

Funktion und Regulation von Separase in Vertebraten

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Ingo Gorr

Juli 2006

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 5. Juli 2006

Promotionsgesuch eingereicht am:

7. Juli 2006

Tag der mündlichen Prüfung:

14. August 2006

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweite Gutachterin:

PD Dr. Angelika Böttger

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2002 und Juli 2006 unter Anleitung von Dr. Olaf Stemmann in der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Gorr, I. H., Boos, D., und Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* 19, 135-141.

Stemmann, O., Gorr, I. H., und Boos, D. (2006). Anaphase Topsy-Turvy: Cdk1 a Securin, Separase a CKI. *Cell Cycle* 5, 11-13.

Gorr, I. H., Reis, A., Madgwick, S., Boos, D., Wühr, M., Jones, K. T., und Stemmann, O. (2006). Essential CDK1 inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. eingereicht

„Es hat sich einmal wieder ein kleines neues Fenster aufgethan, durch das wir in das dunkle Leben der Zelle sehen können; es erlaubt einen unerwarteten, aber noch sehr undeutlichen und beschränkten Einblick.“

Aus „Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung“
von Walther Flemming, 1882

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Der eukaryontische Zellzyklus	2
2.1.1 Die Etablierung der Schwesterchromatidenkohäsion in der S-Phase	4
2.1.2 Die Auflösung der Kohäsion in der Mitose	6
2.1.2.1 Separase und ihre Inhibition durch Securin	7
2.1.2.2 Securin-unabhängige Regulationen der Anaphase	8
2.1.3 Der Mitoseaustritt und seine Koordination mit Anaphase	10
2.1.4 Die Meiose und ihre Besonderheiten	13
2.2 Der Krallenfrosch als Modellorganismus	15
2.3 Die klinische Bedeutung des Anaphasestudiums	18
2.4 Zielsetzung der Arbeit	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Identifikation der Cdk1-Kinase als neuer Bindungspartner von Vertebraten-Separase	20
3.1.1 Phosphorylierung ist notwendig aber nicht ausreichend für die Securin-unabhängige Inhibition von Separase	20
3.1.2 Durch Phosphorylierung inaktivierte Separase befindet sich im Komplex mit der Cdk1-Kinase	21
3.1.3 Der Separase-Cdk1 Komplex ist in mitotischen Zellen nachweisbar	23
3.1.4 Securin- und Cdk1-Bindung an Separase schließen sich gegenseitig aus	24
3.2 Cdk1 ist ein wirksamer Separaseinhibitor	25
3.2.1 Separaseinhibition im gereinigten System	25
3.2.2 Cdk1 inhibiert Separase in zwei Schritten	27

3.3 Vertebraten-Separase zeigt Homologien zu Cdc6 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.3.1 Identifikation einer zusätzlichen, für die Bindung der Cdk1-Kinase relevanten Region in Separase	29
3.3.2 Vertebraten-Separase ähnelt Cdc6 aus <i>S. cerevisiae</i> bezüglich Cdk1-Bindung	30
3.4 Vertebraten-Separase ist ein Cdk1-Cyclin B1 Inhibitor	34
3.4.1 Cdk1-Kinase im Komplex mit Separase ist inaktiv und kann durch Dissoziation aktiviert werden	34
3.4.2 Separase blockiert die Phosphorylierung wichtiger mitotischer Cdk1-Substrate	36
3.5 Separase-abhängige Cdk1-Kinaseinhibition spielt eine wichtige Rolle beim Übergang von Meiose I nach II in Vertebraten	38
3.5.1 Separase-vermittelte Cdk1-Inhibition hat nur einen schwach modulierenden Effekt auf den Austritt aus Meiose II	38
3.5.2 Die Freisetzung der Kinase aus dem Separase-Cdk1 Komplex führt zu einem Stillstand im Ablauf der Meiose	39
4 Diskussion	45
4.1 Der molekulare Mechanismus der Separase-Cdk1 Komplexbildung	45
4.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Securin- und Cdk1-abhängiger Separaseinhibition	47
4.3 Die physiologische Bedeutung der Cdk1-vermittelten Separaseinhibition	49
4.4 Vertebraten-Separase ist ein <i>S.c.</i> Cdc6-ähnlicher Cdk1-Inhibitor	50
4.5 Separase-vermittelte Cdk1-Inhibition in Mitose und Meiose	52
4.6 Vergleich von Vertebraten- und <i>S. cerevisiae</i> Separase	54

5 Materialien und Methoden	57
5.1 Allgemeine mikrobiologische Techniken	58
5.2 Molekularbiologische Methoden	61
5.3 Zellbiologische Techniken	64
5.4 Proteinbiochemische Methoden	66
5.4.1 Allgemeine Protokolle	66
5.4.2 Expression und Reinigung von Proteinen	70
5.4.3 Aktivitäts- und Bindestudien	76
5.5 <i>Xenopus</i> Protokolle	78
6 Literatur	82
7 Abkürzungen	91
Danksagung	94
Lebenslauf	95

1 Zusammenfassung

Um Aneuploidie zu verhindern, muss die Trennung der Chromosomen in der Anaphase mit hoher Genauigkeit und daher streng reguliert ablaufen. Bisher galt folgendes Modell der eukaryontischen Schwesterchromatidentrennung: Der „anaphase promoting complex/cyclosome“ (APC/C) wird erst aktiviert, wenn alle Chromosomen ordnungsgemäß bipolar an die Mikrotubuli des Spindelapparates angeheftet sind. In seiner Eigenschaft als Ubiquitinligase katalysiert der APC/C dann den proteasomalen Abbau des Anaphaseinhibitors Securin aus dem Komplex mit Separase. Die auf diese Weise als Protease aktivierte Separase löst daraufhin die Anaphase aus, indem sie den Proteinkomplex Kohäsin, welcher die Schwesterchromatiden zusammenhält, spaltet. Das Ausbleiben eines Phänotyps beim Verlust von Securin deutet jedoch auf die Existenz weiterer Regulationsmechanismen der Anaphase hin.

Der APC/C sorgt gleichermaßen für den Abbau von Cyclin B1. Die damit verbundene Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (Cdk1) führt zum Austritt aus der Mitose. Im Gegensatz zur Bäckerhefe, in der die Cdc14-Phosphatase ebenfalls als essentieller Gegenspieler von Cdk1 fungiert, repräsentierte in höheren Eukaryonten der APC/C-abhängige Abbau von Cyclin B1 den einzigen bekannten Mechanismus zur Cdk1-Inaktivierung. Bisher glaubte man, dass nach dem APC/C die zur Anaphase und zum Mitoseaustritt führenden Signalwege strikt getrennt voneinander verlaufen. Daher war die kürzlich gemachte Beobachtung unerwartet, wonach die durch nicht abbaubares CyclinB1 konstitutiv aktivierte Cdk1-Kinase die Schwesterchromatidentrennung in *Xenopus* Eiextrakten blockiert und zwar durch eine Securin-unabhängige Inhibition von Separase. Obwohl die Mutation von Separase an Cdk1-Phosphorylierungsstellen die Kohäsinspaltung in Gegenwart von aktiver Cdk1 wiederherstellte, blieben die molekularen Details der Cdk1-abhängigen Separaseinhibition unklar.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Phosphorylierung zwar notwendig aber nicht hinreichend ist, um Separase zu inaktivieren. Zur Inhibition kommt es erst, wenn in einem zweiten Schritt der Cdk1-Komplex stabil und unabhängig von seiner Kinaseaktivität an zuvor phosphorylierte Separase bindet. Es wurde eine Region in Separase identifiziert, die wahrscheinlich in Abhängigkeit von ihrer Phosphorylierung durch die regulatorische CyclinB1-Untereinheit von Cdk1 erkannt wird. Da sich Securin- und Cdk1-Bindung an Separase gegenseitig ausschließen, stellen sie, anders als ursprünglich angenommen, nicht konvergente sondern parallele Inhibitionsmechanismen dar. Bei der Rekonstitution des Separase-Cdk1 Komplexes wurde eine neue Funktion von Vertebraten-Separase als ein direkter, stöchiometrischer Cdk1-Inhibitor entdeckt, welche unabhängig von der proteolytischen Aktivität ist. Eine durch Mutantenanalyse verifizierte Sequenzhomologie im CyclinB1-bindenden Bereich zwischen Separase und dem Cdk1-Inhibitor Cdc6 aus *S. cerevisiae* bestätigt dieses Ergebnis. Mikroinjektionsexperimente an Oozyten zeigen, dass die Separase-vermittelte Inhibition von Cdk1 eine essentielle Rolle während der Meiose I spielt. Separase ist also nicht nur ein universeller Auslöser der eukaryontischen Anaphase, sondern sie wirkt auch, trotz unterschiedlicher Mechanismen in Hefe und Vertebraten, als konservierter Cdk1-Antagonist und koppelt damit die Anaphase mit dem Austritt aus der Meiose I.

2 Einleitung

2.1 Der eukaryontische Zellzyklus

Die Vervielfältigung von Zellen setzt voraus, dass die Zellinhalte zunächst verdoppelt und dann während der Zellteilung gleichmäßig verteilt werden. Chromosomen sind die Träger der Erbinformation und ihre fehlerfreie Verteilung ist für die Homöostase von herausragender Bedeutung. Die genomische DNA eukaryontischer Zellen wird in der S-Phase („S“ für Synthese) genau einmal repliziert. Gleichzeitig mit ihrer Entstehung während der DNA-Replikation werden die Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms miteinander gepaart. Dem deutschen Zytologen Walther Flemming (1843 - 1905) gelang es mit Hilfe von damals neuartigen, synthetischen Farbstoffen Strukturen in einer Tierzelle lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, die er nach dem griechischen Wort für Farbe „Chromatin“ nannte. Von ihm stammt die erste Beschreibung, dass sich das Chromatin zu Beginn des Teilungsprozesses zu kurzen fadenähnlichen Gebilden verdichtet (Flemming, 1882), die später „Chromosomen“ (gefärbte Körper) genannt werden sollten. Inspiriert durch die dramatischen Bewegungen der Chromosomen während ihrer Segregation, prägte Flemming den Begriff „Mitose“ (abgeleitet vom griechischen Wort für „Faden“; Abb. 1).

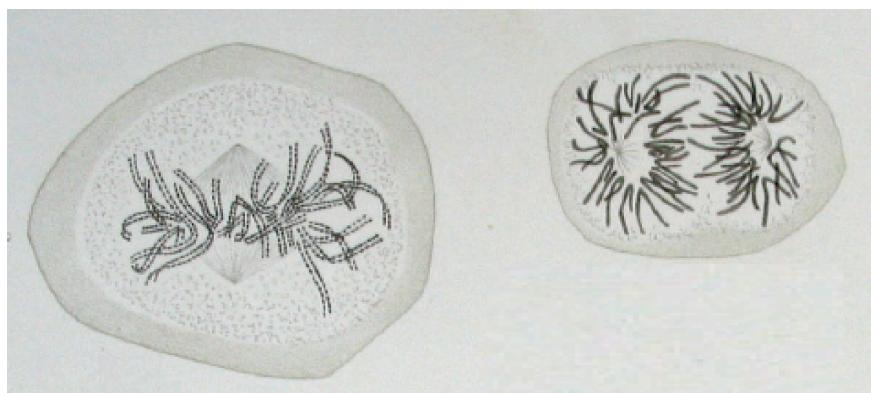


Abb. 1: Walther Flemmings Zeichnungen der Chromosomenteilung um das Jahr 1880. Detaillierte Zeichnungen der Zwei-Chromatid-Chromosomen in der Metaphase (links) und deren Trennung in der Anaphase (rechts). Dargestellt sind Salamanderzellen, gefärbt mit Hämatoxylin. Entnommen aus seinem Buch „Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung“, 1882.

Heute wird die Mitose in die fünf Phasen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase weiter unterteilt (Abb. 2). In der Prophase faltet und verdichtet sich (kondensiert) das Chromatin und die Chromosomen mit den beiden

Schwesterchromatiden und dem zentralen Centromer werden sichtbar. Die beiden Centrosomen mit je einem Centriolenpaar trennen sich und wandern an entgegengesetzte Pole der Zelle. Sie wirken als Mikrotubuli-organisierende Zentren und sind der Ausgangspunkt für den Aufbau der mitotischen Spindel, die sich zunächst sternförmig um die Centriolen anordnet (sog. Aster). Anschließend bilden sich Mikrotubulifasern, die die beiden Pole verbinden (Polfasern). Während dessen depolymerisieren die Mikrotubuli des Zytoskeletts und die Zelle rundet sich ab. Das Ende der Prophase ist erreicht, wenn die Kernhülle fragmentiert. In der Prometaphase zerfällt dann die Kernhülle. Es bilden sich Mikrotubulifasern, die sich an eine Proteinmatrix am Centromer, dem so genannten Kinetochor, anheften. Als Teil der mitotischen Spindel sind die parallel zu den Polfasern angeordneten Kinetochormikrotubuli später für den Transport der getrennten Chromatiden zuständig. Die Chromosomen sammeln sich nun durch die Orientierung an den Polfasern im Zentrum der Zelle. Die Metaphase stellt die dritte Phase der Mitose dar, in der die Chromosomen maximal kondensiert sind. Durch den gleichmäßigen Zug des Spindelapparates richten sich die Chromosomen zwischen beiden Polen in der Äquatorialebene aus. Die Chromosomen haben jetzt die klassische X-Form.

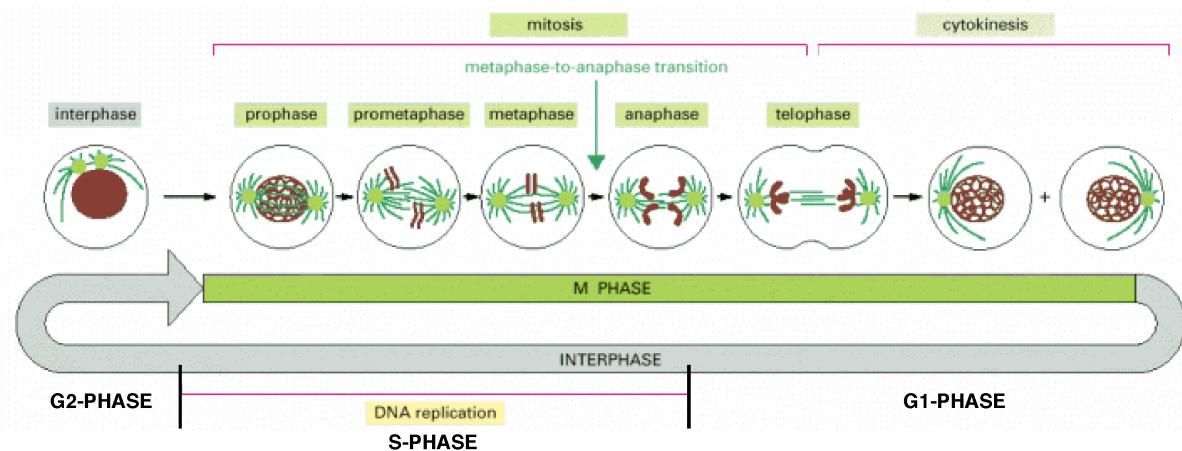


Abb. 2: Die eukaryontische Zellteilung. Die Kernteilung (Mitose) und die Zytoplasmateilung (Zytokinese), zusammen als M-Phase bezeichnet, sind zeitlich ein sehr kurzer Teil des Zellzyklus. Die weitaus längere Phase wird als Interphase bezeichnet und unterteilt sich in die Synthese- (S-) Phase, in der die Schwesterchromatiden verdoppelt werden, sowie die Gap-Phasen G1 und G2. Für die Beschreibung der einzelnen Ereignisse in der M-Phase siehe Text. Chromatin ist in braun, Mikrotubuli in grün und Centrosomen sind in hellgrün dargestellt. Entnommen aus „Molecular biology of the cell“ (Alberts *et al.*, 2002).

Die Trennung der Schwesterchromatiden erfolgt in der Anaphase. Die Kinetochorfasern verkürzen sich und ziehen dabei jeweils die gleiche Anzahl von Chromatiden in Richtung der beiden Pole (Anaphase A). Durch die Verlängerung der Polfasern rücken gleichzeitig die Polregionen auseinander und die Chromatiden trennen sich vollständig (Anaphase B). Die Telophase tritt mit dem Erreichen der Chromosomen an den Polen ein. Die mitotische Spindel depolymerisiert, die Kernhülle wird gebildet und das Chromatin dekondensiert. Während die Mitose als Kernteilung angesehen werden kann, findet die anschließende Teilung des Zytoplasmas in der so genannten Zytokinese statt und schließt die Zellteilung ab. Mitose und Zytokinese werden zusammen als M-Phase bezeichnet (Abb. 2). Zwischen S- und M-Phase liegen die durch Zellwachstum geprägten „Gap“-Phasen. Man nennt diese G1 (zwischen M und S) und G2 (zwischen S und M). G1-, S- und G2-Phase werden als Interphase zusammengefasst. Die Replikation und die Paarung der Chromosomen in der S-Phase sind folglich von der Chromosomenkondensation und -segregation in der M-Phase zeitlich getrennt. Diese Arbeitsteilung wurde erst durch die Kohäsion der Chromatiden in Eukaryonten möglich, da sie als eine Art Gedächtnis noch lange nach der Replikation (bis zu 50 Jahre in Fall von humanen Oozyten) die Zuordnung einander entsprechender Schwesterchromatiden erlaubte. Demgegenüber müssen Bakterien aufgrund fehlender Kohäsion schon während der Replikation mit der Segregation ihres Chromosoms beginnen. Die Entwicklung der Kohäsion ermöglichte auch die Aufteilung der genetischen Information auf mehrere Chromosomen und schaffte gleichzeitig Zeit, diese vor ihrer Segregation in kompakte Transportformen zu kondensieren. Dadurch ermöglichte sie erst die Evolution der großen eukaryontischen Genome. Trotz der frühen und detaillierten Beschreibung der Mitose durch Walther Flemming vergingen etwa einhundert Jahre, bevor ein Verständnis der molekularen Grundlagen von Kohäsion, Kondensation und Segregation begann.

2.1.1 Die Etablierung der Schwesterchromatidenkohäsion in der S-Phase

Die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden wird durch Kohäsin, einem ringförmigen Multiproteinkomplex, in der S-Phase vermittelt. Neue Arbeiten aus dem Labor von Kim Nasmyth sprechen dafür, dass Kohäsin die beiden Schwester-DNA-Doppelstränge topologisch in seiner Mitte einschließt (Ivanov und Nasmyth, 2005). Der Ring wird im Wesentlichen aus den beiden Smc („structural maintenance of

„chromosomes“) Proteinen Smc1 und Smc3 gebildet, welche lange intramolekulare, antiparallele „coiled-coil“ Regionen ausbilden und über eine mittlere Domäne miteinander heterodimerisieren (Abb. 3). Die N- und C-Termini von Smc1 bzw. Smc3 enthalten so genannte Walker-A und Walker-B Motive. In der dreidimensionalen Struktur kommen diese jeweils zusammen und bilden eine ATPase-Domäne, über die durch die Bindung von Scc1/Rad21 der Ringschluss erfolgt. Eine vierte Untereinheit, Scc3, bindet an den C-Terminus von Scc1/Rad21. Humane Zellen, *Xenopus* und andere höhere Eukaryonten besitzen zwei mitotische Orthologe von Scc3, nämlich SA1 und SA2, welche sich gegenseitig ausschließen. Daneben gibt es die lose assoziierte Kohäsinuntereinheit Pds5, die eine mechanistisch unverstandene Rolle in der Aufrechterhaltung der Kohäsion spielt (Losada *et al.*, 2005; Nasmyth und Haering, 2005; Stead *et al.*, 2003).

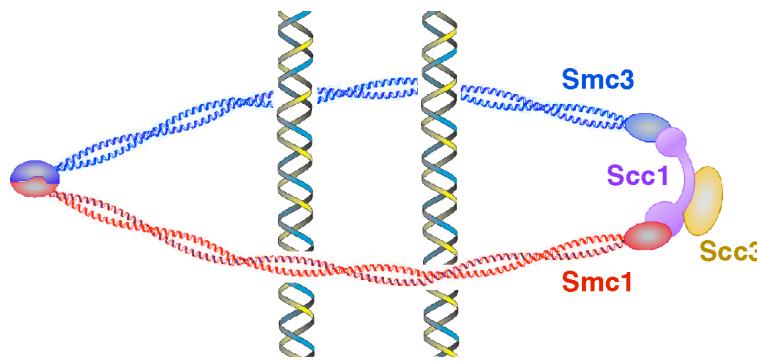


Abb. 3: Der Kohäsinkomplex. Die Kohäsion zwischen den in der S-Phase neu entstehenden Schwesternchromatiden wird durch den Kohäsinkomplex vermittelt. Dabei schließen die „coiled-coil“ Proteine Smc1 und Smc3 die beiden DNA-Doppelstränge ein. Geschlossen wird der Ring durch die Scc1-Untereinheit. Scc3 besitzt regulatorische Eigenschaften.

In *S. cerevisiae* wurden auf genetischem Weg weitere Komponenten identifiziert, die zu verschiedenen Zeitpunkten für die Kohäsion erforderlich sind. Demnach sind Scc2 und Scc4 für die initiale Bindung von Kohäsin an die DNA in der späten G1-Phase notwendig. Im nächsten Schritt, der koreplikativen Etablierung, nicht aber für die Aufrechterhaltung der Kohäsion, wird Eco1/Ctf7 benötigt (Ciosk *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 1999). Diese Acetyltransferase interagiert mit alternativen Formen des Replikationsfaktors C und PCNA, dem Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase δ (Moldovan *et al.*, 2006). Die molekularen Details der Etablierung der Kohäsion sind noch unverstanden. Die Funktionen der ATPaseaktivität von Smc1 und Smc3 sowie der Acetyltransferaseaktivität von Eco1/Ctf7 sind ebenso unklar wie der Mechanismus,

durch den die DNA in den Kohäsinring gelangt. Sowohl Scc2 und Scc4 als auch Eco1/Ctf7 sind funktionell konserviert. Erbliche Defekte in Scc2 bzw. ESCO2, einem von mehreren Eco1/Ctf7-Homologen, führen beim Menschen zum Cornelia de Lange-Syndrom (Strachan, 2005; Tonkin *et al.*, 2004) bzw. zum SC-Phokomelie- und Roberts-Syndrom (Schule *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2005).

