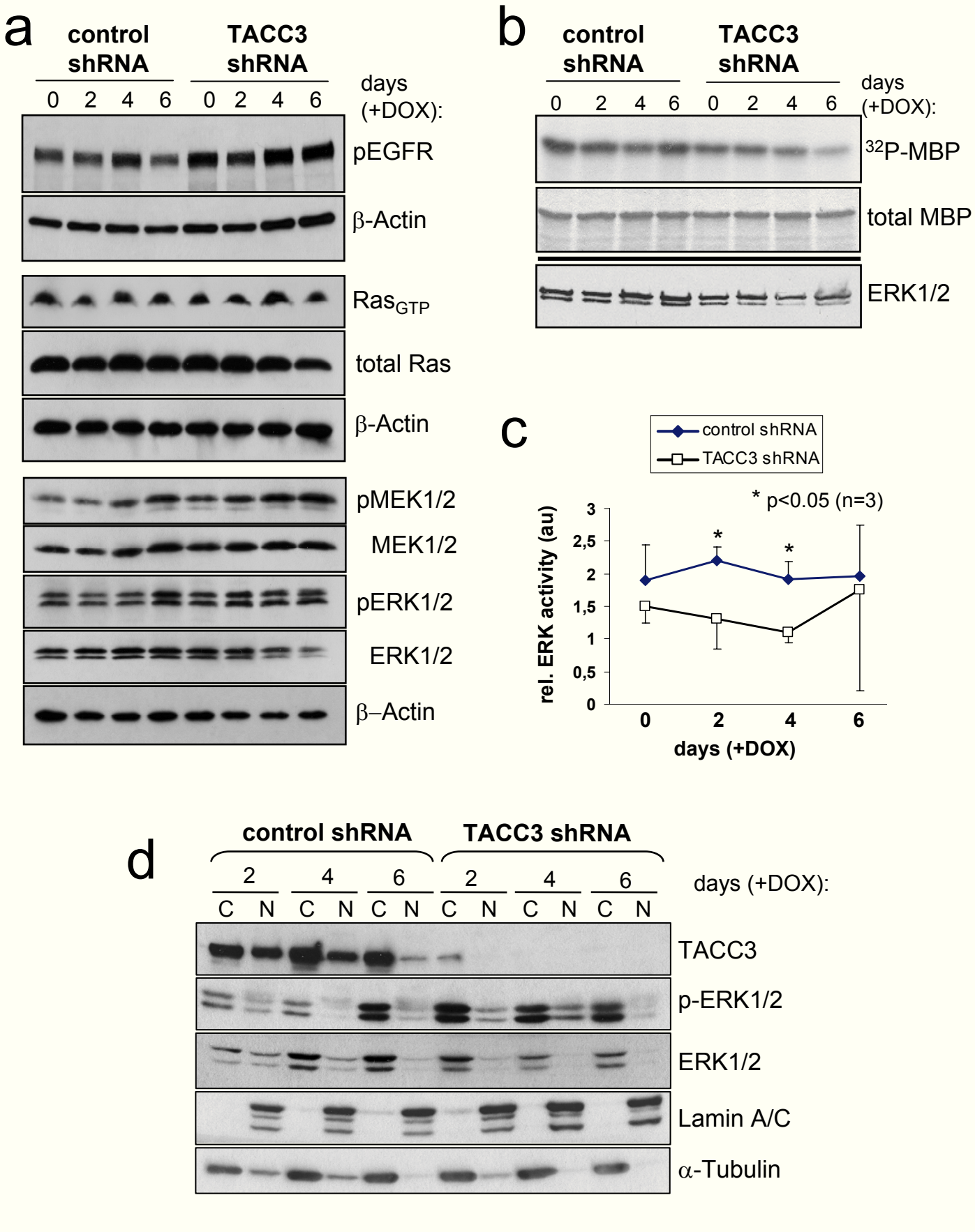


suppl. Figure 3





suppl. Figure 4



suppl. Figure 5

Suppl. Table 1. TACC3 depletion and combined treatment with low paclitaxel concentrations synergistically induce the formation of HP1γ (pS83)-positive senescence-associated heterochromatic foci and nuclear $p21^{WAF}$ expression.

control shRNA	mock	DOX	PTX	DOX+PTX
HP1γ (P-S83)				
day3	3.4±1.9	3.0±4.6	3.9±0.9	7.1±4.2
day 4	2.9±4.7	7.5±7.9	4.5±5.1	8.5±3.0
$p21^{WAF}$				
day 3	2.5±0.6	1.7±1.3	11.8±8.4	13.9±12.6
day 4	2.7±2.5	3.6±1.4	10.7±6.6	15.7±8.6
HP1γ (P-S83)+$p21^{WAF}$				
day 3	0.0±0.0	0.2±0.3	0.7±0.3	1.4±0.6
day 4	0.0±0.0	0.2±0.3	1.1±1.9	3.4±3.2

TACC3 shRNA	mock	DOX	PTX	DOX+PTX
HP1γ (P-S83)				
day 3	1.7±3.2	42.4±19.8	11.3±10.8	40.7±27.5
day 4	6.8±4.3	61.9±7.2	26.4±26.8	68.1±6.1
$p21^{WAF}$				
day 3	6.4±6.5	16.5±7.4	17.0±9.9	24.1±21.5
day 4	6.7±2.4	23.5±8.6	30.6±25.4	45.4±12.6
HP1γ (P-S83)+$p21^{WAF}$				
day 3	0.3±0.3	10.2±11.1	5.9±11.9	32.9±26.4
day 4	0.0	20.1±5.9	18.4±25.0	40.5±11.9

MCF7 cells were stably transduced with lentiviral constructs allowing inducible expression of control and TACC3-specific shRNAs upon treatment with doxycycline (DOX, 5 µg/ml). Cells were analyzed three and four days following treatment with DOX, paclitaxel (PTX; 1 nM), or the combination of both (DOX+PTX). Indicated are percentages of cells positive for either HP1γ (pS83)-containing senescence-associated heterochromatic foci (SAHF), nuclear $p21^{WAF}$, or for both of these markers. Cells were stained using specific antibodies and scored by immunofluorescence microscopy. At least 150 cells were analyzed per condition. Results are mean values ± SD from three to four independent experiments.

2.2 The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence

Schmidt S, Essmann E, Cirstea IC, Kuck F, Thakur HC, Singh M, Kletke A, Jänicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nürnberg B and Piekorz RP.
Cell Cycle, 2010, Dec 7;9(22):4469-73.

Die mitotische Zellteilung ist Voraussetzung für die Entwicklung, proliferative Homöostase und Geweberegeneration. Die fehlerfreie Segregation der Chromosomen während der Mitose wird dabei durch den Spindelapparat gewährleistet, dessen Funktion durch die Zentrosomen und Kinetochore reguliert wird. Abweichungen in der Architektur oder Funktion des mitotischen Spindelapparats, z.B. verursacht durch Spindelgifte, führen zu Malmitose, fehlerhafter Chromosomensegregation und somit zur Aneuploidie. Je nach Art und Schweregrad der auftretenden mitotischen Defekte können diese die Aktivierung des zellulären Apoptoseprogramms oder postmitotisch einen Proliferationsarrest durch Induktion einer prämaturen Seneszenzantwort zur Folge haben.

In diesem Übersichtsartikel (*Perspective*) wurden aktuelle Literaturbefunde zusammengefasst, in denen zentrosomale (Aurora-A, TACC3, NEDD1) und Kinetochor-lokalisierte (CENP-A) Proteine sowie Komponenten des Spindelkontrollpunktes (Mad2, BubR1, Bub1, Bub3 & Rae1) identifiziert wurden, deren Inhibition oder veränderte Expression gezielt eine Aktivierung des p53-$p21^{WAF}$-Tumorsuppressorwegs gefolgt von zellulärer Seneszenz zur Folge haben. Bemerkenswert ist hierbei, dass die genetisch reduzierte Expression eines oder mehrerer Proteine des Spindelkontrollpunkts im Mausmodell zu einem deutlich erhöhten Grad an Aneuploidie führt, ohne dass in diesen Tieren eine erhöhte basale Tumorigenese zu beobachten ist. Vielmehr zeigen z.B. Mäuse mit einer hypomorphen BubR1-Expression überraschenderweise den Phänotyp einer vorzeitigen Alterung (Progerie), die nicht nur proliferative, sondern auch postmitotische Gewebe und deren Funktionen betrifft. Eine komplette Defizienz z.B. für BubR1 im Tiermodell führt dagegen zur frühen embryonalen Letalität. Malmitose ist demnach über eine eingeschränkte, jedoch für das Überleben noch ausreichende Funktion des Spindelkontrollpunkts mit zellulärer Seneszenz und vorzeitiger Alterung assoziiert.

Der Verfasser dieser Dissertation war maßgeblich an der Literaturrecherche sowie dem Aufbau und der Erstellung dieses Übersichtsartikels beteiligt.

Cell Cycle 9:22, 1-5; November 15, 2010; © 2010 Landes Bioscience

This manuscript has been published online, prior to printing. Once the issue is complete and page numbers have been assigned, the citation will change accordingly.

The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence

Stephan Schmidt,[1] Frank Essmann,[6] Ion C. Cirstea,[1] Fabian Kuck,[1] Harish C. Thakur,[1] Madhurendra Singh,[1] Anja Kletke,[1] Reiner U. Jänicke,[2] Constanze Wiek,[3] Helmut Hanenberg,[3,4] M. Reza Ahmadian,[1] Klaus Schulze-Osthoff,[6] Bernd Nürnberg[5] and Roland P. Piekorz[1,*]

[1]Institut für Biochemie und Molekularbiologie II; [2]Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie; [3]Klinik für Kinder-Onkologie; Hämatologie und Klinische Immunologie; Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität; Düsseldorf, Germany; [4]Department of Pediatrics; Wells Center for Pediatric Research; Riley Hospital for Children; Indiana University School of Medicine; Indianapolis, IN USA; [5]Institut für Experimentelle & Klinische Pharmakologie & Toxikologie und Interfakultäres Zentrum für Pharmakogenomik & Arzneimittelforschung (ICePhA); Klinikum der Eberhard Karls Universität; [6]Abteilung für Molekulare Medizin; Interfakultäres Institut für Biochemie (IFIB); Eberhard Karls Universität; Tübingen, Germany

Altered cell division is associated with overproliferation and tumorigenesis, however, mitotic aberrations can also trigger antiproliferative responses leading to postmitotic cell cycle exit. Here, we focus on the role of the centrosome and in particular of centrosomal TACC (transforming acidic coiled coil) proteins in tumorigenesis and cellular senescence. We have compiled recent evidence that inhibition or depletion of various mitotic proteins which take over key roles in centrosome and kinetochore integrity and mitotic checkpoint function is sufficient to activate a p53-p21^{WAF} driven premature senescence phenotype. These findings have direct implications for proliferative tissue homeostasis as well as for cellular and organismal aging.

©2010 Landes Bioscience. Do not distribute.

Key words: centrosome, cancer, kinetochore, mitotic checkpoint, p53, p21^{WAF}, senescence

Submitted: 09/16/10

Accepted: 09/20/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/13684

*Correspondence to: Roland P. Piekorz; Email: roland.piekorz@uni-duesseldorf.de

Role of the Centrosome in Normal and Malignant Proliferation

Mitotic cell division is a prerequisite for development, proliferative homeostasis and tissue regeneration. During mitosis the bipolar spindle is organized by centrosomes to ensure faithful separation of chromosomes to both daughter cells.[1] Spindle poles, kinetochores and various microtubule-associated proteins are involved in the regulation of microtubule dynamics. On the one hand, the assembly of the mitotic spindle apparatus is a highly complex and dynamic process and tightly regulated by cell cycle components and in particular by the kinetochore attachment checkpoint.[2] On the other hand, anomalities in centrosome and mitotic spindle architecture and functions have profound consequences for cell cycle progression and can lead to chromosomal instability, aneuploidy/tetraploidy and cell death.[1,3,4]

Cancer cells often display genetic instability and centrosomal abnormalities, thus implying chromosomal missegregation and aneuploidy as driving forces in tumorigenesis. Interestingly, this concept was already proposed almost 100 years ago by the pioneering work of Theodor Boveri.[5] However, the role of the centrosome and its amplification in generating genomic instability, and as a consequence cancer, is debated as amplified centrosomes can form clusters and assemble a bipolar rather than a multipolar spindle resulting in normal cell division.[6] Moreover, analysis of mice with reduced expression of the centromere-linked motor protein CENP-E (Centromere protein E) unexpectedly revealed that increased aneuploidy can act both in an oncogenic way (in the case of spontaneous tumors) and as a tumor suppressor (in the case of induced tumor formation).[7]

An alternative and intriguing concept linking centrosomal amplification to tumorigenesis was recently proposed and successfully tested in the fruit fly model. The authors demonstrated that symmetric (abnormal), rather than asymmetric (normal) cell division of neuroblasts, but not genomic instability, led to their overproliferation resulting in a transplantable

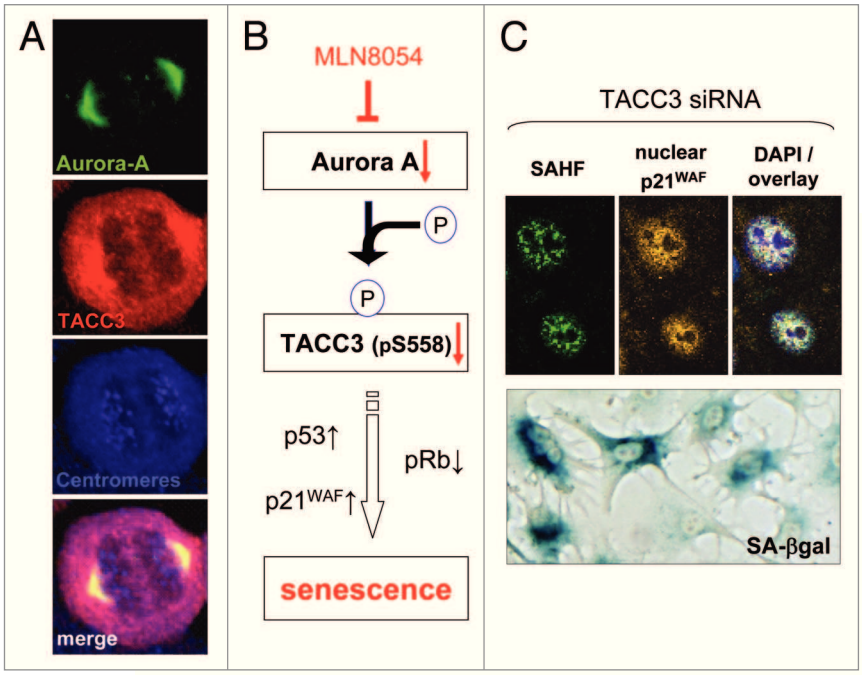


Figure 1. Inhibition of the Aurora-A-TACC3 function triggers premature senescence. (A) Confocal microscopic analysis of Aurora-A kinase colocalized with its substrate TACC3 during cell division. Centromeric regions were visualized by the CREST autoimmune serum. (B) Inhibition of Aurora-A activity by the small molecule inhibitor MLN8054, siRNA-mediated Aurora-A depletion or knockdown of its downstream target TACC3 all trigger comparable effector pathways and a premature senescence phenotype. (C) Senescence upon TACC3 depletion is characterized by the occurrence of HP1γ (pS83)-positive senescence-associated heterochromatic foci (SAHF), nuclear accumulation of the cell cycle inhibitor $p21^{WAF}$, and increased SA-β-Gal activity (blue staining). (B and C) modified from ref. 44.

cancer-like phenotype.[8,9] Given these provocative findings it is important to determine to which extent centrosomal aberrations occur in human cancer stem cells[10] and whether these defects affect an early stem cell balance between the symmetric (cancer promoting) and asymmetric (cancer suppressing) division mode.[11]

Centrosomal TACC Proteins and their Link to Cancer

The mammalian transforming acidic coiled coil (TACC) family of centrosomal proteins consists of three members (TACC1, 2, 3) which are important structural components of the mitotic spindle apparatus contributing to its dynamics.[12,13] TACC proteins are evolutionary conserved from yeast to man[12-16] and share a 200 amino acid coiled coil motif at their C-terminus, but have only limited homology in the N-terminal part. During mitosis, TACCs regulate centrosome integrity, centrosome-dependent assembly of microtubules and spindle stability.[17-20] TACC3 is predominantly expressed during the G_2/M phase of the cell cycle where it localizes in an Aurora-A phosphorylation and clathrin heavy chain-dependent manner to centrosomes and mitotic spindles (**Fig. 1A**; reviewed in ref. 21–24). TACC3, but not the related isoform TACC2 which is rather found in postmitotic tissues, is required for efficient cell expansion and survival as indicated by its crucial and non-redundant role(s) during embryogenesis and stem cell function.[20,25]

TACC genes have been originally discovered in genomic regions that are amplified in cancer.[26,27] Mutations of TACC3 as well as altered expression of TACC1 or TACC3 have been subsequently linked to the etiology of breast, ovarian, bladder and non-small cell lung cancer.[28-31] Interestingly, in gliomas, the TACC3 gene, localized at 4p16, is amplified. This is accompanied by a grade-specific upregulation of TACC3 expression which is highest in grade IV gliomas (glioblastoma multiforme, GBM) which have a very poor prognosis.[32] Despite of these findings, the relevance of TACC3 for the pathogenesis of GBM or other cancer types needs to be substantiated and additional functional data are required to establish TACC3 as a "driver" in tumor development and hence as a potential therapeutic target.

Irrespective of the obvious connection between centrosomal aberrations, overproliferation and tumorigenesis, alterations in the mitotic machinery can also act as potent triggers for postmitotic cell cycle exit and permanent growth arrest. Interestingly, as we discuss below and summarize in **Table 1**, various recent reports link centrosome and kinetochore dysfunction to the induction of cellular senescence.

Cellular Senescence Causes and Characteristics

The phenomenon of cellular senescence was first described almost 50 years ago. Hayflick and Moorhead noted in their classical work that normal diploid fibroblasts exhibit in culture only a limited proliferative capacity and following a finite number of cell divisions undergo a state of cell cycle arrest, known as replicative senescence.[33] In human cells this intrinsic type of senescence is typically elicited by progressive erosion of telomeres.[34] Senescence represents a major cellular stress and self-defense response with tumor suppressor function. As such it is elicited by extrinsic factors, including strong mitogenic stimuli like oncogenic Ras(G12V) (referred to as oncogene-induced senescence), DNA damage, various cytotoxic drugs and oxidative stress.[35,36] These forms of senescence represent rapid antiproliferative reponses and are generally referred to as stress-induced premature senescence (SIPS).

Senescent cells exhibit characteristic features such as growth arrest, apoptosis resistance and altered gene expression.[36] The cells display several features which distinguish them from quiescent cells reversibly arrested in the G_1 phase of the cell cycle.[34,37] In particular, senescent cells adopt (i) morphological changes, i.e., they become larger and flattened and display an increased granularity, (ii) changes in

Table 1. Proteins of the mitotic spindle apparatus linked to premature senescence

Protein(s)	Localization & function	Mode of targeting function/ expression	Effector mechanisms & senescence markers	References
Aurora-A	mitotic kinase	small drugs, siRNA	p53, $p21^{WAF}$, pRb, SA-β-Gal	45, 48
TACC3	CT, MT dynamics	siRNA	p53, $p21^{WAF}$, pRb, SAHF, SA-β-Gal	44
PCM1	CT integrity	siRNA	P53, $p21^{WAF}$, pRb, SA-β-Gal	61, 62
Pericentrin	CT integrity	siRNA	p53, $p21^{WAF}$, pRb, SA-β-Gal	61, 62
$p31^{Comet}$	SAC	overexpression	p53, $p21^{WAF}$, SA-β-Gal, PAI-1	60
CENP-A	KT organisation	OIS, RS, siRNA	$p16^{INK4a}$, p53, $p21^{WAF}$, SAHF, SA-β-Gal	51
Bub1	KT/SAC	RS, siRNA	p53, $p21^{WAF}$	50
Bub3/Rae1	KT/SAC	haploinsufficiency (in vivo)	$p16^{INK4a}$, p53, $p21^{WAF}$, SA-β-Gal	53
BubR1	KT/SAC	hypomorphic alleles (in vivo)	$p16^{INK4a}$, p53, $p21^{WAF}$, SA-β-Gal	52
Mad2	KT/SAC	siRNA	p53, $p21^{WAF}$, SA-β-Gal, SASP	59

This table lists proteins of the mitotic spindle apparatus whose functional inhibition and/or the indicated changes in expression result in p53 activation and a cellular senescence response. Abbrevations: Bub, budding uninhibited by benzimidazoles; CENP, centromere protein; CT, centrosomal; Mad, mitotic arrest deficient; KT, kinetochore; MT, microtubule; OIS, oncogene induced senescence; PAI, plasminogen activator inhibitor; PCM, pericentriolar material; pRb, phosphorylated Retinoblastoma protein; RS, replicative senescence; SAC, spindle assembly checkpoint; SAHF, senescence associated heterochromatic foci; SASP, senescence associated secretory phenotype; TACC, transforming acidic coiled coil.

nuclear architecture characterized by the formation of senescence associated heterochromatic foci (SAHF) linked to the repression of proliferative genes and (iii) biochemical changes including an expansion of the lysosomal compartment with increased SA-β-galactosidase expression, lack of BrdU incorporation and DNA synthesis. Lastly, the cell cycle regulators p53, $p21^{WAF1}$ and $p16^{INK4a}$, as well as the mTOR (mammalian Target of Rapamycin) pathway play crucial roles in the induction and maintenance of the senescent phenotype.[34,38,39] In this regard, recent findings underline a new and key function of mTOR in determining the choice between senescence and quiescence upon p53-$p21^{WAF}$ mediated cell cycle arrest.[40,41]

Centrosomal and Kinetochore Proteins are Linked to Cellular Senescence via the Tumor Suppressor p53

Targeting TACC3 by gene inactivation in mice or RNA interference in cells causes centrosomal dysfunction and mitotic spindle stress with cellular consequences that are determined by the status of the postmitotic and p53-$p21^{WAF}$-controlled G_1 checkpoint.[25,42,43] Whereas checkpoint-compromised human cancer cells rapidly succumb to polyploidization and mitotic catastrophe,[19] checkpoint-proficient cells primarily activate a senescence program. This response is usually characterized by an increase in p53 and $p21^{WAF}$ levels, downregulation of phosphorylated and hence inactive retinoblastoma protein (pRb) preventing S phase entry, formation of SAHFs, and increased SA-β-Gal positivity (**Fig. 1**).[44] Interestingly, a similar premature senescence phenotype was observed in p53 proficient tumor cells when Aurora-A kinase, the upstream regulator of TACC3, was either pharmacologically inhibited or depleted.[45] These findings provide evidence that the centrosomal Aurora A-TACC3 axis (**Fig. 1**) affects the commitment of mitotic cells to cellular senescence. Given that p53 levels rise during prolonged mitosis ("mitotic clock function of p53"; reviewed in ref. 42), and that Aurora-A phosphorylates p53 at Ser315 thereby sensitizing p53 for degradation,[46] it is conceivable that elevated mitotic p53 levels per se link spindle stress to cellular senescence via transcriptional induction of $p21^{WAF}$ in G_1. In this model, Aurora-A plays an inhibitory role during normal cell division, as it keeps p53 levels below a critical threshold, whereas upon prolonged mitotic arrest Aurora-A independent mechanisms may intervene to increase p53 concentrations necessary for G_1 arrest. Possible candidates for those positive p53 regulators would be the ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and the cyclin-dependent kinase inhibitor $p19^{ARF}$ that both prevent p53 degradation by the ubiquitin ligase MDM2.[47,48] However, a deficiency of either ATM or $p19^{ARF}$ did not prevent embryonic lethality caused by TACC3 deficiency (Piekorz et al. unpublished results). Nevertheless, the lethality of TACC3 deficient embryos (being probably secondary to a growth arrest phenotype) could be partially rescued by genetically reducing p53 expression.[25] Moreover, Vogel et al. observed that increase of p53 levels during transient mitotic arrest occurs independently of ATM, ATR, Chk1 and Chk2.[49] Thus, during prolonged mitosis, p53 levels may simply accumulate due to the lack of Mdm2-mediated degradation, as Mdm2 levels are dependent on transcription which is absent in mitosis and only resumes in G_1.[42]

As summarized in **Table 1**, altered expression of various proteins required for centrosomal integrity, kinetochore organisation or mitotic checkpoint function has now been linked to p53 activation and premature senescence. For instance, silencing of the mitotic spindle checkpoint kinase Bub1 or the centromere-localized histone H3 variant CENP-A activates a stress response characterized by the appearance of typical senescence markers. Consistent with these findings, downregulation of Bub1 and CENP-A has been observed under conditions of oncogenic stress and during replicative senescence.[50,51] Lastly, mouse models with a genetic insufficiency for BubR1 or a haploinsufficiency for both Bub3 and Rae1 display progressive aneuploidy, premature

©2010 Landes Bioscience. Do not distribute

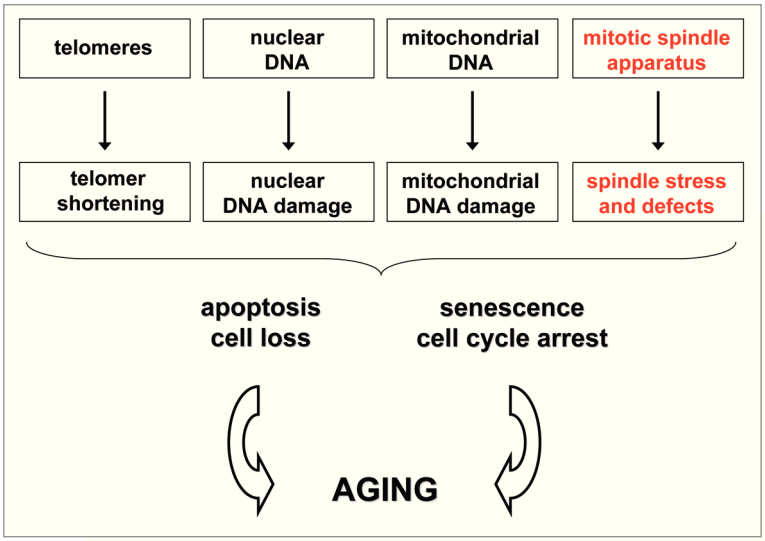


Figure 2. Cellular structures and macromolecules linked to senescence and aging. Degeneration of telomeres and nuclear or mitochondrial DNA damage are major causes for the induction of either apoptotic cell death or cellular senescence. Recent findings indicate that a functional impairment of the centrosome and mitotic spindle apparatus is as well sufficient to provoke a complete loss of proliferative capacity and induction of a cellular senescence program (Table 1). Thus, like telomeres, centrosomes and kinetochores may take over a crucial role in regulating commitment of mitotic cells to premature senescence.

©2010 Landes Bioscience. Do not distribute

senescence and pathological phenotypes typical for accelerated aging.[52,53] Taken together, these data uncovered a particular role of mitotic checkpoint proteins in the regulation of senescence and organismal aging.[54] However, it remains to be determined whether altered expression of the proteins summarized in **Table 1** regulates not only the onset of the postmitotic senescence response but also modulates its severity. Interestingly, whereas the proliferation arrest upon treatment with the Aurora-A kinase inhibitor MLN8054 was irreversible,[45] we observed indications for a reversible nature of the senescence phenotype caused by TACC3 depletion.[44]

Perspective□ Exogenous Noxae, Mitotic Spindle Stress and Aging

Genomic and mitochondrial DNAs are classical cellular targets for the detrimental and senescence inducing effects of various intrinsic and extrinsic noxae, including ROS, ionizing radiation and UV light (**Fig. 2**). In contrast to these cellular macromolecules, surprisingly little is known about DNA damage-independent molecular effects and protein targets of exogenous insults targeting the centrosome and spindle apparatus during mitosis. Mitotic dysfunction has a major impact on proliferative homeostasis and tissue regeneration, processes, which are progressively impaired during normal aging and characterized by the accumulation of senescent cells in proliferative tissues from aged primates.[55,56] Moreover, tetraploidy and polyploidy are biomarkers of aging, as for instance polyploid vascular smooth muscle cells with a senescent phenotype accumulate during aging.[57] Taken these observations into consideration it is conceivable that altered expression and/or functional inhibition of proteins of the mitotic spindle apparatus through the influence of intrinsic or extrinsic noxae contribute to aberrant mitosis and cytokinesis, tetraploidy and cellular senescence, and lastly dysfunction of major proliferative organs. Hence, the proteins listed in **Table 1** represent bona fide candidates for decisive stress sensors that may be redox sensitive and that are able to regulate the commitment of dividing cells to undergo premature senescence.

Acknowledgements

Work in the laboratory of R.P.P. is supported by the DFG, in particular by the SFB 728, the research commission of the medical faculty of the Heinrich-Heine-University, and the NRW Research School "BioStruct" (to H.C.T.).

References

1. Nigg EA. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. Int J Cancer 2006; 119:2717-23.
2. Khodjakov A, Rieder CL. The nature of cell cycle checkpoints: Facts and fallacies. J Biol 2009; 8:88.
3. Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. Centrosome control of the cell cycle. Trends Cell Biol 2005; 15:303-11.
4. Sluder G. Two-way traffic: Centrosomes and the cell cycle. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6:743-8.
5. Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer Verlag, Jena 1914.
6. Gergely F, Basto R. Multiple centrosomes: Together they stand, divided they fall. Genes Dev 2008; 22:2291-6.
7. Weaver BA, Silk AD, Montagna C, Verdier-Pinard P, Cleveland DW. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. Cancer Cell 2007; 11:25-36.
8. Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, Peel N, Franz A, Khodjakov A, et al. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. Cell 2008; 133:1032-42.
9. Castellanos E, Dominguez P, Gonzalez C. Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. Curr Biol 2008; 18:1209-14.
10. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers: Therapeutic implications. Trends Mol Med 2008; 14:450-60.
11. Zyss D, Gergely F. Centrosome function in cancer: guilty or innocent? Trends Cell Biol 2009; 19:334-46.
12. Gergely F. Centrosomal TACCtics. Bioessays 2002; 24:915-25.
13. Peset I, Vernos I. The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. Trends Cell Biol 2008; 18:379-88.
14. Gomez-Baldo L, Schmidt S, Maxwell CA, Bonifaci N, Gabaldon T, Vidalain PO, et al. TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division. Cell Cycle 2010; 9:1143-55.
15. Samereier M, Baumann O, Meyer I, Graf R. Analysis of Dictyostelium TACC reveals differential interactions with CP224 and unusual dynamics of Dictyostelium microtubules. Cell Mol Life Sci 2010; In press.
16. Still IH, Vettaikkorumakankauv AK, DiMatteo A, Liang P. Structure-function evolution of the transforming acidic coiled coil genes revealed by analysis of phylogenetically diverse organisms. BMC Evol Biol 2004; 4:16.
17. Cassimeris L, Morabito J. TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization and bipolar spindle assembly. Mol Biol Cell 2004; 15:1580-90.
18. Gergely F, Draviam VM, Raff JW. The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. Genes Dev 2003; 17:336-41.
19. Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W, et al. The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. J Biol Chem 2007; 282:29273-83.
20. Yao R, Natsume Y, Noda T. TACC3 is required for the proper mitosis of sclerotome mesenchymal cells during formation of the axial skeleton. Cancer Sci 2007; 98:555-62.
21. Hubner NC, Bird AW, Cox J, Splettstoesser B, Bandilla P, Poser I, et al. Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions. J Cell Biol 189:739-54.

22. Kinoshita K, Noetzel TL, Pelletier L, Mechtler K, Drechsel DN, Schwager A, et al. Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. J Cell Biol 2005; 170:1047-55.
23. LeRoy PJ, Hunter JJ, Hoar KM, Burke KE, Shinde V, Ruan J, et al. Localization of human TACC3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on Ser558 by Aurora A: a novel pharmacodynamic method for measuring Aurora A activity. Cancer Res 2007; 67:5362-70.
24. Lin CH, Hu CK, Shih HM. Clathrin heavy chain mediates TACC3 targeting to mitotic spindles to ensure spindle stability. J Cell Biol 189:1097-105.
25. Piekorz RP, Hoffmeyer A, Duntsch CD, McKay C, Nakajima H, Sexl V, et al. The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. EMBO J 2002; 21:653-64.
26. Still IH, Hamilton M, Vince P, Wolfman A, Cowell JK. Cloning of TACC1, an embryonically expressed, potentially transforming coiled coil containing gene, from the 8p11 breast cancer amplicon. Oncogene 1999; 18:4032-8.
27. Still IH, Vince P, Cowell JK. The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines. Genomics 1999; 58:165-70.
28. Cully M, Shiu J, Piekorz RP, Muller WJ, Done SJ, Mak TW. Transforming acidic coiled coil 1 promotes transformation and mammary tumorigenesis. Cancer Res 2005; 65:10363-70.
29. Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY. Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. Pathol Int 2006; 56:503-9.
30. Kiemeney LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G, et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. Nat Genet 2010; 42:415-9.
31. Lauffart B, Vaughan MM, Eddy R, Chervinsky D, DiCioccio RA, Black JD, et al. Aberrations of TACC1 and TACC3 are associated with ovarian cancer. BMC Womens Health 2005; 5:8.
32. Duncan CG, Killela PJ, Payne CA, Lampson B, Chen WC, et al. Integrated genomic analyses identify ERRFI1 and TACC3 as glioblastoma-targeted genes. Oncotarget 2010; 1:265-77.
33. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961; 25:585-621.
34. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8:729-40.
35. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37:961-76.
36. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. Nat Rev Cancer 2006; 6:472-6.
37. Chuaire-Noack L, et al. The dual role of senescence in tumorigenesis. Int J Morphol 2010; 28:37-50.
38. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle 2008; 7:3355-61.
39. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. Cell Cycle 2009; 8:1888-95.
40. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. Aging (Albany NY) 2:344-52.
41. Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. Proc Natl Acad Sci USA 107:9660-4.
42. Blagosklonny MV. Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint: how p53 measures the duration of mitosis. Cell Cycle 2006; 5:971-5.
43. Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Schulze-Osthoff K, et al. TACC3 depletion sensitizes to paclitaxel-induced cell death and overrides p21(WAF)-mediated cell cycle arrest. Oncogene 2008; 27:116-25.
44. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, et al. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. Oncogene 2010; DOI:10.1038/onc.2010.354.
45. Huck JJ, Zhang M, McDonald A, Bowman D, Hoar KM, Stringer B, et al. MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo. Mol Cancer Res 2010; 8:373-84.
46. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat Genet 2004; 36:55-62.
47. Dominguez-Brauer C, Brauer PM, Chen YJ, Pimkina J, Raychaudhuri P. Tumor suppression by ARF: Gatekeeper and caretaker. Cell Cycle 9:86-9.
48. Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, et al. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. Mol Biol Cell 2004; 15:3751-7.
49. Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Muller R, Bastians H. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. Oncogene 2004; 23:6845-53.
50. Gjoerup OV, Wu J, Chandler-Militello D, Williams GL, Zhao J, Schaffhausen B, et al. Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:8334-9.
51. Maehara K, Takahashi K, Saitoh S. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. Mol Cell Biol 2010; 30:2090-104.
52. Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. Nat Genet 2004; 36:744-9.
53. Baker DJ, Jeganathan KB, Malureanu L, Perez-Terzic C, Terzic A, van Deursen JM. Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. J Cell Biol 2006; 172:529-40.
54. Baker DJ, Chen J, van Deursen JM. The mitotic checkpoint in cancer and aging: What have mice taught us? Curr Opin Cell Biol 2005; 17:583-9.
55. Campisi J, Sedivy J. How does proliferative homeostasis change with age? What causes it and how does it contribute to aging? J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2009; 64:164-6.
56. Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. Mech Ageing Dev 2007; 128:36-44.
57. Yang D, McCrann DJ, Nguyen H, St. Hilaire C, DePinho RA, Jones MR, et al. Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence. Aging Cell 2007; 6:257-60.
58. Görgün G, Calabrese E, Hideshima T, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, et al. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell cycle arrest in multiple myeloma. Blood 2010; 115:5202-13.
59. Prencipe M, Fitzpatrick P, Gorman S, Tosetto M, Klinger R, Furlong F, et al. Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness in vitro. Br J Cancer 2009; 101:1900-8.
60. Yun M, Han YH, Yoon SH, Kim HY, Kim BY, Ju YJ, et al. p31^{comet} Induces cellular senescence through p21 accumulation and Mad2 disruption. Mol Cancer Res 2009; 7:371-82.
61. Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurcyzk A, Hergert P, Doxsey S. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G_1-S arrest. Nat Cell Biol 2007; 9:160-70.
62. Srsen V, Gnadt N, Dammermann A, Merdes A. Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. J Cell Biol 2006; 174:625-30.

Landes Bioscience
Do not distribute.

2.3 TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division

Gómez-Baldó L, Schmidt S, Maxwell CA, Bonifaci N, Gabaldón T, Vidalain PO, Senapedis W, Kletke A, Rosing M, Barnekow A, Rottape R, Capellá G, Vidal M, Astrinidis A*, Piekorz RP* and Pujana MA*.
Cell Cycle, 2010, Mar 18;9(6):1143-55.

Ziel dieses kollaborativen Projektes war die Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von TACC3, unter anderem vor dem Hintergrund, den in 2.1 beschriebenen zellulären Seneszenzphänotyp nach TACC3-Depletion auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Originalarbeit wurde ein „*Yeast-Two-Hybrid-Screen*“ mit der cDNS für humanes TACC3 durchgeführt und hierbei neue potentielle TACC3-Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert.

Im Rahmen dieser Interaktom-Analyse konnte zum einen die bekannte Bindung von TACC3 an die Mikrotubuli-Polymerase ch-TOG bestätigt werden, zum anderen wurden neue TACC3-Interaktionspartner, im Besonderen TSC2 und der Zytokineseregulator ARHGEF2, gefunden. Die Interaktion zwischen TACC3 und TSC2, einem zentralen Regulator des mTOR-Signalwegs, wurde durch biochemische und zellbiologische Analysen überprüft und bestätigt. Im Folgenden wurde als Schwerpunkt die Lokalisation und Interaktion beider Proteine während der Mitose und Zytokinese mittels konfokaler Laserraster-Mikroskopie charakterisiert. TACC3 und TSC2 interagierten hierbei direkt in Koimmunopräzipitations- und *Pulldown*-Studien synchronisierter mitotischer Zellen und zeigten interessanterweise während der Pro- und Metaphase eine auffällige und bisher unbekannte Kolokalisation an den Spindelpolen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TACC3-Depletion die beobachtete Lokalisation von TSC2 an den Spindelpolen, aber auch während der Zellteilung in der zytokinetischen Brücke deutlich vermindert. Diese Befunde lassen vermuten, dass TACC3 die mitotische Lokalisation von TSC2 und somit möglicherweise die Aktivität von mTORC1 und mTORC2 während der Mitose reguliert.

Phänotypisch zeigten TACC3- und TSC2-defiziente Fibroblasten ähnliche zytokinetische Defekte, was für eine regulatorische Rolle der TACC3-TSC2-Interaktion in der Zellteilung spricht. Denkbar wäre, dass hierbei die TACC3-TSC2-Interaktion die Aktivität der GTPase RhoA beeinflusst, da RhoA TSC2-mTORC2-abhängig die kontraktile Funktion des Aktin-Zytoskeletts an der Zytokinesebrücke reguliert. In diesem Zusammenhang wurde in der

Literatur gezeigt, dass der in dieser Arbeit gefundene TACC3-Interaktor ARHGEF2 ebenfalls und direkt über RhoA die Zytokinese kontrolliert.

Desweiteren könnte die Induktion der postmitotischen Seneszenzantwort über den TACC3-TSC2-Komplex beeinflusst werden, da für den TSC2-mTORC1-Signalweg kürzlich eine stimulierende Rolle in der Ausprägung von zellulärer Seneszenz beschrieben wurde. Der TACC3-TSC2-Komplex könnte somit die Funktion eines Sensors einnehmen, der sich nach TACC3-Depletion in einer verstärkten Aktivität von mTORC1 manifestieren würde. Dieses Arbeitsmodell dient derzeit als Basis weiterführender Untersuchungen.

Der Verfasser dieser Dissertation führte im Rahmen dieses Manuskripts die subzellulären Lokalisationsstudien mittels konfokaler Laserraster-Mikroskopie durch. Er war darüber hinaus maßgeblich an der Interpretation der Gesamtdaten der Interaktomanalyse und an der Entstehung des Manuskripts beteiligt.

Cell Cycle 9:6, 1143-1155; March 15, 2010; © 2010 Landes Bioscience

TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division

Laia Gómez-Baldó,[1,2] Stephan Schmidt,[3] Christopher A. Maxwell,[1,2,†] Núria Bonifaci,[2,4] Toni Gabaldón,[5] Pierre-Olivier Vidalain,[6] William Senapedis,[7,‡] Anja Kletke,[3] Mechthild Rosing,[8] Angelika Barnekow,[8] Robert Rottapel,[9] Gabriel Capellá,[1] Marc Vidal,[10] Aristotelis Astrinidis,[7,11,*] Roland P. Piekorz[3,*] and Miguel Angel Pujana[1,2,4,*]

[1]Translational Research Laboratory; and [4]Bioinformatics and Biostatistics Unit; Catalan Institute of Oncology; Bellvitge Institute for Biomedical Research; L'Hospitalet, Barcelona Spain; [2]Biomedical Research Centre Network for Epidemiology and Public Health; Spain; [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology II; Heinrich-Heine University; Düsseldorf, Germany; [5]Bioinformatics and Genomics Program; Center for Genomic Regulation; Barcelona Biomedical Research Park; Barcelona, Spain; [6]Laboratoire de Génomique Virale et Vaccination; Centre National de la Recherche Scientifique; Institut Pasteur, Paris France; [7]Department of Medical Oncology; Fox Chase Cancer Center; Philadelphia, PA USA; [8]Department of Experimental Tumorbiology; University of Muenster; Muenster, Germany; [9]Ontario Cancer Institute/Toronto Medical Discovery Tower; Toronto, Canada; [10]Center for Cancer Systems Biology (CCSB) and Department of Cancer Biology; Dana-Farber Cancer Institute; and Department of Genetics; Harvard Medical School; Boston, MA USA; [11]Department of Biochemistry and Molecular Biology; Drexel University College of Medicine; Philadelphia, PA USA

Present addresses: [†]Department of Pediatrics; Child and Family Research Institute; Vancouver, BC Canada; [‡]Department of Systems Biology; Harvard Medical School; Boston, MA USA

Key words: TSC, TACC3, centrosome, nuclear envelope, mitosis

Studies of the role of tuberous sclerosis complex (TSC) proteins (TSC1/TSC2) in pathology have focused mainly on their capacity to regulate translation and cell growth, but their relationship with alterations of cellular structures and the cell cycle is not yet fully understood. The transforming acidic coiled-coil (TACC) domain-containing proteins are central players in structures and processes connected to the centrosome. Here, TACC3 interactome mapping identified TSC2 and 15 other physical interactors, including the evolutionary conserved interactions with ch-TOG/CKAP5 and FAM161B. TACC3 and TSC2 co-localize and co-purify with components of the nuclear envelope, and their deficiency causes morphological alterations of this structure. During cell division, TACC3 is necessary for the proper localization of phospho-Ser939 TSC2 at spindle poles and cytokinetic bridges. Accordingly, abscission alterations and increased frequency of binucleated cells were observed in Tacc3- and Tsc2-deficient cells relative to controls. In regulating cell division, *TSC2* acts epistatically to *TACC3* and, in addition to canonical TSC/mTOR signaling and cytokinetic associations, converges to the early mitotic checkpoint mediated by CHFR, consistently with nuclear envelope associations. Our findings link TACC3 to novel structural and cell division functions of TSC2, which may provide additional explanations for the clinical and pathological manifestations of lymphangioleiomyomatosis (LAM) disease and TSC syndrome, including the greater clinical severity of *TSC2* mutations compared to *TSC1* mutations.

Introduction

The microtubule network has fundamental roles in cell structure and function and, as such, is commonly altered in pathology from neoplasia to neurological disorders.[1] Key in the organization of this network in animal cells is the centrosome, an organelle that provides support to and regulation of diverse biological processes, including the formation of mitotic spindles and cilia, and progression through cytokinesis.[2] In recent years, proteins with the conserved transforming acidic coiled-coil (TACC) domain have emerged as important players in centrosome biology, initially described in Drosophila as necessary for centrosome activity and microtubule assembly during cell division.[3,4] Knowledge of the role of TACCs in microtubule dynamics and centrosome biology comes predominantly from observations of a conserved protein interaction across species, or interolog,[5] with ch-TOG/CKAP5 and their regulation by aurora kinase A (AURKA) (reviewed in refs. 6–9). Studies in human cells and model organisms have revealed a key role of TACC3 in centrosome-dependent microtubule assembly, kinetochore attachment and chromosome alignment during mitosis.[10-14] In addition, a recent study[15] described a link between TACC3 and regulation of mitotic exit through the activator of the anaphase promoting complex/cyclosome, FZR1/CDH1, which further supports an important role in cell division.

Inactivating mutations in the tumor suppressor genes *TSC1* and *TSC2* cause TSC syndrome[16,17] and sporadic pulmonary LAM disease.[18,19] TSC is characterized by the presence of hamartomas, which consist of benign dysplastic and disorganized overgrowth within many organs and tissues.[20] TSC patients can also develop neurological abnormalities such as seizures, mental retardation and autism, in addition to renal cysts (reviewed in ref. 20). On

*Correspondence to: Miguel Angel Pujana; Email: mapujana@ico.scs.es; Aristotelis Astrinidis; Email: aristotelis.astreinidis@drexelmed.edu; Roland P Piekorz; Email: roland.piekorz@uniduesseldorf.de.
Submitted: 12/16/09; Accepted: 12/18/09
Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/11018

average, greater disease severity has been associated with *TSC2* mutations for multiple clinical features including neurological abnormalities and the development of renal cysts.[21,22] Therefore, possible specificities between *TSC1*/TSC1 and *TSC2*/TSC2 may provide a more detailed understanding of pathological manifestations of TSC and LAM.

Hamartin and tuberin, the respective products of *TSC1* and *TSC2*, form a heterodimer that inhibits the rapamycin-sensitive mammalian target of rapamycin (mTOR)/raptor complex (mTORC1).[23-28] mTORC1 positively regulates protein synthesis and cell growth by integrating mitogenic signals and nutrient availability via substrates including p70 S6 kinase (S6K/RPS6KB1/RPS6KB2) and 4E-BP1/EIF4EBP1.[29-33] TSC proteins have also been implicated in regulation of the cell cycle through the cyclin-dependent kinase inhibitor $p27^{Kip1}$/CDKN1B, possibly linked to the development of different types of neoplasms.[34-37] In addition, the TSC1-TSC2 complex activates the rapamycin-insensitive mTOR/rictor complex (mTORC2),[38] which regulates the actin cytoskeleton[39,40] and AKT phosphorylation.[41-44] Recently, a role for TSC proteins in the biology of centrosomes and basal body of cilia has been described through complementary approaches: TSC1 interacts with the mitotic regulator PLK1 in a phosphorylation-dependent manner and is necessary for proper maintenance of centrosome number;[45] and genetic and molecular interactions between the *TSC1*/TSC1-*TSC2*/TSC2 and *PKD1*/PKD1 (polycystin 1) are implicated in cilia formation.[46-48]

Here, TACC3 interactome mapping identified physical interactions with 16 different proteins, including TSC2 and additional regulators of cilia formation, CEP164,[49] and CP110.[50] In interphase, Tacc3 and Tsc2, but not Tsc1, co-localize and co-immunoprecipitate with components of the nuclear envelope and their deficiency causes alterations of this structure. During cell division, TACC3 is necessary for proper localization of phospho-Ser939 (pS939) TSC2 to the mitotic apparatus and cytokinetic structures. Consistently, aberrant cytokinetic abscission and increased frequency of binucleated cells were observed in Tacc3- and Tsc2-deficient cell cultures. Moreover, in agreement with critical gene/protein relationships at different phases of the cell cycle, *TSC2* acts epistatically to *TACC3* in regulating cell viability. According to their participation in the maintenance of the nuclear envelope structure, this genetic interaction inhibited the early mitotic checkpoint mediated by the checkpoint with forkhead and ring finger domains (CHFR) protein. Taken together, our results link *TACC3*/TACC3 to novel structural and cell division functions of *TSC2*/TSC2, which may provide complementary explanations for some of the clinical manifestations of TSC and LAM.

Results

A high-confidence TACC3 interactome network linked to centrosome biology. To investigate TACC3 function, we screened for physically interacting proteins using the yeast two-hybrid (Y2H) system. Sixteen different and mostly novel interactions were identified with the TACC domain as bait, including the TACC3 homodimer and TACC1 and TACC2 heterodimers through the C-terminal region of the corresponding proteins (**Fig. 1A** and Suppl. Material, **Fig. S1**). A range of molecular and functional evidence, including co-affinity purification (co-AP) and endogenous co-immunoprecipitation (co-IPs) assays, supports the high-confidence of this interactome. First, two interologs were identified: with ch-TOG/CKAP5, conserved interaction with TACC ortholog in *S. pombe*, *C. elegans* (TAC-1), *D. melanogaster* and *X. leavis*;[6] and with FAM161B, conserved interaction with TAC-1 (FAM161B putative ortholog: Y38H6C.14, hypothetical protein NP_507957).[51] In addition, KIF1C, another newly identified physical interactor of TACC3, has a homolog (KLP-1) at "two-hop" interactions of TAC-1 (**Fig. 1A**), which further suggests the identification of an evolutionary conserved TACC interaction module.

The fact that no additional interologs were detected—in particular relative to TAC-1, which essentially contains the TACC domain—may be due to technical limitations and/or evolutionary differences. Phylogenetic analysis indicated that human TACCs probably resulted from two consecutive duplications occurring after the divergence of vertebrates and uro-chordates, and that TACC1 and 2 originated from the most recent of these duplications and are, therefore, more evolutionarily related to each other than to TACC3 (Suppl. Material, **Fig. S2**).[52] This analysis also suggested accelerated evolution of TACCs among coiled-coil domain-containing proteins, which may further explain interactome differences across species (Suppl. Material, **Fig. S3**).

The similarity of gene expression profiles, measured with the Pearson correlation coefficient (PCC) across a large number of normal human samples,[53] for 7 of the 12 *TACC3*-Y2H prey gene pairs is further evidence of the high-confidence of the interactome (**Fig. 1A**; $|PCC|>0.30$, Bonferroni-corrected p values <0.05). The primary area of similarity was positive co-expression, which suggests synergistic roles in centrosome biology. Finally, analysis of Gene Ontology (GO) term annotations in the TACC3 interactome relative to all human coding genes identified significant over-representation of microtubule-associated biological processes (Suppl. Material, **Table S1**), which include important regulators of cilia formation (CEP164[49] and CP110[50]) and cytokinesis (ARHGEF2/GEF-H1,[54] LAPSER1/LZTS2[55] and TACC1[56]).

The TACC3 interactions identified in the Y2H system were further evaluated in complementary or independent biochemical assays. The interaction with IPORIN/RUSC2 was narrowed down to the RUN domain using a series of mutants in a different Y2H system and by co-AP, and the interactions with CP110 and KIF1C were corroborated by GST-TACC3 co-APs (Suppl. Material, **Fig. S4**). Additionally, co-IPs in HEK293 cell extracts identified complexes between TACC3 and ARHGEF2/GEF-H1, CGN, CP110 (Suppl. Material, **Fig. S5**) or TSC2 (**Fig. 1B**). ARHGEF2 and CGN were previously shown to interact physically,[57] which further supports the detection of true positive interactions for TACC3. The interaction between TACC3 and TSC2 was detected reciprocally using different subconfluent and unsynchronized cell cultures and specific antibodies in co-IP assays (**Fig. 1B** and subsequent sections): however, unlike endogenous levels of TSC2, TACC3-TSC2 complex formation is likely to be condition/location-dependent or transient. Protein

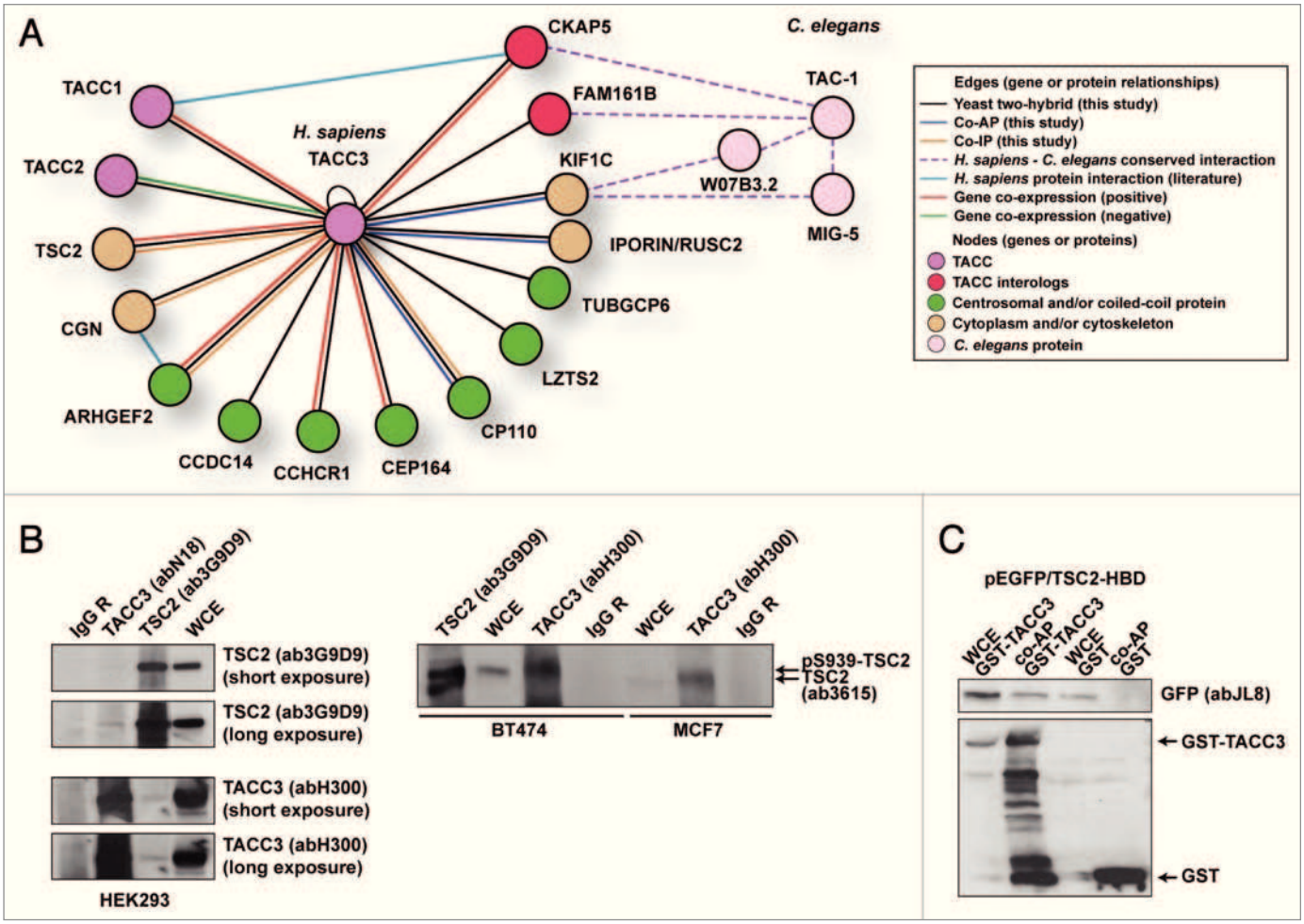


Figure 1. A high-confidence TACC3 interactome network. (A) Network containing transcript and protein associations as detailed in the inset (right). (B) Left, reciprocal co-IPs of TACC3 and TSC2 in HEK293 extracts. Right, shows results for a high-resolution western blot where TACC3 co-IP with pS939-TSC2—in addition to possibly unphosphorylated-TSC2 as compared to WCEs—can be resolved (detected with anti-pS939-TSC2 antibody) according to expected differences between BT474 and MCF7 cells. Whole-cell extract (WCE) and normal purified immunoglobulin negative control (IgG R; rabbit) are shown. The antibodies (ab) used for each experiment are shown in parentheses. (C) Co-AP of GST-TACC3 and pEGFP-TSC2-HBD in HEK293 extracts. Top, shows western blot results using an anti-GFP antibody directed against GFP-TSC2-HBD. Bottom, shows results of the same blot probed with anti-GST antibody. Results of WCEs and the co-AP assays are shown: arrows point to WCEs/co-APs GST-TACC3 and GST-only.

complexes of TACC3-TSC2 were identified in HEK293 and MCF7 extracts (**Fig. 1B**), and in cell cycle-synchronized HeLa extracts (subsequent sections). In addition, complexes of TACC3 and pS939-TSC2 were detected in BT474 extracts (**Fig. 1B**), which are known to contain abundant phosphorylated TSC2 as compared to MCF7.[58] To identify the TACC3-binding domain in TSC2, co-AP assays with predefined TSC2 fragments[59] suggested that the N-terminal region (amino acids (aa) 1–460) but not the rest of the protein (data not shown) mediates the interaction (**Fig. 1C**). This TSC2 fragment contains the TSC1-binding domain and a coiled-coil motif (TSC2 hamartin-binding domain; TSC2-HBD) and, in agreement with the TACC3 interactome, was shown to be involved in the regulation of the cytoskeleton and cell adhesion.[59,60] Together, these observations delineate a high-confidence TACC3 interactome network which includes TSC2 and is linked to centrosome biology.