2.1.2 Die Auflösung der Kohäsion in der Mitose

In höheren Eukaryonten wird das Kohäsin in zwei Schritten von den Chromosomen entfernt (siehe Abb. 5). In der Prophase dissoziiert der größte Teil des Kohäsins von den Armen der Chromosomen. Im Bereich der Centromere lokalisiertes Kohäsin hält die Schwesternchromatiden jedoch gepaart, bis dieser restliche Anteil in der Anaphase von den Chromosomen abfällt. Die erste Welle der Dissoziation wird durch die mitotischen Kinasen Polo (Plk1 in Mensch, Plx1 in *Xenopus*) und Aurora B unter der Beteiligung vermutlich weiterer Faktoren gesteuert und hängt von der Phosphorylierung der Scc3^{SA2}-Untereinheit ab. Dies wird durch eine persistierende Armkohäsion bei Expression einer nicht phosphorylierbaren Scc3^{SA2}-Mutante deutlich (Hauf *et al.*, 2005; Waizenegger *et al.*, 2000). Wie die Phosphorylierung der peripheren Scc3^{SA2}-Untereinheit zur Ringöffnung führt, ist noch unklar. Das centromerische Kohäsin wird durch die Interaktion mit einem Komplex aus Shugoshin (japanisch für „Beschützergeist“) und der Proteinphosphatase 2A (PP2A) in dieser Phase geschützt und zwar vermutlich durch die PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Scc3^{SA2} und möglicherweise durch eine physikalische Abschirmung des Kohäsins (McGuinness *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006). Die zweite Welle der Dissoziation wird durch die Protease Separase bewirkt, die den Kohäsinring durch enzymatische Spaltung der Scc1/Rad21-Untereinheit öffnet und die damit der entscheidende Auslöser der Schwesternchromatidentrennung ist (Uhlmann *et al.*, 2000). Es ist unklar, ob Shugoshin-PP2A auch die Separase-abhängige Spaltung von Scc1/Rad21 in der Mitose negativ beeinflusst und daher vor dem Beginn der Anaphase inaktiviert werden muss.

Eine zeitliche Korrelation besteht zwischen der ersten Dissoziationswelle von Kohäsin und der Assoziation des verwandten Kondensinkomplexes mit den Chromosomen sowie deren Kondensation. Obwohl eine entsprechende Funktion in zellfreien Extrakten namensgebend für Kondensin war, wird dessen Auswirkung auf die Verkürzung der Chromosomen in ihre mitotische Transportform inzwischen kontrovers diskutiert. Eine

Übereinstimmung scheint es nur darin zu geben, dass Kondensin eine wichtige Funktion in der Organisation der mitotischen Chromosomen besitzt, wodurch ein „Verheddern“ der DNA verhindert wird (Hirano, 2006).

2.1.2.1 Separase und ihre Inhibition durch Securin

Separasen sind große Proteasen von 180 bis 250 kDa und existieren in allen bislang untersuchten Eukaryonten. Außerhalb der gut konservierten C-terminalen proteolytischen Domäne sind die Separasen aus verschiedenen Spezies relativ sequenzdivergent. Die Unterschiede scheinen nur in der Primärstruktur zu bestehen, während die Tertiärstruktur gleichzeitig konserviert ist. Bioinformatische Analysen postulieren für Separasen eine aus ARM/HEAT-Wiederholungen bestehende superhelikale Struktur der N-terminalen Hälfte (Jäger *et al.*, 2004; Viadiu *et al.*, 2005). Innerhalb des aktiven Zentrums bilden ein konserviertes Histidin und ein konserviertes Cystein die katalytische Dyade, welche die Hydrolyse der Peptidbindung nach dem Arginin eines ExxR-Motivs im Zielprotein katalysiert. Aufgrund der konservierten Reste im aktiven Zentrum lassen sich die Separasen dem CD-Klan der Cysteinendopeptidasen zuordnen, welchem u.a. auch die Caspasen angehören (Uhlmann *et al.*, 2000). Vergleichbar den Caspasen schneidet sich die Separase aus Vertebraten nach ihrer Aktivierung selbst (Waizenegger *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). Die Aufspaltung der Separase in die zwei Gene *THR* und *SSE* in *Drosophila melanogaster* könnte dabei einer „konstitutiven Selbstspaltung“ entsprechen (Jäger *et al.*, 2001). Anders als bei Caspasen führt die Autoproteolyse jedoch nicht zur Aktivierung. Stattdessen gibt es Hinweise darauf, dass die Selbstspaltung für bislang unbekannte Funktionen von humaner Separase sowohl beim Eintritt in die Mitose (G2>M Übergang) als auch beim Aufbau der Spindel während der frühen Mitose eine Rolle spielen könnte (Papi *et al.*, 2005).

Der Separase fällt als dem essentiellen, universellen Auslöser der Anaphase eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung eines stabilen Chromosomensatzes zu. Eine vorzeitige Aktivierung der Protease führt zu einem vorzeitigen Verlust der Kohäsion und damit zu Chromosomenfehlsegregationen. Daher muss diese potentiell sehr gefährliche Protease in ihrer Aktivität streng reguliert sein. Mit Securin wurde ein direkter, stöchiometrischer Inhibitor von Separase zunächst in Hefe (Funabiki *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996) und später auch in Metazoen identifiziert (Zou *et al.*,

1999). Trotz der konservierten Funktion zeigen die Securine aus verschiedenen Phyla keinerlei Sequenzhomologie. In humanen Zellen akkumuliert Securin in der G1-Phase. Es bindet und inhibiert Separase während der meisten Zeit des Zellzyklus, bis es am Metaphase-Anaphase Übergang über den Ubiquitin/Proteasom-Weg (s.u.) abgebaut wird und aktive Separase entlässt. Securin ist nicht nur ein Inhibitor sondern gleichzeitig auch ein Aktivator von Separase. Wie Securin die Separaseaktivität stimuliert ist noch unklar. Es könnte helfen, Separase korrekt zu lokalisieren (Jensen *et al.*, 2001) oder es hilft Separase als eine Art „Chaperon“ beim Erreichen eines nativen Faltungszustandes, aus dem die Protease später aktiviert werden kann. Letzteres erinnert an die Regulation von Caspase-aktivierter DNase (CAD), die in einem inaktiven Komplex mit ihrem Inhibitor I^{CAD} gebildet wird und erst bei der apoptotischen Spaltung von I^{CAD} aktiv wird (Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998). Der positive Effekt von Securin auf Separase ist in *S. pombe* und *D. melanogaster* essentiell. Die Deletion von Securin bewirkt in diesen Organismen den gleichen Phänotyp wie der Verlust der Separaseaktivität (Ciosk *et al.*, 1998; Funabiki *et al.*, 1996; Hornig *et al.*, 2002; Stratmann und Lehner, 1996). In anderen Organismen wie *S. cerevisiae* und Vertebraten ist jedoch weder die stimulierende noch die inhibierende Wirkung von Securin auf Separase essentiell. Obwohl die Separasemenge in Abwesenheit von Securin stark erniedrigt ist, zeigen Securin-Knockoutmäuse praktisch keinen Phänotyp (Mei *et al.*, 2001). Da Separase für die Anaphase zwingend notwendig ist, muss die geringere proteolytische Aktivität von Separase im Securin-/ Hintergrund also ausreichen, um die Schwesterchromatiden noch effektiv zu trennen (Kumada *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass Vertebraten-Zellen ohne Securin auch nicht an vorzeitiger Trennung oder Fehlsegregation ihrer Chromosomen leiden, deutet stark darauf hin, dass die Anaphase durch zusätzliche Mechanismen reguliert wird (Pfleghaar *et al.*, 2005).

2.1.2.2 Securin-unabhängige Regulationen der Anaphase

Eine Securin-unabhängige Regulation der Anaphase wurde in *S. cerevisiae* beschrieben. Die Polo-abhängige Phosphorylierung im Bereich der Spaltstellen macht Scc1/Rad21 zu einem deutlich besseren Substrat für Separase. Auch die Behandlung von humanem Scc1/Rad21 mit der Polo-Kinase verbessert dessen Spaltung durch Separase. Allerdings hat die Expression von nicht phosphorylierbaren Mutanten in Hefe und menschlichen Zellen keinen Hinweis darauf erbracht, dass die Phosphorylierung von Scc1/Rad21 für

die Separase-abhängige Schwesterchromatidentrennung unter normalen Bedingungen essentiell ist. Erst wenn die Separasemenge in *S. cerevisiae* durch die Deletion von Securin reduziert wird, wirkt die Expression von nicht phosphorylierbarem Scc1/Rad21 synthetisch letal (Alexandru *et al.*, 2001; Hauf *et al.*, 2005). Vor allem aber gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung von Scc1/Rad21 spezifisch am Ende der Metaphase erfolgt, so dass sie eher eine Voraussetzung und nicht ein Regulationsmechanismus für die Anaphase zu sein scheint.

Im Gegensatz hierzu könnte SUMOylierung möglicherweise den Beginn der Anaphase beeinflussen. SUMO („small ubiquitin-like modifier“) ist ein kleines Protein, das wie das verwandte Ubiquitin kovalent an Substratproteine angeknüpft werden kann (s.u.). Die Depletion der SUMO-Ligase PIAS- β oder die Anwesenheit einer dominant-negativen Mutante des SUMO-konjugierenden Enzyms Ubc9 inhibieren die Trennung der Schwestercentromere und den Beginn der Anaphase in Vertebraten (Azuma *et al.*, 2005; Azuma *et al.*, 2003). Im Einklang damit steht, dass Hefemutanten eines SUMO-dekonjugierenden Enzyms (Smt4) einen frühzeitigen Verlust der Kohäsion in centromernahen DNA-Regionen zeigen (Bachant *et al.*, 2002). Obwohl der Mechanismus, über den SUMOylierung die Anaphase fördert, noch unklar ist, wurden mit Pds5, Kondensin und Topoisomerase II interessante Substrate identifiziert. Pds5 ist sowohl in Hefe als auch in Vertebraten neben der oben erwähnten Aufrechterhaltung der Kohäsion auch für deren Auflösung von Bedeutung. In Hefe wird diese Kohäsinuntereinheit spezifisch in der Anaphase sumoyliert (Stead *et al.*, 2003). Kondensin, das in der Anaphase an repetitive Hefe-rDNA lokalisiert, wird zu diesem Zeitpunkt ebenfalls an einer Untereinheit sumoyliert (D'Amours *et al.*, 2004; Strunnikov *et al.*, 2001). Auch die Konjugation von SUMO an *Xenopus* Topoisomerase III stimmt mit der Anaphase überein (Azuma *et al.*, 2003). Seit langem ist bekannt, dass die Topoisomerase III -abhängige Dekatenation eine Voraussetzung für die Trennung der Schwesterchromatiden darstellt (Shamu und Murray, 1992). Es zeichnet sich jedoch ab, dass die SUMOylierung eine von der katalytischen Aktivität unabhängige, strukturelle Funktion von Topoisomerase III moduliert. In *S. cerevisiae* zeigen Pds5, Kondensin und Topoisomerase III genetische Interaktionen nicht nur mit der SUMO-Enzymkaskade, sondern auch untereinander. Sie könnten daher alle im selben, SUMO-kontrollierten Signalweg der Anaphaseregulation liegen (Aguilar *et al.*, 2005; Stemmann *et al.*, 2005).

2.1.3 Der Mitoseaustritt und seine Koordination mit Anaphase

Der mitotische Zustand einer Zelle korreliert direkt mit der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase (Cdk1), einem Heterotrimer bestehend aus dem regulatorischen Cyclin B1, der katalytischen Cdk1-Untereinheit und daran gebunden dem kleinen Cks-Protein (Abb. 4A), das über eine Phosphopeptidbindestelle bei der Rekrutierung bereits phosphorylierter Substrate helfen könnte (Bourne *et al.*, 1996; Harper, 2001; Landrieu *et al.*, 2001).

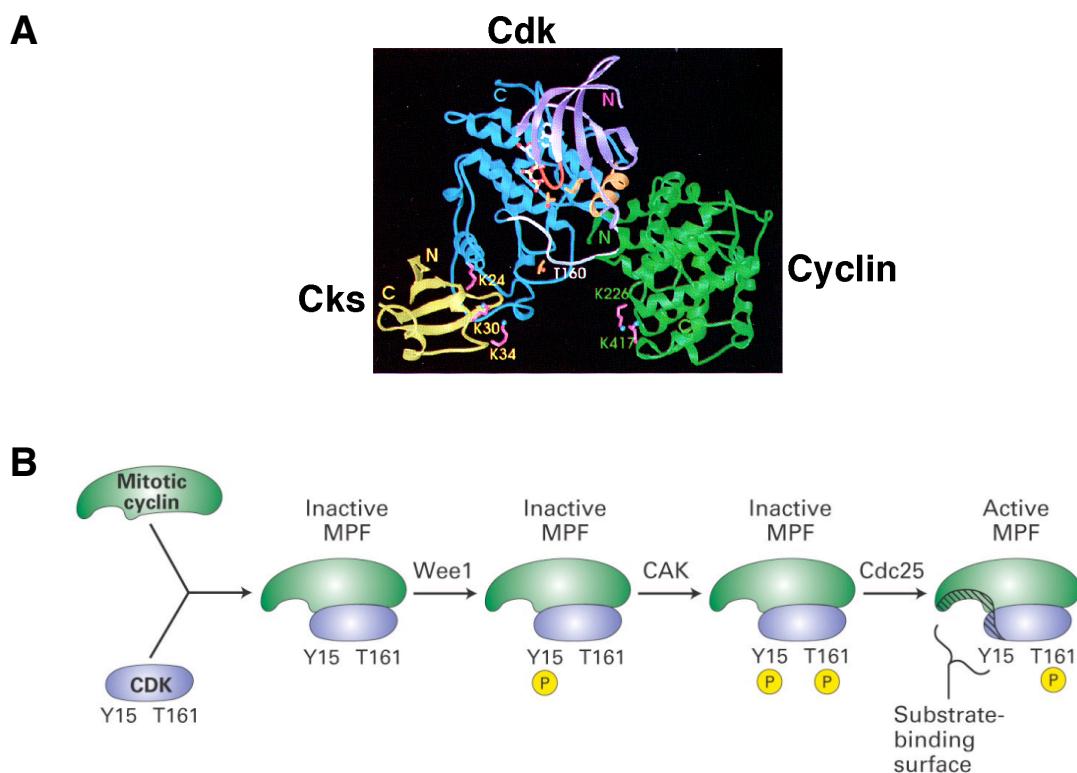


Abb. 4: Die Regulation der Cdk1-Kinase. (A) Struktur eines Cks-Cdk-Cyclin Komplexes, entnommen aus Bourne *et al.*, 1996. (B) Das regulatorische Cyclin ergibt zusammen mit der katalytischen Cdk1-Untereinheit die Cdk1-Kinase, auch „mitosis-promoting factor“ (MPF) genannt. Die Cdk1-Untereinheit kann an drei regulatorischen Stellen phosphoryliert werden: Durch Wee1 an Tyr15, durch Myt1 an Thr14 (nicht gezeigt) und durch die Cdk1-aktivierende Kinase (CAK) an Thr161. Cdk1 ist aktiv, wenn die ersten beiden Phosphorylierungen durch die Cdc25-Phosphatase entfernt wurden und Thr161 monophosphoryliert ist. Entnommen aus „molecular cell biology“ (Lodish *et al.*, 2004).

Cdk1 phosphoryliert Schlüsselproteine der Mitose bevorzugt an Serin- und Threoninresten, auf die C-terminal ein Prolin folgt. Um die volle Aktivität zu erlangen, müssen CDKs nicht nur mit einem Cyclin assoziieren, sondern es müssen auch gleichzeitig die inhibitorischen Phosphorylierungen der Aminosäuren Thr14 und Tyr15

(in humaner Cdk1-Kinase) entfernt und Thr161 phosphoryliert werden (für Details siehe Abb. 2B). Der limitierende Schritt der, für den Mitoseeintritt notwendigen, ersten Cdk1-Aktivierung im frühen embryonalen Zellzyklus von *Xenopus laevis* ist die Akkumulation von Cyclin B1 und in somatischen Zellzyklen die regulierte Dephosphorylierung von Thr14/Tyr15. Demgegenüber gilt der Abbau von Cyclin B1 über den Ubiquitin/Proteasom-Weg (s.u.) als entscheidender Schritt für die Cdk1-Inaktivierung und damit für den Austritt aus der Mitose (Potapova *et al.*, 2006). Eine nicht abbaubare Version von Cyclin B1 arretiert Zellen in der Mitose (Holloway *et al.*, 1993; Wheatley *et al.*, 1997).

Die Ubiquitylierung von Substratproteinen erfolgt über eine Enzymkaskade, bestehend aus dem universellen Ubiquitin-Aktivierungsenzym (E1), den Ubiquitin-Konjugations-enzymen (E2) und den Ubiquitinligasen (E3). Dabei wird das 79 Aminosäuren umfassende Ubiquitin über eine Isopeptidbindung kovalent mit einem Lysinrest des Substratproteins verknüpft. Durch Wiederholungen dieser Reaktion können auf dem Substratprotein lange Polyubiquitinketten aufgebaut werden. Dabei wird das C-terminale Glycin eines neuen Ubiquitinmoleküls an ein Lysin des zuletzt verknüpften Ubiquitins der wachsenden Kette konjugiert (Pickart und Eddins, 2004). Die Polyubiquitylierung führt in den meisten Fällen zum Abbau des Substrates im 26S-Proteasom, einem großen multikatalytischen Proteasekomplex. Der Abbau sowohl von Securin als auch von Cyclin B1 wird durch eine große, aus mehreren Untereinheiten bestehenden Ubiquitinligase vermittelt, dem „anaphase promoting complex“ oder „cyclosome“ (APC/C) in Assoziation mit Cdc20, einem ihrer Kofaktoren. Der APC/C^{Cdc20} erkennt dabei ein als „destruction box“ (DB) bezeichnetes Motiv in den N-Termini von Securin und Cyclin B1 (Glotzer *et al.*, 1991; Peters, 2002; Zur und Brandeis, 2001). Durch diesen gleichartigen Abbau der entscheidenden Regulatorproteine sind die Anaphase und der sich anschließende Austritt aus der Mitose miteinander gekoppelt (Abb. 5).

Die oberste Kontrolle über den Beginn der Anaphase obliegt einem Kontrollmechanismus, dem so genannten „mitotic checkpoint“, der den APC/C^{Cdc20} solange inaktiv hält, bis alle Chromosomen eine ordnungsgemäße, bipolare Orientierung an der Mitosespindel erreicht haben. Solange entweder noch keine Mikrotubuli gebunden haben oder aufgrund einer fehlerhaften Anheftung keine Zugkräfte entstehen (z.B. bei merotelischer Orientierung), wird am betreffenden Kinetochor ein diffundierbares Wartesignal erzeugt, dass den gesamten APC/C^{Cdc20} in

der Zelle stilllegt. Von den zahlreichen Komponenten, die für die Funktionalität des „mitotic checkpoint“ wichtig sind, scheint Mad2 als der direkteste Inhibitor von Cdc20 zu fungieren. Strukturelle und biochemische Untersuchungen führten zum so genannten „template“-Modell, welches an die Prionenhypothese erinnert. Dabei katalysiert das an nicht von Mikrotubuli besetzten Kinetochoren immobilisierte Mad2 die Transformation von freiem Mad2 in eine inhibitorisch aktive Konformation. Erst wenn mit der amphitischen Verknüpfung des letzten Kinetochorenpaars diese Quelle ausgeht, wird die Inhibition des APC/C^{Cdc20} aufgrund des kurzlebigen Wartesignals schnell aufgehoben (De Antoni *et al.*, 2005; Nasmyth, 2005).

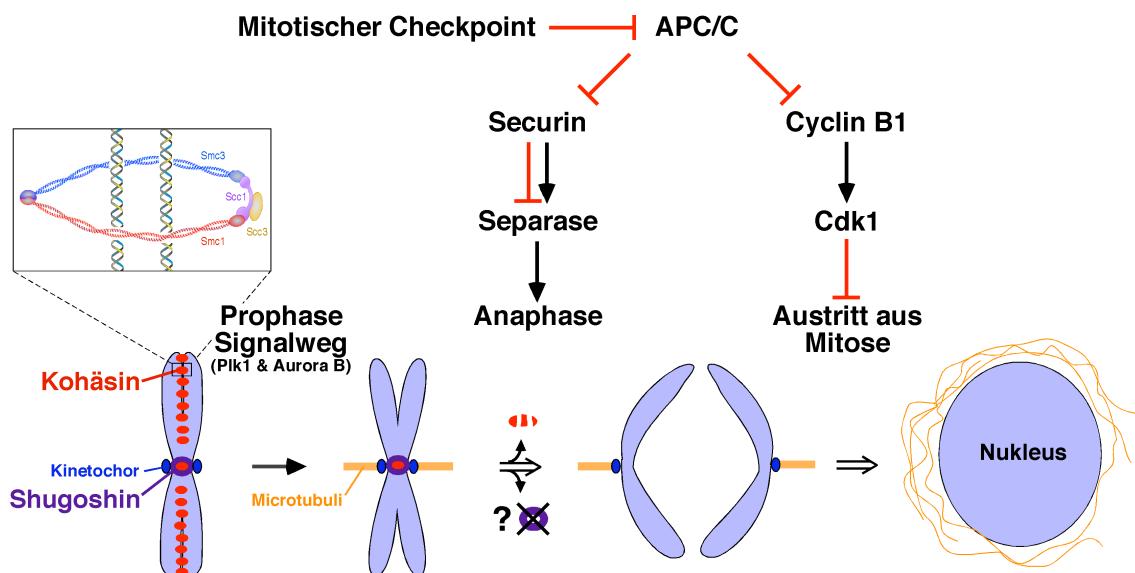


Abb. 5: Späte Ereignisse in der Mitose. Die Dissoziation des Kohäsins erfolgt in höheren Eukaryonten in zwei Wellen. Der Prophasenignalweg führt abhängig von den mitotischen Kinasen Aurora B und Polo zur Auflösung der Armkohäsion. Centromerisches Kohäsin ist in diesem Stadium durch Shugoshin geschützt. Die Dissoziation dieser Kohäsinfaktion erfolgt Separase-abhängig durch die Proteolyse von Scc1. Vor seiner Aktivierung ist Separase im Komplex mit seinem Inhibitor Securin. Beim Übergang von Metaphase zu Anaphase wird der Abbau von Securin durch die Aktivierung des APC/C gesteuert, einer E3 Ubiquitinligase, welche wiederum durch den mitotischen Checkpoint kontrolliert wird. Der APC/C leitet gleichermaßen den Abbau von Cyclin B1 und damit die Inaktivierung von Cdk1 ein. Auf diese Weise wird die Schwesterchromatidentrennung in der Anaphase mit dem Austritt der Zelle aus der Mitose koordiniert. Inhibitorische Effekte sind durch rote, aktivierende durch schwarze Pfeile illustriert. Im unteren Teil des Bildes sind das Chromatin bzw. die Chromosomen in blau, die an den Kinetochoren angreifenden Mikrotubuli und die Interphase-Mikrotubuli in orange dargestellt.