TACC3-TSC2 localize to the nuclear envelope and their depletion causes morphological alterations of this structure. The identification of the tumor suppressor TSC2 as a novel TACC3 interactor supports its involvement in microtubule-dependent structures and processes.[59-61] An in vitro microtubule-binding assay using taxol and nocodazole for microtubule stabilization and depolymerization, respectively, and polo-like kinase 1 (PLK1) and α-tubulin (TUBA) as controls, showed that fractions of TSC2 and its heterodimeric partner TSC1 are associated with microtubules (**Fig. 2A**). This finding may be linked to previous work indicating a role of TSC2/mTOR in regulation of microtubule organization.[61] To further investigate the association of TSC2 with cellular structures, we examined its subcellular localization in HeLa cells and murine embryonic fibroblast (MEF) cultures derived from littermate embryos with the *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ genotype or from controls with the *Tsc2*$^{+/+}$/*Tp53*$^{-/-}$ genotype. These analyses suggested localization of TSC2/Tsc2 at

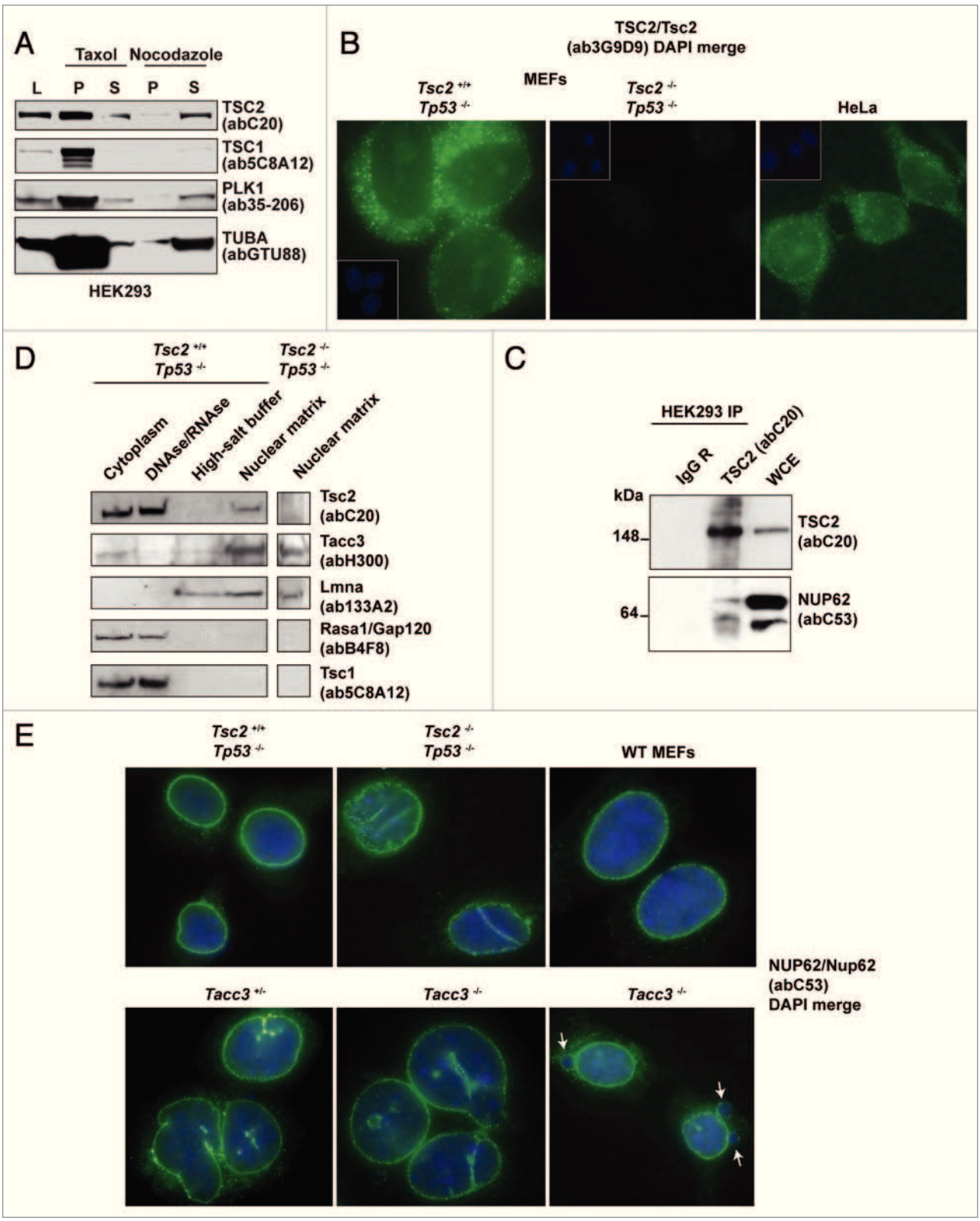


Figure 2. TACC3-TSC2 association with the nuclear envelope. (A) Microtubule binding assays of TSC2 and TSC1, and appropriate controls PLK1 and TUBA, in HEK293 cells. Sample load (L, 1/100 of input), pellets (P) and supernatants (S, 1/100 of input) are shown. (B) Subcellular immunolocalization of TSC2/Tsc2 in MEFs (*Tsc2*$^{+/+}$/*Tp53*$^{-/-}$ and *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$) and HeLa cells. (C) Co-IPs of TSC2 and NUP62 in HEK293 extracts. (D) Co-purification of Lmna, Tacc3 and Tsc2 in *Tsc2*$^{+/+}$/*Tp53*$^{-/-}$ compared to *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ MEFs. Fractionation and western blot analyses are shown for the cytoplasm, DNAse/RNAse-treated nuclear preparations, high-salt extraction buffer nuclear preparations and the remaining pellet, which mainly represents the nuclear matrix. Controls for the purity of the cytoplasmatic (Rasa1/Gap120) and nuclear matrix (Lmna) fractions are shown. (E) Abnormal nuclear envelope structures in *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$, and *Tacc3*$^{+/-}$ and *Tacc3*$^{-/-}$ cells, revealed by Nup62 immunofluorescence. Bottom right, shows micronuclei figures (arrows) in *Tacc3*$^{-/-}$ cells.

the nuclear envelope in interphase cells (**Fig. 2B**). In support of this hypothesis, TSC2 co-IPs with the nuclear pore subunit NUP62 (**Fig. 2C**), which in turn interacts physically with centrosome- and nuclear envelope-associated proteins.[62] In addition, TACC3 was also found to localize at the nuclear envelope (Suppl. Material, **Fig. S6**) and, importantly, TAC-1 was previously found to interact physically with components of the nuclear pore (NPP-1) and lamina (LMN-1).[63] Moreover, using subcellular fractionation, Tsc2 and Tacc3, but not Tsc1, co-purified with the major structural component of the inner nuclear membrane, lamin A (Lmna) (**Fig. 2D**).

Perturbation of centrosome and/or nuclear envelope proteins may cause morphological alterations of the envelope structure.[64-66] In addition, taxol treatment of cell cultures causes dramatic unraveling of the nuclear lamina and disorganization of nuclear pore structures.[67] Consistent with their localization, morphological alterations of the envelope in Tacc3- and Tsc2- but not Tsc1-deficient MEFs were detected using Nup62 immunostaining (**Fig. 2E** shows representative fluorescence microscopy images of Tacc3- and Tsc2-deficient MEFs and controls). Tacc3-deficient MEFs also showed micronuclei figures at a frequency of 4.6 ± 1.5%, which were barely observed in wildtype (WT) MEFs similarly immortalized (0.3 ± 0.5%; these results correspond to a typical experiment of four replicates with >200 cells counted each) (**Fig. 2E**). However, micronuclei figures were not observed in Tsc2- and Tsc1-deficient MEFs (data not shown). Taken together, these results suggest a specific role of TSC2 in maintaining proper nuclear envelope structure, possibly involving TACC3.

pS939-TSC2 localizes to spindle poles and cytokinetic structures in a TACC3-dependent manner. Given the physical interaction between TACC3 and TSC2, and the key role of TACC3 in regulation of cell division,[10-14] we next analyzed the subcellular localization of TACC3 and TSC2 (total and pS939) during mitosis by confocal laser scanning microscopy in four cell lines (BT474, HeLa, MCF7 and MCF10A). In metaphase, TACC3 and total-TSC2 localized at the spindle microtubules and poles, while pS939-TSC2 was specifically detected at the poles (**Fig. 3A** and Suppl. Material, **Fig. S7**). In telophase and cytokinesis, both total- and pS939-TSC2 were particularly strong at the cleavage furrow, while TACC3 localized in the pericentrosomal region and at the remaining polar spindle microtubules in the midbody (**Fig. 3B**). Given the observed interaction through TSC2-HBD (**Fig. 1C**), these observations suggest dynamic associations between TACC3, TSC1 and TSC2. Accordingly, using HeLa cultures synchronized by a double-thymidine block and PLK1 as mitotic marker, TACC3-TSC2 complexes were mostly evident through mitosis (4–10 hours (h) after release), while TSC1-TSC2 complexes appeared more strongly in S-G_2/M (2 and 4 h after release) (**Fig. 3C**). Taken together, these data are consistent with co-IP results in unsynchronized cell cultures (**Fig. 1B**) and suggest a role for TACC3-TSC2 in regulation of cell division.

Having established a dynamic association between TACC3 and TSC2, we next evaluated the dependence on TACC3 for TSC2 localization during cell division. A doxycycline (DOX)-regulated shRNA system allowing almost complete depletion of TACC3 in HeLa cells was used.[13] Depletion of TACC3 in HeLa cells correlated with loss of reactivity of pS939-TSC2 at spindle poles and intercellular bridges during cytokinesis (**Fig. 4A**). Phosphorylated mTOR has been previously described to localize to mitotic and cytokinetic structures.[68,69] However, in contrast to pS939-TSC2, we did not observe alterations of pS2448-mTOR in TACC3-depleted HeLa cells (Suppl. Material, **Fig. S8**), which further supports a specific function of TSC2 in relation to TACC3 during cell division.

Tacc3 or Tsc2 deficiency results in cytokinetic delay and formation of binucleated cells. Consistent with loss of pS939-TSC2 localization to cytokinetic structures in TACC3-depleted cells, abnormally elongated abscission was a common phenotype observed in unsynchronized Tacc3- and Tsc2-deficient MEFs detected using aurora kinase B (Aurkb) immunostaining (**Fig. 4B**). In addition, higher percentages of binucleated cells were observed in Tacc3-deficient and Tsc2-deficient MEFs relative to wildtype counterparts (*Tacc3*$^{-/-}$ 6.5 ± 1.8%; *Tacc3*$^{+/-}$ 5.8 ± 3.4%; WT, immortalized MEFs 2.1 ± 1.6%; and, *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ 7.8 ± 1.7%; *Tsc2*$^{+/+}$/*Tp53*$^{-/-}$ 3.3 ± 1.7%; these percentages illustrate the results of a typical experiment of three replicates with >400 cells counted each). These results suggest a role for TACC3 and TSC2 in regulating cytokinesis, and are consistent with previously reported tetraploidization of Eker rat-derived cell cultures with a germline *Tsc2* mutation.[70]

Next, Eker rat leiomyoma tumor cells (ELT3) were used to evaluate the effects of Tsc2-defiency on cell division in synchronized cultures. Tsc2-deficient ELT3 cells exhibited significant delay in completion of cytokinesis relative to human TSC2 (hTSC2)-reconstituted cells (**Fig. 4C** shows a typical experiment with total >500 cells counted at each time-point; two-tailed t-test at 90 minutes (min) p = 0.005; and Suppl. Material, **Fig. S9**). Surprisingly, slower completion of cytokinesis after nocodazole release was also observed in Tsc1-deficient compared to human TSC1 (hTSC1)-reconstituted MEFs (Suppl. Material, **Fig. S10**) and, consistently, Tsc1-deficient cells also showed increased incidence of binucleated cells after nocodazole release relative to wildtype cells (Suppl. Material, **Fig. S11**). However, aberrant cytokinetic figures (i.e., elongated abscission) were not observed at an increased frequency in Tsc1-deficient cells (Suppl. Material, **Fig. S11**), which suggest complementary but not fully redundant functions of TSC1 and TSC2 in cell division, with TACC3-mediated localization of pS939-TSC2 at cytokinetic structures.

If they are biologically relevant in vivo, the cytokinetic abnormalities observed in ELT3 cell cultures should correlate with detectable alterations of gene expression in epithelial tissues of Eker rats compared to controls. To test this hypothesis, we evaluated association of cell cycle-related gene sets (i.e., sets for G_1/S, S, G_2, G_2/M and M/G_1 phases[71]) in a genome-wide expression dataset of Eker rat kidneys and controls[72] using the non-parametric approach in the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) tool.[73] This analysis revealed that Eker rat kidneys, compared to normal rat kidneys, had higher expression of genes involved in cytokinesis and mitotic exit (M/G_1 set, p = 0.04, **Fig. 4D**); however, other cell cycle-related gene sets were not different (p > 0.20). This

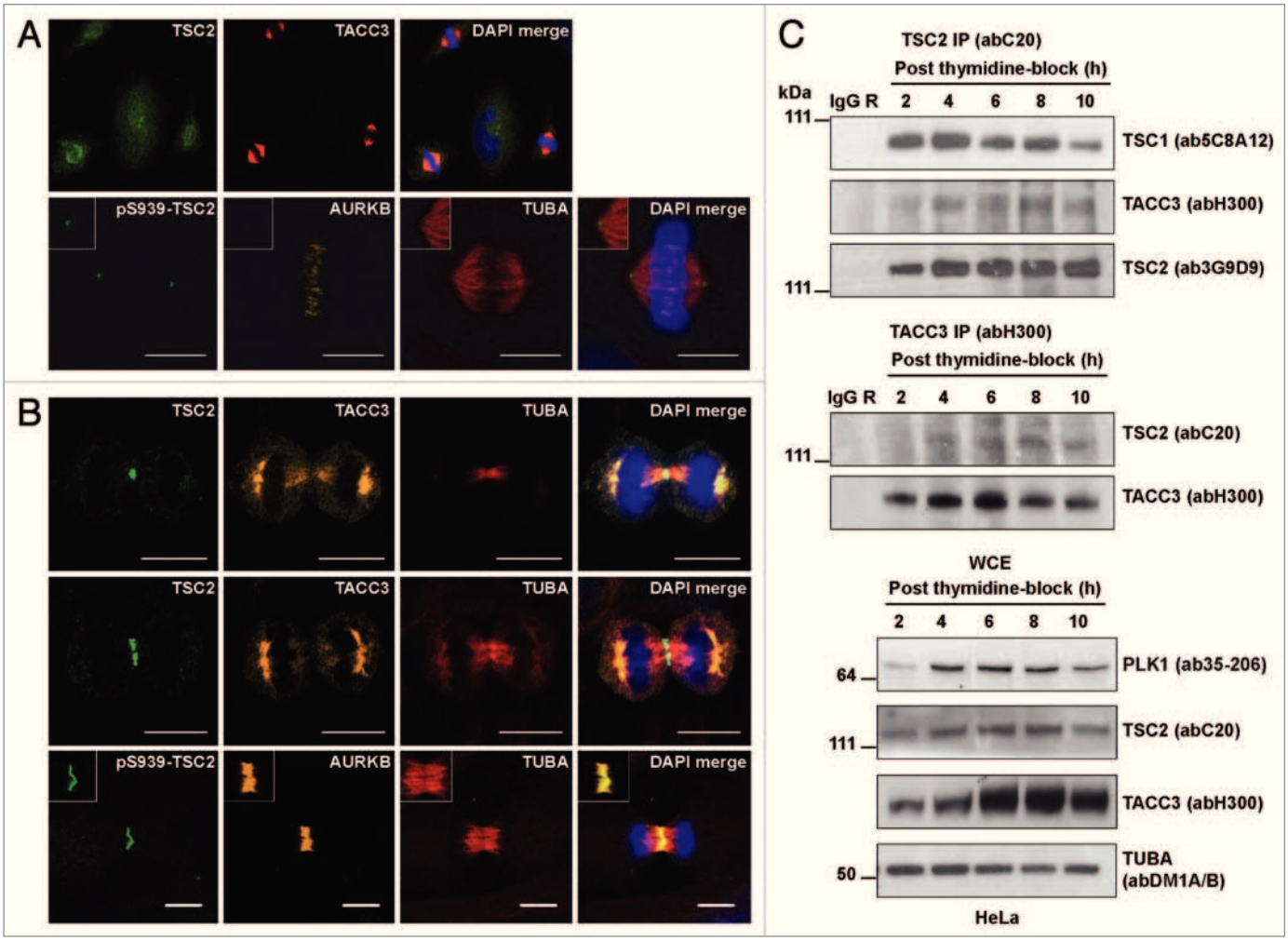


Figure 3. Subcellular localization of TACC3 and TSC2 during mitosis and cytokinesis. (A) Localization of TACC3 and TSC2 at mitotic spindle microtubules and poles, and of pS939-TSC2 at spindle poles. Depicted are representative fluorescence (top) or confocal laser scanning (bottom, scale bars 10 μm) microscopy images. Nucleic acids were stained with DAPI and microtubules with an anti-TUBA antibody. (B) Localization of TACC3 at pericentrosomal areas and at the remaining spindle microtubules in the midbody during cytokinesis, and of TSC2 and pS939-TSC2 at the cleavage furrow. Control staining using antibodies against AURKB and TUBA is shown. Depicted are representative confocal laser scanning microscopy images (scale bars 10 μm). (C) Cell cycle synchronization and co-IP assays in HeLa cultures using a double-thymidine block protocol. Results are shown for TSC2 and TACC3 co-IPs, including IgG controls, and for protein levels across the corresponding WCEs (PLK1 as mitotic marker). Time points (hours, h) post-thymidine block release are indicated.

observation further supports the critical role of TSC2/Tsc2 in cytokinesis and suggests relevant consequences in pathology.

***TSC2* acts epistatically to *TACC3* in the control of cell viability.** To decipher the underlying TACC3-TSC2 relationship in control of cell division, we examined the existence of genetic interactions. Lentiviral shRNA constructs were transduced into MCF7 cells, and the effects of single gene depletions were compared to those of simultaneous depletion of TACC3 and TSC2 in a cell viability assay (time course of viable cells measured using a methylthiazol tetrazolium (MTT) assay). Depletion of TSC2 significantly increased viability relative to the pLKO.1 control, whereas loss of TACC3 had the opposite effect (**Fig. 5A**, the graph shows the typical results of three independent experiments in MCF7 cultures; ANCOVA Bonferroni-corrected p values <0.005). Interestingly, simultaneous depletion of TSC2 and TACC3 rescued the reduced viability observed in the TACC3-depleted cells to a level similar to that observed in the presence of TSC2 depletion only (Bonferroni-corrected p = 0.09). Taken together, these data suggest that *TSC2* acts epistatically to *TACC3* in regulation of cell viability.

Sensing the integrity of the microtubule network and the nuclear envelope structure contributes to an early mitotic checkpoint mediated by CHFR,[74,75] which is a regulator of AURKA.[76] In keeping with a putative role of TACC3 and TSC2 in microtubule dynamics and nuclear envelope structure (**Fig. 2**), levels of CHFR and cyclin B1 (CCNB1) were higher in MCF7 cells after shRNA-mediated depletion of either TSC2 or TACC3 (**Fig. 5B**). Accumulation of CCNB1 is consistent with previous observations of cell cycle-dependent regulation and depletion studies of TACC3 expression.[13-15] However, simultaneous depletion of

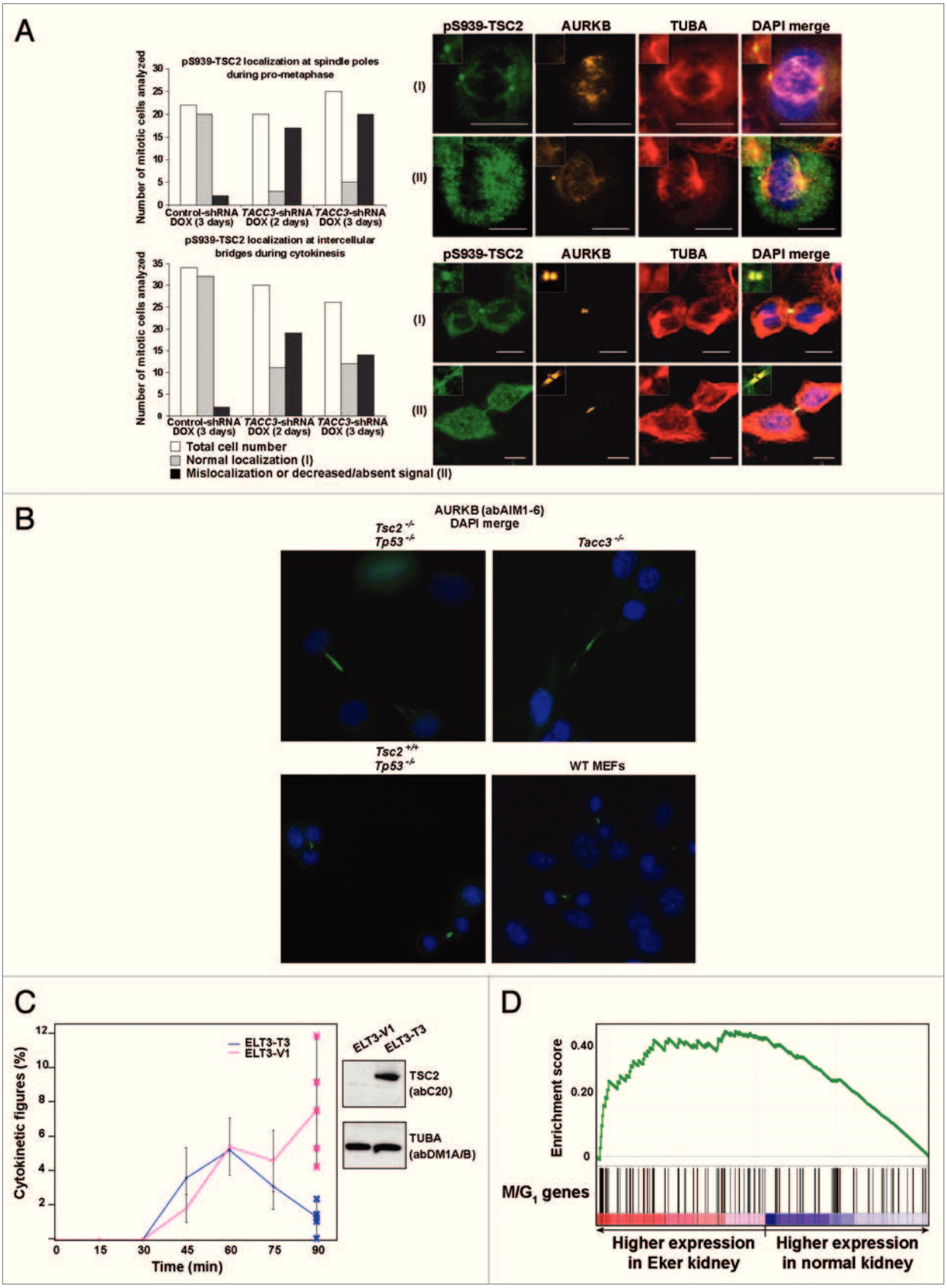


Figure 4. For figure legend, see page 1150.

Figure 4. *TACC3*/TACC3-dependent subcellular localization of pS939-TSC2 during cell division and abnormal cytokinesis in Tacc3- and Tsc2-deficient cultures. (A) Loss of pS939-TSC2 reactivity and/or localization in TACC3-depleted HeLa cells at days 2 and 3 of DOX-induced shRNA expression. Graphs show absolute numbers of cell counts as indicated and representative images of TACC3-depleted HeLa cells are shown in right. Scale bars represent 10 µm. (B) Aberrant (elongated) abscission in *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ and *Tacc3*$^{-/-}$ cells compared to wild-type counterparts as indicated by staining for the passenger protein Aurkb. (C) Evaluation of cytokinesis progression in ELT3-V1 (Tsc2-deficient, vector control) relative to ELT3-T3 (hTSC2-reconstituted) cells using a nocodazole synchronization protocol. Left, graphical representation of the percentages of cytokinetic figures in cells after nocodazole release over time (min). Results are shown for a typical experiment of three independent replicas. Curves include the mean and standard deviation calculated from five independent microscopy fields with counting each >100 cells at each time point. Percentages of cytokinetic cells at 90 min after nocodazole release are shown with colored crosses as indicated for each cell line. Right, confirmation of the TSC2/Tsc2 status of ELT3 cells before and after hTSC2 reconstitution. (D) Association of M/G_1 genes (i.e., genes with cell cycle periodic expression and a peak at M/G_1 phase[71]) with Eker status. The GSEA output is shown including the enrichment score and M/G_1 gene positions (vertical black lines) in the whole-genome-ordered gene list according to the signal-to-noise expression ratio between kidneys isolated from Eker and control rats.

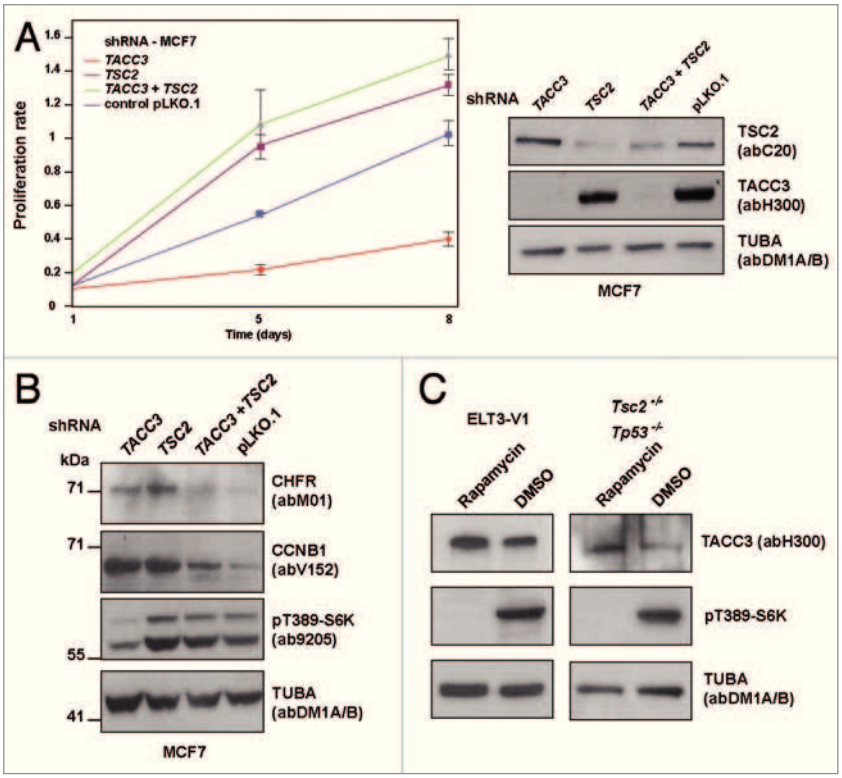


Figure 5. *TSC2-TACC3* epistatic relationship, convergence to the early mitotic checkpoint mediated by CHFR, and TSC/mTOR-mediated regulation. (A) Results of a typical cell viability assay in MCF7 cells depleted of TACC3, TSC2 or TACC3 and TSC2 simultaneously, or transduced with a pLKO.1-based scrambled control construct. The graph shows the relative proliferation rate (number of viable cells measured using MTT conversion) over one, five and eight days after transduction with the corresponding lentiviral construct(s). Bottom, western blot analysis of depleted proteins in WCEs. (B) Analysis of early mitosis checkpoint activation by accumulation of CHFR and CCNB1 in MCF7 cultures depleted of TACC3 or TSC2 versus TACC3 and TSC2 simultaneously, or pLKO.1 control transduced cells. Evaluation of the pT389-S6K (p70/p85) in these conditions is shown. (C) Effect of rapamycin treatment (20 nM, 14 h) on Tacc3 levels in Tsc2-deficient cell lines. Tsc2-deficient ELT3 leiomyoma extracts (ELT3-V1, left) and *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ MEF extracts (right) are shown.

TSC2 and TACC3 did not cause an accumulation of CHFR or CCNB1 (**Fig. 5B**), which is consistent with an epistatic relationship (**Fig. 5A**).

Accumulation of CHFR/CCNB1 and activation of the early mitotic checkpoint in TSC2-depleted cells may be compatible with increased proliferation due to the concomitant increase in mTOR signaling and translation. While TSC2 depletion resulted in an increase in phosphorylation of ribosomal protein S6 kinase (pT389-S6K), as expected, TACC3-depleted cells showed lower levels of this marker (**Fig. 5B**). Consistent with an epistatic relationship, simultaneous depletion of both proteins resulted in increased pT389-S6K (**Fig. 5B**). To determine whether aberrant mTOR signaling in Tsc2-deficient cells leads to perturbation of Tacc3 expression, protein levels were assayed in rapamycin-treated Tsc2-deficient MEFs and ELT3 cells and compared to DMSO-treated controls. These assays revealed that inhibition of mTOR signaling significantly inclreases Tacc3 levels (**Fig. 5C**). Together, these observations support the convergence of *TACC3*/TACC3 and *TSC2*/TSC2 in nuclear envelope structure integrity and cell division control through genetic and molecular interactions.

Discussion

In this study, we describe the participation of *TSC2*/TSC2 in maintaining proper nuclear envelope structure and controlling different phases of cell division possibly through genetic and molecular interactions with *TACC3*/TACC3. Three important, interconnected insights can be derived from our results. First, while the novel TACC3 physical interactions are consistent with known molecular and functional associations of TACCs across species,[6] they also provide novel mechanistic hypotheses on the role of TACCs in microtubule-network organization and centrosome or basal body biology. Since TACCs are deregulated in many epithelial neoplasias,[8] TACC3 may be involved in cell migration and differentiation through its interaction with ARHGEF2 (also known as GEF-H1/Lfc) and CGN, both corroborated by co-IP assays. ARHGEF2 is a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and CGN is a cell-to-cell tight junction adaptor.[77,78] CGN binding to ARHGEF2 inhibits RhoA activation, promoting polarized epithelial formation.[57] The role of TACCs in this process is unknown but TSC1/TSC2 has been shown to regulate Rho GTPases.[59,60,79] This function of TSC proteins may explain

the metastatic phenotype of benign smooth muscle-like cells in lymphangiomyomatosis (LAM) caused by *TSC2* mutations (reviewed in ref. 80). Binding of TSC2 to TSC1 causes activation of RAC1 and, consequently, inhibition of RhoA activity.[59] Since TACC3 might interact with TSC2 through the TSC2-HBD domain, it could have a role in promoting cytoskeletal remodeling and the metastatic LAM phenotype. Alternatively, RhoA and the actin cytoskeleton can be potentially regulated by the TACC3-TSC2-mTORC2 axis.[39,40] Similar regulation may also occur during cell division. ARHGEF2, once it has been released from its phospho-dependent inhibition by AURKA, activates RhoA to promote cytokinesis.[54] ARHGEF2 and TSC2 may then compete for TACC3 binding in a similar manner to the transition from epithelial proliferation to differentiation. The role of TACC3 in these processes may be common or converge on other TACCs, as our data suggest heterodimer formations.

Closely related to the process mediating epithelial polarity, the TACC3 interactome may also provide additional hypotheses on the development of renal cysts in TSC patients. Renal cysts appear more frequently in patients with *TSC2* mutations.[21,22] Tsc1 and Tsc2-deficent MEFs show enhanced primary cilium development, and the corresponding genes interact with *Pkd1* in this process.[46,47] As corroborated by co-AP and co-IP assays, the physical interaction of TACC3 with key players in primary cilium development, where CEP164 is a promoter[49] and CP110 a suppressor,[50,81] suggests that TSC2 function in this process can be mediated through regulation of these interactions. Similarly to processes of epithelial polarity and mitotic exit, inactivation of AURKA, the master regulator of TACCs, is necessary for cilium formation,[82] which in turn might be coordinated with regulation of the novel TACC3 interactions with TSC2 and CEP164/CP110.

The second insight that can be derived from this study is the novel role of *TSC2*/TSC2 in the maintenance of the nuclear envelope structure and the early mitotic checkpoint mediated by CHFR. Our results suggest that the regulation of nuclear envelope structure is specific to *TSC2*/TSC2 relative to *TSC1*/TSC1, which may provide additional explanations for the increased clinical severity associated with *TSC2* mutations.[21,22] Alterations of this structure are commonly associated with human genetic diseases with muscular-related anomalies and, in some cases, accompanied by neurological abnormalities (reviewed in ref. 83). In addition, TACCs are critical in interkinetic nuclear migration in neuronal progenitors: concomitant to altered microtubule organization, perturbation of TACCs affects nuclear position and mode of division.[84] These observations may be linked to the putative neuronal migration defect in TSC disease.[85,86] Interestingly, Tsc1 and Tsc2 have recently been shown to regulate axon formation and growth through the key polarity protein SAD kinase,[87] which also regulates cell cycle checkpoints.[88] The question of whether SAD integrates TACC3 with TSC1/TSC2 in neuronal and/or epithelial differentiation, in addition to regulating CHFR function, may appear as a fundamental issue in the study of TSC pathology.

Finally, the genetic interaction at the early mitotic checkpoint and the molecular and localization-dependent associations observed in cytokinesis suggest a global control of cell division events by *TACC3*/TACC3-*TSC2*/TSC2. Our data suggest that when cell division begins, CHFR senses the structure of the nuclear envelope and probably that of the microtubule network[74,75] through a mechanism involving TACC3 and TSC2. Next, TACC3 regulates pS939-TSC2 localization, possibly linked to the cytokinetic abnormalities observed in Tacc3- and Tsc2-deficient MEFs. Our study also suggests that TSC1 may have a complementary role in cytokinesis, although this might be independent of TACC3, as indicated by the implication of the phosphorylated TSC2 form commonly believed to be "inactive" (pS939). Our results showing increased frequency of binucleated cells are consistent with a previous study in which tetraploidization was observed in smooth muscle cells derived from Eker rats with a *Tsc2* germline mutation[70] and with altered M/G_1 genes expression in the Eker kidney. Together, this study provides evidence of novel interactions and functions for *TACC3*/TACC3 and *TSC2*/TSC2 possibly linked to centrosome biology and TSC/LAM pathology.

Materials and Methods

Y2H screens. Y2H screens were performed following two different strategies, transformation and mating,[89] and using two different cDNA libraries, of human fetal brain and spleen (ProQuest, Invitrogen). Three TACC3 baits were defined according to protein domains,[3,52,90] with the C-term region spanning amino acids aa 629–838. The Gateway system (Invitrogen) was used for cloning and, subsequently, baits were fully sequenced so that they did not show changes relative to publicly available sequence information. Products were transferred to the pPC97 yeast expression vector (Invitrogen) and then transformed in MaV203 (Invitrogen) or AH109 (Clontech) yeast strains for screens using selective medium lacking histidine and supplemented with 10 mM (mating protocol) or 20 mM (transformation protocol) 3-amino-triazole (3-AT, Sigma-Aldrich) to test the interaction-dependent transactivation of the HIS3 reporter. Previously, baits were examined for self-activation at 3-AT range concentrations in the range 10–80 mM. Together, using these conditions, more than 10 million transformants were screened for each bait. Positive colonies were grown in selective medium for three cycles (10–15 days) to avoid unspecific cDNA contaminants, prior to PCR amplification and sequence identification of preys.[91] To map the IPORIN/RUSC2 interaction domain,[92] the TACC3 C-term was transferred to the pAS2-1 vector to test the interaction-dependent transactivation of the lacZ reporter.

Microarray data analysis. The similarity of expression profiles was evaluated by computing PCCs using normalized (gcRMA) expression levels from the GeneAtlas U133A human dataset.[53] Comparisons were made for all possible microarray probe pairs and p values adjusted for multiple testing using the Bonferroni approach. Enrichment in GO term annotations was computed using the Onto-Express tool[93] with all coding human genes as reference. The GSEA[73] was run using the Gene Expression Omnibus reference GSE5923,[72] with default values for all the parameters except for the median probe instead of the max probe as the collapse method when multiple probe sets map to the same gene.

Phylogenetic analyses. PSI-BLAST searches[94] were performed against proteins encoded in genomes deposited in Ensembl as of January 2008, using human TACC proteins. Parameters were set to a maximum of five iterations and an e-value threshold of 10^{-4}. The phylogenetic pipeline used here is adapted from Huertas-Cepas et al.[95] Alignments of homologous sets of proteins were performed with MUSCLE 3.6,[96] and trimmed to remove columns with gaps in more than 10% of the sequences, unless the procedure removed more than one third of the positions in the alignment. In such cases the permissible percentage of sequences with gaps was increased automatically until at least two thirds of the initial columns were conserved. Phylogenetic trees were reconstructed using Maximum Likelihood (ML) as implemented in PhyML v2.4.4.[97] We used a discrete gamma-distribution model with four rate categories, in which invariant sites and the gamma shape parameter were estimated from the data. Four different evolutionary models were used (JTT, Dayhoff, VT and BLOSUM62) and the one best fitting the data according to the AIC criterion was selected.[98]

Cell culture. Spontaneously immortalized *Tsc2*$^{+/+}$/*Tp53*$^{-/-}$ and *Tsc2*$^{-/-}$/*Tp53*$^{-/-}$ MEFs were cultured in DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 100 μM non-essential aa, and using culture plates pre-treated with collagen R2 dissolved at 2 mg/ml in 0.1% acetic acid. Tsc2-deficient ELT3 cells derived from a uterine leiomyoma of Eker rats,[99] were cultured in DMEM-F12 supplemented with 15% FBS, 2 mM L-glutamine and 2 mM sodium pyruvate. hTSC2-reconstituted ELT3 and hTSC1-reconstituted *Tsc1*$^{-/-}$ cells were cultured as described previously.[45,60] Where indicated, cells were arrested in G_2/M using 5 ng/ml nocodazole or vehicle control (DMSO, Sigma-Aldrich) for 12–24 h.

Co-AP and co-IP assays. TACC3 C-term ORF was transferred into an N-terminal GST-tagged Gateway-compatible vector pDEST-27 (Invitrogen). For co-AP assays, plasmids (1.5 μg) were transfected into HEK293 cells in six-well format using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Next, cells were cultured for 48 h and lysates prepared in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals). Lysates were clarified twice by centrifugation at 13,000 xg before purification of protein complexes using glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) for one hour at 4°C. BHK cells were lysed in PD buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.2% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals). Purified complexes and control lysate samples were resolved in Tris-glycine-SDS PAGE gels, transferred to Invitrolon PVDF membranes (Invitrogen) or Immobilon PVDF (Millipore), and target proteins were identified by detection of HRP-labeled antibody complexes with chemiluminescence using ECL or ECL-Plus western blotting Detection Kit (GE Healthcare) following standard protocols. For co-IP assays, cells were harvested at subconfluent density, washed twice with PBS and lysed in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) and, in some assays, supplementary phosphatase (10 mM NaF) or proteasome (MG132, Sigma-Aldrich) inhibitors. Cells were incubated in lysis buffer for 15 min at 4°C and clarified twice by centrifugation at 13,000 xg for 20 min. Protein concentrations in the clarified lysates were determined by the Bradford BioRad Protein Assay. Preclearing was carried out for one hour at 4°C with Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Immunoprecipitations using 2.5–5 μg of antibodies were performed at 4°C overnight. Samples were then incubated for one hour at 4°C with Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), washed three times with lysis buffer and denatured prior to gel analysis.

Microtubule binding assay. Microtubule binding assays were performed as described previously.[100] Briefly, HEK293 cells were collected by trypsinization and homogenized in PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM $Mg(CH_3COO)_2$ pH 6.8) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich). The homogenate was then clarified by centrifugation at 14,000 xg for 30 min, GTP was added to a final concentration of 1 mM, and taxol or nocodazole was added to a final concentration of 20 μM and 100 μM, respectively. Next, homogenates were incubated for 30 min at room temperature with rotation, layered onto an equal volume of 15% sucrose cushion in PHEM buffer and centrifuged at 14,000 xg for 15 min. The supernatants and cushions were aspirated, the pellets were washed once in PHEM buffer and denatured prior to gel analysis.

Immunofluorescence microscopy. Cells were grown on glass cover slips and fixed with ice-cold methanol for 10 min followed by three washes in PBS. Permeabilization and blocking was performed in 1x PBS, 4% FBS and 0.02% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Staining was performed overnight at 4°C in these conditions using appropriate primary antibody dilutions. Next, samples were washed three times with 0.02% Tween 20 in PBS, incubated for 30 min at room temperature with Alexa fluor-conjugated secondary antibodies (Invitrogen), washed three times with 0.02% Tween 20 in PBS, and mounted on 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing VECTASHIELD solution (Vector Laboratories). Images were obtained using a SPOT RT Mono-2000 camera (Diagnostic Instruments) or, when indicated, using a Nikon Eclipse TE2000-E system equipped with x40/1.0 or x60/1.4 immersion objectives.

Cell fractionation. Cells were harvested at subconfluent density and washed with PBS. Cell pellets were resuspended in 500 μl of Buffer A (10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol) containing protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) and 10 mM NaF, and incubated for 10 min on ice. Cell membranes were disrupted by 15 passages through a 23-gauge needle plus 10 passages through a 25-gauge needle. Cells were then centrifuged for 5 min at 228 xg at 4°C. The supernatant (cytoplasmatic fraction) was collected and stored at -20°C and the pellet (nuclear fraction) was resuspended in Buffer B (0.25 M sucrose, 10 mM $MgCl_2$, with protease and phosphatase inhibitors), re-homogenized by 10 passages through a 23-gauge needle and centrifuged for 5 min at 1,430 xg in a sucrose cushion (Buffer C: 0.35 M sucrose, 0.5 mM $MgCl_2$, and protease and phosphatase inhibitors). The pellets (purified nuclei) were resuspended in STM buffer (250 mM sucrose, 50

mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM $MgSO_4$, protease and phosphatase inhibitors), DNAse (250 μg/ml) and RNAse (250 μg/ml). Pellets were incubated for one hour on ice and centrifuged for 10 min at 2,600 xg. Supernatant (S1) was collected and stored at -20°C. Pellets were resuspended in 1/5 LS/HS buffer (LS: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 mM $MgSO_4$; and HS: 2 M NaCl in LS buffer) supplemented with phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF) and aprotinin. This fraction was incubated for 15 min on ice and centrifuged for 20 min at 6,460 xg. The supernatant was collected (S2) and pellets were resuspended in 1/5 LS/HS buffer following the same protocol as described above. After centrifugation, pellets containing the nuclear matrix were homogenized in STM buffer and denatured prior to gel analysis.

Doxycycline-inducible system and confocal laser scanning microscopy. Cells were seeded at densities of 8 x 10^3 cells/cm^2 on cover slips and grown in media containing 5 μg/ml DOX. After the indicated time, cells were fixed with ice-cold methanol/acetone (1:1) for 20 min. Cells were then incubated two times for 5 min in PBS followed by a blocking step for 20 min in IF buffer (4% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% saponin in PBS). Cells were stained in PBS containing 1% BSA and 0.05% saponin with the primary antibodies at a dilution of 1:500. Thereafter, cells were washed three times and labeled with Alexa fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) at a dilution of 1:500. DNA was detected using DAPI (5 μg/ml in PBS; Sigma-Aldrich). Preparations were analyzed on an LSM510-Meta confocal microscope (Zeiss) equipped with x40/1.3 or x63/1.4 immersion objectives and excitation wavelengths of 364, 488, 543 or 633 nm. Confocal pictures shown throughout this work are single optical slices of 0.9–1.3 μm thickness.

shRNA-based assays. Five short hairpin RNAs (shRNAs) directed against *TACC3* were purchased and tested from the MISSION library (Sigma-Aldrich). HEK293T cells were used as the packaging cell line. Cells were co-transfected with the packaging vector psPAX2, the envelope-encoding vector pMD2.G and shRNA construct or the control pLKO.1 vector using FuGENE (Roche Molecular Biochemicals) in serum-free OptiMEM medium (Invitrogen). Transfected cells were incubated for 12–15 h and then replaced with fresh media for an additional 24 h. After this period, the medium was harvested by centrifugation at 1,250 xg and filtered through a 0.45 μm pore. Lentiviral particles were used immediately for transduction or aliquoted at -80°C. For transduction, cells were plated at 70–80% confluence and incubated for 24 h with lentiviral supernatants containing 8 μg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich). The next day, the culture medium was replaced with fresh medium supplemented with 5 μg/ml puromycin. An analysis of covariance (ANCOVA) was used to test for the equality of slopes of data of viability assays.

Cytokinesis assays. ELT3 cells were plated on coverslips for 16–24 h before treatment with nocodazole. The next day, cells were treated with 70 ng/ml nocodazole for 8–12 h, released in fresh media without nocodazole, and fixed with ice-cold methanol at different time points to 90 min. Immunofluorescence assays were performed as detailed above using anti-AURKB (AIM-1 clone 6, BD Transduction Laboratories) or anti-TUBA linked to Cy3 (clone TUB 2.1, Sigma-Aldrich) antibodies co-stained with DAPI. Tsc1-deficient cells were treated similarly, permeabilized in 0.1% Triton X-100 and 1x PBS for 30 min, blocked in this solution with 3% BSA for 30 min and mounted with GelMount (Biomeda) prior to direct immunofluorescence and counting.

Antibodies. Immunofluorescence and confocal microscopy studies were performed with anti-AURKB (AIM-1 clone 6, BD Transduction Laboratories), anti-pS2448-mTOR (Cell Signaling Technology catalog #2971), anti-NUP62 (clone 53, BD Transduction Laboratories), anti-TACC3 (D-2 and H-300, Santa Cruz Biotechnologies), anti-TSC1 (clone 5C8A12, Zymed, Invitrogen), anti-TSC2 (clone 3G9D9, Zymed, Invitrogen), anti-pS939-TSC2 (Cell Signaling Technology catalog #3615) and anti-TUBG1 (clone GTU-88, Sigma-Aldrich). Immunoprecipitation assays were performed with anti-TACC3 (N-18, Upstate Biotechnology; H-300, Santa Cruz Biotechnologies), anti-TSC2 (C-20, Santa Cruz Biotechnology; clone 3G9D9, Zymed, Invitrogen), anti-TSC1 (clone 5C8A12, Zymed, Invitrogen) and anti-TUBA (Acris catalog #SM568P). Other antibodies used in this study were anti-ARHGEF2 (aa 41–487),[101] anti-CGN (H-180, Santa Cruz Biotechnologies), anti-CHFR (M01 clone 1H3-A12, Abnova), anti-HA (clone 16B12, BAbCO), anti-CP110 (aa 1–149), anti-LMNA (clone 133A2, Chemicon, Millipore), anti-Rasa1 (clone B4F8, Upstate, Millipore), anti-PLK1 (clone 35–206, Invitrogen) and anti-pT389-S6K (Cell Signaling Technology catalog #9205). Purified negative control IgGs of different species were purchased from Santa Cruz Biotechnologies. Epitope tag antibodies were anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich), anti-GFP (clone JL-8, BD Biosciences), anti-GST (Sigma-Aldrich) and anti-MYC (clone 9E10, Sigma-Aldrich). Secondary HRP-linked antibodies were purchased from GE Healthcare and fluor-linked antibodies were Alexa 488, 546, 594 and 633 nm, anti-mouse, anti-rabbit or anti-rat (Molecular Probes, Invitrogen).

Acknowledgements

We wish to thank Conxi Lázaro and Víctor Moreno for continuous scientific support, and Neus Agell and Oriol Bachs for assistance with cellular fractionation. We also wish to thank Brian David Dynlacht, Elena Goncharova and Vera Krymskaya, Elizabeth P. Henske and Reiner Lammers for providing reagents: Flag-CP110 construct and anti-CP110 antibody; TSC2-HBD/ΔHBD constructs; Tsc1-, Tsc2- and ELT3-related cell lines; and GFP-KIF1C construct, respectively.

Financial disclosure

This work was supported by the Spanish Biomedical Research Centre Network for Epidemiology and Public Health [M.A.P.]; the "la Caixa" foundation [BM05/254 to M.A.P.]; the Instituto de Salud Carlos III Fondo de Investigación Sanitaria [PI06-0545 to M.A.P.]; the LAM Foundation [058F07-06 to A.A.]; the Deutsche Forschungsgemeinschaft [SFB-728-TP-A5 to R.P.P.]; and the Elterninitiative Kinderkrebsklinik e.V. (Düsseldorf) for help in establishing the cLSM core unit. L.G-.B. was supported by a short-term fellowship from the Catalan Agency for the Management of University and Research Grants (AGAUR, BE2-00162). C.A.M. is supported by a Beatriu de Pinós fellowship

from the AGAUR and by the Transversal Action Against Cancer of the Spanish Ministry of Health. M.A.P. is a Ramón y Cajal Researcher with the Spanish Ministry of Education and Science.

Note

Supplementary materials can be found at:
www.landesbioscience.com/supplement/Gomez-BaldoCC9-6-Sup.pdf

References

1. Bornens M. Organelle positioning and cell polarity. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9:874-86.
2. Sankaran S, Parvin JD. Centrosome function in normal and tumor cells. J Cell Biochem 2006; 99:1240-50.
3. Gergely F, Karlsson C, Still I, Cowell J, Kilmartin J, Raff JW. The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:14352-7.
4. Gergely F, Kidd D, Jeffers K, Wakefield JG, Raff JW. D-TACC: a novel centrosomal protein required for normal spindle function in the early Drosophila embryo. EMBO J 2000; 19:241-52.
5. Matthews LR, Vaglio P, Reboul J, Ge H, Davis BP, Garrels J, et al. Identification of potential interaction networks using sequence-based searches for conserved protein-protein interactions or "interologs". Genome Res 2001; 11:2120-6.
6. Peset I, Vernos I. The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. Trends Cell Biol 2008; 18:379-88.
7. Gergely F. Centrosomal TACCtics. Bioessays 2002; 24:915-25.
8. Raff JW. Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. Trends Cell Biol 2002; 12:222-5.
9. Brittle AL, Ohkura H. Centrosome maturation: Aurora lights the way to the poles. Curr Biol 2005; 15:880-2.
10. Gergely F, Draviam VM, Raff JW. The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. Genes Dev 2003; 17:336-41.
11. Albee AJ, Wiese C. Xenopus TACC3/maskin is not required for microtubule stability but is required for anchoring microtubules at the centrosome. Mol Biol Cell 2008; 19:3347-56.
12. Kinoshita K, Noetzel TL, Pelletier L, Mechtler K, Drechsel DN, Schwager A, et al. Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. J Cell Biol 2005; 170:1047-55.
13. Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W, et al. The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. J Biol Chem 2007; 282:29273-83.
14. Yao R, Natsume Y, Noda T. TACC3 is required for the proper mitosis of sclerotome mesenchymal cells during formation of the axial skeleton. Cancer Sci 2007; 98:555-62.
15. Jeng JC, Lin YM, Lin CH, Shih HM. Cdh1 controls the stability of TACC3. Cell Cycle 2009; 8:3529-36.
16. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. Science 1997; 277:805-8.
17. consortium. Ects. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. Cell 1993; 75:1305-15.
18. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:6085-90.
19. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis. Am J Hum Genet 1998; 62:810-5.
20. Napolioni V, Curatolo P. Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex. Curr Genomics 2008; 9:475-87.
21. Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A, et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype—phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. Eur J Hum Genet 2005; 13:731-41.
22. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. Am J Hum Genet 2001; 68:64-80.
23. Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. Cancer Res 1998; 58:4766-70.
24. van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. Hum Mol Genet 1998; 7:1053-7.
25. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nat Cell Biol 2002; 4:648-57.
26. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. Nat Cell Biol 2002; 4:699-704.
27. Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. Cell 2001; 105:357-68.
28. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. The Drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. Cell 2001; 105:345-55.
29. Radimerski T, Montagne J, Hemmings-Mieszczak M, Thomas G. Lethality of Drosophila lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. Genes Dev 2002; 16:2627-32.
30. Jaeschke A, Hartkamp J, Saitoh M, Roworth W, Nobukuni T, Hodges A, et al. Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositide-3-OH kinase is mTOR independent. J Cell Biol 2002; 159:217-24.
31. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell 2002; 110:163-75.
32. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol Cell 2002; 10:457-68.
33. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell 2002; 110:177-89.
34. Miloloza A, Rosner M, Nellist M, Halley D, Bernaschek G, Hengstschlager M. The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. Hum Mol Genet 2000; 9:1721-7.
35. Rosner M, Hengstschlager M. Tuberin binds p27 and negatively regulates its interaction with the SCF component Skp2. J Biol Chem 2004; 279:48707-15.
36. Soucek T, Rosner M, Miloloza A, Kubista M, Cheadle JP, Sampson JR, et al. Tuberous sclerosis causing mutants of the TSC2 gene product affect proliferation and p27 expression. Oncogene 2001; 20:4904-9.
37. Soucek T, Yeung RS, Hengstschlager M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:15653-8.
38. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. Mol Cell Biol 2008; 28:4104-15.
39. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. Nat Cell Biol 2004; 6:1122-8.
40. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol 2004; 14:1296-302.
41. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. Curr Biol 2006; 16:1865-70.
42. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. Dev Cell 2006; 11:859-71.
43. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol Cell 2006; 22:159-68.
44. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. Genes Dev 2006; 20:2820-32.
45. Astrinidis A, Senapedis W, Henske EP. Hamartin, the tuberous sclerosis complex 1 gene product, interacts with polo-like kinase 1 in a phosphorylation-dependent manner. Hum Mol Genet 2006; 15:287-97.
46. Hartman TR, Liu D, Zilfou JT, Robb V, Morrison T, Watnick T, et al. The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. Hum Mol Genet 2009; 18:151-63.
47. Bonnet CS, Aldred M, von Ruhland C, Harris R, Sandford R, Cheadle JP. Defects in cell polarity underlie TSC and ADPKD-associated cystogenesis. Hum Mol Genet 2009; 18:2166-76.
48. DiBella LM, Park A, Sun Z. Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway. Hum Mol Genet 2009; 18:595-606.
49. Graser S, Stierhof YD, Lavoie SB, Gassner OS, Lamla S, Le Clech M, et al. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. J Cell Biol 2007; 179:321-30.
50. Tsang WY, Bossard C, Khanna H, Peranen J, Swaroop A, Malhotra V, et al. CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. Dev Cell 2008; 15:187-97.
51. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. Science 2004; 303:540-3.
52. Still IH, Vettaikkorumakankauv AK, DiMatteo A, Liang P. Structure-function evolution of the transforming acidic coiled coil genes revealed by analysis of phylogenetically diverse organisms. BMC Evol Biol 2004; 4:16.

53. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:6062-7.
54. Birkenfeld J, Nalbant P, Bohl BP, Pertz O, Hahn KM, Bokoch GM. GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. Dev Cell 2007; 12:699-712.
55. Sudo H, Maru Y. LAPSER1 is a putative cytokinetic tumor suppressor that shows the same centrosome and midbody subcellular localization pattern as p80 katanin. Faseb J 2007; 21:2086-100.
56. Delaval B, Ferrand A, Conte N, Larroque C, Hernandez-Verdun D, Prigent C, et al. Aurora B-TACC1 protein complex in cytokinesis. Oncogene 2004; 23:4516-22.
57. Aijaz S, D'Atri F, Citi S, Balda MS, Matter K. Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G_1/S phase transition. Dev Cell 2005; 8:777-86.
58. Ju X, Katiyar S, Wang C, Liu M, Jiao X, Li S, et al. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:7438-43.
59. Goncharova E, Goncharov D, Noonan D, Krymskaya VP. TSC2 modulates actin cytoskeleton and focal adhesion through TSC1-binding domain and the Rac1 GTPase. J Cell Biol 2004; 167:1171-82.
60. Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, Henske EP. Tuberin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. Oncogene 2002; 21:8470-6.
61. Jiang X, Yeung RS. Regulation of microtubule-dependent protein transport by the TSC2/mammalian target of rapamycin pathway. Cancer Res 2006; 66:5258-69.
62. Pujana MA, Han JD, Starita LM, Stevens KN, Tewari M, Ahn JS, et al. Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. Nat Genet 2007; 39:1338-49.
63. Boxem M, Maliga Z, Klitgord N, Li N, Lemmens I, Mana M, et al. A protein domain-based interactome network for *C. elegans* early embryogenesis. Cell 2008; 134:534-45.
64. Dawe HR, Adams M, Wheway G, Szymanska K, Logan CV, Noegel AA, et al. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. J Cell Sci 2009; 122:2716-26.
65. Malone CJ, Misner L, Le Bot N, Tsai MC, Campbell JM, Ahringer J, et al. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. Cell 2003; 115:825-36.
66. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet 1999; 21:285-8.
67. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Kostaki O, Derdas SP, Georgoulias V, Dargemont C, et al. Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. Cancer Res 1999; 59:4625-33.
68. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Bernado L, Lopez-Bonet E, Menendez JA. The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2009; 380:638-43.
69. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. Reprod Sci 2008; 15:128-38.
70. Gui Y, He GH, Walsh MP, Zheng XL. Predisposition to tetraploidy in pulmonary vascular smooth muscle cells derived from the Eker rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 293:702-11.
71. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. Mol Biol Cell 2002; 13:1977-2000.
72. Stemmer K, Ellinger-Ziegelbauer H, Ahr HJ, Dietrich DR. Carcinogen-specific gene expression profiles in short-term treated Eker and wildtype rats indicative of pathways involved in renal tumorigenesis. Cancer Res 2007; 67:4052-68.
73. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:15545-50.
74. Summers MK, Bothos J, Halazonetis TD. The CHFR mitotic checkpoint protein delays cell cycle progression by excluding Cyclin B1 from the nucleus. Oncogene 2005; 24:2589-98.
75. Scolnick DM, Halazonetis TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. Nature 2000; 406:430-5.
76. Yu X, Minter-Dykhouse K, Malureanu L, Zhao WM, Zhang D, Merkle CJ, et al. Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. Nat Genet 2005; 37:401-6.
77. Ren Y, Li R, Zheng Y, Busch H. Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. J Biol Chem 1998; 273:34954-60.
78. Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. Nature 1988; 333:272-6.
79. Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, et al. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. Nat Cell Biol 2000; 2:281-7.
80. Hohman DW, Noghrehkar D, Ratnayake S. Lymphangioleiomyomatosis: A review. Eur J Intern Med 2008; 19:319-24.
81. Spektor A, Tsang WY, Khoo D, Dynlacht BD. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. Cell 2007; 130:678-90.
82. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. Cell 2007; 129:1351-63.
83. Elcock LS, Bridger JM. Exploring the effects of a dysfunctional nuclear matrix. Biochem Soc Trans 2008; 36:1378-83.
84. Xie Z, Moy LY, Sanada K, Zhou Y, Buchman JJ, Tsai LH. Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. Neuron 2007; 56:79-93.
85. Crino PB, Henske EP. New developments in the neurobiology of the tuberous sclerosis complex. Neurology 1999; 53:1384-90.
86. Vinters HV, Park SH, Johnson MW, Mischel PS, Catania M, Kerfoot C. Cortical dysplasia, genetic abnormalities and neurocutaneous syndromes. Dev Neurosci 1999; 21:248-59.
87. Choi YJ, Di Nardo A, Kramvis I, Meikle L, Kwiatkowski DJ, Sahin M, et al. Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. Genes Dev 2008; 22:2485-95.
88. Lu R, Niida H, Nakanishi M. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. J Biol Chem 2004; 279:31164-70.
89. Walhout AJ, Vidal M. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. Methods 2001; 24:297-306.
90. Piekorz RP, Hoffmeyer A, Duntsch CD, McKay C, Nakajima H, Sexl V, et al. The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. EMBO J 2002; 21:653-64.
91. Vidalain PO, Boxem M, Ge H, Li S, Vidal M. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. Methods 2004; 32:363-70.
92. Bayer M, Fischer J, Kremerskothen J, Ossendorf E, Matanis T, Konczal M, et al. Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1. BMC Cell Biol 2005; 6:15.
93. Khatri P, Voichita C, Kattan K, Ansari N, Khatri A, Georgescu C, et al. Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. Nucleic Acids Res 2007; 35:206-11.
94. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997; 25:3389-402.
95. Huerta-Cepas J, Dopazo H, Dopazo J, Gabaldon T. The human phylome. Genome Biol 2007; 8:109.
96. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 2004; 5:113.
97. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 2003; 52:696-704.
98. Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Proceedings of the 2nd international symposium on information theory 1973:267-81.
99. Howe SR, Pass HI, Ethier SP, Matthews WJ, Walker C. Presence of an insulin-like growth factor I autocrine loop predicts uterine fibroid responsiveness to tamoxifen. Cancer Res 1996; 56:4049-55.
100. Groisman I, Huang YS, Mendez R, Cao Q, Theurkauf W, Richter JD. CPEB, maskin and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. Cell 2000; 103:435-47.
101. Bakal CJ, Finan D, LaRose J, Wells CD, Gish G, Kulkarni S, et al. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9529-34.

TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division

Supplementary Material

Figure S1. Y2H results for TACC3-TACC homo and heterodimers. Blue boxes show the approximate boundaries of the corresponding TACC domains (amino acids, aa). Bottom lines and aa indicate the overlap with the TACC3-Y2H preys. Asterisk indicates the largest putative isoform of TACC2 (NP_996744).

Figure S2. Phylogenetic tree representing the evolutionary relationships among human TACCs and related proteins. Duplication events at the base of vertebrates leading to the three TACC paralogous groups are indicated with black circles. Members belonging to each of the TACC paralogous groups are indicated by colored boxes. Noteworthy is the presence of two paralogous copies of TACC1 in fish. Bootstrap support (over 100 replicates) is indicated for the main groupings. Three letter codes at the beginning of the sequence identifier indicate the organism source: *Anopheles gambiae* (Aga), *Bos taurus* (Bta), *Canis familiaris* (Cfa), *Ciona intestinalis* (Cin), *Danio rerio* (Dre), *Dasypus novemcinctus* (Dno), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Echinops telfairi* (Ete), *Gallus gallus* (Gga), *Gasterosteus aculeatus* (Gac), *Homo sapiens* (Hsa), *Oryzias latipes* (Ola), *Pan troglodytes* (Ptr), *Rattus norvergicus* (Rno), *Loxodontha africana* (Laf), *Macaca mulata* (Mmu), *Monodelphis domestica* (Mdo), *Mus musculus* (Mms), *Oryctolagus cuniculus* (Ocu), *Takifugu rubripes* (Tru), *Tetraodon nigroviris* (Tni), and *Xenopus tropicalis* (Xtr). The corresponding sequences can be downloaded from PhylomeDB (www.phylomedb.org).

Figure S3. Phylogenetic analysis of TACCs within coiled-coil motif-containing proteins (large tree). Homologous proteins from a selected group of species were

retrieved with PSI-Blast searches starting from each human TACC representative. All TACC representatives cluster within a monophyletic partition in the tree (see detail). High evolutionary rates affecting TACCs are apparent from the relative long branches leading to these proteins. Their specific position within the tree is perhaps the result of long branch attraction. Three letter codes as in **Fig. S2**. The corresponding sequences can be downloaded from PhylomeDB (www.phylomedb.org).

Figure S4. Left top panel, fine mapping of the TACC3-IPORIN/RUSC2 physical interaction using IPORIN/RUSC2 deletion mutants. This study was performed with the pAS2-1 bait vector and the Y190 strain following standard Y2H protocols. Right top panel, co-AP of GST-IPORIN/RUSC2Δ3 and HA-TACC3 (C-term) in BHK cell extracts. Bottom panels, validation of TACC3 Y2H protein interactions by co-AP in HEK293 extracts. Results are shown for GST-TACC3 and FLAG-CP110 (left panels) and for GST-TACC3 and GFP-KIF1C (right panels).

Figure S5. Validation of TACC3 Y2H protein interactions by co-IPs in HEK293 extracts. Results are shown for ARHGEF2 and CP110 in normal conditions (left panels), and for CGN in cells treated with nocodazole (right panels).

Figure S6. Nuclear envelope localization of TACC3. A doxycycline (DOX)-regulated shRNA system was used in this study. Left panel, induced control-shRNA expression (DOX day 2); right panel, induced TACC3-shRNA expression (DOX day 2). Scale bars represent 10 μm.

Figure S7. Cellular localization of ectopic TACC3-GFP after retroviral-based re-expression in 20.8 *Tacc3*$^{-/-}$ MEFs.

Figure S8. Localization of pS2448-mTOR during cell division is not affected in TACC3-depleted HeLa cells. Scale bars represent 10 μm**.**

Figure S9. Representative fluorescence microscopy images (x20) in ELT3-V1 (Tsc2-deficient, vector control) relative to ELT3-T3 (hTSC2-reconstituted) cells at 90 min with cytokinetic figures marked with arrows, using Aurkb immunostaining.

Figure S10. Graphical representation of cytokinetic figures (%) in MEF cultures of the *Tsc1*$^{-/-}$ genetic background reconstituted with *hTSC1* (T3 and T9) or vector controls (P1 and P2), and synchronized with nocodazole. Mean and standard deviation are shown.

Figure S11. Left panel, Tsc1-deficient MEF cultures have increased incidence of binucleated cells. MEFs were arrested in G2/M with nocodazole for 12 h, released in fresh media for 90 min, fixed and stained with anti-TUBA antibody and DAPI. The percentage of cells with multiple nuclei was calculated by direct counting 300 cells from each cell line. Histogram shows the mean and standard error of means (p values computed with the chi-square test). Right panel, normal abscission figures in Tsc1-deficient MEFs detected using Aurkb immunostaining.

Table S1. Over-represented GO biological processes terms in the TACC3 interactome (FDR-adjusted p values < 0.05)

Microtubule-based process
Microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
Metabolic process
Cytoskeleton organization and biogenesis
Cellular metabolic process
Centrosome organization and biogenesis
Primary metabolic process
Microtubule organizing center organization and biogenesis
Negative regulation of phosphoinositide 3-kinase cascade
Microtubule nucleation
Macromolecule metabolic process
Cell cycle

Figure S1

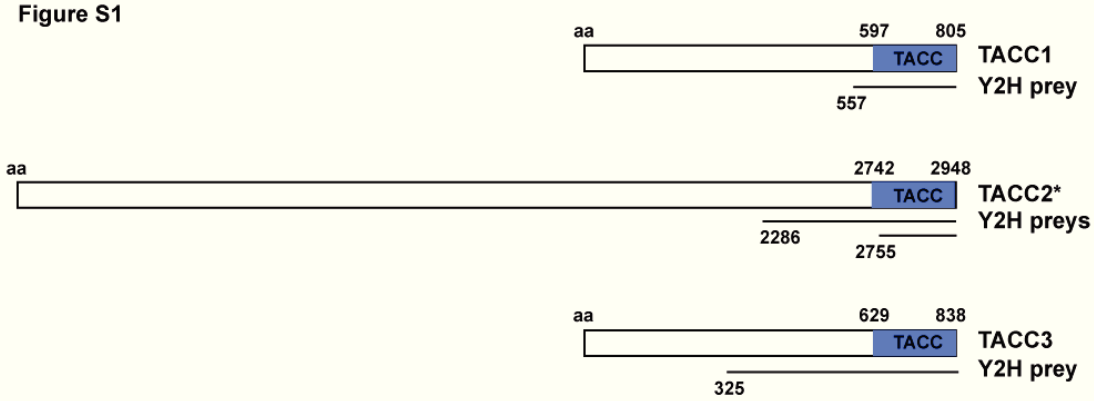

aa
597
805
TACC
TACC1
Y2H prey
557
aa
2742
2948
TACC
TACC2*
Y2H preys
2286
2755
aa
629
838
TACC
TACC3
Y2H prey
325

Figure S2

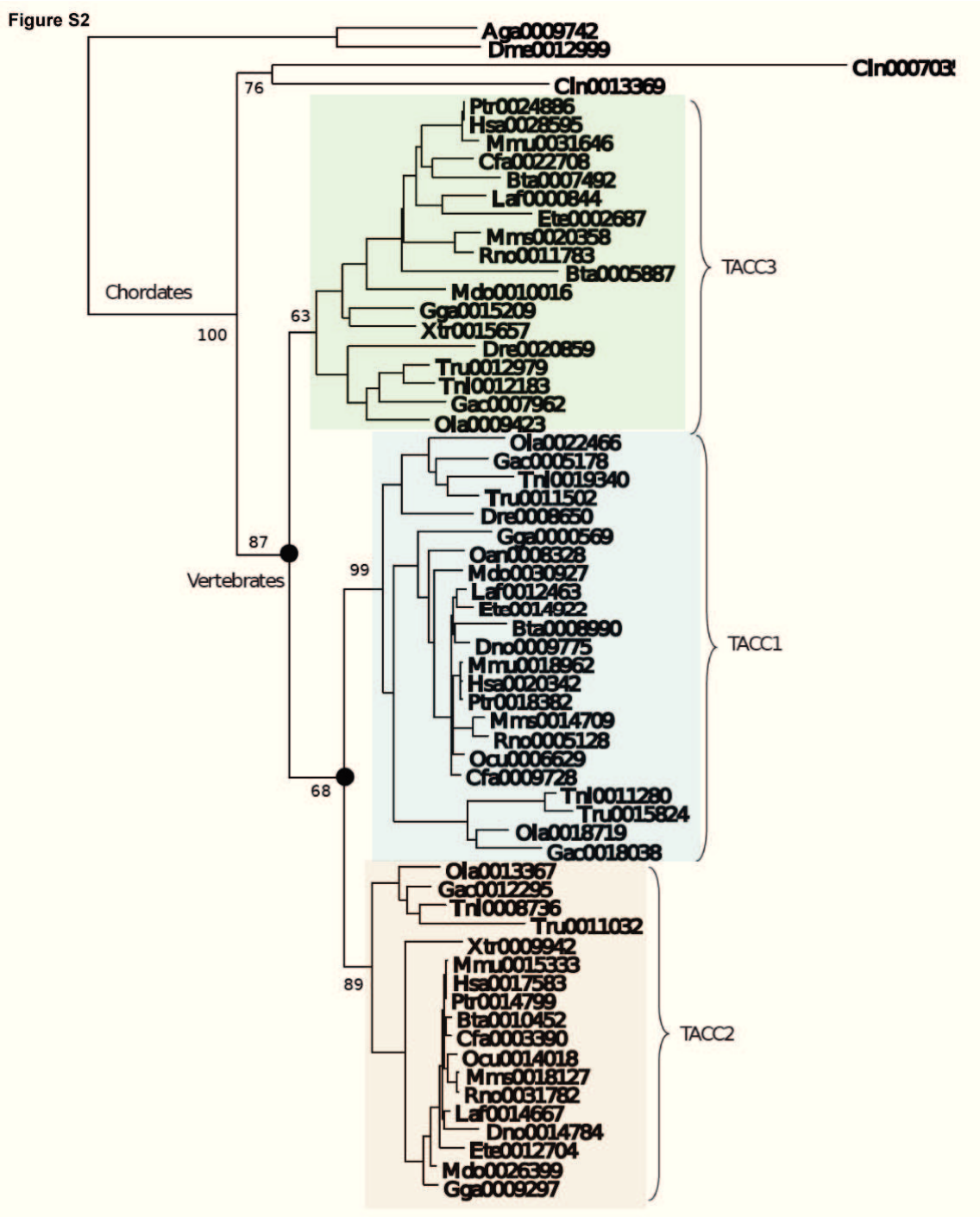

Aga0009742
Dme0012999
Cln0007031
Cln0013369
76
Ptr0024886
Hsa0028695
Mmu0031646
Cfa0022708
Bta0007492
Laf0000844
Ete0002687
Mms0020358
Rno0011783
Bta0005887
Mdo0010016
Gga0015209
Xtr0015657
Dre0020859
Tru0012979
Tni0012183
Gac0007962
Ola0009423
TACC3
Chordates
100
63
Ola0022466
Gac0005178
Tni0019340
Tru0011502
Dre0008650
Gga0000569
Oan0008328
Mdo0030927
Laf0012463
Ete0014922
Bta0008990
Dno0009775
Mmu0018962
Hsa0020342
Ptr0018382
Mms0014709
Rno0005128
Ocu0006629
Cfa0009728
Tni0011280
Tru0015824
Ola0018719
Gac0018038
TACC1
87
Vertebrates
99
68
Ola0013367
Gac0012295
Tni0008736
Tru0011032
Xtr0009942
Mmu0015333
Hsa0017583
Ptr0014799
Bta0010452
Cfa0003390
Ocu0014018
Mms0018127
Rno0031782
Laf0014667
Dno0014784
Ete0012704
Mdo0026399
Gga0009297
TACC2
89

Figure S3

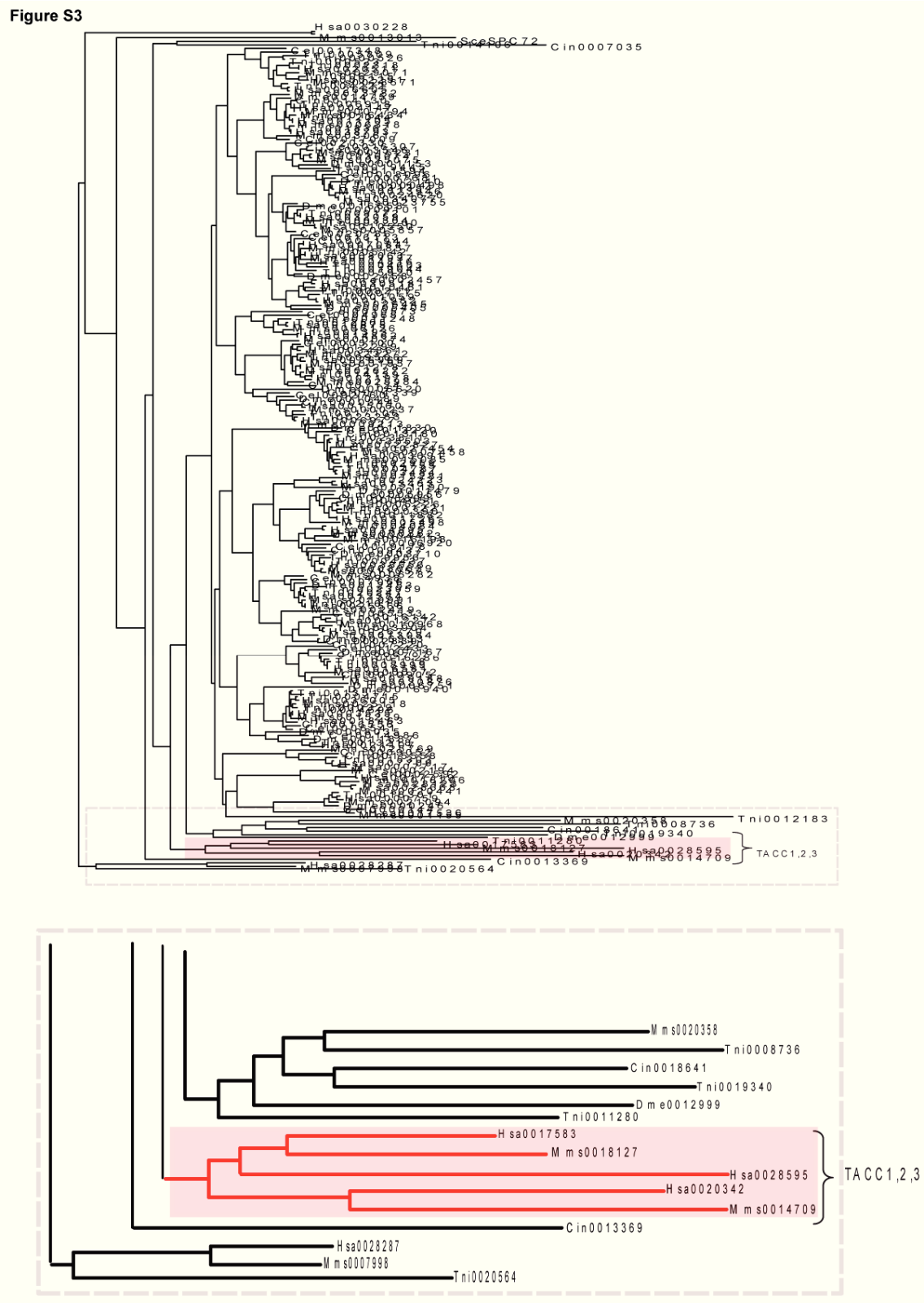

Hsa0030228
Mms0013013
SceSPC72
Cin0007035
Mms0020358
Tni0008736
Cin0018641
Tni0019340
Dme0012999
Tni0011280
Hsa0017583
Mms0018127
Hsa0028595
Hsa0020342
Mms0014709
TACC1,2,3
Cin0013369
Hsa0028287
Mms0007998
Tni0020564