2.1.4 Die Meiose und ihre Besonderheiten

Das Ziel der Meiose besteht darin, ausgehend von diploiden Zellen haploide Gameten mit nur einer Kopie eines jeden Chromosoms zu bilden. Um die Chromosomenzahl zu reduzieren und gleichzeitig sicherzustellen, dass jede Gamete einen kompletten Chromosomensatz erhält, werden mütterliche und väterliche Versionen eines jeden Chromosoms (Homologe) zunächst zu Tetraden gepaart (Synapsis) und dann in der ersten Reifeteilung voneinander getrennt. Reziproke Rekombinationseignisse („crossing-over“) und daraus resultierende Chiasmata zwischen homologen Nicht-Schwesterchromatiden zusammen mit der Armkohäsion zwischen Schwesterchromatiden sind für den Zusammenhalt homologer Chromosomen verantwortlich (Abb. 6). In der ersten Anaphase wird dann Rec8, die meiotische Form von Scc1/Rad21, entlang der Chromosomenarme durch Separase gespalten. Die folgende Aufteilung der Homologen zu entgegengesetzten Polen bei gleichzeitig anhaltender Kohäsion zwischen Schwesterchromatiden ist von zwei weiteren Besonderheiten der Meiose I abhängig: Erstens fusionieren die Schwesterkinetochore jeweils zu einer Einheit und interagieren mit von nur einem Spindelpol ausgehenden Mikrotubuli (monopolare Aufhängung). Zweitens schützt der Komplex aus Shugoshin und PP2A centromerisches Kohäsin vor der Spaltung durch Separase. Dieser Schutz scheint eine Besonderheit des meiotischen Kohäsins zu sein, da die künstliche Expression von Scc1/Rad21 anstelle von Rec8 in *S. cerevisiae* zum vorzeitigen Verlust der Schwesterchromatidenkohäsion in der Meiose I führt (Petronczki *et al.*, 2003; Stemmann *et al.*, 2005).

In der anschließenden zweiten Reifeteilung werden dann, ähnlich wie in der Mitose, die Schwesterchromatiden getrennt und aufgeteilt. Da auch hier die Anaphase durch Separase initiiert wird, setzt dies die (bislang unverstandene) Inaktivierung von Shugoshin-PP2A voraus. Die beiden Chromosomensegregationen in Meiose I und II erfolgen ohne eine zwischengeschobene Replikation der DNA und ohne die Dekondensation der Chromosomen. Gleichzeitig muss jedoch die Spindel der ersten Reifeteilung abgebaut und in der zweiten Reifeteilung durch zwei Meiose II-Spindeln ersetzt werden. Während ersteres von einer effizienten Cdk1-Inaktivierung abhängt, ist letzteres auf die anhaltende Aktivität der Cdk1-Kinase angewiesen. Der Übergang zwischen Meiose I und II ist daher durch eine balancierte, teilweise Cdk1-Inaktivierung gekennzeichnet (Iwabuchi *et al.*, 2000).

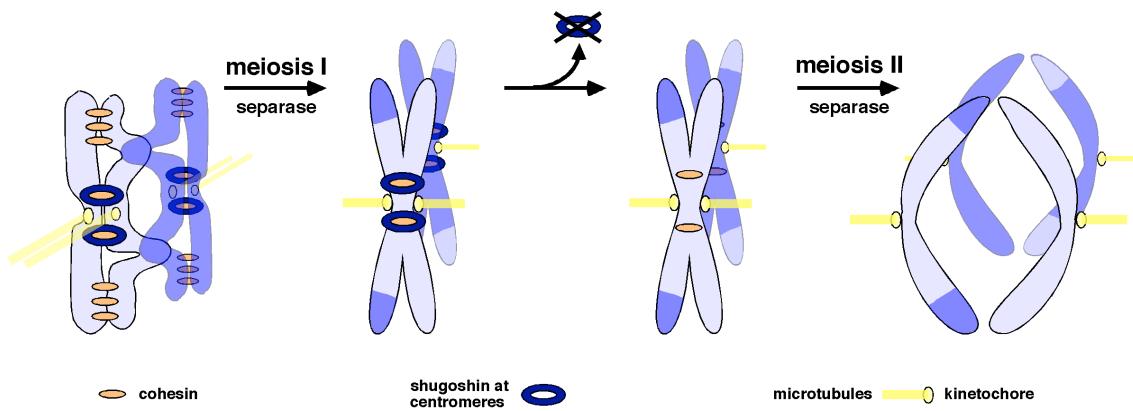


Abb. 6: Schematische Darstellung der Meiose. In der Meiose I werden homologe Chromosomen durch Chiasmata und Kohäsion zwischen den Chromosomenarmen zusammengehalten. Die Schwesterkinetochore werden in dieser Phase durch Mikrotubuli gleicher Polarität innerviert. In Anaphase I wird Separase-abhängig selektiv die Armkohäsion entfernt, da centromerisches Kohäsin durch Shugoshin geschützt ist, und die Homologen trennen sich. In einem erneut von Separase abhängigen Prozess segregieren die Schwesterchromatiden ähnlich wie in der Mitose durch das Entfernen von centromerischem Kohäsin. Entnommen aus Stemmann *et al.*, 2005.

Proteolyse-unabhängige Funktion von Separase in der Bäckerhefe

Interessanterweise besitzt Separase in *S. cerevisiae* (Esp1) eine zusätzliche Funktion, die nicht von ihrer proteolytischen Aktivität abhängt. Sie ist zusammen mit anderen Proteinen wie Spo12 und Slk19 ein Bestandteil des so genannten „Cdc fourteen early anaphase release“ (FEAR) Netzwerkes, welches die Freisetzung der Cdc14-Phosphatase von ihrem Inhibitor Cfi1/Net1 aus dem Nukleolus bewirkt (D'Amours und Amon, 2004). Nach dem Abbau von Securin bindet und inaktiviert Separase dabei eine alternative Form von PP2A und führt so indirekt zu einer inaktivierenden Phosphorylierung von Cfi1/Net1 (Queralt *et al.*, 2006). Die daraufhin freigesetzte, aktive Cdc14-Phosphatase wirkt der Cdk1-Kinase entgegen und fördert dadurch den Austritt aus der Mitose bzw. der Meiose. Wegen MEN („mitotic exit network“), einem alternativen Weg der Cdc14-Aktivierung, ist FEAR nicht essentiell für den Mitoseaustritt. In der Meiose hingegen ist FEAR für die Disassemblierung der Meiose I-Spindel und damit für den Übergang von Meiose I nach II entscheidend, da MEN in dieser Phase abwesend ist (Buonomo *et al.*, 2003; Kamieniecki *et al.*, 2005; Marston *et al.*, 2003). *S. cerevisiae* Separase besitzt also eine Protease-unabhängige, essentielle Funktion als Cdk1-Antagonist in der Meiose. Obwohl Cdc14 konserviert ist, gibt es bislang keinen Hinweis darauf, dass dieser Phosphatase auch bei der Cdk1-

Inaktivierung in Vertebraten eine wichtige Funktion zukommt. Stattdessen scheint hier, anders als in der Bäckerhefe, der APC/C für die Cdk1-Inaktivierung auszureichen.

2.2 Der Krallenfrosch als Modellorganismus

Ein leistungsstarkes Modellsystem zur Erforschung von Mitose und Meiose sind die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*). Der Name Krallenfrosch leitet sich ab von den in Krallen auslaufenden drei inneren Zehen der hinteren Extremitäten, die dem Herausreißen von kleineren Stücken beim Verzehr von Beute dienen. Dieser anspruchslose Frosch wird seit den 40er Jahren als Labortier gehalten und wurde bis 1960 für die Schwangerschaftsdiagnose herangezogen, da geschlechtsreife Weibchen auf die Injektion von Harn schwangerer Frauen aufgrund des darin enthaltenen Choriongonadotropins mit Eiablage reagieren. Später erlangten die Eier der Weibchen immer größere Bedeutung in der Beantwortung zell- und entwicklungsbiologischer Fragestellungen.

Um meiotische Vorgänge zu untersuchen, entnimmt man durch einen minimalen operativen Eingriff unreife Oozyten aus dem Ovar der Weibchen. Die entnommenen Stadium VI-Oozyten sind in der Prophase der Meiose I arretiert. Durch die Zugabe von Progesteron ins Medium lässt sich die Oozytenreifung induzieren, die aus dem Durchlaufen der Meiose bis zum erneuten Arrest in der Metaphase der Meiose III besteht, und für die der Ausstoß eines Polkörpers charakteristisch ist. Die unreifen Oozyten eignen sich aufgrund ihrer Größe sehr gut zur Injektion von mRNA und stellen ein robustes Expressionssystem dar. Zum Ausschalten der Proteinfunktion ist es möglich, Antikörper oder so genannte Morpholino-Oligonukleotide zu injizieren, wobei letztere als „antisense“-Moleküle die Translation der Ziel-mRNA verhindern.

Die nach hormoneller Stimulation der Weibchen abgelegten Eier können *in vitro* leicht befruchtet werden. In den sich teilenden Embryonen lassen sich in Kombination mit Mikroinjektionen frühe Zellzyklen und die weitere Entwicklung sehr gut studieren.

Das Studium des Zellzyklus im zellfreien System

Die aus biochemischer Sicht größte Stärke des *Xenopus* Systems sind jedoch die zytosolischen Eiextrakte, in denen sich alle Ereignisse des Zellzyklus nachahmen lassen (Abb. □). Durch den Zusatz rekombinanter Proteine oder Immundepletion endogener

Proteine lässt sich deren Beteiligung an diversen zellbiologischen Vorgängen, wie z.B. Replikationsinitiation, Änderung der Chromatinstruktur, Proteolyse und Auf- bzw. Abbau des Spindelapparates untersuchen (Liu, 2006). Ausgehend vom Laich gewinnt man durch einfache Zentrifugation einen im Zellzyklus synchronisierten Extrakt (Abb. 7). Das extrahierte Zytosol ist typischerweise aufgrund der Anwesenheit des so genannten zytostatischen Faktors (engl. „cytostatic factor“, CSF) vollständig in der Metaphase der Meiose II arretiert. Neueste Arbeiten aus der Gruppe von Thomas Mayer haben gezeigt, dass der CSF-Arrest auf die Inhibition des APC/C^{Cdc20} durch XErp1 zurückzuführen ist (Rauh *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2006). Als Reaktion auf die Zugabe von Calciumionen, welche die Befruchtung nachahmt, wird XErp1 proteolytisch abgebaut und der Extrakt geht in die Interphase über. Zugesetzte Spermienkerne werden in dieser Phase repliziert, bevor das System (nach der Zugabe eines neuen Aliquots von CSF-Extrakt) mit bipolaren Spindeln in der folgenden Metaphase wieder arretiert. Daraufhin lassen sich die Ereignisse der Anaphase untersuchen, indem man den APC/C^{Cdc20} durch die Zugabe von Calcium erneut aktiviert.

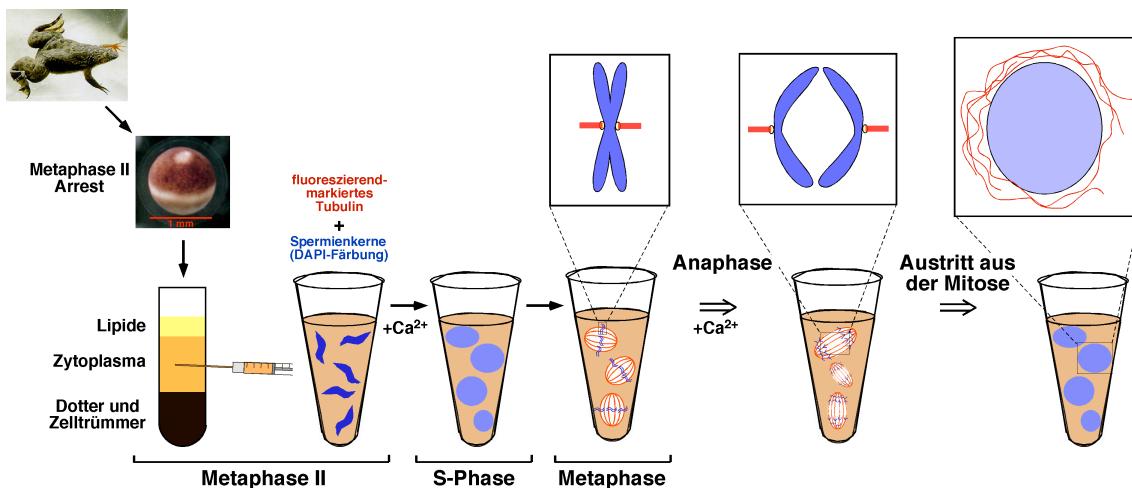


Abb. 7: Der Ablauf der Mitose kann in Extrakten aus *Xenopus* Eiern nachgestellt werden. *Xenopus laevis* Weibchen werden durch Hormoninjektion zur Eiablage stimuliert. Die in Metaphase II arretierten Eier werden zentrifugiert und die das Zytosol enthaltende Fraktion wird extrahiert. Dieser Extrakt kann jetzt mit fluoreszierend-markiertem Tubulin (rot) und Spermienkernen versetzt werden. Unter dem Mikroskop lassen sich dann die Zellzyklusstadien nach Dapi-Färbung des Chromatins (blau) verfolgen. Nach Calciumzugabe wandert der zuvor in Metaphase II arretierte Extrakt synchron durch die Mitose in die Interphase, in der das Chromatin repliziert wird (Interphasekerne: blaue Kreise). Beim Eintritt in die Mitose kondensieren die Chromosomen anschließend und nach erneuter Calciumzugabe erfolgt die Schwesterchromatidentrennung im Extrakt. In den Kästchen sind die Chromatinstadien vergrößert dargestellt.

Die Securin-unabhängige Restriktion der Separaseaktivität

Für die Beurteilung der Schwesterchromatidentrennung ist die sich unmittelbar anschließende Dekondensation der Chromosomen von Nachteil. Andrew Murray und seine Mitarbeiter fanden, dass sich durch die Zugabe von rekombinantem, nicht abbaubarem Cyclin B1, d.h. durch konstitutive Aktivierung von Cdk1, der Austritt eines *Xenopus* Eiextraktes aus der Mitose (bzw. Meiose II) verhindern lässt, ohne dass die Anaphase negativ beeinflusst wird (Holloway *et al.*, 1993). CyclinB1 wurde stabilisiert durch eine 90 Aminosäuren umfassende Deletion im N-terminalen Bereich, die vom APC/C^{Cdc20} erkannte D-Box beinhaltet. Die verkürzte Form wird allgemein CyclinB1 Δ 90 oder kurz Δ 90 genannt. Im Gegensatz zu Δ 90 verhinderte die kompetitive Inhibition des APC/C^{Cdc20} nicht nur den Mitoseaustritt, sondern auch die Anaphase und veranlasste die Autoren dazu, die Existenz vom Anaphaseinhibitor Securin erstmalig zu postulieren. Auf diese wichtige Arbeit geht das Dogma zurück, dass die Signalwege, die zur Schwesterchromatidentrennung einerseits und zum Mitoseaustritt andererseits führen, unterhalb des APC/C^{Cdc20} in Vertebraten strikt getrennt voneinander ablaufen (siehe Abb. 5).

Diese Schlussfolgerung wurde jedoch von Olaf Stemmann und Kollegen in Frage gestellt, als sie herausfanden, dass das System sehr empfindlich auf die Cdk1-Aktivität reagierte und sich zwei effektive Konzentrationen von stabilisiertem Cyclin B1 unterscheiden ließen. Während bei einer Δ 90-Konzentration von 80 nM im Oozytenextrakt der „Murray“-Phänotyp (Trennung der Schwesterchromatiden, aber kein Austritt aus der Mitose) bestätigt wurde, fanden ab 120 nM auch keine Schwesterchromatidentrennung und -segregation mehr statt, obwohl der Securinabbau völlig ungehindert ablief (Stemmann *et al.*, 2001). Diese Cdk1-vermittelte Inhibition der Schwesterchromatidentrennung konnte auf eine Securin-unabhängige Inaktivierung von Separase zurückgeführt werden. Die Kartierung von Phosphorylierungsstellen in Separase und die Analyse entsprechender Mutanten ergab, dass die Phosphorylierung von Serin 1126 für diesen neuen Mechanismus der Separaseinhibition essentiell ist. Der Austausch von Serin gegen Alanin an der Position 1126 war ausreichend, um die Schwesterchromatidentrennung und die Kohäsinspaltung unter den ansonsten restriktiven Bedingungen hoher Cdk1-Aktivität wiederherzustellen. Diese und eine weniger wichtige Phosphorylierungsstelle an der Position 1346, die ebenfalls zur Cdk1-abhängigen Inhibition von Separase beiträgt, stellen Konsensusmotive für die Cdk1-

Kinase dar, d.h. sie weisen ein Prolin an der +1 Position auf. Durch quantitative Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass Serin 1126 in humaner Separase *in vitro* ein *bona fide* Substrat für Cdk1 ist und außerdem in mitotisch arretierten HeLaS3-Zellen vollständig phosphoryliert vorliegt (Stemmann *et al.*, 2001). Mehrere voneinander unabhängige Veröffentlichungen haben seitdem bestätigt, dass selbst physiologische Mengen von stabilem Cyclin B1 in lebenden Zellen die Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose und der Meiose verhindern (Chang *et al.*, 2003; Hagting *et al.*, 2002; Herbert *et al.*, 2003). Dies führte zu einem weiterentwickelten Modell der Anaphaseregulation in Vertebraten, bei dem die proteolytische Aktivität von Separase durch gleichzeitige Bindung von Securin und Cdk1-abhängige Phosphorylierung doppelt inhibiert wird.

2.3 Die klinische Bedeutung des Anaphasestudiums

Es gibt Berechnungen, wonach die Lebensspanne eines Menschen zu kurz wäre, um bei einer natürlichen Mutationsrate die zur Tumorentstehung notwendige Anzahl an genetischen Veränderungen zu akkumulieren. Da Aneuploidie und chromosomale Instabilität (CIN) für die meisten Krebsarten charakteristisch sind, geht man von einem entscheidenden Beitrag einer veränderten Gendosis zur Tumorentwicklung aus. Diese kann in einem Verlust von Tumorsuppressor- und einem Gewinn von Onkogenen bestehen (Jallepalli und Lengauer, 2001; Knudson, 1971; Pihan und Doxsey, 2003; Wang *et al.*, 2002). Während die Rolle von CIN in der Tumorgenese kontrovers diskutiert wird, besteht Einigkeit über die wichtige Rolle von CIN bei der Tumorprogression (Marx, 2002). Chromosomenfehlverteilungen sind eine Ursache für die chromosomale Instabilität und es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die oben genannten Kontrollmechanismen der Anaphase in Tumoren häufig dereguliert sind (Hamid und Kakar, 2003; Kops *et al.*, 2005; Lahad *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2003; Scanlan *et al.*, 2001; Wasch und Engelbert, 2005). So erstaunt es kaum, dass Shugoshin in 9 von 10 Brustkrebsfällen überexprimiert ist und dass Securin (auch bekannt als „pituitary tumor transforming gene”, PTTG) und Mad2 in solchen Tumoren vermehrt exprimiert werden, die besonders zur Bildung von Metastasen neigen (Hernando *et al.*, 2004; Pei und Melmed, 1997; Ramaswamy *et al.*, 2003). Chromosomenfehlverteilungen in der Meiose können zu Unfruchtbarkeit und Trisomien führen, wobei die Trisomie 21 die häufigste erbliche Ursache für geistige Behinderung

beim Menschen darstellt. Aus diesen Gründen ist das Studium der Chromosomensegregation nicht nur ein zellbiologisch faszinierender Forschungszweig sondern auch von großem medizinischen Interesse.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Anaphaseinhibitor Securin ist nicht notwendig für eine zuverlässige Chromosomensegregation in humanen Zellen (Pflehaar *et al.*, 2005) und Mäuse, bei denen beide Kopien des Securingens ausgeschaltet sind, erweisen sich als lebensfähig und scheinbar völlig normal (Mei *et al.*, 2001). Dies legt nahe, dass es in der Zelle noch andere Mechanismen gibt, um die potentiell sehr gefährliche Protease Separase in ihrer Aktivität zu kontrollieren. Mit der inhibitorischen Phosphorylierung von Separase durch Cdk1 wurde eine solche Regulation kürzlich entdeckt (Stemmann *et al.*, 2001). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Mechanismus aufzuklären, durch den ein, in der Primärstruktur weit vom aktiven Zentrum entferntes Phosphorylierungsereignis die Inhibition dieser essentiellen Protease vermitteln kann. Zur Identifikation weiterer, potentiell beteiligter Faktoren sollte inhibierte Separase gereinigt werden, um mit massenspektrometrischen Methoden assoziierte Proteine zu bestimmen. Für ein detailliertes Verständnis sollten anschließend alle beteiligten Komponenten rekombinant exprimiert und die Securin-unabhängige Inhibition der Separase im gereinigten System rekonstituiert werden. Dabei wurde eine neue Funktion von Separase als Kinaseinhibitor entdeckt, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter beschrieben wurde.

3 Ergebnisse

Eine durch Zugabe von nicht abbaubarem Cyclin B1 („Δ90“) eingestellte, hohe Cdk1-Kinaseaktivität verhindert die Schwesterchromatidentrennung und die Aktivierung von humaner Separase, nicht aber den Abbau von Securin in *Xenopus* Eiextrakten (Stemmann *et al.*, 2001). Durch die Mutation von nur zwei Cdk1-Konsensusstellen in Separase (Serin 1126 und Threonin 1346 zu Alanin) wird die Kohäsinspaltung und die Schwesterchromatidentrennung nicht länger durch konstitutive, hohe Cdk1-Aktivität inhibiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass Separase das vermutlich einzige nachgeschaltete Substrat bei der Cdk1-abhängigen Inhibition der Schwesterchromatidentrennung in zellfreien Extrakten ist. Es zeigt außerdem, dass die Phosphorylierung zu einer Securin-unabhängigen Inhibition von Separase führt, wobei nachfolgend gezeigt werden konnte, dass hierbei die Modifikation von Serin 1126 im Vergleich zu Threonin 1346 die weitaus wichtigere Rolle spielt (Stemmann *et al.*, 2001). Es blieb jedoch ungeklärt, wie die Phosphorylierung von nur einer, in der Primärstruktur der Separase etwa in der Mitte liegenden Aminosäure, zur Inhibition des C-terminalen aktiven Zentrums führen kann.