Figure S4

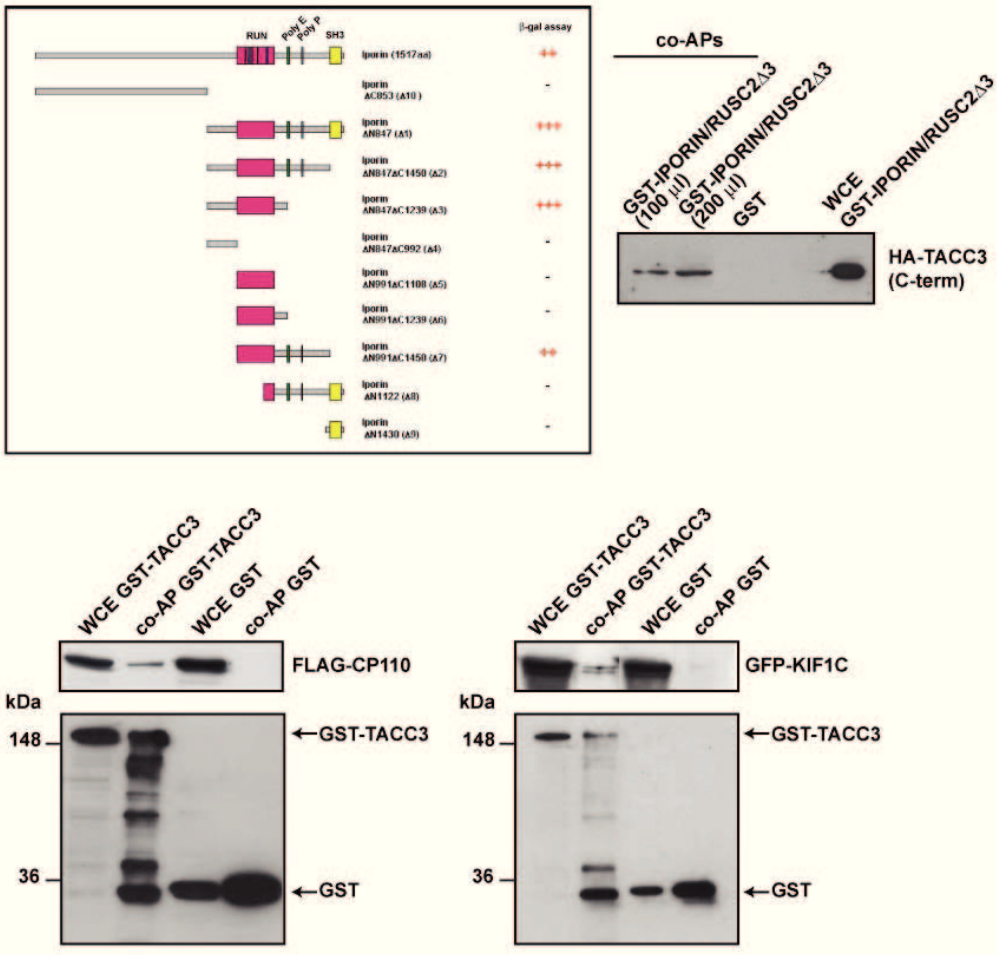


Figure S5

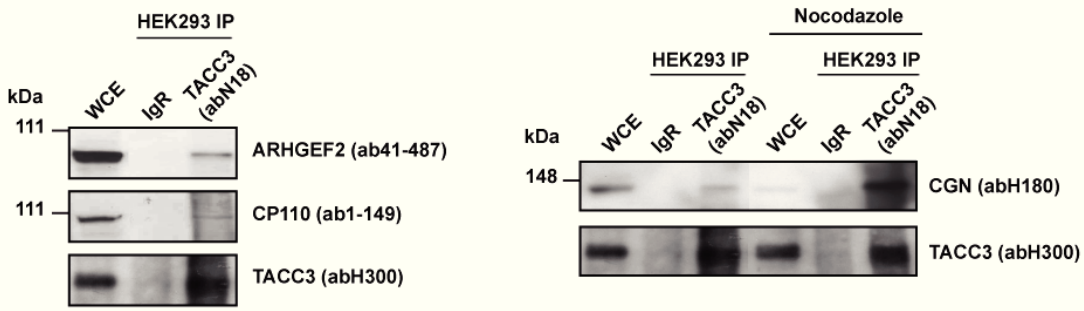


Figure S6

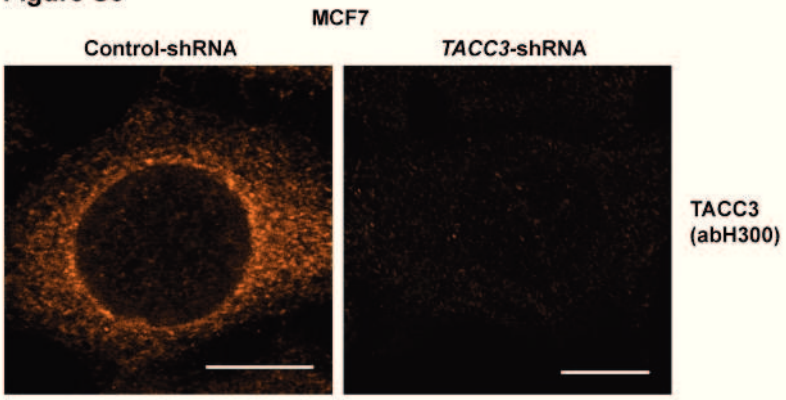


Figure S7

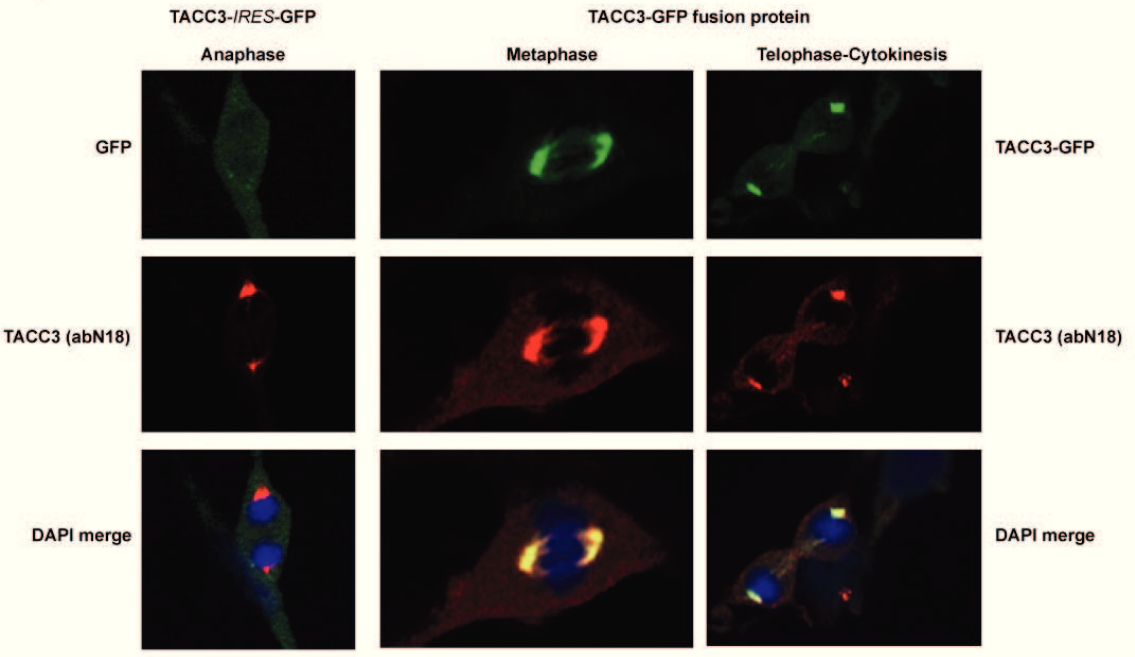


Figure S8

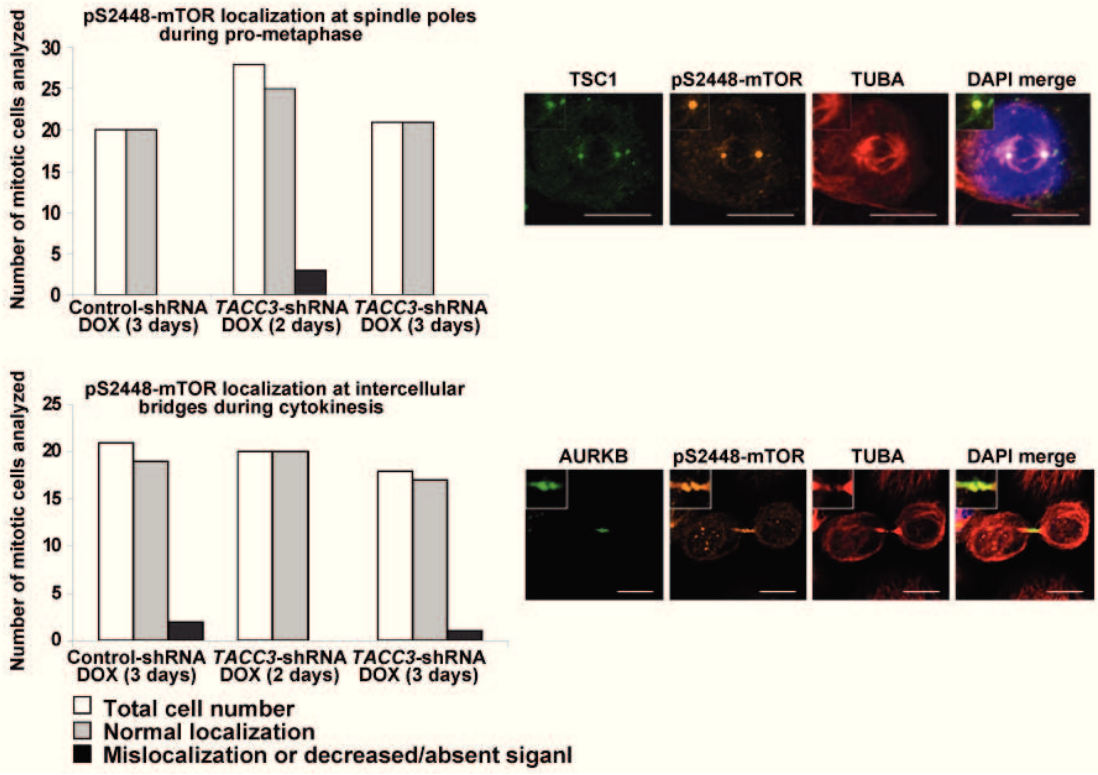


Figure S9

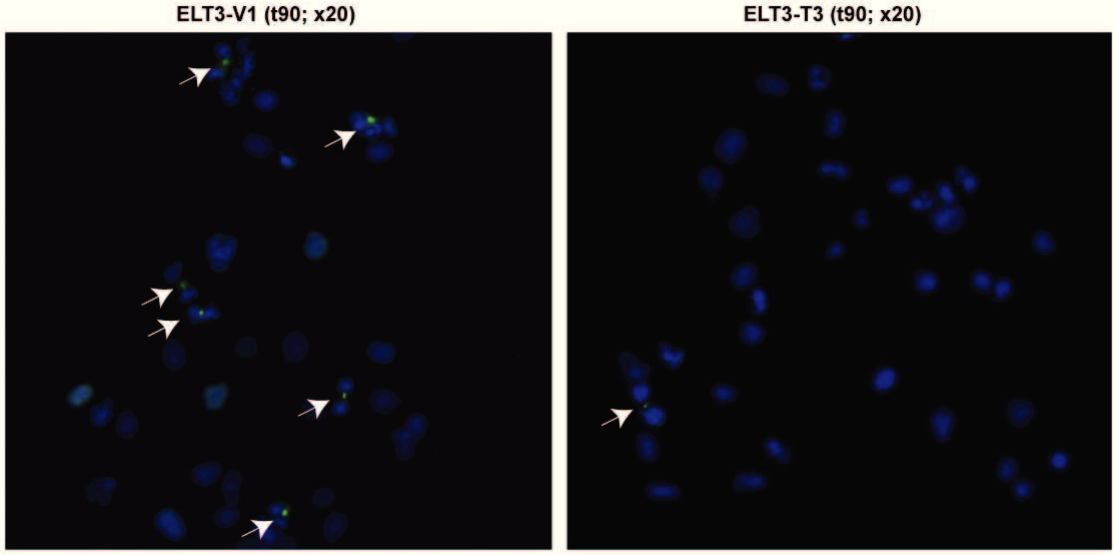


Figure S10

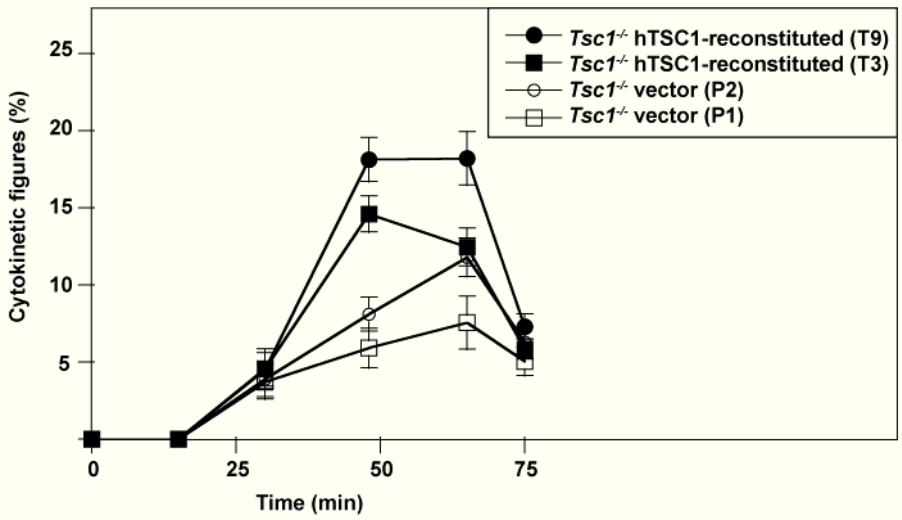
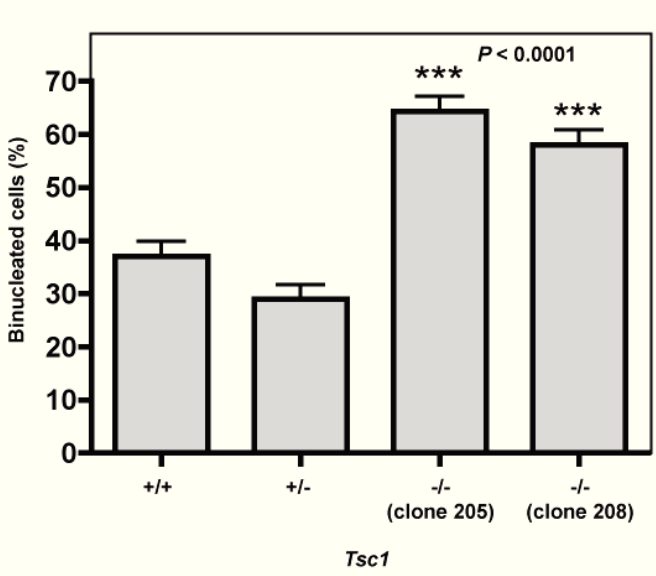
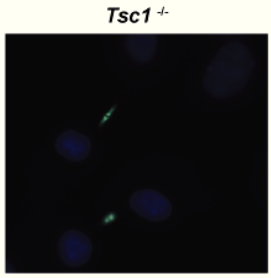


Figure S11





AURKB
(abAIM1-6)

3. Abschlussdiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des zentrosomalen Proteins TACC3 für die Induktion zellulärer Seneszenz untersucht. Hierbei sollte die zelluläre Seneszenzantwort nach TACC3-Depletion charakterisiert und mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen durch die Identifikation von Bindungspartnern für TACC3 eingehender untersucht werden.

3.1 Malmitose kann Stress-induzierte prämature Seneszenz auslösen

Der Begriff Malmitose beschreibt eine fehlerhafte Mitose, welche aufgrund von intrinsischen oder extrinischen Einflüssen eine ungleiche Segregation der Chromosomen zur Folge haben kann. Während einer Malmitose wird in der Regel der Spindelkontrollpunkt ausgelöst (exakterweise nicht mehr saturiert), welcher dann einen mitotischen Arrest induziert. Durch diesen Arrest wird der sich teilenden Zelle die Möglichkeit gegeben, fehlerhafte Prozesse innerhalb der Mitose, wie z.B. eine monotelische Bindung zwischen Mikrotubulus und Kinetochor (Abb. 5) zu korrigieren (Rieder & Maiato, 2004). Abhängig vom Erfolg dieser Korrekturen kann die Zelle anschließend entweder die Zellteilung erfolgreich abschließen oder den mitotischen Arrest aufrechterhalten. Ein durch schwere Defekte bedingter andauernder Arrest führt zur Aktivierung eines programmierten Zelltods (Apoptose) in der Mitose, während geringfügigere Defekte postmitotisch einen G_1-Arrest und eine zelluläre Seneszenzantwort induzieren können (Vitale *et al.*, 2011). Prinzipiell können Zellen dem mitotischen Arrest entkommen (bedingt durch eine mit der Arrestdauer zunehmenden Proteolyse von Zyklin B1, die eine Metaphase-Anaphase-Transition erlaubt), ohne dass die Chromosomensegregation korrekt bzw. überhaupt abgeschlossen wurde (*„mitotic slippage“*) (Brito & Rieder, 2006). Dies führt in der Regel zu Aneuploidie, ohne hierbei eine unmittelbare Zellantwort wie Apoptose oder Seneszenz auszulösen. Malmitose kann auf verschiedene Weisen verursacht werden. Typische Auslöser sind Spindelgifte wie Paclitaxel oder Discodermolid (Calligaris *et al.*, 2010), welche die Dynamik der mitotischen Spindel inhibieren und somit einen mitotischen Arrest auslösen. Therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Tumoren mit Spindelgiften ist es, gezielt mitotische Defekte zu verursachen, um die Proliferation der Tumorzellen zu hemmen und in der Folge möglichst Apoptose (hoher Grad an Defekten) oder Seneszenz (niedriger Grad an Defekten) zu induzieren.

Neben Spindelgiften kann auch die verminderte Expression oder die Inhibition einzelner mitotischer Proteine Malmitose auslösen. Dies bewirkt ebenfalls eine mitotischen Arrest, welcher in der Folge zu Apoptose oder, wie erstmals von Srsen und Kollegen gezeigt wurde, zu einem G_1-Arrest durch zelluläre Seneszenz führen kann (Srsen *et al.*, 2006). Aus diesem Grund ist für diese Arbeit die Frage von Interesse, inwiefern und welche mitotischen Proteine als Zielstrukturen für eine mögliche und zukünftige Anti-Tumortherapie geeignet sein könnten.

3.1.1 TACC3-Depletion aktiviert ein zelluläres Seneszenzprogramm

Zelluläre Seneszenz ist definiert als permanenter irreversibler Zellzyklusarrest in der G_1-Phase des Zellzyklus und kann unter anderem durch Telomerverkürzung, DNS-Schäden und eine erhöhte Onkogenexpression bzw. -aktivierung induziert werden. Durch die Depletion zweier struktureller Proteine des Zentrosoms, PCM1 (□*Pericentriolar material 1 protein*□) und Pericentrin, konnte vor Beginn dieser Arbeit initial gezeigt werden, dass die verminderte Expression mitotischer Proteine eine postmitotische zelluläre Seneszenz nach sich ziehen kann (Srsen *et al.*, 2006). Jedoch blieb hier die Charakterisierung der Seneszenzantwort unvollständig und die molekularen Mechanismen weitgehend unklar. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob auch die Depletion des zentrosomalen Proteins TACC3 Seneszenz induziert und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weitergehend untersucht werden.

Bei der in 2.1 vorgestellten Arbeit, in der die Auswirkungen von TACC3-Depletion auf humane Brustepithel-Zelllinien (MCF7, MCF10a) untersucht wurden (Schmidt *et al.*, 2010b), die über einen funktionellen G_1-Kontrollpunkt verfügen, konnte, anders als zuvor in G_1-Kontrollpunkt-defizienten Zervixkarzinomzellen (Schneider *et al.*, 2007), überraschenderweise keinerlei Apoptose, sondern ausschließlich ein postmitotischer Zellzyklusarrest in der G_1-Phase nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2010b). Der fehlende Apoptose-Phänotyp ging hierbei einher mit einer deutlich reduzierten Expression des proapoptotischen Proteins Bim, welches an den Mikrotubuli lokalisiert und die Zelltodantwort nach Gabe hoher Spindelgiftmengen vermitteln kann (Mollinedo & Gajate, 2003). Des Weiteren konnte in MCF7-Zellen, die interessanterweise Caspase-3 nicht exprimieren (Jänicke *et al.*, 1998), eine Zelltodantwort selbst nach Reexpression einer cDNS für Caspase-3 und nachfolgender TACC3-Depletion nicht nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2010b). Somit zeigen

TACC3-depletierte MCF7 und MCF10a-Zellen ausschließlich einen G_1-Arrest, der durch die Aktivierung des Tumorsuppressors p53, die Expression des Zellzyklusinhibitors $p21^{WAF}$ und eine verminderte Phosphorylierung des Rb-Proteins charakterisiert ist. Diese und die Befunde von Schneider und Kollegen (Schneider *et al.*, 2007) zeigen, dass TACC3-Depletion in transformierten humanen Zellen sowohl Apoptose als auch einen permanenten Zellzyklusarrest induzieren kann, wobei der G_1-Arrest primär über den $p53\text{-}p21^{WAF}$-Signalweg vermittelt wird. Analog zu den Arbeiten, in denen PCM1 und Pericentrin depletiert wurden (Srsen *et al.*, 2006), wurden auch in dieser Arbeit die typischen morphologischen und zellulären Merkmale untersucht, um den Seneszenzphänotyp nach TACC3-Depletion zu charakterisieren.

Zelluläre Seneszenz ist gekennzeichnet durch einen permanenten und irreversiblen G_1-Arrest. Seneszente Zellen können darüber hinaus eine Vielzahl morphologischer, struktureller und metabolischer Charakteristika aufweisen. Abhängig von Zelltyp und Art der Induktion können seneszente Zellen eine Kombination verschiedener Merkmale ausbilden. Entscheindend ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass nicht alle in der Literatur beschriebenen Charakteristika zellulärer Seneszenz ausgebildet sein müssen, um eine Zelle als seneszent zu klassifizieren. Die alleinige Ausbildung eines einzigen Merkmals zellulärer Seneszenz ist allerdings noch kein hinreichendes Kriterium für die finale Klassifizierung einer Zelle als Zelle mit einem seneszenten Phänotyp. Neben dem G_1-Zellzyklusarrest nach Aktivierung des $p53\text{-}p21^{WAF}$-Signalwegs gelten eine deutlich vergrößerte Zelloberfläche und eine flache Zellmorphologie als grundlegende Merkmale seneszenter Zellen. Darüber hinaus wird eine erhöhte Anzahl an lysosomalen Vakuolen und die damit verbundene gesteigerte Aktivität der SA-β-Galaktosidase (SA-βgal, pH 6.0) einer Zelle als zentrales Charakteristikum zellulärer Seneszenz angesehen (Dimri *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006). Bei der Analyse der SA-βgal-Aktivität sollte allerdings berücksichtigt werden, dass diese nicht alleiniges Merkmal zellulärer Seneszenz ist, da diese enzymatische Aktivität auch in nicht-seneszenten Zellen aufgrund von z.B. Zelldichte-induziertem Stress *in vitro* erhöht sein kann. Zusätzlich zur Erfassung der Zellmorphologie und SA-βGal-Aktivität wird in der Literatur oft die Formation sogenannter „Seneszenz-Assoziierter Heterochromatischer Foci“ (SAHF) im Zellkern nachgewiesen. Diese entstehen durch Umstrukturierungen des Heterochromatins im Nukleus und führen zur Hemmung der Expression essentieller, zellzyklusfördernder Gene. Zwar konnten SAHFs längst nicht in allen Formen zellulärer Seneszenz nachgewiesen

werden, doch gelten sie als robustes Merkmal seneszenter Zellen (Zhang *et al.*, 2007; Kosar *et al.*, 2011).

Um die Seneszenzantwort nach Depletion von TACC3 zu charakterisieren, wurden TACC3-depletierte Zellen auf die zuvor beschriebenen Merkmale hin untersucht. Nach TACC3-Depletion zeigten MCF7- und MCF10a-Zellen eine deutlich vergrößerte Zelloberfläche und eine flache Morphologie sowie einen etwa einen um den Faktor 10 erhöhten Prozentsatz an Zellen mit gesteigerter SA-βGal-Aktivität. Um diesen Seneszenzphänotyp weiter zu bestätigen, wurde zusätzlich zur Bildung von SAHFs die nukleäre Lokalisation von $p21^{WAF}$ als Parallelkriterium herangezogen. Hier zeigten über die Hälfte der TACC3-depletierten Zellen, im Gegensatz zu Zellen, die eine Kontroll-shRNA exprimierten, ein Vorhandensein beider Marker. Damit konnte eine Seneszenzantwort nach Malmitose, analog zu den Befunden für PCM1 und Pericentrin (Srsen *et al.*, 2006), auch für die Depletion von TACC3 nachgewiesen werden. Als wichtige experimentelle Kontrolle wurden MCF7-Zellen ionisierender Strahlung (γ-IR; einmalige Dosis von 20 Gy) ausgesetzt, die DNS-Schädigung hervorruft und so als potenter Auslöser zellulärer Seneszenz gilt (Essmann *et al.*, 2004).

Erstaunlicherweise konnte die Induktion der Seneszenzantwort in TACC3-depletierten Zellen durch die Zugabe niedriger, subzytotoxischer Dosen an Paclitaxel stark beschleunigt werden. Da bekannt war, dass auch die Behandlung mit geringen Mengen an Paclitaxel humane Zellen in die Seneszenz führen kann (Giannakakou *et al.*, 2001), wurde weiterhin getestet, ob die Seneszenzantwort nach TACC3-Depletion in Kombination mit der Gabe von Paclitaxel verstärkt wird. Hierzu wurden die Zellen einen Tag nach Induktion der TACC3-Depletion zusätzlich mit einer Paclitaxel-Dosis von 1 nM für drei weitere Tage inkubiert. Im Vergleich zu ausschließlichen TACC3-Depletion oder ausschließlichen Paclitaxelbehandlung konnte durch die kombinierte Behandlung die Ausprägung der Seneszenzantwort (gemessen an dem Prozentsatz SA-βGal-positiver sowie SAHF/$p21^{WAF}$-doppelpositiver Zellen) beschleunigt und verstärkt werden (Schmidt *et al.*, 2010b). Somit konnte gezeigt werden, dass die Wirkung niedriger Dosen eines Spindelgifts in Kombination mit der verminderten Expression eines Regulators des mitotischen Spindelapparats einen synergistischen Effekt auf die Proliferationsinhibition bzw. die zelluläre Seneszenz in humanen Zelllinien ausüben kann. Dieser synergistische Effekt könnte in der konzeptionellen Entwicklung künftiger Tumortherapien von Bedeutung sein.

Die Irreversibilität des G_1-Arrests ist ein zentrales Dogma zellulärer Seneszenz (Rodier & Campisi, 2011). Jedoch konnte durch mehrere Arbeitsgruppen demonstriert werden, dass eine extrinsische Manipulation zentraler Schlüsselmoleküle des G_1-Zellzyklusarrests den Phänotyp zellulärer Seneszenz *in vitro* sehr wohl revertieren kann. Hierbei wurde gezeigt, dass die Depletion von CKIs (*cyclin dependent kinase inhibitors*), wie $p16^{INK4a}$ oder $p21^{WAF}$ (Pajalunga *et al.*, 2007), die intrazelluläre Injektion neutralisierender Antikörper gegen p53 (Gire & Wynford-Thomas, 1998), oder funktionelle Mutationen von Rb (Sage *et al.*, 2003) in seneszenten humanen Fibroblasten oder embryonalen Nierenzellen den permanenten Zellzyklusarrest aufheben und den Zellen wieder den Wiedereintritt in den Zellzyklus erlauben. Analog zu diesen Literaturbefunden konnte in TACC3-depletierten MCF7-Brustkarzinomzellen nach Wegnahme des TACC3-shRNA-Expressionsinduktors Doxyzyklin und der damit verbundenen Reexpression von TACC3 eine Wiederaufnahme der Proliferation beobachtet werden. Diese Befunde lassen vermuten, dass zelluläre Seneszenz prinzipiell durch externe, nicht-physiologische Einflüsse revertiert werden kann. Erstaunlicherweise war dies nicht nur nach der Inhibition bzw. Wegnahme zentraler Regulatoren des Zellzyklus möglich, sondern auch durch die Reexpression von TACC3, welches nach bisherigem Kenntnisstand lediglich einen Regulator des mitotischen Spindelapparats darstellt. Somit scheint nach TACC3-Depletion ein in seiner Ausprägung abgeschwächter und revertierbarer Seneszenzphänotyp vorzuliegen, während in Kontrollexperimenten nach Behandlung mit ionisierender Strahlung kein Wiedereintritt in den Zellzyklus beobachtet werden konnte.

In seiner Funktion als Regulator der Dynamik und Stabilität des mitotischen Spindelapparats ist TACC3 eng mit der Aktivität der zentrosomalen Aurora-A-Kinase verknüpft, welche TACC3 an Serin 558 phosphoryliert (LeRoy *et al.*, 2007) (Abb.10) und damit dessen Lokalisation an die Zentrosomen ermöglicht. Zelluläre Depletion oder pharmakologische Inhibition von Aurora-A mittels MLN8054 löste in humanen Kolon- und Brusttumor-Zelllinien ebenfalls prämature Seneszenz aus, die durch einen G_1-Zellzyklusarrest und eine erhöhte SA-βGal-Aktivität gekennzeichnet war (Huck *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu TACC3-depletierten Zellen zeigten jedoch etwa ein Fünftel der MLN8054-behandelten Zellen eine apoptotische Antwort (Huck *et al.*, 2010), die möglicherweise auf Nebenwirkungen des Inhibitors zurückzuführen ist oder aber eine unterschiedliche Auswirkung auf mitotische Zellen widerspiegelt. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich mittels hochdurchsatz-basiertem *live cell imaging* erstmals eindrucksvoll demonstriert, dass mitotisch

synchronisierte Zellen eine profunde Variation in der Empfindlichkeit und Zellantwort gegenüber Spindelgiften aufweisen (Gascoigne & Taylor, 2008). Die Inhibition von Aurora-A-Kinase durch MLN8054 unterbindet die Phosphorylierung von TACC3 an Serin 558 und führt damit zu einer stark reduzierten Lokalisation von TACC3 an den Zentrosomen (LeRoy *et al.*, 2007). Somit könnte die Induktion zellulärer Seneszenz nach Aurora-A-Inhibition zu einem Großteil, jedoch nicht vollständig, über die Fehlregulation des Aurora-A-Zielproteins TACC3 vermittelt werden (Abb.10).

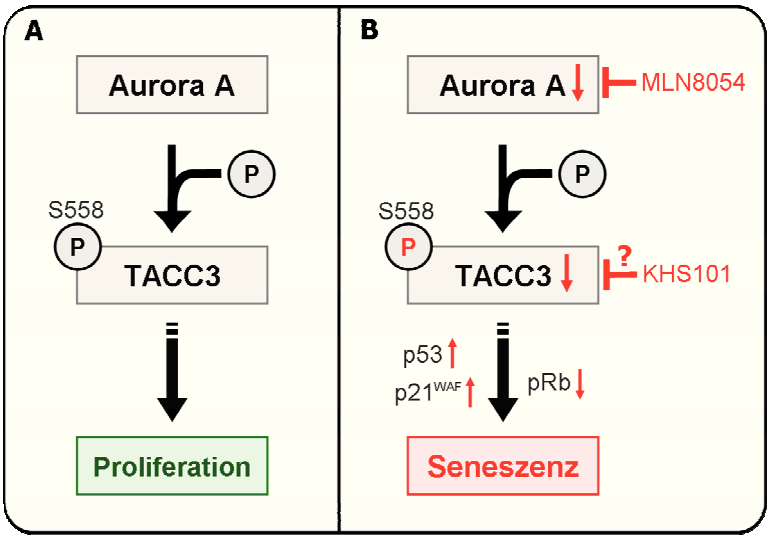


Abb. 10: Regulation von Proliferation durch den Aurora-A-TACC3-Signalweg. (A) Aurora-A-Kinase phosphoryliert während der Mitose TACC3 an Serin 558, welches daraufhin an den Zentrosomen lokalisiert und dort zur Regulation der Dynamik des mitotischen Spindelapparats beiträgt. (B) Die Inhibition (MLN8054) oder Depletion von Aurora-A, genauso wie die Depletion von TACC3, sind jeweils hinreichend für die Induktion zellulärer Seneszenz, welche über die Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs vermittelt wird. Kürzlich wurde außerdem ein Inhibitor (KHS101) gegen TACC3 beschrieben (Wurdack *et al.*, 2010), der in ersten Ansätzen eine starke proliferationsinhibierende Wirkung auf MCF7-Zellen zeigt (unveröffentlichte Befunde). Schemata modifiziert nach Schmidt *et al.*, 2010b.

Hierfür spricht, dass die Seneszenz nach Aurora-A-Inhibition im Gegensatz zum TACC3-Zellmodell irreversibel ist und durch das Wegwaschen des Inhibitors nicht revertiert werden kann (Huck *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass eine pharmakologische Inhibition der Kinase-Aktivität von Aurora-A Seneszenz induzieren kann, eröffnet potentielle Anwendungen in der Tumortherapie. So konnte die Wirkung von MLN8054 bereits *in vivo* bestätigt werden, indem die Proliferation von Tumoren, welche als „*Xenografts*" humaner Kolonkarzinomzellen in Mäusen etabliert wurden, durch Induktion zellulärer Seneszenz inhibiert wurde (Huck *et al.*, 2010). Daher wird MLN8054 derzeit in Phase 1 einer klinischen

Studie an Patienten mit soliden Tumoren hinsichtlich seines antiproliferativen Potentials getestet (Dees *et al.*, 2011).

Inzwischen wurde auch ein Inhibitor für TACC3 (Abb.10) beschrieben, welcher eine prämature Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in Ratten auslöst (Wurdak *et al.*, 2010). In eigenen ersten Experimenten konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass KHS101 auch die Proliferation humaner Brustkarzinomzellen hemmt (unpubliziert). In weiterführenden Ansätzen gilt es zu klären, inwieweit dieser TACC3-Inhibitor einen der TACC3-Depletion vergleichbaren Seneszenzphänotyp induziert und analog zur TACC3-Depletion in Kombination mit Paclitaxel synergistisch die Seneszenzinduktion beschleunigt bzw. verstärkt. Ist dies der Fall, würde KHS101 ein ähnlich vielversprechendes potentielles Tumortherapeutikum darstellen wie MLN8054 und somit TACC3 zu einem weiteren wichtigen Zielprotein in der Entwicklung neuer Therapien werden.

3.1.2 Proteine des Kinetochors und des Spindelkontrollpunkts in der zellulären Seneszenzinduktion und vorzeitigen Alterung

Während der Mitose besitzen neben dem mitotischen Spindelapparat auch die Kinetochore, die auf den Zentromeren der zu segregierenden Schwesterchromatiden assembliert werden, eine bedeutende Funktion für den fehlerfreien Ablauf der Mitose, indem sie eine korrekte Interaktion von Spindelapparat und Kinetochor gewährleisten. Für mehrere strukturelle und regulatorische Proteine des Kinetochors und des Spindelkontrollpunkts konnte inzwischen demonstriert werden, dass deren verminderte Expression mit der Induktion zellulärer Seneszenz assoziiert ist und in bestimmten Fällen sogar vorzeitige Alterung im Mausmodell verursacht (Übersicht in Schmidt *et al.*, 2010a). Ein Beispiel für die Rolle des Kinetochors in der zellulären Seneszenz ist z.B. CENP-A, welches eine Variante des Histon H3 darstellt und die Struktur des Kinetochors am Zentromer stabilisiert (Abb. 4) (Orthaus *et al.*, 2008). Für CENP-A wurde beschrieben, dass dieses sowohl in replikativer als auch in Onkogen-induzierter Seneszenz in seiner Expression herunterreguliert ist und zudem die Depletion von CENP-A in humanen Fibroblasten *per se* Seneszenz induzieren kann (Maehara *et al.*, 2010). CENP-A stellt möglicherweise einen der ersten mitotischen und physiologisch relevanten Alterungsmarker dar, da die CENP-A Expression in Insulin-produzierenden β-Zellen des humanen Pankreas ab dem 30. Lebensjahr stark abnimmt (Lee *et al.*, 2010).

Nichtsdestoweniger stellen aber Komponenten des Spindelkontrollpunkts die derzeit überzeugendste und im Tiermodell eindrucksvollste Verbindung zwischen Malmitose und zellulärer Seneszenz dar. Ein wesentliches Protein ist hierbei Mad2, das am äußeren Kinetochor lokalisiert und die Kontrollfunktion des „*spindle assembly checkpoints*" im Komplex mit den Proteinen BubR1 und Bub1 vermittelt (Musacchio & Salmon, 2007). Mad2-depletierte humane MCF7-Brustkarzinomzellen zeigten eine typische zelluläre Seneszenzantwort und außerdem eine erhöhte Anzahl polyploider Zellen (Prencipe *et al.*, 2009), wobei Polyploidie direkt mit der Induktion zellulärer Seneszenz assoziiert ist (Mosieniak & Sikora, 2010). Bemerkenswert ist, dass nach Mad2-Depletion eine zusätzliche Behandlung mit Paclitaxel, ähnlich wie nach TACC3-Depletion, synergistisch wirkt und eine beschleunigte Seneszenzantwort zur Folge hat. In einer komplementären Studie konnte Seneszenzinduktion nach Überexpression von $p31^{Comet}$, welches Mad2 direkt bindet und damit dessen Funktion inhibiert (Xia *et al.*, 2004), demonstriert werden (Yun *et al.*, 2009). Funktionell wurden diese Befunde dadurch verstärkt, dass Zellen nach Überexpression einer $p31^{Comet}$-Variante mit mutierter Mad2-Bindestelle nicht mehr in der Lage waren, eine zelluläre Seneszenzantwort auszulösen (Yun *et al.*, 2009).