3.1 Identifikation der Cdk1-Kinase als neuer Bindungspartner von Vertebraten-Separase

3.1.1 Phosphorylierung ist notwendig aber nicht ausreichend für die Securin-unabhängige Inhibition von Separase

Um den Mechanismus der Securin-unabhängigen Inaktivierung genauer zu untersuchen, wurde Separase aus einem „Hoch-Δ90-Extrakt“ durch Affinitätschromatographie rückgereinigt. Dieser *Xenopus* Eiextrakt weist aufgrund von zugesetztem, stabilem Cyclin B1 (Δ90) eine hohe Cdk1-Aktivität sowie eine durch Calciumzugabe ausgelöste APC/C-Aktivität auf. Die so gewonnene phosphorylierte Wildtyp-Separase (WT) ist nicht in der Lage, sich selbst oder durch *in vitro* Translation radioaktiv markiertes Scc1 effektiv zu schneiden (Abb. 8, Spur 1). Überraschend war jedoch, dass sich diese Separase durch Waschen mit Puffern steigender Ionenstärke reaktivieren lässt. Dies äußert sich in der Zunahme von selbstprozessierter Separase im anti-Separase Westernblot sowie der Scc1-Spaltung in der Autoradiographie (Abb. 8, Spuren 2-4). Im

Gegensatz dazu ist die nicht phosphorylierbare Separase (PM) wie erwartet auch unter niedrigen Salzbedingungen aktiv (Spuren 5 und 6).

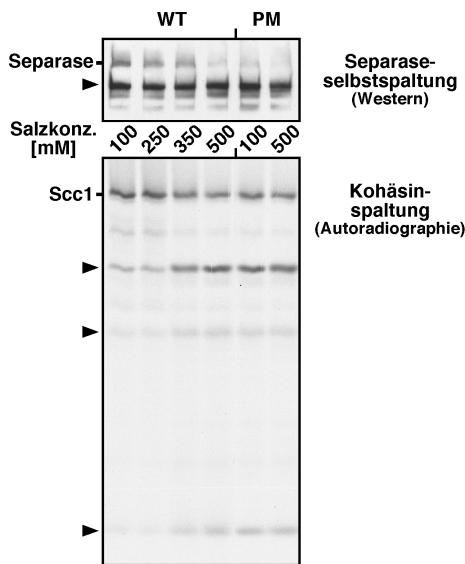


Abb. 8: Inhibierte, Securin-freie Separase lässt sich durch Steigerung der Salzkonzentration reaktivieren. Mit ZZ-Tev₄-Epitop (IgG-Bindedomäne von Protein Δ gefolgt von 4 Spaltstellen für die TEV-Protease) versehene WT- oder PM-Separase wurde im Komplex mit Securin exprimiert, an IgG-Sepharose immobilisiert und in Hoch- Δ 90-Extrakt inkubiert, um Separase zu phosphorylieren und Securin zu entfernen. Die reisolierte Matrix wurde aliquotiert und mit Puffern steigender Ionenstärke gewaschen. Separase wurde durch Behandlung mit TEV-Protease eluiert und in Bezug auf proteolytische Aktivität gegenüber ³⁵S-markiertem Scc1 analysiert. Die Pfeilspitzen kennzeichnen hier und im Folgenden das durch Selbstspaltung erzeugte N-terminale Separasefragment und ³⁵S-Scc1-Spaltprodukte.

Die beobachtete Reaktivierung lässt sich nicht durch das Auswaschen von Securin erklären, da der Separase-Securin Komplex auch unter Hochsalzbedingungen stabil ist (nicht gezeigt). Da Phosphataseinhibitoren in allen Waschschritten anwesend waren, erscheint eine Dephosphorylierung während der Reinigung als Grund für die Reaktivierung ebenfalls unwahrscheinlich. Die Phosphorylierung ist also - trotz ihrer Notwendigkeit - nicht hinreichend für die Securin-unabhängige Inhibition von Separase. Es wurde daher ein zusätzlicher Faktor postuliert, der aus dem *Xenopus* Eiextrakt an phosphorylierte Separase rekrutiert wird und die Inhibition vermittelt.

3.1.2 Durch Phosphorylierung inaktivierte Separase befindet sich im Komplex mit der Cdk1-Kinase

Um einen solchen Faktor zu identifizieren wurde Separase im präparativen Maßstab aus einem Hoch- Δ 90-Extrakt gereinigt und assoziierte Proteine mittels SDS-PAGE

analysiert (Abb. 9). Es wurden drei Proteine der Größen 55, 35 und 13 kDa gefunden, die spezifisch mit WT- (Spuren 1 und 5), nicht aber mit PM-Separase (Spuren 2 und 6) interagieren. Durch Massenspektrometrie wurden diese als Cyclin B1 Δ 90, Cdk1 und Cks2/p9 identifiziert. Bei Letzterem handelt es sich um eine dritte Untereinheit des Kinasekomplexes, die das katalytische Cdk1 direkt bindet. Von dem für die Meiose typischen Cks2 existiert ein eng verwandtes, somatisches Cks1 (Pines, 1996). Westernblots bestätigten, dass der Cdk1-Kinasekomplex spezifisch an WT-, nicht aber an PM-Separase bindet (Abb. 9B, Spuren 1 und 3). In Übereinstimmung mit den Daten aus Abbildung 8 lässt sich die Kinase durch Waschen mit Hochsalzpuffer von Separase eluieren, welche sich daraufhin verstärkt selbstspaltet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur humane sondern auch *Xenopus* Separase *in vitro* einen Komplex mit Cdk1 bildet (Abb. 9C).

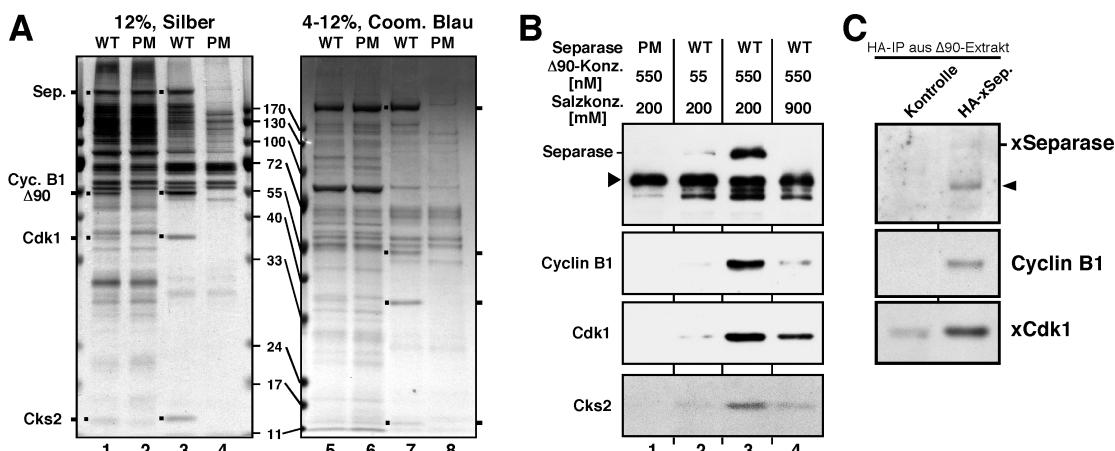


Abb. 9: Inaktivierte Vertebraten-Separase ohne Securin befindet sich im Komplex mit Cdk1-Kinase. (A) Humane Separase bildet einen Komplex mit Cyclin B1, Cdk1 und Cks2, aber keinem anderen stöchiometrischen Faktor. WT- oder PM-Separase wurde unter Niedrigsalzbedingungen (200 mM) gereinigt wie in Abb. 8 beschrieben. Vom TEV-Eluat wurde anschließend 2xHis₆-Epitop markiertes Cyclin B1 Δ 90 über Ni²⁺-NTA Chromatographie isoliert. TEV- (Spuren 1, 2, 5 und 6) und Imidazoleluate (Spuren 3, 4, 7 und 8) wurden über SDS-PAGE mit anschließender Silber- oder Coomassiefärbung der Proteine analysiert. (B) Separaseaktivität korreliert umgekehrt mit Cdk1-Kinasebindung. WT- oder PM-Separase wurden aus einem Niedrig- oder Hoch- Δ 90-Extrakt rückgereinigt, mit Niedrig- oder Hochsalzpuffern gewaschen und im Westernblot analysiert. (C) *Xenopus* Separase bildet einen Komplex mit der Cdk1-Kinase. HA₃-Tev-Epitop markierte xSeparase oder GFP-xSeparase wurden mit xSecurin in 293T-Zellen exprimiert und an einer anti-HA Affinitätsmatrix immobilisiert. Nach Inkubation im Hoch- Δ 90-Extrakt wurden assoziierte Proteine mittels SDS-PAGE analysiert.

Mehrere Gründe sprechen dafür, dass es sich beim Cdk1-Separase Komplex nicht um eine erwartete Interaktion zwischen einer Kinase und ihrem Substrat handelt. Wie für Beziehungen dieser Art sonst typisch konnte der Cdk1-Separase Komplex nämlich nicht

durch die Behandlung mit folgenden Reagenzien in hohen Konzentrationen dissoziiert werden (nicht gezeigt): Phosphatpuffer (Natrium-ortho-Vanadat, Natriumphosphat und β -Glycerophosphat), ATP, dem Cdk1-Modellsubstrat Histon H1 oder Separasepeptiden, die der Hauptphosphorylierungsstelle entsprechen (Aminosäuren 1115-1129 mit phosphoryliertem oder dephosphoryliertem Ser1126). Stattdessen sprechen diese Beobachtungen für einen stabilen Komplex, der sich deutlich von einer Kinase-Substratbeziehung unterscheidet und dafür, dass Cdk1 selbst der postulierte Koinhibitor sein könnte.

Das His₆-Epitop am zuvor dem Extrakt zugesetzten Cyclin B1 \square 90 erlaubte eine zweite affinitätschromatographische Reinigung des Komplexes über Ni²⁺-chelatierende Agarose. Der so gereinigte Komplex enthielt Separase und die drei Untereinheiten der Cdk1-Kinase in Mengen, die eine 1:1:1:1 Stöchiometrie vermuten ließen (Abb. 9A, Spuren 3 und 7). Ein Vergleich mit der PM-Separasepräparation, die als Negativkontrolle fungierte, identifizierte alle anderen Banden als unspezifische Verunreinigungen (Spuren 4 und 8). Der Separase-Cdk1 Komplex scheint demnach nur aus vier Komponenten zu bestehen.

3.1.3 Der Separase-Cdk1 Komplex ist in mitotischen Zellen nachweisbar

Nachdem die Cdk1-Kinase als Bindungspartner von Separase gefunden worden war, stellte sich die Frage, ob der Komplex auch in lebenden mitotischen Zellen gebildet wird. Dazu wurde HA₃-Epitop markiertes Cks1-Protein in geringen Mengen in HeLa-Zellen exprimiert und die Zellen nach zwei Tagen durch Aktivierung des mitotischen „Checkpoint“ mit dem Spindelgift Nocodazol in der Mitose arretiert. Das über eine anti-HA Affinitätsmatrix gereinigte Cks bindet sowohl endogenes Cyclin B1 und Cdk1 als auch endogene Separase (Abb. 10A, IP). Dabei machte es keinen Unterschied, ob Cks1 oder das nah verwandte Cks2 exprimiert und immunpräzipitiert wurde (nicht gezeigt). Um zu bestimmen, ob die Komplexbildung auch in lebenden Zellen vom Phosphorylierungszustand der Separase abhängt, wurde entweder WT- oder PM-Separase zusätzlich zu Cyclin B1, Cdk1 und HA₃-Epitop markiertem Cks1 in 293T-Zellen exprimiert. Dabei zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit den *in vitro* Experimenten nur WT-Separase mit dem Cdk1-Kinasekomplex assoziiert war (Abb. 10B). Separase und Cdk1 interagieren demnach in lebenden mitotischen Zellen und

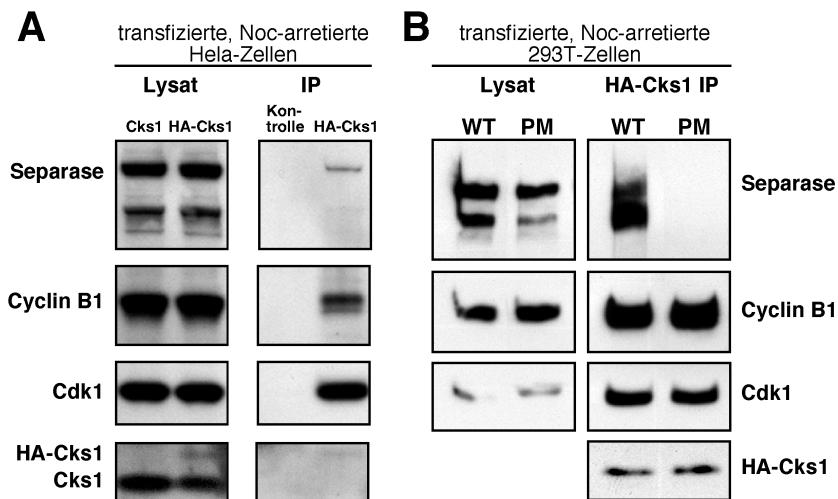


Abb. 10: Humane mitotische Zellen enthalten Separase-Cdk1 Komplexe. (A) Nicht markiertes oder HA₃-Epitop markiertes Cks1 wurde aus transfizierten, Nocodazol-arretierten HeLa-Zellen über eine anti-HA Affinitätsmatrix isoliert. Lysat und Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (B) Die Bindung von Cdk1 an Separase ist auch *in vivo* abhängig von Ser1126- und Thr1346-Phosphorylierung. ZZ-Tev₄-Separase (WT oder PM), His-markiertes β 90, Cdk1 und HA₃-Cks1 wurden in 293T-Zellen exprimiert. Im Westernblot sind die Lysate (links) und die, an eine anti-HA Affinitätsmatrix bindenden Komponenten aus dem Separase-Cdk1 Komplex (rechts) dargestellt.

die Interaktion ist von der Phosphorylierung der Separase abhängig. In Zusammenarbeit mit Dominik Boos konnte ferner gezeigt werden, dass der Separase-Cdk1 Komplex auch ohne Überexpression, durch Immunpräzipitation von endogener Separase oder Cyclin B1, nachweisbar ist (nicht gezeigt). Diese Interaktion ist in der Prometaphase maximal und geht in der G1-Phase verloren, d.h. sie korreliert mit der Menge von Cyclin B1 und damit der Aktivität von Cdk1 (nicht gezeigt).

3.1.4 Securin- und Cdk1-Bindung an Separase schließen sich gegenseitig aus

Neben dem bekannten Securin ist Cdk1 der einzige für Vertebraten-Separase beschriebene Bindungspartner. Um herauszufinden, ob beide gleichzeitig an Separase binden können, wurden Separase, Securin und alle drei Kinaseuntereinheiten gleichzeitig in 293T-Zellen überexprimiert. Separase, Securin und Cks2 wurden daraufhin über verschiedene Epitope spezifisch gereinigt und die assoziierten Proteine mittels Westernblot identifiziert (Abb. 11). Wie erwartet fanden sich sowohl Securin als auch - stellvertretend für den Cdk1-Kinasekomplex - Cyclin B1 in der affinitätsgereinigten Separasepräparation. Interessanterweise war in einer Immunpräzipitation

von Securin zwar Separase, nicht aber Cyclin B1 nachweisbar. Umgekehrt fehlte Securin, wenn Separase über die Cks2-Kinaseuntereinheit präzipitiert wurde. Securin und Cdk1 binden demnach nicht gleichzeitig an Separase.

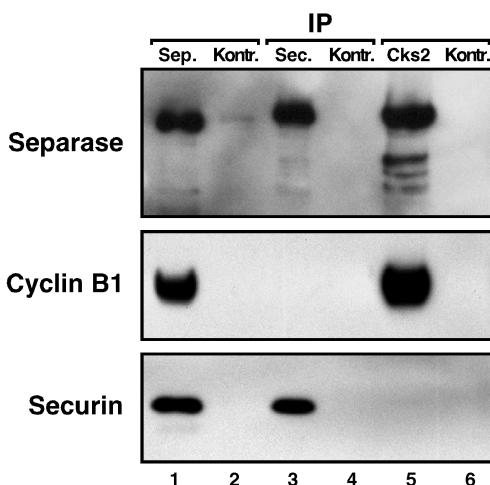


Abb. 11: Securin- und Cdk1-Bindung an Separase schließen sich gegenseitig aus. Myc₆-Tev₂-Separase, 2xHis₆-Δ90, Cdk1, HA₃-Cks2 und Securin-His₆-Flag-His₆-Flag wurden in 293T-Zellen koexprimiert. Die selektive IP von entweder Separase, Securin oder Cks2 wurde mit Antikörpern gegen die Epitope Myc, Flag bzw. HA durchgeführt. Die gewaschenen Präzipitate wurden im Westernblot analysiert. Eine anti-Myc IP in Anwesenheit von TEV-Protease (Spur 1) sowie anti-FLAG (Spur 4) bzw. anti-HA (Spur 6) IPs aus Zellen, welche nicht markiertes Cks2 und Securin exprimierten, dienten als negative Kontrollen (Kontr.).

3.2 Cdk1 ist ein wirksamer Separaseinhibitor

3.2.1 Separaseinhibition im gereinigten System

Die Reaktivierung von, aus Hoch-Δ90-Extrakt gereinigter, inaktiver Separase durch Waschen mit Hochsalzpuffer (Abb. 8) korreliert mit der Dissoziation von Cdk1 (Abb. 9B, Spuren 3 und 4). Diese Beobachtung legt nahe, dass Cdk1 nicht ein katalytischer sondern ein stöchiometrischer Inhibitor von Separase ist. Um zu testen, ob Cdk1 zur Inhibition von phosphorylierter Separase ausreicht, wurde ein Separaseinhibitionstest mit gereinigten, rekombinanten Proteinen etabliert.

Für die Herstellung aktiver, humaner Cdk1-Kinase wurden die drei Untereinheiten mittels Baculoviren in Sf9-Zellen koexprimiert. Die Aufreinigung erfolgte im ersten Schritt durch Affinitätschromatographie über das His₆-Epitop von Cyclin B1Δ90. In einem zweiten Schritt wurde überschüssiges, freies Cyclin B1Δ90 durch Anionenaustauscherchromatographie vom Kinasekomplex abgetrennt. Die resultierende

Kinasefraktion enthielt keine kontaminierenden Proteine mehr und phosphorylierte das Modellsubstrat Histon H1 effektiv (Abb. 12A, linke Seite; nicht gezeigte Daten).

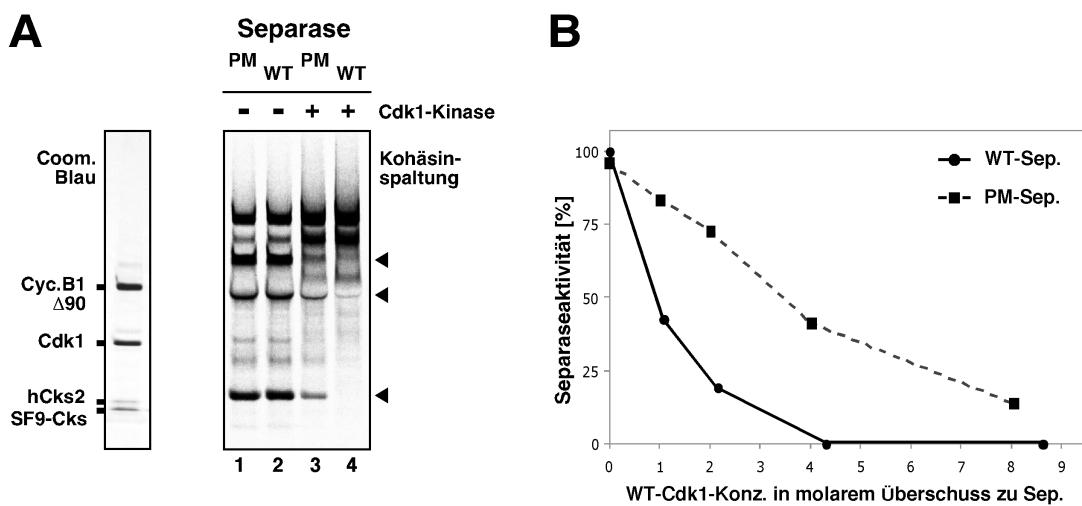


Abb. 12: Die Cdk1-Kinase reicht zur Securin-unabhängigen Inhibition von Separase aus. (A) Rekonstitution der Securin-unabhängigen Inhibition von Separase. Der His₆-CyclinB1 Δ90-Cdk1-Cks1 Komplex wurde durch Affinitäts- und Anionenaustauscherchromatographie aus Sf9-Zellen gereinigt und mittels Coomassiefärbung überprüft (links). WT- (Spuren 2 und 4) oder PM-Separase (Spuren 1 und 3) wurden durch Inkubation in einem *Xenopus* Δ90-Extrakt und anschließender Hochsalzbehandlung von Securin und Cdk1 befreit und dann mit ATP und rekombinanter Cdk1 (20 nM; Spuren 3 und 4) bzw. Referenzpuffer (Spuren 1 und 2) inkubiert. Gezeigt ist das Ergebnis des anschließenden Aktivitätstests. Kohäsinspaltprodukte sind durch Pfeile markiert. (B) Cdk1 ist ein wirksamer Separase-Inhibitor. WT- und PM-Separase wurden wie in (A) beschrieben, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationen der Cdk1-Kinase inhibiert.

Für die Herstellung von Separase wurde sie zunächst zusammen mit ihrem „Chaperon“ Securin in 293T-Zellen exprimiert. Securin wurde dann durch APC/C-vermittelten Abbau im Δ90-Extrakt entfernt. Um aktive, phosphorylierte Separase zu erhalten, wurde die reisolierte Protease anschließend mit Hochsalzpuffer von Cdk1 befreit. Auf diese Weise wurden WT- und PM-Separase der gleichen spezifischen Aktivität aufgereinigt (Abb. 12A, Spuren 1 und 2). Wenn gereinigte WT-Separase mit rekombinanter Cdk1-Kinase vorinkubiert wurde, so war sie im anschließenden Aktivitätstest nicht mehr in der Lage, radioaktiv markiertes Kohäsin zu spalten (Abb. 12A, vgl. Spuren 2 und 4). PM-Separase wurde dagegen signifikant schlechter inhibiert (Abb. 12A, Spur 3). Um sie zu 50% zu inhibieren war im Vergleich zur WT-Separase eine 4fach höhere Cdk1-Konzentration notwendig (Abb. 12B). Die beobachtete Inhibition der Mutante bei hohem Cdk1-Überschuss deutete an, dass neben phosphoryliertem Ser1126 und

Thr1346 noch weitere Domänen in Separase an der Cdk1-Bindung beteiligt sein könnten (siehe unten). Die in diesem Experiment verwendete Separasepräparation wurde in einem Schritt aus *Xenopus* Eiextrakt rückgereinigt und ist daher nicht rein (siehe Abb. 9A). Formal kann daher die Beteiligung weiterer Proteine an der Cdk1-abhängigen Inhibition nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch bei der Tandemaffinitätsreinigung des Separase-Cdk1 Komplexes keine weiteren Faktoren in stöchiometrischen Mengen gefunden wurden (Abb. 9A), wurde dieses Experiment als starker Hinweis darauf gewertet, dass die Cdk1-Kinase zur Securin-unabhängigen Inhibition von phosphorylierter Separase ausreicht.