Proteine des Spindelkontrollpunkts, die mit Seneszenz und sogar vorzeitiger Alterung *in vivo* assoziiert sind, sind BubR1, Bub3 und Rae1. Die Gruppe um Jan van Deursen hat als erste Mauslinien generiert, die homozygot hypomorphe Allele für BubR1 ($BubR1^{H/H}$) bzw. haploide Allele für Bub3 und Rae1 ($Bub3^{+/-}/Rae1^{+/-}$) tragen. Hierbei konnten Baker und Kollegen zeigen, dass beide Mausmodelle eine deutlich verkürzte Lebensspanne aufwiesen (Baker *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2006). Zudem traten in diesen Mäusen markante Alterungssymptome auf, die pathobiologisch durch kachektischen Zwergwuchs, Kyphose, grauen Star, Verlust von Fettgewebe der Unterhaut und eine verzögerte Wundheilung charakterisiert waren. Assoziiert waren diese Symptome mit einer erhöhten Anzahl aneuploider und seneszenter Zellen in Geweben dieser Mäuse. Diese wiesen interessanterweise keine erhöhte Anzahl an spontanen Tumoren auf (Baker *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2006), obwohl Aneuploidie mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist (Kops *et al.*, 2005). Aus $BubR1^{H/H}$- und $Bub3^{+/-}/Rae^{+/-}$-Tieren isolierte und *ex vivo* kultivierte MEFs wurden nach nur wenigen Passagen seneszent, wobei dies ebenfalls auf Aneuploidie in den kultivierten Zellen zurückzuführen war. Somit kann die Induktion von zellulärer Seneszenz in diesen genetischen Modellen als präventiver Mechanismus gegen Vermehrung aneuploider Zellen betrachtet werden.

Zusammengefasst demonstrieren nicht nur die Depletion von TACC3, sondern auch die Inhibition und verminderte Expression zahlreicher anderer zentrosomaler Proteine oder Proteine des Kinetochors und Spindelkontrollpunkts die wesentliche Bedeutung von Malmitose als Auslöser prämaturer Seneszenz. Dabei kann deren Induktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als intrinsischer protektiver Mechanismus betrachtet werden, der Zellen nach Malmitose vor der Proliferation und damit vor der Propagierung möglicher genetischer Defekte mit den entsprechenden Folgen schützt. Eine besondere funktionelle Rolle scheint hierbei der Spindelkontrollpunkt einzunehmen, da hier auch *in vivo* gezeigt werden konnte, dass eine Störung dieses „*checkpoints*" zelluläre Seneszenz und letztendlich vorzeitige Alterung verursachen kann.

3.2 Wie bewirkt Malmitose eine Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs als wesentlichen Induktor der zellulären Seneszenzantwort?

Seneszenz nach Malmitose wird wie andere Formen der zellulären Seneszenz über die Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs und den dadurch ausgelösten Arrest in der G_1-Phase des Zellzyklus vermittelt (Abb.2). Anders als zum Beispiel in der Seneszenzantwort nach DNS-Schädigung, welche durch z.B. Doxorubicin oder ionisierende Strahlung hervorgerufen wird und hierbei p53 über die Kinase ATM aktiviert (Roninson *et al.*, 2001), wird Seneszenz nach Malmitose unabhängig von DNS-Schädigung ausgelöst. Insofern stellt sich die Frage, *wie* der Tumorsuppressor p53 aufgrund der Malmitose durch die Inhibition oder verminderte Expression mitotischer Proteine aktiviert wird und nachgeschaltet eine postmitotische Seneszenzantwort auslöst.

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der zwar konstitutiv in der Zelle exprimiert wird, aber unter normalen Bedingungen nur eine kurze Halbwertszeit aufweist. Dies ist dadurch bedingt, dass p53 durch das inhibitorische Protein Mdm2 gebunden wird, welches als E3-Ubiquitinligase fungiert und p53 zum proteasomalen Abbau freigibt (Fang *et al.*, 2000). Nur unter Stresssituationen oder wenn Mdm2 fehlt, kann p53 in ausreichenden Mengen aktiviert werden. Interessanterweise induziert p53 nach seiner Aktivierung nicht nur die Expression seines Zielgens und Zellzyklusinhibitors p21^{WAF}, sondern auch die von Mdm2, wodurch die Aktivität von p53 negativ reguliert wird. Dieser Umstand zeigt sich eindrucksvoll während der Entwicklung, in welcher Mdm2-Defizienz eine frühe, p53-

abhängige embryonale Letalität im Mausmodell bewirkt, die komplett durch eine gleichzeitige p53-Defizienz revertiert werden kann (Jones *et al.*, 1995).

Wie bisher in einigen wenigen Studien gezeigt werden konnte, lokalisiert p53 *per se* während der Mitose an den Zentrosomen (Ciciarello *et al.*, 2001; Tritarelli *et al.*, 2004) und könnte dort eine putative Sensorfunktion beim Auftreten zentrosomaler Defekte einnehmen. Diese Lokalisation ist Mikrotubuli-abhängig, da nach Behandlung mit Nocodazol, welches die Polymerisation der Mikrotubuli reversibel hemmt, p53 nicht mehr an den Spindelpolen nachweisbar war und interessanterweise die anschließende Wegnahme von Nocodazol in einem p53-abhängigen G_1-Arrest resultierte (Ciciarello *et al.*, 2001). Dabei blieb allerdings unklar, wie der G_1-Arrest ausgelöst wurde. Die Autoren vermuteten, dass das Auslösen eines mitotischen Arrests über den Spindelkontrollpunkt direkt zur Aktivierung/Stabilisierung von p53 führen könnte. In einem Versuch, in dem ein mitotischer Arrest nach Behandlung mit Paclitaxel induziert wurde, konnte entsprechend gezeigt werden, dass die Länge dieses Arrests direkt mit dem Ausmaß der Akkumulation und Aktivierung von p53 korrelierte („mitotic clock model", Abb. 11) (Blagosklonny, 2006).

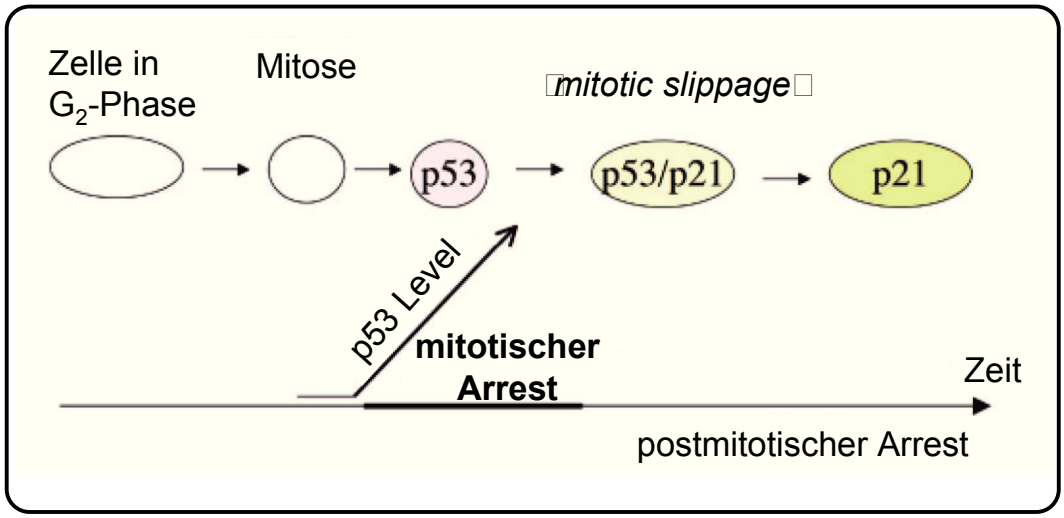


Abb. 11: Das „*mitotic clock model*". Stabilisierung bzw. Aktivierung von p53 während und nach der Mitose kann G_1-Arrest induzieren. Während eines mitotischen Arrests wird der Tumorsuppressor p53 stabilisiert (d.h., nicht abgebaut) und aktiviert, was nach der Mitose zur Transkription des Zellzyklusinhibitors $p21^{WAF}$ führt und damit einen G_1-Arrest zur Folge hat. Modifiziert nach (Blagosklonny, 2006).

Diese Aktivierung wird vermutlich dadurch vermittelt, dass in der Zelle während der Mitose keine Transkription stattfindet und damit Mdm2 nicht in ausreichender Menge *de novo* exprimiert wird. Dadurch wird p53 in der Folge nicht mehr proteasomal degradiert, sondern stabilisiert. Dies führt zwar zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53, da aber während

der Mitose lediglich Translation, nicht aber Transkription erfolgt, kann p53 als Transkriptionsfaktor seine Funktion erst nach Vollendung der Zellteilung oder dem Verlassen der Mitose durch „*mitotic slippage*“ erfüllen. Postmitotisch induziert p53 schließlich die Transkription von $p21^{WAF}$ und induziert damit einen Zellzyklusarrest in der G_1-Phase, welcher zur Seneszenz führt (Abb. 11) (Blagosklonny, 2006).
Dass p53 essentiell für die Seneszenzinduktion nach Malmitose ist, konnte für TACC3, CENP-A und Mad2 eindeutig demonstriert werden. Deren zelluläre Depletion in p53-defizienten oder -inaktiven Zelllinien induzierte keinen G_1-Arrest und somit auch keine Seneszenz (Schneider *et al.*, 2007; Prencipe *et al.*, 2009; Maehara *et al.*, 2010), sondern resultierte vielmehr in Polyploidie und apoptotischem Zelltod.

Interessanterweise existieren zwischen p53 und einigen regulatorischen mitotischen Proteinen direkte molekulare Verbindungen, die die Aktivität von p53 beeinflussen können. Eine wesentliche Entdeckung ist dabei, dass Aurora-A-Kinase den Tumorsuppressor p53 an Serin 315 phosphorylieren und in diesem Falle die Bindung von Mdm2 an p53 und folglich seinen Abbau verstärken kann (Katayama *et al.*, 2004). Durch Aurora-A-Überexpression konnte die Inaktivierung von p53 dementsprechend verstärkt werden, während die Kontrollexpression einer Kinase-inaktiven Aurora-A-Mutante diesen Effekt nicht erzielte. Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion des Spindelkontrollpunktproteins BubR1 mit p53 *in vitro* wie auch *in vivo* beobachtet, die während der Mitose besonders ausgeprägt war, hierbei aber die Phosphorylierung und Aktivierung von p53 verstärkte (Ha *et al.*, 2007).

Zusammenfassend ergibt sich ein Modell, in dem p53 während eines mitotischen Arrests *per se* akkumuliert (Abb. 11) und hierbei zusätzlich durch regulatorische Schlüsselproteine am Zentrosom und Kinetochor, und somit abhängig von der subzellulären Lokalisation, in seiner Stabilität bzw. Aktivität reguliert werden kann.

3.3 Die mögliche Bedeutung der TACC3-TSC2-Interaktion für die Zellteilung und Seneszenzinduktion

Ziel eines weiterführenden Ansatzes war es zu klären, inwieweit TACC3 direkt mit bisher unbekannten Proteinen interagiert, die in die Kontrolle von mitotischer Zellteilung und zellulärer Seneszenz involviert sind. Hierzu wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Miguel Pujana eine Interaktomanalyse für humanes TACC3 durchgeführt. In dem in 2.3 vorgestellten Manuskript wurde ein „*yeast-two-hybrid screen*“ angewandt, in dem, neben den

bereits als Interaktionspartner von TACC3 bekannten Proteinen (wie z.B. ch-TOG) , interessanterweise auch TSC2, der zentrale Regulator der mTOR-Kinase (Abb. 9), identifiziert wurde (Gomez-Baldo *et al.*, 2010).

TACC3-TSC2-Interaktion und Zellteilung

Die Interaktion zwischen TACC3 und TSC2 wurde anschließend biochemisch in mitotisch synchronisierten Zellen überprüft und bestätigt. Der Einsatz von TSC2-Deletionsmutanten ergab, dass TACC3 gezielt mit dem N-Terminus von TSC2 interagieren kann, welcher auch die Bindestelle für TSC1 darstellt. Für eine subzelluläre Darstellung der TACC3-TSC2-Interaktion wurde die Lokalisation beider Proteine während der Mitose mittels konfokaler Laserraster-Mikroskopie überprüft. Hierbei kolokalisiert TSC2 in der (Pro)Metaphase mit TACC3 am gesamten mitotischen Spindelapparat. Während der Telophase und Zytokinese findet sich TSC2, anders als TACC3, welches weiterhin an den Spindelpolen und der Zentralspindel verbleibt, ausschließlich an der zytokinetischen Brücke wieder. Des Weiteren wurde das durch Akt am Serin 939 phosphorylierte TSC2, welches TSC1 nicht mehr binden kann, mittels eines TSC2 (pS939)-spezifischen Antikörpers fokussiert an den Spindelpolen und analog zu TSC2 an der zytokinetischen Brücke nachgewiesen. Interessanterweise wird hierbei an diesen mitotischen Strukturen TSC2 (pS939) nach zellulärer TACC3-Depletion nicht mehr oder nur in verringertem Maße bzw. delokalisiert vorgefunden (Gomez-Baldo *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen sind erste Hinweise darauf, dass die Spindelpol-Lokalisation von TSC2/TSC2 (pS939) direkt über die Bindung an TACC3 vermittelt wird, während die Abwesenheit von TSC2 an der zytokinetischen Brücke nach TACC3-Depletion durch eine veränderte Dynamik der Zentralspindel bewirkt sein könnte. Nichtsdestoweniger resultiert die Abwesenheit von TACC3 oder TSC2 in vergleichbaren zellulären Defekten. Kulturen TSC2- oder TACC3-defizienter MEFs zeigen hierbei einen erhöhten Prozentsatz von Zellen mit abnormalen Zytokinesebrücken (Gomez-Baldo *et al.*, 2010).

Während der Zytokinese wird die Ausbildung des kontraktilen Aktinrings in der Teilungsfurche über die Aktivität der GTPase RhoA vermittelt (Birkenfeld *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2007). Da bekannt ist, dass mTORC2 (Abb. 9) über RhoA die Formation des Aktinzytoskeletts reguliert (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004), wäre denkbar, dass ein putativer TACC3-TSC2-mTORC2-Signalweg über RhoA die Zytokinese steuert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass TSC2 im Rahmen der Zellmigrations-

und Zelladhäsionkontrolle die Aktivität von RhoA stimuliert (Astrinidis *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde in der hier beschriebenen Interaktomanalyse ARHGEF2, ein GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) von RhoA, als Interaktionspartner von TACC3 identifiziert und diese Interaktion in ersten Koimmunopräzipitations-Experimenten bestätigt (Gomez-Baldo *et al.*, 2010). ARHGEF2 spielt hierbei als RhoA-Aktivator eine essentielle Rolle für die Mitose und Zytokinese (Birkenfeld *et al.*, 2007). Somit könnte TACC3 die RhoA-Aktivität während der Zellteilung nicht nur über die Interaktion mit TSC2, sondern zusätzlich auch über ARHGEF2 regulieren.

TACC3-TSC2-Interaktion und Seneszenzinduktion

Das Auslösen zellulärer Seneszenz erfordert die Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs. Neuere Literaturbefunde zeigen jedoch, dass Rapamycin, ein spezifischer Inhibitor des mTORC1-Signalwegs (Abb. 9), die zelluläre Seneszenzantwort trotz p53-Aktivierung verhindern kann (Demidenko *et al.*, 2009). Analog zu diesen Erkenntnissen kann zelluläre Seneszenz nach Malmitose durch TACC3-Depletion ebenfalls durch gleichzeitige Rapamycingabe verhindert werden (unpubliziert). Diese Beobachtungen stellen wichtige Hinweise auf die essentielle Rolle der mTOR-Kinase in der Seneszenzregulation dar. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung des p53-p21^{WAF}-Signalwegs nur einen Zellzyklusarrest in der G_1-Phase auslöst, es aber für die Etablierung zellulärer Seneszenz der anhaltenden Aktivierung von mTORC1 bedarf (Korotchkina *et al.*, 2010).

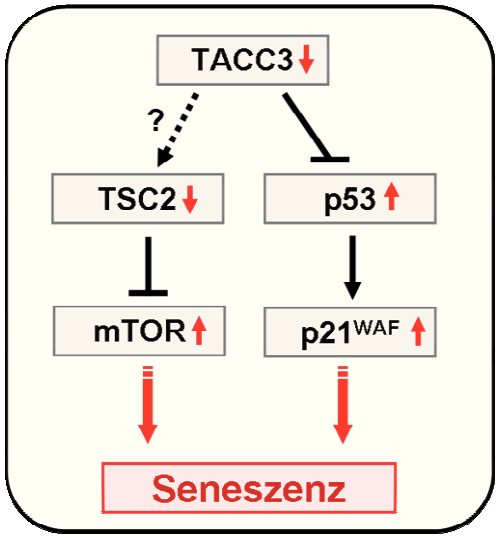


Abb. 12: Bedeutung der mitotischen TACC3-TSC2-Interaktion für die zelluläre Seneszenzinduktion (Arbeitsmodell). Durch TACC3-Depletion wird hierbei eine (möglicherweise synergistische) Effektor- und Seneszenzantwort (rot) über die Aktivierung des p53-p21^{WAF}- und mTOR-Signalwegs induziert. Beide Signalwege sind *per se* notwendig, um zelluläre Seneszenz auszulösen. Zu weiteren Erklärungen s. Text.

Dementsprechend konnte eine verstärkte Expression von TSC2, dem zentralen negativen Regulator von mTORC1, die Etablierung der Seneszenzantwort hemmen (Demidenko *et al.*, 2009; Demidenko *et al.*, 2010), während TSC2-Depletion in G_1-arretierten Zellen die Ausprägung der Seneszenz deutlich verstärkt (Korotchkina *et al.*, 2010). Interessanterweise wurden auch in auch Angiofibromen der Gesichtshaut von „*tuberous sclerosis*"-Patienten seneszente Zellen gefunden (Toyoshima *et al.*, 1999). Auf diese Weise wurde eine funktionsterminierende Mutation im *TSC2*-Gen mit der Induktion zellulärer Seneszenz assoziiert.

Insgesamt ergibt sich derzeit ein Modell, in dem die vollständige Ausprägung zellulärer Seneszenz nach Malmitose nur durch die gleichzeitige Aktivierung der p53-$p21^{WAF}$- und TSC2-mTOR-Signalwege gewährleistet ist. TACC3 könnte hierbei eine übergeordnete regulative Rolle einnehmen, die mechanistisch eine direkte (*Interaktion mit TSC2*) und indirekte (*Aktivierung von p53 durch Malmitose*) Komponente beinhaltet.

3.4 Die Bedeutung zellulärer Seneszenz für die Suppression und Promotion von Tumorentwicklung

Aufgrund gradueller Telomerverkürzung zeigen humane Fibroblasten unter *in vitro* Kulturbedingungen eine limitierte replikative Lebensspanne, an deren Ende ein irreversibler G_1-Zellzyklusarrest steht (Hornsby, 2003). Dieser Prozess wurde initial von Hayflick und Kollegen entdeckt und als replikative Alterung bzw. replikative Seneszenz beschrieben (Hayflick, 1965). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass Seneszenz nicht allein als zelluläres Alterungsmodell verstanden werden kann, da weitere, extrinsische und intrinsische, nicht mit Telomerverkürzung assoziierte, Stressoren ebenfalls Seneszenz induzieren können („Stress-induzierte prämature Seneszenz", SIPS), die nicht auf primäre Zellen *in vitro* beschränkt ist (Toussaint *et al.*, 2000). Unter den bekannten Auslösern von SIPS finden sich erstaunlicherweise auch solche Faktoren, die die Entstehung von Tumoren sowohl initiieren, als auch fördern können (z.B. DNS-Schädigung oder Mutation/Überexpression von Onkogenen) (Campisi, 2010).

Vor diesem Hintergrund erscheint die Frage interessant, ob und inwieweit zelluläre Seneszenz wirklich einen wirksamen Schutz eines Gewebes oder Organismus vor der vollständigen Transformation einzelner, bereits prämaligner Zellen darstellt (Abb.13). Durch einen permanenten Zellzyklusarrest, wie ihn die zelluläre Seneszenz darstellt, könnte die

Propagierung zellulärer Defekte und damit die mögliche Tumorentstehung unterbunden werden. Wesentlich für die Initiierung dieses G_1-Arrests ist die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und die p53-abhängige Expression von $p21^{WAF}$ (Campisi, 2010). Da p53 in vielen Tumoren mutiert bzw. inaktiviert ist (Tomasini *et al.*, 2008), ist die Induktion zellulärer Seneszenz in diesen nicht mehr möglich. Daher ist davon auszugehen, dass zelluläre Seneszenz nur in prämalignen Zellen, oder aber generell in Zellen, welche noch über ein funktionelles p53 verfügen, einen wirksamen Schutz des Gewebes bzw. des Organismus vor der Entstehung maligner Tumore bieten kann (Abb. 13).

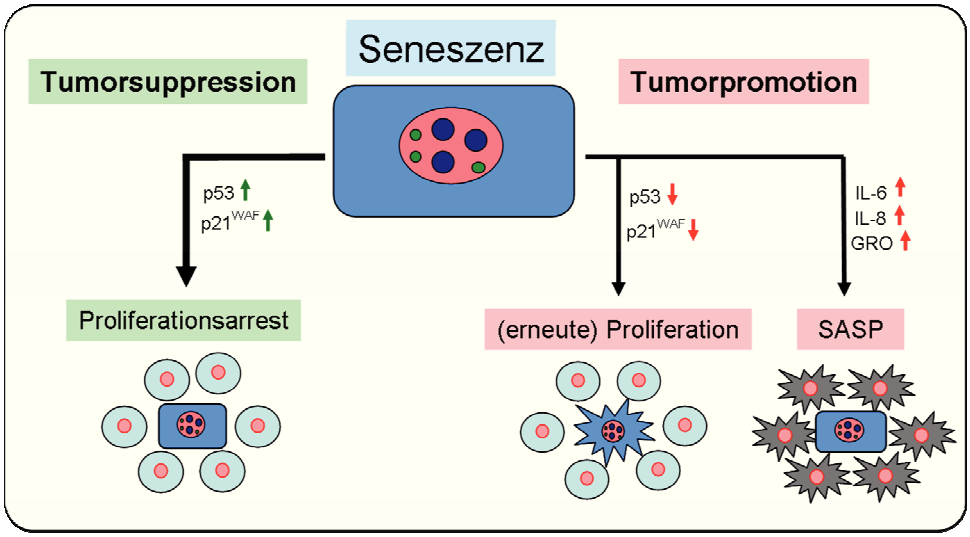


Abb. 13: Die Bedeutung der zellulären Seneszenz für die Suppression und Promotion der Tumorentwicklung. Durch den induzierten Zellzyklusarrest können entartete Zellen nicht mehr proliferieren, so dass ihre Expansion tumorsupprimierend gestoppt wird. Jedoch können einige wenige seneszente Zellen durch die Inaktivierung von essentiellen, Zellzyklusarrest-aufrechterhaltenden Proteinen diesen Arrest aufheben und erneut in den Zellzyklus eintreten. Zudem sekretieren seneszente Zellen mehrheitlich diverse lösliche Faktoren, wie z.B. Interleukin 6 (IL-6) (Seneszenz-assoziierter sekretorisches Phänotyp, SASP), welche wiederum die Tumorentwicklung und Expansion prämaligner Zellen fördern können. Modifiziert nach Rodier & Campisi, 2011 .

Diese Schlußfolgerung wird durch Befunde aus der Literatur gestützt, in denen in prämalignen Darm-Adenomen vermehrt seneszente Zellen detektiert werden konnten, während die Zahl seneszenter Zellen in späteren Stadien, d.h. in malignen Adenokarzinomen, deutlich geringer war (Braig *et al.*, 2005; Arzt *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte *in vivo* gezeigt werden, dass in prämalignen murinen Geweben, welche eine konstitutiv-aktive Ras-Mutante exprimierten, vermehrt seneszente Zellen nachgewiesen werden konnten, während in malignen Tumoren, wie Lymphomen, in dem besagten Mausmodell deutlich seltener seneszente Zellen auftraten (Braig *et al.*, 2005). Zudem konnte in diesen Mäusen beobachtet werden, dass eine genetische Deletion von p53 die Induktion von Seneszenz in prämalignen

Geweben unterband und entsprechend die Entwicklung vom Lymphomen förderte (Braig *et al.*, 2005). Nichtsdestotrotz konnte für Zellen aus murinen Lymphomen demonstriert werden, dass in Einzelfällen auch maligne Zellen seneszent werden können, wobei die Seneszenzinduktion von der erfolgreichen genetischen Reaktivierung des Tumorsuppressors p53 abhängig war (Abb. 13) (Schmitt *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2007).

Da Aneuploidie mit der Entstehung maligner Tumore assoziiert ist (Kops *et al.*, 2005), kann die Induktion von zellulärer Seneszenz nach Malmitose ebenfalls als protektiver Mechanismus gegen Tumorentstehung angesehen werden. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 eingehend diskutiert wurde, kann sowohl die Inhibition bzw. Depletion von Aurora-A, als auch die Depletion von TACC3 zelluläre Seneszenz auslösen (Abb.10) (Huck *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2010b). Somit könnte, analog zur Aurora-A-Kinase, deren spezifischer Inhibitor MLN8054 bereits in Phase 1 einer klinischen Studie getestet wird (Dees *et al.*, 2011), auch TACC3 ein wichtiges Zielprotein in der Entwicklung neuer Tumortherapien darstellen. Inzwischen wurde auch ein Inhibitor von TACC3 beschrieben (Wurdak *et al.*, 2010), welcher die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen von Ratten fördert und in ersten eigenen Vorarbeiten eine starke proliferationsinhibierende Wirkung auf humane MCF7-Brustepithelzellen zeigt (unpubliziert). Weiterführende biochemische und zelluläre Untersuchungen werden zeigen, ob der TACC3-Inhibitor KHS101 (i) mit der Aurora-A-vermittelten Phosphorylierung und zentrosomalen Lokalisation von TACC3 interferiert, (ii) die Expression und Halbwertszeit von TACC3 beeinflusst, (iii) einen der TACC3-Depletion vergleichbaren Seneszenzphänotyp hervorruft, und (iv) analog zur TACC3-Depletion in Kombination mit geringen Dosen Paclitaxel die Seneszenzinduktion synergistisch verstärkt. Daher ist es denkbar, dass die klassische chemotherapeutische Behandlung von Tumoren mit Spindelgiften wie Paclitaxel zukünftig durch gezielte Inhibition zentrosomaler und Mikrotubuli-assoziierter Proteine wie Aurora-A oder TACC3 unterstützt werden kann.

Weitere, teils überraschende Erkenntnisse aus der Literatur, legen die Vermutung nahe, dass seneszente Zellen auch einen positiven Einfluss auf die Tumorentwicklung nehmen können. Hierfür würde sprechen, dass in einer Vielzahl unabhängiger Studien demonstriert werden konnte, dass sowohl die Inzidenz maligner Tumore (Campisi, 2003; Hinkal *et al.*, 2009; Cherdyntseva *et al.*, 2010), als auch die Häufigkeit seneszenter Zellen (Erusalimsky & Kurz, 2005; Jeyapalan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009) in verschiedenen Spezies, insbesondere in mitotisch aktiven Geweben, positiv mit zunehmendem Alter korrelieren. Bisher blieb jedoch

ungeklärt, ob der zuvor genannten positiven Korrelation von Inzidenz maligner Tumore und der Häufigkeit seneszenter Zellen ein realer kausaler Zusammenhang zugrunde liegt.