3.2.2 Cdk1 inhibiert Separase in zwei Schritten

Auch eine katalytisch inaktive Mutante von Cdk1 (Lys33Arg; KD) konnte phosphorylierte Separase inhibieren und zwar interessanterweise genauso effizient wie wildtypisches Cdk1 (WT), was ein quantitativer Inhibitionstest ergab (Abb. 13A). Wie unten gezeigt wird, war die Vorphosphorylierung von Separase hierfür jedoch von entscheidender Bedeutung. Die stabile Assoziation der Kinase kann also zeitlich getrennt von der Phosphorylierung der Protease erfolgen. Andererseits war bereits bekannt, dass katalytische Mengen von Cdk1 die Separase am entscheidenden Ser1126 quantitativ phosphorylieren können (Gerber *et al.*, 2003; Stemmann *et al.*, 2001), wenn diese sich im Komplex mit Securin befindet. Da unter diesen Bedingungen Cdk1 nicht stabil an Separase binden kann (Abb. 11) folgt insgesamt, dass die Phosphorylierung von Separase durch Cdk1 und die Bildung eines stabilen Separase-Cdk1 Komplexes zeitlich trennbare Ereignisse sind. Die Verwendung der inaktiven Kinase schloss weiterhin aus, dass die beobachtete Inhibition durch Phosphorylierung des Scc1-Substrates beeinflusst wurde.

Ein Vorbehalt gegen die Verwendung einer Separasemutante mit zwei veränderten Phosphorylierungsstellen ist, dass sie nicht genau den Zustand des unphosphorylierten Proteins widerspiegelt, sondern eine veränderte Oberfläche aufweist. Um zweifelsfrei zu zeigen, dass die Bindung von Cdk1 die Phosphorylierung von Separase erfordert, wurde aktive Separase mit β -Phosphatase behandelt. Wie erwartet ließ sich die so dephosphorylierte Separase im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr durch katalytisch inaktive Cdk1-Kinase inhibieren (Abb. 13B, vgl. Spuren 1, 2 und 3). Die aktive WT-

Kinase war hingegen in der Lage, bei Anwesenheit von ATP die vorher dephosphorylierte Separase vollständig zu inhibieren (Spur 4). Im Gegensatz zur Securin-vermittelten Inhibition (nicht gezeigt) ist die Cdk1-vermittelte also von einer vorherigen Phosphorylierung der Separase abhängig.

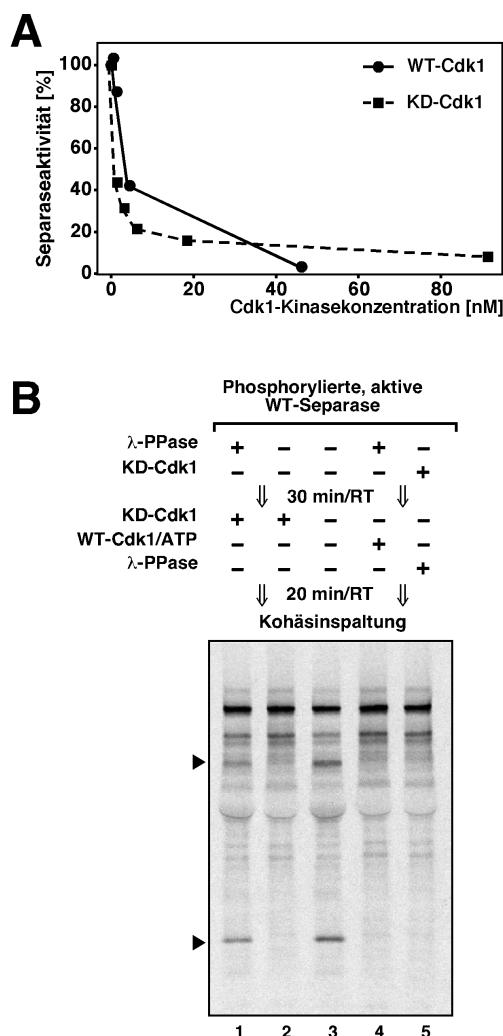


Abb. 13: Katalytisch inaktive Cdk1-Kinase inhibiert phosphorylierte, aber nicht dephosphorylierte Separase. (A) Die Kinaseaktivität ist entbehrlich für eine Cdk1-abhängige Inhibition von phosphorylierter Separase. WT-Separase wurde aus einem Hoch- Δ 90-Extrakt isoliert, unter Hochsalzbedingungen gewaschen, mit steigenden Konzentrationen von wildtypischer (WT; Kreise) oder katalytisch inaktiver (KD; Rechtecke) Cdk1-Kinase inkubiert und auf Kohäsinspaltung getestet. Die jeweilige Separaseaktivität wurde relativ zur Aktivität in Abwesenheit der rekombinanten Kinase quantifiziert. (B) Nach Dephosphorylierung widersteht Separase der Inhibition durch katalytisch inaktive Cdk1-Kinase. Phosphorylierte WT-Separase wurde mit λ -Phosphatase, Referenzpuffer oder rekombinanter Cdk1-Kinase (WT oder KD) nach dem aufgezeigten Schema behandelt und auf Kohäsinspaltung hin untersucht.

Interessanterweise ließ sich eine durch KD-Cdk1 zuvor inhibierte Separase nicht durch die Behandlung mit λ -Phosphatase reaktivieren (Spur 5). Demzufolge sind in Separase-Cdk1 die zur Komplexbildung notwendigen Phosphatgruppen entweder nicht mehr für die Phosphatase zugängig oder für die Aufrechterhaltung des Komplexes nicht mehr erforderlich (Abb. 13B, vgl. Spuren 1 und 5).

3.3 Vertebraten-Separase zeigt Homologien zu Cdc6 aus *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 Identifikation einer zusätzlichen, für die Bindung der Cdk1-Kinase relevanten Region in Separase

Die leichte Inhibition der PM-Separase bei hoher Cdk1-Konzentration deutete bereits an, dass neben der Phosphorylierung von Serin 1126 noch zusätzliche Cdk1-Bindungsdeterminanten in Separase existieren (Abb. 12). Ausgehend von einer großen

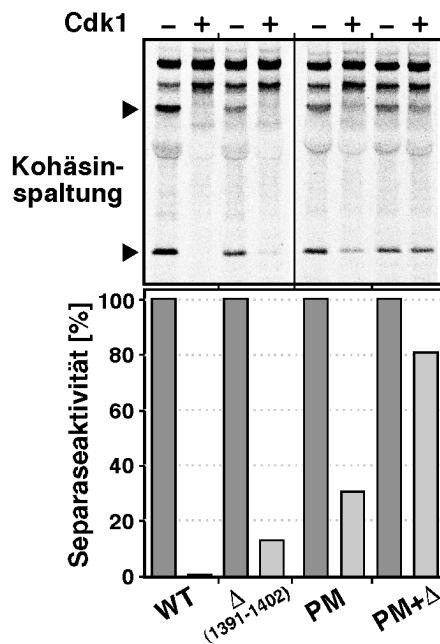


Abb. 14: Teilweise Deletion der Cdc6-ähnlichen Domäne erhöht die Resistenz von PM-Separase gegen Cdk1-abhängige Inhibition. Gleiche Mengen aktiver Separasen mit den angegebenen Mutationen wurden mit rekombinanter Cdk1-Kinase inkubiert, bevor die Spaltung von ^{35}S -Scc1 analysiert (Pfeile) und mittels Phosphoimager quantifiziert wurde (unten). Die Kombination aus S1126,T1346A (PM) und Deletion der Aminosäuren 1391-1402 (Δ) ergab „PM+ Δ “.

internen Deletion (Aminosäuren 1298 bis 1564) in Separase, die Resistenz gegen die Inhibition in Hoch- Δ 90-Extrakt vermittelt (Hui Zou, persönliche Mitteilung), wurden immer kleinere Deletionen und schließlich Punktmutationen in Separase eingeführt. Die Analyse dieser Mutanten grenzte den Bereich der Cdk1-Bindung auf 22 Aminosäuren ein, beginnend bei Position 1378 von Separase (Dominik Boos, persönliche Mitteilung; Gorr *et al.*, 2005). Die Deletion eines Teiles dieser Sequenz (Aminosäuren 1391-1402) machte Separase teilweise resistent gegen die Inhibition in Hoch- Δ 90-Extrakt oder

durch gereinigte Cdk1-Kinase (Abb. 14 und nicht gezeigte Daten). Die gleichzeitige Mutation von Ser1126 und Thr1346 zu Ala vermittelte eine fast vollständige Resistenz von Separase selbst gegenüber hohen Konzentrationen von gereinigtem Cdk1. Da weder die proteolytische Aktivität noch die Securinbindung in dieser Mutante beeinträchtigt waren (Abb. 14 und nicht gezeigte Daten), kann eine weitreichende Fehlfaltung von Separase als Grund für die Unfähigkeit, Cdk1 zu binden, ausgeschlossen werden. Eine Region um die Aminosäureposition 1400 in Separase ist folglich an der Bindung von Cdk1 beteiligt.

3.3.2 Vertebraten-Separase ähnelt Cdc6 aus *S. cerevisiae* bezüglich Cdk1-Bindung

Kürzlich ist ein weiteres Beispiel aus *S. cerevisiae* bekannt geworden, bei dem die Cdk1-Kinase ein zuvor phosphoryliertes Substrat stabil bindet und dadurch inhibiert. Hierbei handelt es sich um Cdc6, einer Komponente des Präreplikationskomplexes, dessen Cdk1-abhängige Inhibition Überreplikation in der G2/M-Phase verhindert (Mimura *et al.*, 2004). Die Aminosäuren 1380 bis 1397 von humaner Separase, die die oben erwähnte zusätzliche Cdk1-Bindedomäne enthalten, zeigen 39% Übereinstimmung und 61% Ähnlichkeit zu einem Abschnitt von Cdc6 (Abb. 15A, Kasten). Die Homologie war besonders interessant, da sie zum N-terminalen Bereich des Hefeproteins besteht, welcher für die Bindung von Cdk1 notwendig und hinreichend ist (Elsasser *et al.*, 1996).

Da die homologe Region sehr kurz war, wurde die Bedeutung dieses Befundes experimentell untersucht. Die konservierten Aminosäuren APxxxxR wurden sowohl in humaner Separase als auch in *S.c.* Cdc6 zu LAXXXXG verändert und dann beide Mutanten auf Cdk1-Bindung hin untersucht. Aus Hoch-Δ90-Extrakt rückisolierter LAG-Separase war mit deutlich weniger Cdk1 assoziiert als der Wildtyp und entsprechend weitgehend aktiv, d.h. resistent gegen Cdk1-abhängige Inhibition (D.Boos; Gorr *et al.*, 2005). Entsprechend wurden die 49 N-terminalen Aminosäurereste von Cdc6 in Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und auf Bindung von Cdk1 aus mitotischem *Xenopus* Eiextrakt getestet (Abb. 15B). Diese Fähigkeit war bei LAG-Cdc6 gegenüber Wildtyp-Cdc6 stark kompromittiert. Die Deletion der zu Separase homologen Aminosäuren 20-37 unterdrückte die Bindung von Cdk1 sogar vollständig.

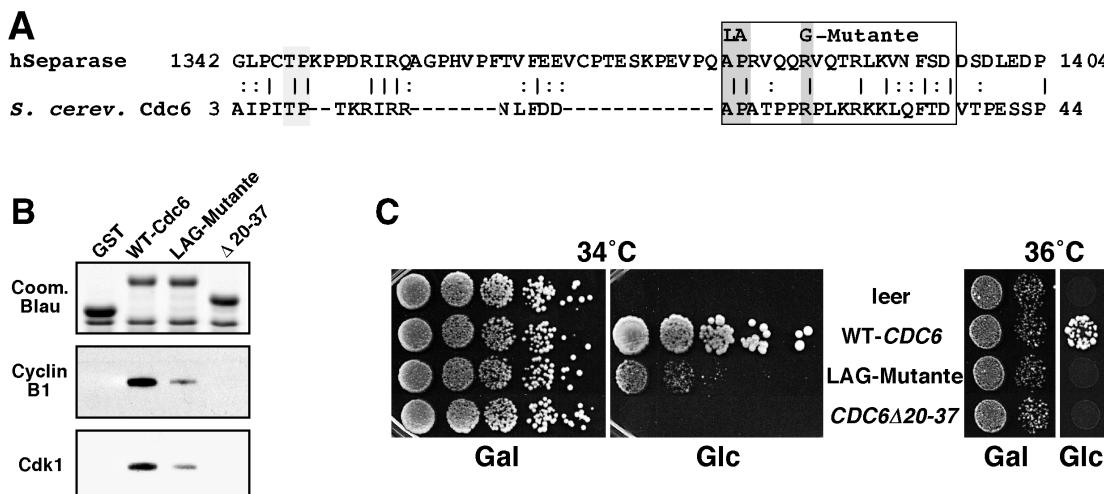


Abb. 15: Die Mutation der zu Separase homologen Domäne in Cdc6 verhindert die Komplexbildung mit Cdk1. (A) Sequenzvergleich zwischen humaner Separase und *S. cerevisiae* Cdc6. Über einen Bereich von 63 Aminosäuren weisen beide Proteine 24% Übereinstimmung und 41% Ähnlichkeit auf (33% Lücken). Identische Aminosäuren, chemische Ähnlichkeiten und Lücken sind durch vertikale Linien, zwei Punkte bzw. horizontale Linien wiedergegeben. Konserviertes APxxxxR (dunkelgrau hinterlegt) wurde in beiden Proteinen zu LAXxxG verändert. Eine konservierte Cdk1-Phosphorylierungsstelle (T7 in Cdc6 und T1346 in Separase) ist hellgrau markiert. (B) Kompromittierte Bindung von Cdk1 an Cdc6^{LAG} *in vitro*. GST oder GST in Fusion mit wildtypischem oder unterschiedlich mutiertem Cdc6 (bis Aminosäure 49) wurden in *Xenopus* Eiextrakt mit niedriger Cdk1-Aktivität inkubiert, reisoliert und mittels Westernblot analysiert. (C) Kompromittierte Bindung von Cdk1 an Cdc6^{LAG} *in vivo*. WT und N-terminale Mutanten von Cdc6 wurden vom pRS425-Plasmid in FC1975-7-2D-28 (*MAT* \square ; *CLB2* \square *db,ken*; *trp1::TRP1::GAL-SIC1(2X)*) überexprimiert. Verdünnungsreihen wurden auf YPGlc und YPGal ausplattiert und bei 34°C oder 36°C für 2 Tage inkubiert. „Leer“ bezeichnet pRS425.

Diese *in vitro* Studien wurden durch Wachstumstests in Hefe bestätigt, bei denen die Inhibition von Cdk1 durch Assoziation mit Cdc6 ausgenutzt wurde. Ein Hefestamm, der ein stabiles Cyclin vom B-Typ (Clb2 \square *db*) exprimiert, kann die Mitose nur verlassen, wenn gleichzeitig Cdc6 oder ein anderer Cdk1-Inhibitor (Sic1) überexprimiert wird (Archambault *et al.*, 2003). Wird die Sic1-Überexpression unter die Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promoters gestellt, so wächst die Hefe nur auf galaktose- (Gal) aber nicht auf glukosehaltigem (Glc) Medium, es sei denn Cdc6 wird gleichzeitig konstitutiv überexprimiert (Abb. 15C, Reihen 1 und 2). Obwohl die LAG-Mutante von Cdc6 in diesem Test nur einen schwachen Wachstumsdefekt bei 30°C aufwies (nicht gezeigt), konnte sie – anders als der Wildtyp – bei 34°C kaum und bei 36°C gar nicht mehr wachsen (Reihe 3). Die Deletion der Aminosäuren 20-37 in Cdc6 verhinderten Wachstum bereits bei 34°C (Reihe 4). Diese abgestuften Phänotypen *in vivo*

korrelierten also direkt mit der Cdk1-Bindung der entsprechenden N-terminalen Cdc6-Fragmente *in vitro* (vgl. Abb. 15B und 15C). Verschiedene Mutationen der zwischen humaner Separase und Hefe Cdc6 konservierten Aminosäuren schränken also die Cdk1-Bindefähigkeit beider Proteine gleichermaßen ein. Diesen auffälligen Parallelen folgend wird der zu Cdc6 homologe Separaseabschnitt nachfolgend als CLD (Cdc6-like domain) bezeichnet.

Die Bindung der Cdk1-Kinase an Hefe Cdc6 ist abhängig erstens von der Phosphorylierung mehrerer S/P- und T/P-Stellen innerhalb des N-Terminus von Cdc6 und zweitens von deren direkter Erkennung durch die Cyclinuntereinheit von Cdk1 (Mimura *et al.*, 2004). Diese Situation erinnert an die Bindung von Cdk1 an humane Separase, die ebenfalls von S/P- und T/P-Phosphorylierungen abhängt. Obwohl die wichtigste Rolle dabei Serin 1126 zukommt, welches weit entfernt von der zu Cdc6 homologen Region liegt, führt auch die Mutation von Threonin 1346 zu Alanin zu einer deutlich gesteigerten Resistenz der Separase gegenüber der Inhibition durch Cdk1 (Stemmann *et al.*, 2001). Tatsächlich liegt Thr1346 innerhalb der CLD (Abb. 15A) und lässt sich Thr7 in Hefe Cdc6 zuordnen. Interessanterweise ist dessen Phosphorylierung ebenfalls wichtig für die Bindung von Cdk1 (Mimura *et al.*, 2004; Weinreich *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten war es möglich, dass die Cdk1-Kinase über die Cyclin B1-Untereinheit an Separase bindet und zwar abhängig von Phosphorylierung der CLD. Cyclin B1 alleine könnte also ausreichen, um Separase zu binden und möglicherweise sogar zu inhibieren. Tatsächlich verhinderte die Zugabe von bakteriell exprimiertem, reinem Cyclin B1 (Abb. 16A) zu isolierter, phosphorylierter Separase die Spaltung von Kohäsin (Abb. 16D, Spuren 1 und 2). In Titrationsexperimenten zeigte sich jedoch, dass isoliertes Cyclin B1 etwa 460 mal weniger effektiv in der Inhibition von Separase war als der Cks2-Cdk1-Cyclin B1 Komplex (Abb. 16B). Dies deutete an, dass auch Cdk1 und/oder Cks2 möglicherweise einen direkten Kontakt zu Separase herstellen. Trotzdem war der beobachtete Effekt spezifisch, da große Mengen anderer Proteine wie z.B. GST oder CSA einen positiven Effekt auf die Separaseaktivität hatten (Abb. 16C). Dieser lässt sich durch die Stabilisierung der labilen Protease erklären. Übereinstimmend mit der phosphorylierungsabhängigen Bindung ließ sich die PM-Separase weniger gut durch gereinigtes Cyclin B1 inhibieren als der Wildtyp (Abb. 16D). Auch die partielle Deletion (1391-1402) oder Mutation (APxxxxR zu LxxxxxG) der CLD setzte die Inhibition von Separase durch Cyclin B1 teilweise außer

Kraft. Die PM-Separase mit zusätzlich teilweise deletierter CLD war gegenüber Cyclin B1 fast vollständig resistent (Abb. 16D). Demnach wird also die für die Bindung des Cdk1-Kinasekomplexes wichtige CLD – wie aufgrund der Homologie zu Cdc6 vorhergesagt – phosphorylierungsabhängig durch die Cyclin B1-Untereinheit erkannt. Ob phosphoryliertes Ser1126 direkt an Cyclin B1 bindet bleibt unklar, da es in der PM-Separase stets in Kombination mit einer Phosphorylierungsstelle innerhalb der CLD (Thr1346) verändert wurde (siehe Diskussion).

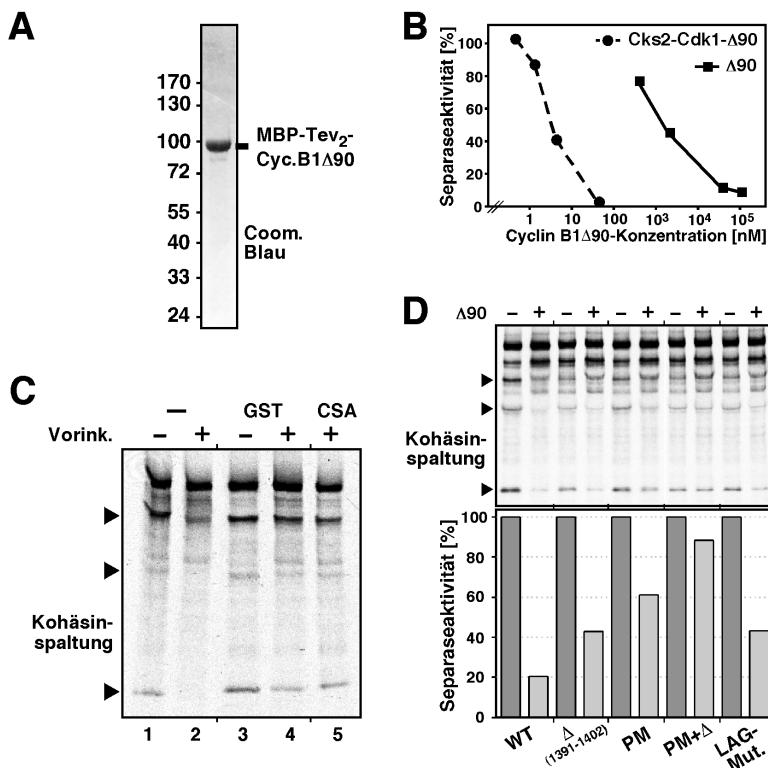


Abb. 16: Die isolierte Cyclin B1-Untereinheit bindet phosphorylierte Separase. (A) Coomassiefärbung von bakteriell exprimiertem, aufgereinigtem MBP-Tev₂-Cyclin B1 Δ 90 (MW = 83,5 kDa). (B) Cyclin B1 alleine ist in hoher Konzentration ausreichend, um Separase zu inhibieren. Dargestellt ist die Aktivität von WT-Separase in Gegenwart steigender Mengen des Cdk1-Kinasekomplexes (0,5-50 nM; Kreise) oder von Cyclin B1 Δ 90 (0,4-100 μ M; Rechtecke). (C) Aktive Separase ist instabil und kann durch unspezifische Proteine stabilisiert werden. Aktive Separase wurde auf Eis (-) oder bei 30°C (+) für 15 Minuten in Anwesenheit von Referenzpuffer (Spuren 1 und 2), GST (40 μ M; Spuren 3 und 4) oder CSA (40 μ M; Spur 5) vorinkubiert und dann auf Kohäsinspaltung getestet. ³⁵S-Scc1 Spaltfragmente sind durch Pfeile markiert. (D) Phosphorylierung und eine intakte CLD sind wichtig für die Inhibition von Separase durch isoliertes Cyclin B1. Die gezeigten Separasemutanten wurden wie in Abb. 14 angegeben analysiert, nur dass statt der Cdk1-Kinase rekombinantes Δ 90 zugegeben wurde.

3.4 Vertebraten-Separase ist ein Cdk1-Cyclin B1 Inhibitor

3.4.1 Cdk1-Kinase im Komplex mit Separase ist inaktiv und kann durch Dissoziation aktiviert werden

Separase-Cdk1 ist ein Komplex aus zwei Enzymen, nämlich einer Protease und einer Kinase. Die Kinase inhibiert die Protease und eine offensichtliche Frage ist, ob umgekehrt die Protease auch die Aktivität der Kinase beeinflusst.

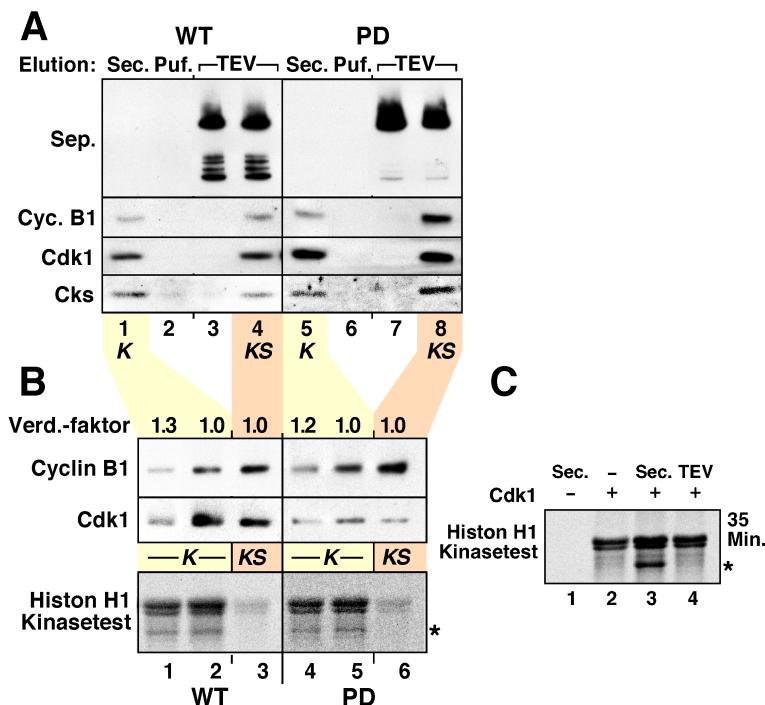


Abb. 17: Cdk1-Kinase ist im Komplex mit Separase inaktiv und kann durch Dissoziation aktiviert werden. (A) Securin verdrängt Cdk1 von Separase. ZZ-Tev₄-markierte WT- oder proteolytisch inaktive (PD-) Separase (5 µg) wurden mittels IgG-Sepharose aus einem Hoch-Δ90-Extrakt unter Niedrigsalzbedingungen reisoliert, mit 15 µg rekombinantern Securin (Spuren 1 und 5) oder Referenzpuffer (Spuren 2 und 6) vorbehandelt, gewaschen (200 mM NaCl) und schließlich mit TEV-Protease eluiert (Spuren 3 und 7 für Securin-behandelte Aliquots, Spuren 4 und 8 für die Referenz). Cdk1-Separase („KS“) wurde in (B) mit Securin-eluerter, Separase-freier Cdk1 („K“) verglichen. (B) Die Cdk1-Kinase wird durch Dissoziation von Separase aktiviert. Vergleich der spezifischen Aktivitäten von „K“ (zwei Verdünnungen) und „KS“ aus (A) mittels Westernblot und Histon H1 Phosphorylierungsassay (für H1 Test siehe Abb. 18). „*“ markiert phosphoryliertes Securin. (C) Cdk1-Aktivität bleibt durch rekombinantes Securin und TEV-Protease (weitgehend) unbeeinflusst. Cdk1 (Spuren 2 bis 4) oder der entsprechende Referenzpuffer (Spur 1) wurden mit Securin (Spuren 1 und 3), TEV-Protease (Spur 4) oder deren Referenzpuffer (Spur 2) kombiniert und bezüglich Kinaseaktivität verglichen. „*“ markiert phosphoryliertes Securin.

Um diese Frage zu beantworten wurde die Beobachtung genutzt, dass Cdk1 und Securin nicht gleichzeitig an Separase binden können. Der Separase-Cdk1 Komplex wurde über

ein N-terminales ZZ-Tev₄-Epitop an Separase aus einem Hoch- \square 90-Extrakt isoliert (Abb. 17A, Spur 2) und mit einem Überschuss an rekombinanter Securin (oder dem entsprechenden Kontrollpuffer) behandelt. Wie erwartet führte dies zur spezifischen Elution von Cdk1 durch die Kompetition um die Bindung an Separase (Spuren 1-3). Mit Securin voreluierte und kontrollbehandelte Separase wurden dann durch Inkubation mit TEV-Protease gleichermaßen eluiert. Anschließend wurden die Securin-eluierte, Separase-freie Kinase („K“) mit dem noch intakten, TEV-eluierten Separase-Cdk1-Komplex der Kontrolle („KS“) auf ihre Cdk1-Aktivität hin verglichen (Abb. 17B). Dass hierbei jeweils gleiche Mengen an Cdk1 analysiert wurden, stellte ein vergleichender Westernblot sicher (Abb. 17B, oberer Abschnitt). Der Cdk1-Aktivitätstest wird klassischerweise mit dem Modellsubstrat Histon H1 durchgeführt, welches in Gegenwart von aktiver Cdk1-Kinase und \square P³³-ATP radioaktiv markiert wird. Anhand des Autoradiogrammes konnte gezeigt werden, dass die freie Kinase sogar in geringerer Konzentration viel aktiver (7,1fach) war als die Kinase im Komplex mit Separase (Abb. 17B, Spuren 1-3). Die beobachteten, signifikanten Unterschiede können nicht durch die Anwesenheit von Securin oder TEV-Protease in den Kinasefraktionen erklärt werden. Diese Proteine für sich genommen haben nur einen geringen (Securin: 1,7fach) oder keinen (TEV-Protease) aktivierenden Effekt auf Cdk1 (Abb. 17C). Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn man statt wildtypischer eine proteolytisch inaktive Separase (PD) verwendet, welche sich aufgrund der Mutation des katalytischen Cysteins 2028 zu Serin nicht mehr selbst spalten kann (Abb. 17A, Spuren 5-8 und 17B, Spuren 4-6). Bindung und Inhibition von Cdk1 erfolgen also unabhängig von proteolytischer Aktivität und Selbstspaltung der Separase.

Diese Ergebnisse konnten durch Inkubation von gereinigter rekombinanter Cdk1-Kinase mit freier Separase bestätigt werden (Abb. 18). Die Zugabe von WT-Separase reduzierte die Cdk1-Aktivität gegenüber Histon H1 auf Hintergrundniveau (vgl. Spuren 1, 3 und 4). Gleiche Mengen der PM-Separase (Abb. 18 unten) konnten demgegenüber die Aktivität von Cdk1 nicht unterdrücken (Spur 2). Die Hintergrundphosphorylierung von Histon H1 durch Separase alleine (Spur 4) sowie die leichte Zunahme der Phosphorylierung in der PM-Probe lässt sich durch Kontamination der Separasepräparation mit Spuren einer Histon H1-phosphorylierenden Kinase erklären.

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Experimente, dass die Inhibition im Separase-Cdk1 Komplex auf Gegenseitigkeit beruht: Die Kinase inhibiert die Protease

und gleichzeitig inhibiert Separase Cdk1. Diese unerwartete, neue Funktion von Vertebraten-Separase als ein Cdk1-Cyclin B1 Inhibitor ist unabhängig von ihrer Proteaseaktivität, die gegenseitige Inhibition ist reversibel.

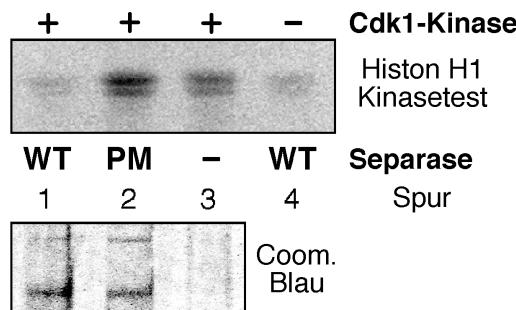


Abb. 18: Freie Cdk1-Kinase wird durch Separase inhibiert. Rekombinante Cdk1-Kinase sowie gereinigte WT- oder PM-Separase (siehe Coomassiefärbung) wurden in den angezeigten Kombinationen in Gegenwart von Histon H1 und $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Phosphorylierung von H1 wurde mittels Autoradiographie analysiert.

3.4.2 Separase blockiert die Phosphorylierung wichtiger mitotischer Cdk1-Substrate

Die biochemischen Daten haben gezeigt, dass Separase die Aktivität der Cdk1-Kinase gegenüber Histon H1 *in vitro* hemmt. Als nächstes stellte sich die Frage, ob Separase auch unter den physiologischen Bedingungen eines *Xenopus* Eiextraktes als Cdk1-Inhibitor wirksam ist. Die Inaktivierung von Cdk1 wird durch den APC/C-abhängigen Abbau von CyclinB1 vermittelt und ist für den Austritt aus der Mitose sowie der Meiose I und II notwendig. Ausgehend von einem in der Metaphase der MeioseIII arretierten *Xenopus* Eiextrakt verhinderte der Zusatz von nicht abbaubarem CyclinB1 Δ 90 auch nach der Calcium-abhängigen Aktivierung des APC/C die Dekondensation von Spermienchromatin sowie die Depolymerisation von umgebenden, sternförmig angeordneten Mikrotubuli (so genannte Astern; Abb. 19, Spur 4 unten). Aliquots eines auf diese Weise in der Anaphase arretierten Extraktes wurden mit Kontrollpuffer oder gleichen Mengen gereinigter Komplexe aus Securin und WT- bzw. PM-Separase versetzt (Westernblot, Spuren 5 und 6). Fünfzig Minuten später waren die mit Puffer oder PM-Separase supplementierten Proben immer noch meiotisch (Spuren 3 und 4). Im Gegensatz hierzu hatte der WT-Separase enthaltende Extrakt die Meiose

verlassen, wie folgende Interphase-typische Ereignisse zeigten (Spur 2 von oben nach unten): 1) Inaktivität von Cdk1 gegenüber Histon H1 und 2) Inaktivierung des APC/C, d.h. zugesetztes ^{35}S -markiertes Securin wurde nicht abgebaut; 3) Ersetzen meiotischer Astern durch ein für die Interphase typisches, diffuses Mikrotubulgeflecht und 4) Dekondensation des Chromatins und Ausbildung runder Zellkerne. Die letzten drei Ereignisse werden durch die Dephosphorylierung von Cdk1-Substraten ausgelöst.

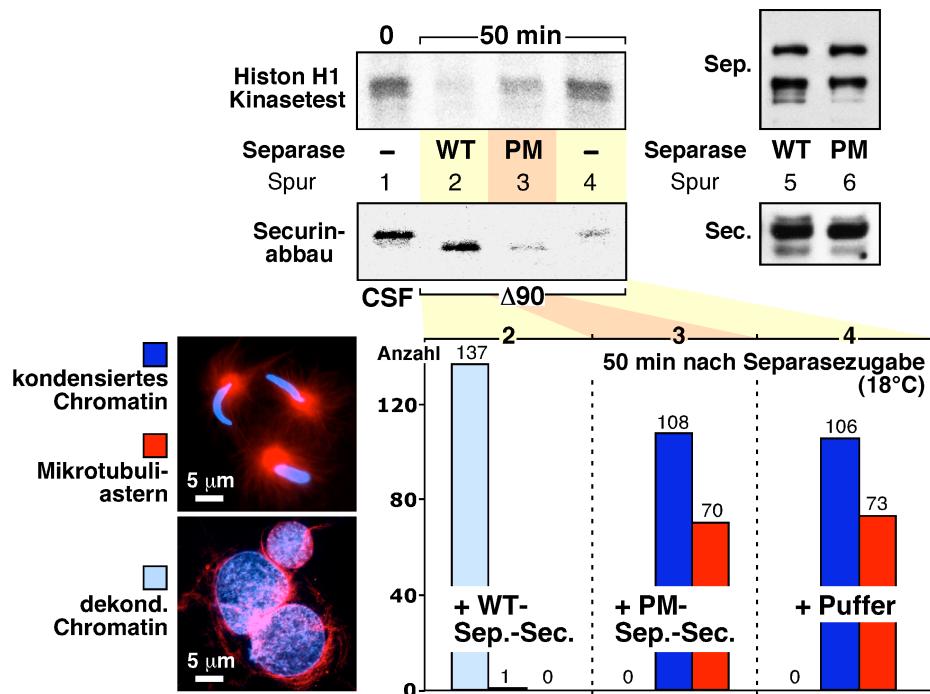


Abb. 19: Separase hebt einen durch konstitutiv aktive Cdk1 verursachten meiotischen Arrest auf. Ein *Xenopus* Anaphaseextrakt (55 nM $\Delta 90$; APC/C aktiv) wurde mit WT- oder PM-Separase-Securin Komplex (je 40 nM; Spuren 5 und 6) bzw. Referenzpuffer für 50 Minuten bei 18°C inkubiert. Cdk1- und APC/C-Aktivität wurden dann bestimmt durch Histon H1 Phosphorylierungs- (oben links) bzw. ^{35}S -Securinabbau (darunter befindliches Autoradiogramm, 30 min RT). Zur Bestimmung des Zellzyklusstadiums wurden kondensiertes Chromatin (dunkelblau), meiotische Astern (rot) und Nukle (hellblau) gezählt (Gesamtmenge auf den Balken). Auf der linken Seite sind repräsentative Bilder von DAPI-gefärbtem Chromatin in blau und Rhodamin-markierten Mikrotubuli in rot dargestellt. Es ist anzumerken, dass Securin im Komplex mit Separase nicht die für freies Securin typische Phosphorylierung im meiotischen Extrakt und die damit verbundene Verzögerung in SDS-PAGE zeigt (vgl. Spuren 1 und 4 mit 2 und 3).

Vertebraten-Separase ist somit in der Lage, die Phosphorylierung verschiedener physiologisch relevanter Substrate durch Cdk1 zu verhindern und verhält sich daher wie ein echter Kinaseinhibitor.

3.5 Separase-abhängige Cdk1-Kinaseinhibition spielt eine wichtige Rolle beim Übergang von Meiose I nach II in Vertebraten

3.5.1 Separase-vermittelte Cdk1-Inhibition hat nur einen schwach modulierenden Effekt auf den Austritt aus Meiose II

Die Cdk1-inhibitorische Wirkung von Separase wird durch Securin negativ reguliert. Da in mitotisch arretierten HeLa-Zellen der überwiegende Teil von Separase (>90%; nicht gezeigt) in Assoziation mit Securin vorliegt, wird Separase erst beim Abbau von Securin in der Anaphase nicht nur als Protease sondern auch als Cdk1-Inhibitor aktiv. Dies legt nahe, dass Separase bei der Inaktivierung von Cdk1 am Ende der Mitose, der Meiose I oder der Meiose II eine Rolle spielen könnte. Die Tatsache, dass der APC/C gleichzeitig mit dem Abbau von Securin auch den Abbau von Cyclin B1 vermittelt, definiert ein Zeitfenster, in dem Securin-freie Separase und noch aktives Cdk1-CyclinB1 koexistieren und in dem Separase dem APC/C beim Abschalten der Cdk1-Kinase assistieren könnte.

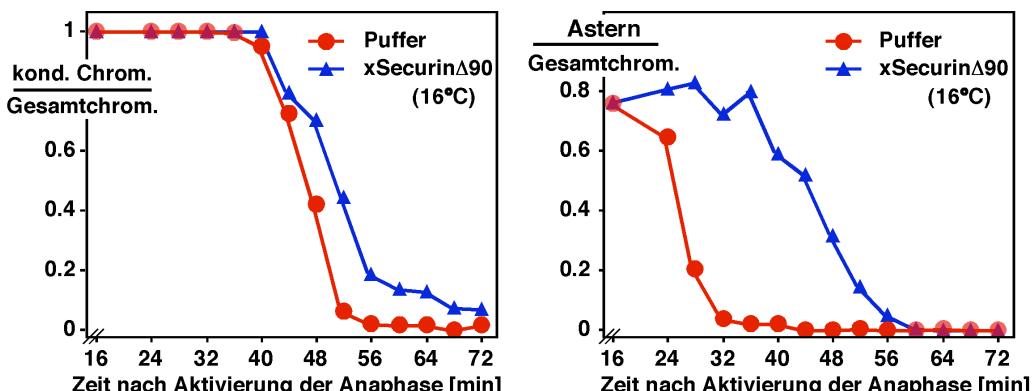


Abb. 20: Nicht abbaubares Securin verursacht eine leichte Verzögerung beim Austritt aus der Meiose II eines *Xenopus* Eiextraktes. Bakteriell exprimierte xSecurinΔ90 (blaue Dreiecke) oder Referenzpuffer (rote Kreise) wurden zu einem CSF-Extrakt gegeben. 30 Minuten später wurde durch Calciumzugabe die Anaphase induziert ($t = 0$). Die Graphik zeigt das Verhältnis des kondensierten Chromatins zum Gesamtchromatin (links) und das Verhältnis der mitotischen Chromatin-assozierten Astern zum Gesamtchromatin (rechts) über die Zeit.

Es sollte im zellfreien *Xenopus* System eine mögliche Rolle von Separase beim Verlassen von Meiose II untersucht werden. Dazu wurde endogene Separase durch die Zugabe von rekombinantem, nicht abbaubarem *Xenopus* Securin zu einem CSF-Extrakt am Binden von Cdk1 gehindert. Daraufhin wurde die Aktivierung des APC/C durch Calciumzugabe induziert. Die kinetische Analyse des Austrittes aus der Meiose ergab,

dass Securin im Vergleich zu einer Referenzprobe die Chromosomendekondensation um 6 Minuten bei 16°C verzögerte (Abb. 20, linke Hälfte). Interessanterweise war die Verzögerung durch Securin in Bezug auf meiotische Mikrotubulstrukturen wesentlich deutlicher. Die mit Chromatin assoziierten Astern blieben im Durchschnitt 23 Minuten länger bestehen als in der Pufferkontrolle (Abb. 20, rechte Hälfte). Der Austritt aus der Meiose wurde aber nur vorübergehend verzögert, und auch in Wiederholungen des Experimentes erreichten schließlich alle Extrakte die Interphase. Dieses Ergebnis schließt eine essentielle Funktion von Separase beim Austritt aus der Meiose II aus, stünde aber mit einer möglichen Feinmodulation der Cdk1-Inaktivierung durch Separase im Einklang. Da Securin einen leicht aktivierenden Effekt auf Cdk1 in dem, in Abbildung 17C gezeigten, Experiment hatte, kann die hier beobachtete Verzögerung allerdings nicht zweifelsfrei auf das Wegfangen von Separase zurückgeführt werden.

3.5.2 Die Freisetzung der Kinase aus dem Separase-Cdk1 Komplex führt zu einem Stillstand im Ablauf der Meiose

Um eine mögliche Funktion der Separase-abhängigen Inhibition von Cdk1 in der Meiose I zu untersuchen, sollten in der Prophase der Meiose I arretierte Oozyten nach der Injektion von blockierenden Separaseantikörpern *in vitro* zum Durchlaufen der ersten Reifeteilung angeregt werden. Es wurden Peptide entsprechend den Aminosäureabschnitten 1123-1154 (S/P-Stelle) und 1381-1422 (CLD) von *Xenopus* Separase synthetisiert, an KLH gekoppelt und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Ein resultierender Antikörper sollte mit Cdk1 um die Bindung an *Xenopus* Separase konkurrieren und zwar durch die Verhinderung der essentiellen Phosphorylierung von Ser1139 (entsprechend Ser1126 in humaner Separase) bzw. durch Maskieren der als Cyclin B1-Bindestelle fungierenden CLD. Die gegen die antigenen Peptide affinitätsgereinigten Antikörper detektierten rekombinante *Xenopus* Separase im 293T-Zelllysat (Abb. 21A, Spuren 1 und 8). Der anti-CLD Antikörper immunpräzipitierte und detektierte endogene Proteine von 230 und 170 kDa aus einem meiotischen *Xenopus* Eiextrakt in guter Übereinstimmung mit den Erwartungen für Volllängen-Separase und dem selbstgespalteten N-terminalen Fragment (Abb. 21A, Spuren 2-5). Die gleichen Banden wurden auch durch den anti-S/P Antikörper erkannt (Spuren 6 und 7). Die weitere biochemische Charakterisierung der Antikörper ergab, dass ein Gemisch aus beiden Antikörpern in der Lage ist, in einem Δ90-Extrakt die

Bindung von Cdk1 an *Xenopus* Separase zu verhindern (Abb. 21B, vgl. Spuren 3 und 4). In der kurzen Exposition des Westernblots sieht man, dass sich Separase im Anaphase- gegenüber dem CSF-Extrakt stärker selbstspaltet und zwar unabhängig von der Anwesenheit der Separaseantikörper (vgl. Spuren 1, 3 und 4, kurze Exposition). Die Antikörper scheinen demnach keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der Separase zu haben.