Insbesondere die Arbeitsgruppe um Judith Campisi konnte eindrucksvoll belegen, dass zelluläre Seneszenz unter bestimmten Umständen die Entwicklung maligner Tumore fördern kann (Rodier & Campisi, 2011). In seneszenten Fibroblasten konnte hierbei die verstärkte Sekretion zweier Mediatoren, Amphiregulin und „growth related oncogene (GRO)", beobachtet werden, welche *in vitro* die Proliferation prämaligner Epithelzellen fördern konnte (Coppe *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass seneszente Zellen mehrheitlich eine Reihe löslicher Faktoren, wie Zytokine, sezernieren, die in der Literatur als „Seneszenz-assoziierter-sekretorischer-Phänotyp" (SASP) zusammengefasst sind (Abb. 13) (Fumagalli & d'Adda di Fagagna, 2009; Young & Narita, 2009). Für Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), zwei bedeutende Bestandteile des SASP, konnte nachgewiesen werden, dass ihre Sekretion durch seneszente Zellen *in vitro* prämaligne Epithelzellen nach deren epithelialer-mesenchymaler-Transsition (EMT) zur Invadierung der Basalmembran stimulieren können (Coppe *et al.*, 2008). *In vivo* wurden prämaligne Epithelzellen spezifisch durch seneszente Zellen stimuliert, maligne Tumore auszubilden, wenn die prämalignen Epithelzellen zuvor zusammen mit seneszenten Fibroblasten in Mäuse injiziert wurden (Krtolica *et al.*, 2001). Darüber hinaus beschleunigte die gleichzeitige Injektion von seneszenten Zellen und malignen Tumorzellen das Tumorwachstum in Mäusen (Liu & Hornsby, 2007). Interessanterweise konnte in eigenen Genexpressionsstudien TACC3-depletierter, seneszenter MCF7-Zellen keine Erhöhung von IL-6 und IL-8 beobachtet werden. Da die mRNS-Mengen löslicher Komponenten des SASPs deren Proteinmengen reflektieren, ist davon auszugehen, dass auch die Proteinkonzentrationen für IL-6 und IL-8 in seneszenten MCF7 nach TACC3-Depletion unverändert sind. Hieraus lässt sich folgern, dass zumindest in diesem Zellmodell durch Depletion des zentrosomalen Proteins TACC3 keine löslichen Faktoren sezeniert werden, von denen bekannt ist, dass sie ihrerseits die Tumorentstehung begünstigen können.

Schließlich konnte demonstriert werden, dass auch die Manipulation zentraler Proteine der Zellzykluskontrolle, wie p53 (Roberson *et al.*, 2005), $p21^{WAF}$ (de Carne Trecesson *et al.*, 2011) oder Rb (Sage *et al.*, 2003), zu einem Wiedereintritt seneszenter Zellen in den Zellzyklus führen kann (Abb. 13). Dies ist für den Erfolg einer Tumortherapie unter Umständen von höchster Relevanz, da seneszente gegenüber proliferierender Tumorzellen weit weniger suszeptibel für Spindelgifte wie z.B. Paclitaxel sind. Daher kann angenommen werden, dass ein Teil der in der Literatur dokumentierten Rezidive nach einer Chemotherapie

aus ehemals seneszenten Zellen hervorgegangen sein könnten, die z.B. durch eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 wieder in den Zellzyklus eingetreten sind.

Zelluläre Seneszenz stellt somit im Vergleich zur Apoptose tumorbiologisch und therapeutisch ein zweischneidiges Schwert dar, da es als Tumorsuppressor mit einer Hemmung der Expansion prämaligner Zellen assoziiert ist, auf der anderen Seite aber über primäre (Zellzykluskontrolle) und sekundäre, aber inkomplett verstandene Mechanismen (z.B. SASP), tumorfördernd wirken kann.

4. Zusammenfassung

Die mitotische Zellteilung ist Vorrausetzung für die Entwicklung, proliferative Hömöostase und Regeneration von Geweben. Die fehlerfreie Verteilung der Chromosomen während der Mitose auf die Tochterzellen wird durch den Spindelapparat gewährleistet, dessen Funktion und Dynamik wesentlich durch die Zentrosomen reguliert wird. Störungen in der Architektur oder Funktion des mitotischen Spindelapparats führen in der Regel zu Malmitose, fehlerhafter Chromosomen-segregation und somit Aneuploidie. Dies kann in der Folge Zelltod durch Apoptose, aber auch postmitotischen G_1-Arrest und hierbei zelluläre Seneszenz induzieren.

Zu Beginn dieser Dissertation war Seneszenz als Stressantwort auf Malmitose, hervorgerufen durch Depletion einzelner zentrosomaler Proteine wie z.B. Pericentrin, nur unzureichend charakterisiert und die hier zugrundeliegenden molekularen Mechanismen waren unverstanden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung des zentrosomalen und tumorassoziierten Proteins TACC3 (*Transforming Acidic Coil Coil 3*), einem wesentlichen Regulator der mitotischen Spindeldynamik, in der Proliferationskontrolle und Seneszenzinduktion auf zellulärer und molekularer Ebene zu charakterisieren. In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass shRNA-vermittelte TACC3-Depletion in den humanen Brustepithel-Zelllinien MCF7 und MCF10a, im Gegensatz zu DNS-schädigenden Einflüssen wie ionisierende γ-Strahlung, ausschließlich zelluläre Seneszenz, nicht aber Apoptose auslöst. Diese Seneszenzantwort war durch die Aktivierung des p53-$p21^{WAF}$-Tumorsuppressorwegs, Induktion eines Zellzyklusarrests in der G_1-Phase und das Auftreten typischer Seneszenzmerkmale (z.B. erhöhte SA-βGal-Positivität) gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang wurde die Bildung Seneszenz-assoziierter, heterochromatischer Foci (SAHF) in Kombination mit der nukleären Lokalisation des Zellzyklusinhibitors $p21^{WAF}$ in TACC3-depletierten Zellen als neuer und robuster, quantitativer Marker für die Beurteilung seneszenter Zellen etabliert. Diese Daten werden in ihrer Bedeutung durch Literaturbefunde komplementiert, in denen nach Inhibition der zentrosomalen und TACC3-regulierenden Kinase Aurora-A ebenfalls prämature Seneszenz ausgelöst wurde.

In einem nächsten Schritt konnte im Rahmen einer *Yeast-Two-Hybrid*-basierten TACC3-Interaktomanalyse TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex Protein 2*), der zentrale Regulator der mTOR-Kinase, als neuer Interaktionspartner von TACC3 identifiziert und diese Interaktion in Coimmunopräzipitations- und subzellulären Colokalisations-Experimenten in mitotisch arretierten Zellen näher charakterisiert werden. Interessanterweise erfüllt TSC2 das Kriterium eines Regulators, der in die mTOR-abhängige Kontrolle von mitotischer

Zellteilung *und* zellulärer Seneszenz involviert ist. Da TACC3- und TSC2-defiziente Fibroblasten ähnliche zytokinetische Defekte aufweisen und hierbei sowohl TACC3- als auch TSC2-Depletion bzw. Defizienz mit zellulärer Seneszenz assoziiert ist, könnte der TACC3-TSC2-Interaktion eine übergeordnete funktionelle Rolle in der Proliferationskontrolle mitotischer Zellen zukommen.

Ein wichtiger Befund dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die Seneszenzantwort nach TACC3-Depletion durch die Zugabe niedriger, subtoxischer Dosen des Spindelgifts Paclitaxel wesentlich verstärk werden kann, so dass TACC3-Depletion Tumorzellen offensichtlich für die antiproliferative Wirkung von Spindelgiften sensibilisiert. Daher ist es denkbar, dass die klassische chemotherapeutische Behandlung von Tumoren mit Spindelgiften zukünftig durch gezielte Inhibition zentrosomaler Proteine unterstützt werden kann.

5. Abstract

Mitotic cell division is a prerequisite for development, proliferative homeostasis and tissue regeneration. At this, the centrosomes play a key role in the regulation of the function and dynamics of the mitotic spindle apparatus in order to ensure an error-free chromosomal allocation to both daughter cells. An impaired mitotic spindle function, e.g. due to structural defects, normally causes a disturbed mitotic progression and chromosome segregation defects potentially leading to aneuploidy. As a consequence, cells may undergo apoptotic cell death or post-mitotic G_1-arrest characterized by the induction of cellular senescence.

Premature senescence as a stress response to mitotic defects, caused e.g. by cellular depletion of a single centrosomal protein like Pericentrin, and the underlying molecular mechanisms were at the beginning of this dissertation rather ill-defined. Therefore, the aim of this study was to characterize the role of the centrosomal and tumour-associated protein TACC3 (*Transforming Acidic Coiled Coil 3*), a major regulator of mitotic spindle dynamics, in proliferation control and cellular senescence at a cellular and molecular level. Using the human mammary epithelial cell line models MCF7 and MCF10a, it could be demonstrated that shRNA-mediated inhibition of TACC3 expression, in contrast to DNA-damaging influences like ionizing γ-radiation, exclusively triggers cellular senescence without inducing any apoptotic response. This senescence program was characterized by the activation of the p53-$p21^{WAF}$ tumour suppressor pathway, induction of a complete G_1-arrest, and the appearance of markers typical for cellular senescence (e.g. increased SA-βGal activity). In this regard, the formation of senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) in combination with the nuclear localization of the cell cycle inhibitor $p21^{WAF}$ in TACC3-depleted cells emerged as a new and robust marker for the evaluation and quantification of senescent cells. The findings from above are complemented by recent data from the literature demonstrating that inhibition of Aurora-A, a centrosomally localized and TACC3-regulating kinase, triggers likewise premature senescence in human tumour cell lines.

In the course of a a yeast-two-hybrid based screen in order to identify novel TACC3-interacting proteins, TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex Protein 2*), the central cellular regulator of mTOR kinase, could be identified as a binding partner of TACC3. This interaction was verified and characterized on a biochemical and cellular level in coimmunoprecipitation and subcellular colocalization studies using mitotically synchronized cells. Interestingly, for TSC2 regulatory roles have been described for both mTOR-dependent control of mitotic cell divison and the induction of cellular senescence. In line with this,

TACC3- and TSC2-deficient fibroblasts display similar cytokinetic defects, and cellular depletion of either TACC3 or TSC2 can trigger premature senescence. Taken together, these data indicate that the TACC3-TSC2 interaction could be functionally engaged in a higher-ranking role in proliferation control of mitotic cells.

Importantly, the cellular senescence response upon TACC3 depletion could be considerably strengthened by treatment with low, subtoxic amounts of the spindle poison paclitaxel, indicating that tumour cells are sensibilized by TACC3 depletion to the antiproliferative effects of spindle poisons. Therefore, it is conceivable that in future the classical chemotherapeutic treatment of tumours with spindle poisons may be enhanced by a targeted inhibition of selective centrosomal proteins.

6. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1
AHRGEF2	Rho guanine nucleotide exchange factor 2
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC/C	Anaphase promoting complex / cyclosome
Aurora-A	Aurora Kinase A
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog
Bub3	Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog
BubR1	Budding uninhibited by benomyl related-1
Cdc20	Cell division cycle 20
Cdc25	Cell division control protein 25
Cdk	Cyclin dependent kinase
ch-TOG	Colonic, hepatic tumour overexpressed gene
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanin nucleotide Exchange Faktor
γ-IR	γ-irradiation
HP-1	Heterochromatic protein 1
Mad2	Mitotic arrest deficient homolog 2
MCF10a	Michigan Cancer Foundation 10a (Brustepithelzelllinie)
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7 (Brustkarzinomzelllinie)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
OIS	Oncogen induced senescence
PLK1	Polo like kinase1
pRb	Phosphorylated Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
Rb	Retinoblastoma Protein
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RhoA	Transforming protein RhoA
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
S6K	Protein S6 kinase 1
SA-βGal	Senescence Associated β-Galaktosidase

SAHF	Senescence associated heterochromatic foci
shRNA	Small-hairpin ribonucleic acid
SIPS	Stress-induzierte prämature Seneszenz
TACC	Transforming Acidic Coiled Coil
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex Protein 1
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex Protein 2

7. Literaturverzeichnis

Arzt E, Chesnokova V, Stalla GK, Melmed S (2009). Pituitary adenoma growth: a model for cellular senescence and cytokine action. *Cell Cycle* **8:** 677-678.

Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, Henske EP (2002). Tuberin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. *Oncogene* **21:** 8470-8476.

Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* **36:** 744-749.

Baker DJ, Jeganathan KB, Malureanu L, Perez-Terzic C, Terzic A, van Deursen JM (2006). Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol* **172:** 529-540.

Barnard DC, Cao Q, Richter JD (2005). Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Mol Cell Biol* **25:** 7605-7615.

Birkenfeld J, Nalbant P, Bohl BP, Pertz O, Hahn KM, Bokoch GM (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell* **12:** 699-712.

Blagosklonny MV (2006). Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint: how p53 measures the duration of mitosis. *Cell Cycle* **5:** 971-975.

Bond J, Jones C, Haughton M, DeMicco C, Kipling D, Wynford-Thomas D (2004). Direct evidence from siRNA-directed "knock down" that p16(INK4a) is required for human fibroblast senescence and for limiting ras-induced epithelial cell proliferation. *Exp Cell Res* **292:** 151-156.

Booth DG, Hood FE, Prior IA, Royle SJ (2011). A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *EMBO J* **30:** 906-919.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436:** 660-665.

Brito DA, Rieder CL (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* **16:** 1194-1200.

Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132:** 79-88.

Calligaris D, Verdier-Pinard P, Devred F, Villard C, Braguer D, Lafitte D (2010). Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell Mol Life Sci* **67:** 1089-1104.

Campisi J (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* **3:** 339-349.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8:** 729-740.

Campisi J (2010). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* **21:** 107-112.

Cherdyntseva NV, Gervas PA, Litvyakov NV, Stakcheeva MN, Ponomaryeva AA, Dobrodeev AY, Denisov EV, Belyavskaya VA, Choinzonov EL (2010). Age-related function of tumor suppressor gene TP53:contribution to cancer risk and progression. *Exp Oncol* **32:** 205-208.

Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL (2006). TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **281:** 8313-8316.

Ciciarello M, Mangiacasale R, Casenghi M, Zaira Limongi M, D'Angelo M, Soddu S, Lavia P, Cundari E (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* **276:** 19205-19213.

Collado M, Serrano M (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6:** 472-476.

Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281:** 29568-29574.

Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6:** 2853-2868.

Currais A, Hortobagyi T, Soriano S (2009). The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **1:** 363-371.

Dai BN, Yang Y, Chau Z, Jhanwar-Uniyal M (2007). Polo-like kinase 1 regulates RhoA during cytokinesis exit in human cells. *Cell Prolif* **40:** 550-557.

David R (2011). Cell migration: MTORC2 brings up the rear. *Nature reviews Molecular cell biology* **12:** 74.

de Carne Trecesson S, Guillemin Y, Belanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, Gamelin E, Juin P, Barre B, Coqueret O (2011). Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins. *J Biol Chem* **286:** 12825-12838.

Dees EC, Infante JR, Cohen RB, O'Neil BH, Jones S, von Mehren M, Danaee H, Lee Y, Ecsedy J, Manfredi M, Galvin K, Stringer B, Liu H, Eton O *et al* (2011). Phase 1 study of MLN8054, a selective inhibitor of Aurora A kinase in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **67:** 945-954.

Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV (2009). Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle* **8:** 1888-1895.

Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV (2010). Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 9660-9664.

Diederichs S, Baumer N, Ji P, Metzelder SK, Idos GE, Cauvet T, Wang W, Moller M, Pierschalski S, Gromoll J, Schrader MG, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H *et al* (2004). Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex. *J Biol Chem* **279:** 33727-33741.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 9363-9367.

Dupre A, Boyer-Chatenet L, Gautier J (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol* **13:** 451-457.

Erusalimsky JD, Kurz DJ (2005). Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* **40:** 634-642.

Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2004). Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* **64:** 7065-7072.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275:** 8945-8951.

Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F (2009). SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat Cell Biol* **11:** 921-923.

Gascoigne KE, Taylor SS (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell* **14:** 111-122.

Gascoigne KE, Taylor SS (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* **122:** 2579-2585.

Gavet O, Pines J (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* **18:** 533-543.

Gergely F, Draviam VM, Raff JW (2003). The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. *Genes Dev* **17:** 336-341.

Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV (2001). Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* **20:** 3806-3813.

Giet R, McLean D, Descamps S, Lee MJ, Raff JW, Prigent C, Glover DM (2002). Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *The Journal of cell biology* **156:** 437-451.

Gire V, Wynford-Thomas D (1998). Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol* **18:** 1611-1621.

Golka K, Selinski S, Lehmann ML, Blaszkewicz M, Marchan R, Ickstadt K, Schwender H, Bolt HM, Hengstler JG (2011). Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the "wimp SNPs". *Arch Toxicol*. ; DOI: 10.1007/s00204-011-0676-3

Gomez-Baldo L, Schmidt S, Maxwell CA, Bonifaci N, Gabaldon T, Vidalain PO, Senapedis W, Kletke A, Rosing M, Barnekow A, Rottapel R, Capella G, Vidal M, Astrinidis A *et al* (2010). TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division. *Cell Cycle* **9:** 1143-1155.

Goncharova EA, Goncharov DA, Li H, Pimtong W, Lu S, Khavin I, Krymskaya VP (2011). mTORC2 is Required for Proliferation and Survival of TSC2-Null Cells. *Mol Cell Biol*. DOI:10.1128/MCB.01061-10

Ha GH, Baek KH, Kim HS, Jeong SJ, Kim CM, McKeon F, Lee CW (2007). p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res* **67:** 7155-7164.

Hari M, Loganzo F, Annable T, Tan X, Musto S, Morilla DB, Nettles JH, Snyder JP, Greenberger LM (2006). Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules. *Mol Cancer Ther* **5:** 270-278.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6:** 387-400.

Hartwell LH, Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246:** 629-634.

Hayflick L (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37:** 614-636.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14:** 501-513.

Hinkal G, Parikh N, Donehower LA (2009). Timed somatic deletion of p53 in mice reveals age-associated differences in tumor progression. *PLoS ONE* **4:** e6654.

Hornsby PJ (2003). Replicative senescence of human and mouse cells in culture: significance for aging research. *Mech Ageing Dev* **124:** 853-855.

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* **28:** 4104-4115.

Huck JJ, Zhang M, McDonald A, Bowman D, Hoar KM, Stringer B, Ecsedy J, Manfredi MG, Hyer ML (2010). MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* **8:** 373-384.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4:** 648-657.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* **17:** 1829-1834.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6:** 1122-1128.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273:** 9357-9360.

Jeng JC, Lin YM, Lin CH, Shih HM (2009). Cdh1 controls the stability of TACC3. *Cell Cycle* **8:** 3529-3536.

Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U (2007). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* **128:** 36-44.

Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378:** 206-208.

Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Pathol Int* **56:** 503-509.

Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36:** 55-62.

Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* **7:** 331-342.

Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 14973-14977.

Kiemeney LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Gudmundsson J, Zanon C, Kostic J, Masson G, Bjarnason H, Palsson ST *et al* (2010). A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* **42:** 415-419.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110:** 163-175.

Kinoshita K, Noetzel TL, Pelletier L, Mechtler K, Drechsel DN, Schwager A, Lee M, Raff JW, Hyman AA (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *The Journal of cell biology* **170:** 1047-1055.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5:** 773-785.

Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV (2010). The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)* **2:** 344-352.

Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hodny Z, Lukas J, Bartek J (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* **10:** 457-468.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 12072-12077.

Langkau N, Martin N, Brandt R, Zugge K, Quast S, Wiegele G, Jauch A, Rehm M, Kuhl A, Mack-Vetter M, Zimmerhackl LB, Janssen B (2002). TSC1 and TSC2 mutations in tuberous sclerosis, the associated phenotypes and a model to explain observed TSC1/ TSC2 frequency ratios. *Eur J Pediatr* **161:** 393-402.

Lauffart B, Vaughan MM, Eddy R, Chervinsky D, DiCioccio RA, Black JD, Still IH (2005). Aberrations of TACC1 and TACC3 are associated with ovarian cancer. *BMC Womens Health* **5:** 8.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5:** 187-195.

Lee SH, Itkin-Ansari P, Levine F (2010). CENP-A, a protein required for chromosome segregation in mitosis, declines with age in islet but not exocrine cells. *Aging (Albany NY)* **2:** 785-790.

LeRoy PJ, Hunter JJ, Hoar KM, Burke KE, Shinde V, Ruan J, Bowman D, Galvin K, Ecsedy JA (2007). Localization of human TACC3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on Ser558 by Aurora A: a novel pharmacodynamic method for measuring Aurora A activity. *Cancer research* **67:** 5362-5370.

Liu D, Hornsby PJ (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* **67:** 3117-3126.

Lobjois V, Jullien D, Bouche JP, Ducommun B (2009). The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochim Biophys Acta* **1793:** 462-468.

Lodish HF (2000). *Molecular cell biology*, 4th edn. W.H. Freeman: New York.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10:** 457-468.

Maehara K, Takahashi K, Saitoh S (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* **30:** 2090-2104.

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15:** 1067-1077.

Mollinedo F, Gajate C (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8:** 413-450.

Mosieniak G, Sikora E (2010). Polyploidy: the link between senescence and cancer. *Curr Pharm Des* **16:** 734-740.

Musacchio A, Salmon ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8:** 379-393.

Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113:** 703-716.

Orthaus S, Biskup C, Hoffmann B, Hoischen C, Ohndorf S, Benndorf K, Diekmann S (2008). Assembly of the inner kinetochore proteins CENP-A and CENP-B in living human cells. *Chembiochem* **9:** 77-92.

Ou Y, Zhang M, Rattner JB (2004). The centrosome: The centriole-PCM coalition. *Cell Motil Cytoskeleton* **57:** 1-7.

Pajalunga D, Mazzola A, Salzano AM, Biferi MG, De Luca G, Crescenzi M (2007). Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol* **176:** 807-818.

Peset I, Vernos I (2008). The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. *Trends Cell Biol* **18:** 379-388.

Piekorz RP, Hoffmeyer A, Duntsch CD, McKay C, Nakajima H, Sexl V, Snyder L, Rehg J, Ihle JN (2002). The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. *EMBO J* **21:** 653-664.

Prencipe M, Fitzpatrick P, Gorman S, Tosetto M, Klinger R, Furlong F, Harrison M, O'Connor D, Roninson IB, O'Sullivan J, McCann A (2009). Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness in vitro. *Br J Cancer* **101:** 1900-1908.

Przewloka MR, Glover DM (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* **43:** 439-465.

Qin XQ, Livingston DM, Ewen M, Sellers WR, Arany Z, Kaelin WG, Jr. (1995). The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol Cell Biol* **15:** 742-755.

Rieder CL, Maiato H (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell* **7:** 637-651.

Rieder CL (2011). Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **19:** 291-306.

Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **65:** 2795-2803.

Rodier F, Campisi J (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192:** 547-556.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4:** 303-313.

Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424:** 223-228.

Santaguida S, Musacchio A (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* **28:** 2511-2531.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14:** 1296-1302.

Schmidt S, Essmann F, Cirtea IC, Kuck F, Thakur HC, Singh M, Kletke A, Janicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B, Piekorz RP (2010a). The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence. *Cell Cycle* **9:** 4469-4473.

Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, Janicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B, Piekorz RP (2010b). The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene* **29:** 6184-6192.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109:** 335-346.

Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B, Piekorz RP (2007). The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. *J Biol Chem* **282:** 29273-29283.

Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B, Piekorz RP (2008). TACC3 depletion sensitizes to paclitaxel-induced cell death and overrides p21WAF-mediated cell cycle arrest. *Oncogene* **27:** 116-125.

Schuendeln MM, Piekorz RP, Wichmann C, Lee Y, McKinnon PJ, Boyd K, Takahashi Y, Ihle JN (2004). The centrosomal, putative tumor suppressor protein TACC2 is dispensable for normal development, and deficiency does not lead to cancer. *Mol Cell Biol* **24:** 6403-6409.

Sexl V, Diehl JA, Sherr CJ, Ashmun R, Beach D, Roussel MF (1999). A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene* **18:** 573-582.

Solomon H, Brosh R, Buganim Y, Rotter V (2010). Inactivation of the p53 tumor suppressor gene and activation of the Ras oncogene: cooperative events in tumorigenesis. *Discov Med* **9:** 448-454.

Spyridopoulos I, Isner JM, Losordo DW (2002). Oncogenic ras induces premature senescence in endothelial cells: role of p21(Cip1/Waf1). *Basic Res Cardiol* **97:** 117-124.

Srsen V, Gnadt N, Dammermann A, Merdes A (2006). Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *J Cell Biol* **174:** 625-630.

Still IH, Hamilton M, Vince P, Wolfman A, Cowell JK (1999a). Cloning of TACC1, an embryonically expressed, potentially transforming coiled coil containing gene, from the 8p11 breast cancer amplicon. *Oncogene* **18:** 4032-4038.

Still IH, Vince P, Cowell JK (1999b). The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines. *Genomics* **58:** 165-170.

Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I (2010). Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem* **285:** 16978-16990.

Tomasini R, Mak TW, Melino G (2008). The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol* **18:** 244-252.

Toussaint O, Dumont P, Dierick JF, Pascal T, Frippiat C, Chainiaux F, Sluse F, Eliaers F, Remacle J (2000). Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann N Y Acad Sci* **908:** 85-98.

Toyoshima M, Ohno K, Katsumoto T, Maki H, Takeshita K (1999). Cellular senescence of angiofibroma stroma cells from patients with tuberous sclerosis. *Brain Dev* **21:** 184-191.

Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, Soddu S, Cundari E (2004). p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **15:** 3751-3757.

Ulisse S, Baldini E, Toller M, Delcros JG, Gueho A, Curcio F, De Antoni E, Giacomelli L, Ambesi-Impiombato FS, Bocchini S, D'Armiento M, Arlot-Bonnemains Y (2007). Transforming acidic coiled-coil 3 and Aurora-A interact in human thyrocytes and their expression is deregulated in thyroid cancer tissues. *Endocrine-related cancer* **14:** 827-837.

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445:** 661-665.

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ; DOI:10.1038/nrm3115

Waizenegger I, Gimenez-Abian JF, Wernic D, Peters JM (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* **12:** 1368-1378.

Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8:** 311-323.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124:** 471-484.

Wurdak H, Zhu S, Min KH, Aimone L, Lairson LL, Watson J, Chopiuk G, Demas J, Charette B, Halder R, Weerapana E, Cravatt BF, Cline HT, Peters EC *et al* (2010). A small molecule accelerates neuronal differentiation in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 16542-16547.

Xia G, Luo X, Habu T, Rizo J, Matsumoto T, Yu H (2004). Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO J* **23:** 3133-3143.

Yao R, Natsume Y, Noda T (2007). TACC3 is required for the proper mitosis of sclerotome mesenchymal cells during formation of the axial skeleton. *Cancer Sci* **98:** 555-562.

Young AR, Narita M (2009). SASP reflects senescence. *EMBO Rep* **10:** 228-230.

Yun M, Han YH, Yoon SH, Kim HY, Kim BY, Ju YJ, Kang CM, Jang SH, Chung HY, Lee SJ, Cho MH, Yoon G, Park GH, Kim SH *et al* (2009). p31comet Induces cellular senescence through p21 accumulation and Mad2 disruption. *Mol Cancer Res* **7:** 371-382.

Zhang H, Cicchetti G, Onda H, Koon HB, Asrican K, Bajraszewski N, Vazquez F, Carpenter CL, Kwiatkowski DJ (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest* **112:** 1223-1233.

Zhang R, Chen W, Adams PD (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* **27:** 2343-2358.

Zhao L (2008). Gene symbol: TSC2. Disease: Tuberous sclerosis. *Hum Genet* **123:** 113.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Stephan Schmidt
Geburtsdatum:	02.04.1981
Geburtsort:	Wesel
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	-

Schulische Laufbahn:

Juli 1987 - Juni 1991	Grundschule
Juli 1991 - Juni 2000	Gymnasium
Juli 2000 – Juni2001	Zivildienst

Akademische Laufbahn:

Okt. 2001- Sept. 2007	Diplomstudiengang der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Sept.2006 – Juli 2007	Diplomarbeit Diplomzeugnisnote: „ausgezeichnet“
Sept. 2007- Juni 2011	Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Dr. Roland Piekorz und PD Dr. Reza Ahmadian Promotionsnote: „magna cum laude“

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg als ehemaligen und Prof. Dr. Jürgen Scheller als aktuellen Leiter des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und aller technischen Möglichkeiten.

Herr PD Dr. Reza Ahmadian danke ich für die Übernahme des Referates dieser Arbeit sowie für die zahlreichen anregenden Diskussion zu dem Thema dieser Arbeit innerhalb unserer Seminare.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferates und die freundliche Betreuung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Roland P. Piekorz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieses Themas. Die Betreuung und sein Engagement waren während der gesamten Zeit ausgezeichnet und die vielen Anregungen, die zahlreichen Erklärungen und ausdauernden Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit an diversen Kongressen teilzunehmen und dabei viel Neues zu lernen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die hier vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Es wurden keinerlei andere Quellen und Hilfsmittel, außer den angegebenen, benutzt. Zitate aus anderen Arbeiten wurden kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht und es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche von mir unternommen.

Düsseldorf, Mai 2011