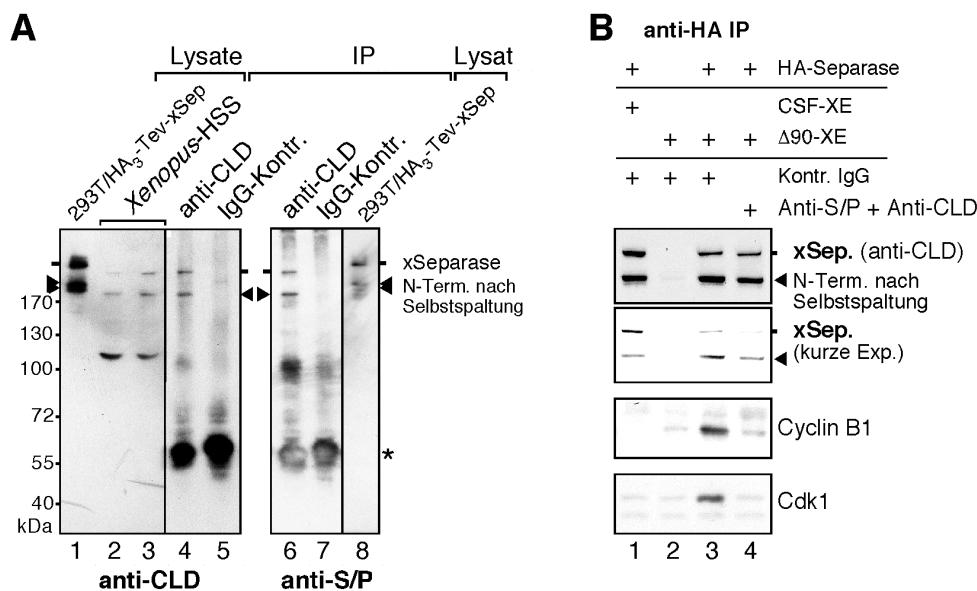


Abb. 21: Charakterisierung von anti-xSeparase Antikörpern, die Cdk1-Bindung blockieren. (A) Peptidantikörper gegen Cdk1-Bindungsdeterminanten von *Xenopus* Separase erkennen transfizierte und endogene Separase. Das Lysat aus 293T-Zellen, welche den HA₃-Tev-xSeparase-xSecurin Komplex exprimierten (Spuren 1 und 8), sowie 0,5 µl eines ultrazentrifugierten *Xenopus* Eiextraktes (HSS) und das anti-CLD Immunpräzipitat aus 10 µl HSS (Spuren 4 und 6) wurden im Westernblot mit den affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die S/P-Stelle (anti-AS 1123-1154) oder die CLD (anti-AS 1381-1422) analysiert. „*“ markiert die schwere Kette des Antikörpers. **(B)** Die Kombination beider Antikörper verhindert Cdk1-Bindung ohne die Separaseaktivität zu beeinflussen. Immobilisierter HA₃-Tev-Separase-Securin Komplex wurde wie angegeben in meiotischem Eiextrakt mit inaktivem (CSF-Extrakt) oder aktivem APC/C (Δ90-Extr.) zusammen mit anti-Separase oder Kaninchen-IgG inkubiert. Aliquots der reisolierten, mit TEV-Protease eluierten Separase wurden im Westernblot analysiert.

Als nächstes wurden einem betäubten Froschweibchen unreife Oozyten (in Prophase II arretiert) durch einen einfachen operativen Eingriff entnommen, durch Kollagenaseverdau von umgebenden Follikelzellen befreit und mit je 200 ng Separase-antikörpergemisch oder unspezifischen IgG mikroinjiziert. Durch Zugabe von Progesteron zum Kulturmedium wurde dann die Reifung, d.h. der Übergang von Prophase I zur Metaphase der Meiose II induziert. Das erfolgreiche Abschließen dieses Vorganges erkennt man am Ausstoß des Polkörpers, der sich über die in ihm enthaltene

DNA mikroskopisch identifizieren lässt. Dazu wurden die Oozyten fixiert und permeabilisiert, bevor die DNA fluoreszenzgefärbt wurde. Bemerkenswerterweise verhinderten die Separaseantikörper die Polkörperbildung sehr effizient. Im Vergleich zur IgG-Kontrolle wurde eine um den Faktor 11,2 erniedrigte Reifungsrate beobachtet (Abb. 22). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Inhibition von Cdk1 durch Separase beim Übergang von Meiose I nach II eine besondere Bedeutung hat.

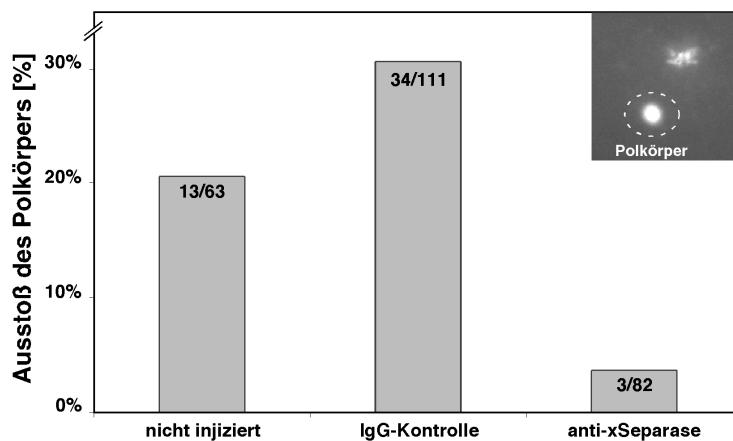


Abb. 22: Separaseantikörper verhindern die meiotische Reifung in *Xenopus* Oozyten. Prophase I-arretierte Oozyten wurden mit unspezifischen IgG oder einem Gemisch von Separaseantikörpern, welches die Cdk1-Bindung verhindert, injiziert (je 200 ng). Zwanzig Minuten später wurde die Reifung der Eier (12 Stunden bei 18°C) durch die Zugabe von 10 μ g/ml Progesteron ins Kulturmedium induziert. Nach Fixierung und Hoechstfärbung wurde der prozentuale Anteil der Eier mit sichtbarem Polkörper ausgewertet. Angegeben sind die Polkörper pro Gesamtmenge (= Summe aus mehreren Einzelexperimenten). Als weitere Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten analysiert. Auf der rechten Seite ist ein repräsentatives Bild einer gereiften Metaphase II-Oozyte mit Polkörper (Kreis) dargestellt.

Obwohl das *Xenopus* Oozytensystem aufgrund der Verfügbarkeit und Größe der Eier große Vorteile bietet, ist dessen Effizienz aufgrund großer Schwankungen in der Eiqualität und Reifungsrate relativ gering (Liu, 2006). Um die beobachtete *in vivo* Relevanz der Protease-unabhängigen Funktion von Separase in der Meiose zu bestätigen, wurde im Zuge dieser Doktorarbeit ein analoger Peptidantikörper gegen Separase aus *Mus musculus*, genauer gegen die Sequenzabschnitte 1120-1134 und 1340-1354, aufgereinigt. Der Antikörper erkannte im Westernblot den *in vitro* translatierten mittleren Teil von Maus-Separase (Aminosäuren 1053-1382) und reagierte aufgrund von 83%iger Sequenzhomologie auch mit transfizierter humaner Separase in einem 293T-Zelllysat (Abb. 23A, Spuren 1-3). Er erkannte ferner endogene Separase in Zelllysaten eines B-Zell Lymphoms von Maus (Spur 4). Aufgrund der Kreuzreaktivität

des Antikörpers wurde die weitere Charakterisierung stellvertretend mit humaner Separase durchgeführt. Die Zugabe des Antikörpers zu aktiver Separase hatte keinen störenden Einfluss auf die Spaltung von Kohäsin (Abb. 23B, Spuren 1 und 4). Andererseits kompromittierte der Antikörper die Separase-Cdk1 Komplexbildung, da er die Inhibition von Separase durch Cdk1 im gereinigten System zum Teil verhinderte (Abb. 23B, Spuren 2 und 3).

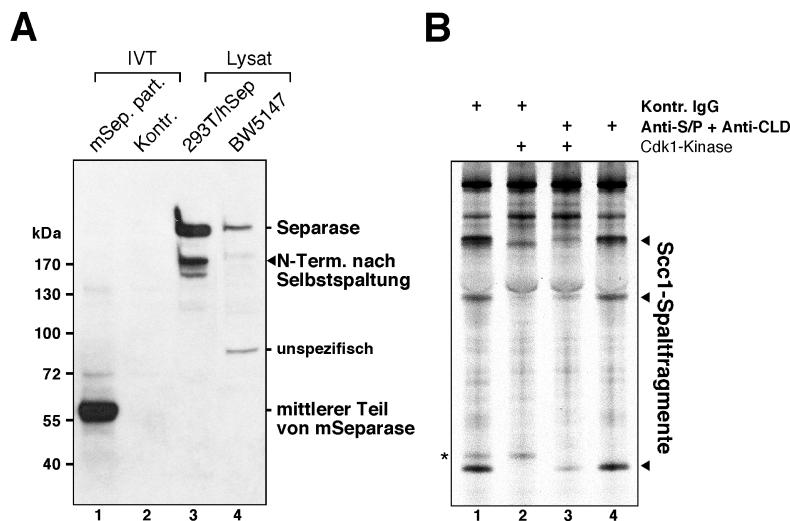


Abb. 23: Charakterisierung des Antikörpers gegen mSeparase. (A) Ein Peptidantikörper gegen die Cdk1-Bindedeterminanten von *Mus musculus* Separase erkennt endogene Separase. Die Spezifität eines Antikörpers gegen die analoge S/P-Stelle (AS 1120-1134) und CLD (1340-1354) in Maus-Separase wurde im Westernblot analysiert. Die untersuchten Proben waren der *in vitro* translatierte (IVT) mittlere Teil von mSeparase (AS 1053-1382) und Kontrolle (Spuren 1 und 2), HA₃-hSeparase im Lysat aus 293T-Zellen (Spur 3) und ein Lysat aus Zellen, abgeleitet aus einem Maus-B-Zell Lymphom (Spur 4). (B) Anti-mSeparase behindert die Bindung von Cdk1 aber beeinflusst nicht die proteolytische Aktivität der Separase. Aktive hSeparase wurde mit anti-mSeparase oder unspezifischen IgG und rekombinanter Cdk1-Kinase oder Referenzpuffer wie angegeben inkubiert und auf Kohäsinspaltung hin getestet. „*“ markiert eine Bande, die in den IgG-Proben auftrat.

Die Injektionsexperimente in Mausoozyten wurden im Rahmen einer Kollaboration von Alexandra Reis im Labor von Keith Jones durchgeführt. Wie schon in den entsprechenden *Xenopus* Experimenten verhinderte auch der Antikörper gegen Maus-Separase sehr effizient den Ausstoß des Polkörpers, wenn er in Oozyten der Maus injiziert wurde (Abb. 24A). Wenn die polkörperlosen Oozyten mit anti-Tubulin angefärbt wurden, so sah man, dass die Chromosomen der meisten Oozyten (59%) auf einer elongierten Meiose I-Spindel verstreut lagen (Abb. 24B, Bild II). Zwei entscheidende Zusatzexperimente in Maus belegten, dass dieser Phänotyp nicht durch eine unerwartete Inhibition der Kohäsinspaltung *in vivo* zustande kam: 1) Wurde dem

Medium der mit anti-Separase injizierten Oozyten etwa eine Stunde bevor sich der Polkörper normalerweise formt, der chemische Cdk1-Inhibitor Roscovitin zugesetzt, so erfolgte die meiotische Reifung wieder normal. 2) Polkörper bildeten sich auch dann in Oozyten, wenn gleichzeitig mit den Separaseantikörpern eine mRNA injiziert wurde, die für *Xenopus* Separase bis zur Selbstspaltstelle, also ohne die C-terminale, proteolytisch aktive Domäne, kodierte (Abb. 24A). *Xenopus* Separase wurde verwendet, weil sie nicht vom Antikörper gegen Maus-Separase erkannt wurde. Daher lässt sich ausschließen, dass die translatierte, rekombinante Separase wirkt, indem sie endogene Separase kompetitiv aus dem Komplex mit dem Antikörper verdrängt (nicht gezeigt). Wurde die zu Ser1126 aus humaner Separase entsprechende Phosphorylierungsstelle (Ser1139) zu Ala mutiert, so war die entsprechende mRNA nicht mehr in der Lage den Antikörpereffekt aufzuheben.

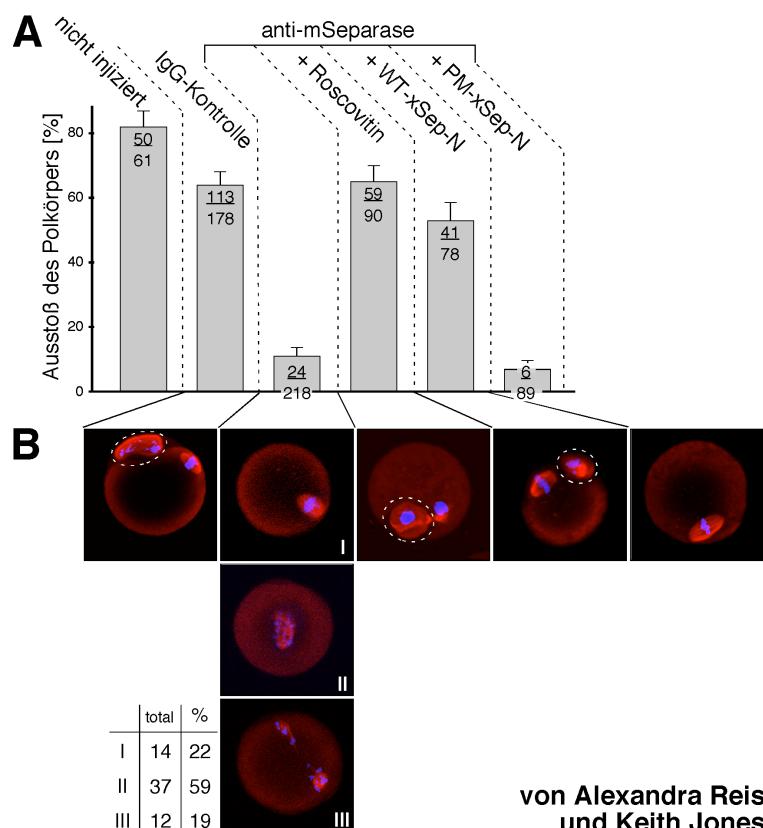


Abb.24: Die Blockierung des Polkörperausstoßes durch Separaseantikörper wird durch gleichzeitige Inhibition der Cdk1-Kinase aufgehoben. (A) Dargestellt ist der Polkörperausstoß von Mausoozyten, wie angegeben injiziert mit Kontroll-IgG, anti-mSeparase und mRNAs der N-terminalen Fragmente (AS 1-1552) für wildtypische *Xenopus* Separase oder mit zusätzlich mutierter Phosphorylierungsstelle (Ser1138/1139Ala). (B) Repräsentative Bilder der injizierten Mausoozyten. Mit anti-Tubulin gefärbte Spindeln (rot) und Hoechst gefärbte Chromosomen (blau) wurden durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Daten wurden mit freundlicher Genehmigung von A. Reis und K. Jones zur Verfügung gestellt.

Der Polkörperausstoß der mit anti-mSeparase injizierten Mausoozyten lässt sich also durch zwei unabhängige Maßnahmen wiederherstellen, die nach heutigem Wissensstand beide die Cdk1-Aktivität herabsetzen ohne dabei die proteolytische Aktivität von Separase zu beeinflussen. Insgesamt zeigen diese Experimente, dass die Separase-abhängige Inhibition von Cdk1 am Ende der ersten meiotischen Reifeteilung von Vertebraten-Oozyten eine essentielle Bedeutung hat.

4 Diskussion

Bisher wurden in der Literatur zwei direkte Regulationsmechanismen beschrieben, die die proteolytische Aktivität von Separase inhibieren. Zum Einen bindet der Anaphaseinhibitor Securin direkt an Separase (Ciosk *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999). Zum Anderen wird Separase in einem Extrakt aus den Eiern des Krallenfrosches in Gegenwart von konstitutiv aktiver Cdk1-Kinase inaktiviert. Obwohl zwei inhibitorische Phosphorylierungsstellen in Separase identifiziert wurden (Stemmann *et al.*, 2001), blieb der Mechanismus dieser Securin-unabhängigen Inhibition von Separase unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Regulation in seinen molekularen Details aufgeklärt und dabei eine unerwartete, neue Funktion von Vertebraten-Separase als Cdk1-Inhibitor entdeckt, welche in der Meiose I von besonderer Bedeutung ist.

4.1 Der molekulare Mechanismus der Separase-Cdk1 Komplexbildung

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung zwar notwendig, aber nicht ausreichend ist, um Separase zu inhibieren. Bei der biochemischen Reinigung von inhibierter Separase aus Securin-freiem *Xenopus* Eiextrakt wurde der postulierte Inhibitor im Komplex mit phosphorylierter Separase als die Cdk1-Kinase selbst identifiziert. Mit Hilfe stöchiometrischer (aber nicht katalytischer) Mengen von rekombinanter Cdk1-Kinase konnte die Securin-unabhängige Inhibition von Separase im gereinigten System rekonstituiert werden.

Mehrere Experimente belegen, dass sich Separase-Cdk1 von einem Substrat-Kinasekomplex unterscheidet: 1) Die effiziente Katalyse erfordert allgemein eine transiente Interaktion von Kinasen mit ihren Substraten. Der Separase-Cdk1 Komplex bleibt jedoch über mehrere chromatographische Reinigungsschritte stabil und lässt sich auch nicht durch hohe Konzentrationen von anderen Cdk1-Substraten, Phosphat oder Adenosinnukleotiden dissoziieren. Im Gegensatz zu all diesen getesteten Faktoren konkurriert Securin effizient mit Cdk1 um die Bindung an Separase. 2) Cdk1 kann Separase auch dann vollständig phosphorylieren, wenn sich die Protease im Komplex mit Securin befindet und daher nicht stabil von der Kinase gebunden werden kann (Stemmann *et al.*, 2001). Umgekehrt kann katalytisch inaktive Cdk1-Kinase vorphosphorylierte Separase inhibieren. Die Phosphorylierung ist also für die stabile Komplexbildung notwendig, lässt sich aber zeitlich von dieser trennen. 3) In einem

Substrat-Kinasekomplex sollte sich die phosphorylierte Seitenkette im aktiven Zentrum der Kinase befinden und vor Dephosphorylierung geschützt sein. Jüngste Befunde zeigen jedoch, dass die wichtigste inhibitorische Cdk1-Phosphorylierungsstelle in Separase (Ser1126) bei der Behandlung mit Phosphatase tatsächlich dephosphoryliert wird (Dominik Boos, persönliche Mitteilung), ohne dass der Separase-Cdk1 Komplex dabei dissoziiert (siehe Abb. 13B, Spur 5). Die Phosphorylierung von Ser1126 scheint also nur essentiell für die Etablierung, nicht aber für die Aufrechterhaltung der Separase-Cdk1 Interaktion zu sein. 4) Ebenfalls gegen eine Substrat-Kinasebeziehung spricht der Befund, dass die regulatorische Cyclin B1-Untereinheit von Cdk1 alleine ausreicht, um bereits phosphorylierte Separase zu inaktivieren (siehe unten).

Etwa 250 Aminosäurereste hinter Ser1126 wurde eine Region in Separase identifiziert, deren Veränderung durch Punktmutationen die Bildung von Separase-Cdk1 ebenfalls verhindert. Die Arbeiten von O. Stemmann und D. Boos haben gezeigt, dass zwei in dieser Region liegende Cdk1-Konsensusstellen (Thr1346 und Ser1399) *in vivo* phosphoryliert werden, was wiederum für die Separase-Cdk1 Komplexbildung wichtig ist (Stemmann *et al.*, 2001 und persönliche Mitteilung). Interessanterweise wurden alle gegen Cdk1 resistenten Separasemutanten auch von isoliertem Cyclin B1 schlechter inhibiert und zwar in identischer Abstufung. Dabei sollte jedoch betont werden, dass Ser1126 und Thr1346 stets in Kombination zu Ala mutiert wurden, und daher kann nicht unterschieden werden, welchen Beitrag die Phosphorylierung von Ser1126 bzw. Thr1346 für die CyclinB1-Bindung leistet. Dennoch lässt sich, aufgrund einer interessanten Homologie zwischen Separase und dem an der Replikationslizenierung beteiligten Faktor Cdc6 (siehe unten), wie folgt spekulieren. Von der Position 1342 bis 1404 weist Vertebraten-Separase 24% Identität mit dem N-Terminus von *S. cerevisiae* Cdc6 auf, weshalb dieser Abschnitt als CLD („Cdc6-like domain“) bezeichnet wird. Wie Separase und Cdk1, so bilden auch Cdc6 und Cdk1 einen Komplex. Das Labor von J.F. Diffley konnte kürzlich zeigen, dass die isolierte Cyclin B-Untereinheit spezifisch den N-Terminus von Hefe Cdc6 bindet, wenn dieser an mindestens zwei Stellen phosphoryliert ist (Mimura *et al.*, 2004). Basierend auf diesen Parallelen könnte das weit außerhalb der CLD liegende, phosphorylierte Ser1126 nicht in direktem Kontakt mit CyclinB1 stehen, wohl aber das phosphorylierte Thr1346. Die Resistenz der Thr1346Ala-Mutante gegenüber CyclinB1 bei gleichzeitig unveränderter Inhibition der Ser1126Ala-Separase würde stark für dieses Modell sprechen.

Zusammengekommen sprechen diese Befunde für eine Inhibition der Separase in zwei Stufen: Zuerst wird Separase an den Resten Ser1126 und Thr1346 durch Cdk1 phosphoryliert. Ser1399 und mögliche weitere Reste innerhalb der CLD könnten auch von anderen mitotischen Kinasen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsereignisse schaffen eine Bindestelle für Cdk1, welche dann im zweiten Schritt einen stabilen Komplex mit Securin-freier Separase eingeht. Dabei wird die phosphorylierte CLD direkt von Cyclin B1 erkannt. Die viel effizientere Inhibition von Separase durch den Cdk1-Kinasekomplex im Vergleich zu isoliertem Cyclin B1 zeigt jedoch, dass auch der Cdk1-Cks Teilkomplex zur festen Bindung beiträgt und möglicherweise ebenfalls einen direkten Kontakt zu Separase herstellt. Dass das phosphorylierte Ser1126 direkt an das aktive Zentrum von Cdk1 oder die Anionenbindestelle der Cks-Untereinheit bindet, erscheint aufgrund seiner Zugänglichkeit für Phosphatase unwahrscheinlich. Eventuell führt die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung in Separase, welche die Komplexbildung begünstigt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein weiterer Faktor transient mit dem phosphorylierten Ser1126 interagiert und die Kinasebindung initiiert.

4.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Securin- und Cdk1-abhängiger Separaseinhibition

Die Inhibition von Separase durch Securin oder Cdk1 erfolgt voneinander unabhängig und schließt sich sogar gegenseitig aus. Beide Inhibitionsmechanismen zeigen auffällige Gemeinsamkeiten: Die Cyclin B1-Untereinheit von Cdk1, welche in hoher Konzentration zur Inhibition von Separase ausreicht, ist wie Securin ein Substrat des APC/C, und beide werden am Übergang zwischen Meta- und Anaphase mit identischen Kinetiken abgebaut (Hagting *et al.*, 2002). In beiden Fällen liegt das vom APC/C erkannte Sequenzmotif, die „Destruction Box“, nahe dem Aminoterminus. Wenn man Securin oder Cyclin B1 durch eine N-terminale Deletion von 90 Aminosäuren stabilisiert, so bleibt die Fähigkeit, Separase zu inhibieren, in beiden Fällen bestehen. Dies legt nahe, dass die N-Termini der gebundenen Inhibitoren für den APC/C jeweils frei zugänglich sind, wodurch eine effiziente Aktivierung der Separase gewährleistet wird. Die Unempfindlichkeit des Separase-Cdk1 Komplexes gegen Dephosphorylierung durch die β -Phosphatase deutet an, dass auch *in vivo* Separase ausschließlich durch den

APC/C vermittelten Abbau von der Cdk1-Kinase befreit wird, also ähnlich, wie es bei Separase im Komplex mit Securin der Fall zu sein scheint.

Daneben gibt es aber auch signifikante Unterschiede zwischen Cdk1- und Securin-vermittelter Separaseinaktivierung. Beide Inhibitoren binden vermutlich an unterschiedliche Sequenzabschnitte von Separase. Securin interagiert mit dem N- und möglicherweise auch dem C-Terminus der großen Protease (Hornig *et al.*, 2002; Jäger *et al.*, 2001; Jager *et al.*, 2004; Kumada *et al.*, 1998; Viadiu *et al.*, 2005). Wichtige Stellen für die Cdk1-Bindung liegen dagegen zwischen den Positionen 1126 und 1399, etwa in der Mitte der aus 2120 Aminosäuren bestehenden humanen Separase (Abb. 25). Alle Mutationen in dieser Region, die eine Resistenz gegen Cdk1 vermitteln, beeinflussen die Interaktion von Securin mit Separase nicht.

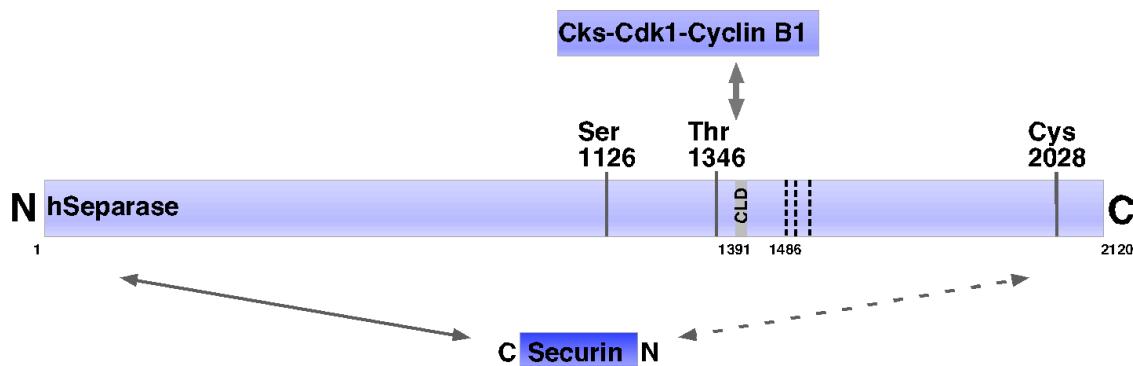


Abb. 25: Schematische Darstellung von hSeparase mit ihren Interaktionspartnern. Gezeigt werden die relativen Positionen der wichtigen Phosphorylierungsstellen Ser1126 und Thr1346 zu den letzten 12 Aminosäuren (1391-1402) der Cdc6-ähnlichen Domäne (CLD), den drei Selbstspaltstellen (gestrichelte, senkrechte Linien) und dem proteolytisch aktiven Cystein in der Primärstruktur von humaner Separase. Die Interaktionsbereiche von Cdk1 und Securin mit Separase sind durch Doppelpfeile angedeutet. N bezeichnet den Aminotermus, C den Carboxyterminus.

Demzufolge scheinen Cdk1 und Securin jeweils eine bestimmte Konformation von Separase zu induzieren oder zu stabilisieren, welche durch den anderen Inhibitor nicht erkannt wird. In Übereinstimmung damit verhalten sich Separase-Securin und Separase-Cdk1 Komplexe in der Chromatographie sehr unterschiedlich, obwohl Separase jeweils 91% bzw. 72% des Molekulargewichtes ausmacht (nicht gezeigte Daten). Im Gegensatz zu Securin scheint Cdk1 auch nicht die Fähigkeit zu besitzen, als „Chaperon“ von Separase zu fungieren. In Securin-defizienten Zellen sind sowohl die Menge als auch die Aktivität von Separase stark erniedrigt und lassen sich nicht durch die Überexpression von Cdk1 und Cyclin B1 erhöhen (Pfleghaar *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2006).

4.3 Die physiologische Bedeutung der Cdk1-vermittelten Separaseinhibition

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass entgegen der ursprünglichen Annahme (Stemmann *et al.*, 2001) die Securinbindung und die inhibitorische Phosphorylierung nicht gleichzeitig auf dasselbe Separasemolekül wirken können. Stattdessen schließen sich beide Regulationen gegenseitig aus und stellen parallele und nicht redundante Inhibitionsmechanismen dar. Aufgrund der Verwendung von rekombinantem Cyclin B1 in zellfreien Extrakten konnte nicht geklärt werden, ob die Cdk1-Aktivität in der Mitose *in vivo* hoch genug wäre, um Separase effektiv zu regulieren. Die Arbeiten zahlreicher unabhängiger Gruppen an lebenden Zellen stellten daher eine wichtige Überprüfung der biochemischen Experimente dar: Die Veröffentlichungen berichten, dass stabiles Cyclin B1 die Trennung sowohl von homologen Chromosomen in der Meiose, als auch von Schwesternchromatiden in der Mitose verhindert, ohne dabei den APC/C-abhängigen Abbau von endogenem Securin und Cyclin B1 zu beeinträchtigen. Es wurde berechnet, dass Cyclin B1 seine inhibitorische Wirkung auf die Anaphase schon ausübt, wenn es nur leicht überexprimiert wird (1,5- bis 2fach, Hagting *et al.*, 2002) oder sogar, wenn seine Konzentration deutlich unter der von endogenem Cyclin B1 liegt (20-30%, Chang *et al.*, 2003; 2,5-7,8%, Herbert *et al.*, 2003). Diese Daten sprechen für die effektive Inhibition von Separase durch eine physiologische Cdk1-Aktivität in lebenden Zellen.

Cdk1 verbessert tendenziell die proteolytische Spaltung von Kohäsin (O. Stemmann, persönliche Mitteilung), was einen negativen Einfluss der Kinase auf das Separasesubstrat unwahrscheinlich macht. Trotzdem können zusätzliche Mechanismen nicht ausgeschlossen werden, durch welche dieses Schlüsselenzym der Mitose der Anaphase entgegenwirkt. In der Tat beobachtete die Gruppe von Stephan Geley bei der Expression von stabilem Maus-Cyclin B1 in humanen Krebszelllinien eine Inhibition der Chromosomensegregation, die sie auf eine Cdk1-abhängige konstitutive Aktivierung des Chromokinesins Kid zurückführen konnte (Wolf *et al.*, 2006). Es sollte erwähnt werden, dass dieses Labor den inhibitorischen Effekt konstitutiv aktiver Cdk1-Kinase auf die Chromosomentrennung als einzige Gruppe nicht bestätigen konnte. Es wäre daher interessant, Separase und Cdk1 in der verwendeten Zelllinie auf Mutationen hin zu untersuchen, die die Komplexbildung verhindern. Hieraus könnte sich die interessante Frage ergeben, ob die Unfähigkeit, Separase durch Cdk1 zu inhibieren, in entarteten Zellen allgemein vermehrt auftritt.

Die Koexistenz von Separase-Securin und Separase-Cdk1 in Nocodazol-arretierten Zellen impliziert, dass der Verlust des einen Inhibitionsmechanismus möglicherweise durch den anderen kompensiert werden kann. Diese Hypothese wurde kürzlich bestätigt (Huang *et al.*, 2005). Das zu Ser1126 in humaner Separase analoge Ser1121 in Maus-Separase wurde in einem Separaseallel zu Ala verändert. Wenn diese, vermutlich dominant wirkende Mutation zusätzlich mit einem Securin-Knockout kombiniert wurde, so waren die entsprechenden embryonalen Stammzellen zwar lebensfähig, litten aber nach einer Behandlung mit Nocodazol unter dem raschen Verlust der Schwesterchromatidenkohäsion. In den beiden Einzelmutanten wurde dies nicht beobachtet. Auch jüngste Studien von Holland und Taylor unterstreichen die Bedeutung der Separaseinhibition durch Cdk1: Wenn Securin durch die Überexpression von Separase in Hek293-Zellen ausgetriert wurde, so verursachten die in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten mit eingeschränkter Cdk1-Bindung, aber nicht die wildtypische Separase, eine frühzeitige Trennung der Schwesterchromatiden (persönliche Mitteilung). Dieser Defekt resultierte dann in der Arretierung der Zellen in der Mitose, da der mitotische „Checkpoint“ aktiviert wurde. Unerwartet war jedoch, dass trotz der Anwesenheit von vermutlich nicht inhibierter Separase die Kongression der Chromosomen zur Metaphaseebene zunächst noch stattfand und die Anaphase im Durchschnitt lediglich 5 Minuten zu früh ausgelöst wurde. Diese Beobachtung, sowie das Ausbleiben von Chromosomenfehlsegregationen in den doppelt mutierten, embryonalen Stammzellen (siehe oben, Huang *et al.*, 2005), lässt auf einen weiteren, bislang unbekannten Inhibitionsmechanismus der Anaphase schließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cdk1 *in vivo* ein wirksamer Separaseinhibitor ist, der den Verlust von Securin kompensieren kann, und dass die Cdk1-abhängige Regulation von Separase unter bestimmten Bedingungen (z.B. einer verlängerten Metaphase aufgrund der Schädigung des Spindelapparates) für eine zuverlässige Chromosomensegregation essentiell wird.

4.4 Vertebraten-Separase ist ein S.c. Cdc6-ähnlicher Cdk1-Inhibitor

Bei der Charakterisierung der Cdk1-abhängigen Separaseinhibition stellte sich überraschenderweise heraus, dass die mit Separase assoziierte Cdk1-Kinase inaktiv war und durch das Entfernen von Separase reaktiviert werden konnte. Im Separase-Cdk1 Komplex inhibieren sich also beide Enzyme gegenseitig. Da auch katalytisch inaktive

(und daher nicht selbstgespaltene) Separase mit Cdk1 assoziierte, ergibt sich insgesamt, dass Vertebraten-Separase unabhängig von seiner proteolytischen Aktivität als direkter Inhibitor von Cdk1 wirken kann. In der Tat blockierte die Zugabe von Separase nicht nur die Phosphorylierung des Modellsubstrates Histon H1 durch freie Cdk1-Kinase, sondern auch ganz allgemein die Phosphorylierung wichtiger mitotischer Substrate. Letzteres wurde dadurch verdeutlicht, dass Separase in zellfreien Extrakten die Spindeldisassemblierung, die Chromosomendekondensation und die Zellkernbildung selbst dann herbeiführen konnte, wenn diese komplexen Vorgänge eigentlich durch die Anwesenheit von konstitutiv aktiver Cdk1-Kinase blockiert waren (siehe Abb. 19).

Nur wenige Cdk1-Cyclin β Inhibitoren sind bisher beschrieben worden: Sic1 (Schwob *et al.*, 1994) und Cdc6 (Elsasser *et al.*, 1996) aus *S. cerevisiae*, Rum1 aus *S. pombe* (Labib und Moreno, 1996; Martin-Castellanos *et al.*, 1996), humanes Gadd45 (Zhan *et al.*, 1999) und p27^{Kip1} (Toyoshima und Hunter, 1994) sowie Roughex aus *Drosophila* (Foley *et al.*, 1999), wobei die Hauptfunktion der beiden letzteren in der Inhibition von Cdks in Kombination mit Cyclin α zu bestehen scheint. Von diesen weist nur das für die Bildung des Präreplikationskomplexes (Pre-RC) notwendige Cdc6 eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit Vertebraten-Separase auf (Mimura *et al.*, 2004):
1) Beide gehen einen stabilen Komplex mit Cdk1 ein, welcher *in vitro* unter vergleichbaren NaCl-Konzentrationen dissoziiert. 2) Die Funktion beider Proteine, nämlich die Pre-RC Assemblierung im Fall von Cdc6 und die Kohäsinspaltung im Fall von Separase, wird durch die feste Bindung von Cdk1 blockiert. 3) Sowohl Vertebraten-Separase als auch *S. cerevisiae* Cdc6 sind ihrerseits Inhibitoren der Cdk1-Kinase. 4) Die Mutation verschiedener, konservierter Reste in einer zwischen beiden Proteinen sequenzhomologen Region schränkt die Cdk1-Bindung in gleicher Abstufung ein. 5) Die Phosphorylierung von Separase und Cdc6 ist für die Assoziation mit Cdk1 von entscheidender Bedeutung. Die wichtigen funktionellen Phosphorylierungsstellen können im Sequenzvergleich einander zugeordnet werden. Demnach entsprechen Thr1346 und Ser1399 aus Separase den Resten Thr7 und Thr39 aus Cdc6. 6) Die regulatorische Cyclin B-Untereinheit von Cdk1 reicht alleine aus, um phosphorylierte Separase bzw. phosphoryliertes Cdc6 zu binden. Die Beispiele Separase und Cdc6 zeigen, dass Cyclin B unerwartete Phosphopeptid-Bindeeigenschaften besitzt und damit den Cdk1-Kinasekomplex an phosphorylierte Proteine rekrutieren kann. Es stellt sich die spannende Frage, ob sich aus dem homologen Sequenzabschnitt von Separase und Cdc6 ein Konsensusmotiv für die Cyclin B-Interaktion ableiten ließe, mit dessen Hilfe

man bislang unbekannte Bindungspartner von Cdk1 identifizieren könnte. Es ist erwähnenswert, dass die Cdk1-Bindung zwischen *S. cerevisiae* Cdc6 und humanem Cdc6 nicht konserviert ist.

4.5 Separase-vermittelte Cdk1-Inhibition in Mitose und Meiose

Ein entscheidender Unterschied zwischen Cdc6 und Separase wird in der Mitose deutlich. Cdc6 ist in dieser Zellzyklusphase quantitativ mit Cdk1 komplexiert und wird so an einer vorzeitigen Lizensierung der DNA-Replikation gehindert (Bell und Dutta, 2002). Separase dagegen liegt in der Metaphase größtenteils im Komplex mit Securin vor und kann folglich nicht an Cdk1 binden. Seine Cdk1-inhibitorische Eigenschaft wird erst beim APC/C-abhängigen Abbau von Securin demaskiert. Diese Regulation durch die Assoziation mit Securin macht Separase zu einem ungewöhnlichen Cdk1-Inhibitor und lässt vermuten, dass Separase bei der, für den Mitoseaustritt essentiellen Inaktivierung von Cdk1 eine Rolle spielen könnte. Allerdings ist auch Cyclin B1 ein APC/C Substrat, welches mit einer zu Securin identischen Kinetik über einen Zeitraum von 20 – 30 Minuten abgebaut wird (Hagting *et al.*, 2002). Nur in diesem schmalen Zeitfenster koexistiert noch nicht inaktivierte Cdk1-Kinase mit bereits von Securin befreiter Separase. Demnach sollte der Beitrag von Separase zur Cdk1-Inaktivierung gering ausfallen. Übereinstimmend mit dieser Erwartung wurde keine auffallende Verzögerung der Histon H1-Phosphorylierungsaktivität und nur eine geringe Verzögerung der Chromosomendekondensation beobachtet, wenn Separase im *Xenopus* Eiextrakt durch den Zusatz von nicht abbaubarem Securin an der Cdk1-Bindung gehindert wurde (siehe Abb. 20). Auch die Mikroinjektion von stabilisiertem Securin in HeLa-Zellen beeinflusst den Mitoseaustritt fast nicht (Jonathon Pines, persönliche Mitteilung). Interessant war jedoch, dass stabiles Securin im zellfreien System zu einer deutlichen Verzögerung der Spindeldisassembly führte. Der Separase könnte daher eine besondere Bedeutung bei der lokalen Cdk1-Inaktivierung an der Spindel bzw. an den Centrosomen zukommen. Mit dieser Hypothese konsistent sind Berichte, nach denen sowohl Separase als auch Cyclin B1 mit der Spindel bzw. den Centrosomen assoziieren (Chestukhin *et al.*, 2003; Clute und Pines, 1999). Es ist sogar denkbar, dass Separase-gebundenes Cyclin B1 ein besonders gutes Substrat für den APC/C darstellt, welcher ebenfalls mit der mitotischen Spindel assoziiert (Tugendreich *et al.*, 1995). Gemäß diesem Modell wäre Separase nicht nur ein direkter, stöchiometrischer

Kinaseinhibitor, sondern würde die Cdk1-Inaktivierung sogar katalysieren. Eine lokale Cdk1-Inaktivierung in der Nähe der Spindel könnte dann besonders wichtig sein, wenn der Abbau von Cyclin B nicht vollständig erfolgt, wie dies zum Beispiel in der frühen Embryogenese bei *Drosophila* (und möglicherweise auch bei Vertebraten) der Fall ist (Huang und Raff, 1999; Wakefield *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Kombination von Securin^{-/-} und Separase^{WT/S1121A} in der Maus embryonal letal ist (Xingxu Huang, persönliche Mitteilung). Der Verlust des „Chaperons“ Securin reduziert die Separasemenge und sollte daher indirekt auch die Separase-abhängige Cdk1-Inhibition beeinträchtigen. Demzufolge erscheint es möglich, dass die Ursache für das Absterben der doppelt mutierten Embryonen in einem defekten Mitoseaustritt liegt und nicht in einer frühzeitigen Schwesterchromatidentrennung aufgrund einer proteolytisch fehlregulierten, aktiven Separase.

Eine unvollständige Inaktivierung der Cdk1-Kinase ist jedoch vor allem ein Charakteristikum der Meiose (Iwabuchi *et al.*, 2000). Zwischen der ersten und zweiten Reifeteilung muss die Cdk1-Aktivität weit genug abgesenkt werden, um die Auflösung der Meiose I-Spindel zu erlauben, andererseits aber hoch genug bleiben, um eine Rereplikation zu verhindern. Die Bäckerhefe scheint diese Balance sicherzustellen, indem zum einen der APC/C nur teilweise aktiviert und Cyclin B somit nur unvollständig abgebaut wird (Buonomo *et al.*, 2003) und indem das „mitotic exit network“ (MEN) fehlt, und daher die zu Cdk1 antagonistische Phosphatase Cdc14 nur unvollständig aktiviert wird (Kamieniecki *et al.*, 2005). In den Oozyten der Maus blockiert eine injizierte geringe Menge von nicht abbaubarem Securin, die sich nicht störend auf den APC/C-abhängigen Abbau von endogenem Cyclin auswirkt, den Übergang von Meiose I nach Meiose II (Herbert *et al.*, 2003). Demgegenüber verhindert die Injektion eines Peptidinhibitors von Separase nicht den Ausstoß des Polkörpers, welcher als Marker für die meiotische Reifung dient (Terret *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass zwar Separase, nicht aber die durch sie vermittelte Trennung der homologen Chromosomen für den Ablauf der Meiose notwendig ist. Dass eine proteolytisch inaktive, rekombinante Separase die Polkörperbildung in Abwesenheit von endogener Separase teilweise wiederherstellen kann, stützt diese Hypothese (Katja Wassmann, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Separaseantikörpern, welche selektiv die Cdk1-Bindung, nicht aber die Proteaseaktivität inhibierten, den Ausstoß des Polkörpers in *Xenopus*- und Mausoozyten wirksam blockierte. Dieser Effekt ließ sich durch die Behandlung mit

dem spezifischen Cdk1-Inhibitor Roscovitin rückgängig machen. Er ließ sich auch durch die Koinjektion von mRNA unterdrücken, welche für wildtypische Separase bis zur Selbstspaltstelle, also ohne die C-terminale proteolytische Domäne, codierte. Die Punktmutation der dem Ser1126 entsprechenden Phosphorylierungsstelle in der mRNA hob diese Fähigkeit jedoch wieder auf. Da sowohl Roscovitin als auch N-terminale Separasefragmente die Kohäsinspaltung nicht beeinflussen sollten, sprechen diese Ergebnisse insgesamt dafür, dass die Separase-abhängige Cdk1-Inaktivierung am Ende der Meiose I essentiell ist. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht der Befund, dass die Einschränkung der Cdk1-Bindefähigkeit durch die Mutation von Ser1121 in einem Allel von Maus-Separase schon ausreicht, um die Meiose fehlschlagen zu lassen. Beide Geschlechter entsprechender Mäuse sind steril (Xingxu Huang, persönliche Mitteilung). Erstaunlich ist jedoch, dass die haploinsuffizienten Mäuse mit einem wildtypischen Separaseallel (WT/-) fertig sind, während die zusätzliche Anwesenheit eines mutierten Allels (WT/S1121A) zu einer defekten Meiose führt. Dieser dominant negative Effekt ließe sich erklären, wenn man annimmt, dass die Separase-abhängige Rekrutierung von Cdk1 an die Spindel wichtig ist, um dort z.B. den Abbau von Cyclin B1 zu ermöglichen. Ser1121Ala-Separase würde demnach die Bindestellen an der Spindel für wildtypische Separase blockieren, ohne jedoch Cdk1 zu binden. Die Untersuchung des Abbaus von Cyclin B1 in Abhängigkeit von Separase wäre ein wichtiges nächstes Projekt.

4.6 Vergleich von Vertebraten- und *S. cerevisiae* Separase

Dass Separase unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität eine aktive Rolle im Mitoseaustritt spielt, ist von der Bäckerhefe seit längerem bekannt. Als eine Komponente des so genannten FEAR-Netzwerkes ist *S. cerevisiae* Separase (Esp1) in der Anaphase an der Aktivierung der Cdc14-Phosphatase, einem Cdk1-Antagonist, beteiligt (Stegmeier *et al.*, 2002). Eine bemerkenswerte Parallele zwischen den Hefestudien und dieser Arbeit an Vertebraten-Separase wird beim Vergleich von Mitose und Meiose deutlich: Esp1/FEAR ist für den Austritt aus der Mitose ebenfalls entbehrlich, erweist sich aber als essentiell für den Ablauf der Meiose. In der Abwesenheit von Esp1/FEAR wird die Meiose-II-Spindel nicht abgebaut und die Schwesterchromatiden verteilen sich wie zufällig auf der stabilen Meiose-II-Spindel (Buonomo *et al.*, 2003; Marston *et al.*, 2003). Diese Situation erinnert stark an den

vorherrschenden Phänotyp in Mausoozyten nach der Injektion von Separaseantikörpern, bei dem getrennte Chromatiden auf einer elongierten Spindel verstreut liegen. Die negative Regulation von Cdk1 ist also eine konservierte Funktion von Separase trotz der scheinbar völlig unterschiedlichen Wirkungsmechanismen in Hefe und Vertebraten.

Nach der Befreiung von Securin in Metaphase I der Meiose übernimmt Separase also zwei wichtige Funktionen in Eukaryonten: Einerseits steuert sie die Trennung der homologen Chromosomen durch die proteolytische Spaltung von Kohäsin an den Chromosomenarmen. Andererseits sorgt Separase für die darauf folgende Disassemblierung der MeioseI-Spindel durch die Inaktivierung von Cdk1. Die gegenseitige Regulation von Separase und Cdk1 könnte mitverantwortlich sein für die enge Kopplung von Anaphase und Mitose- bzw. Meioseaustritt in höheren

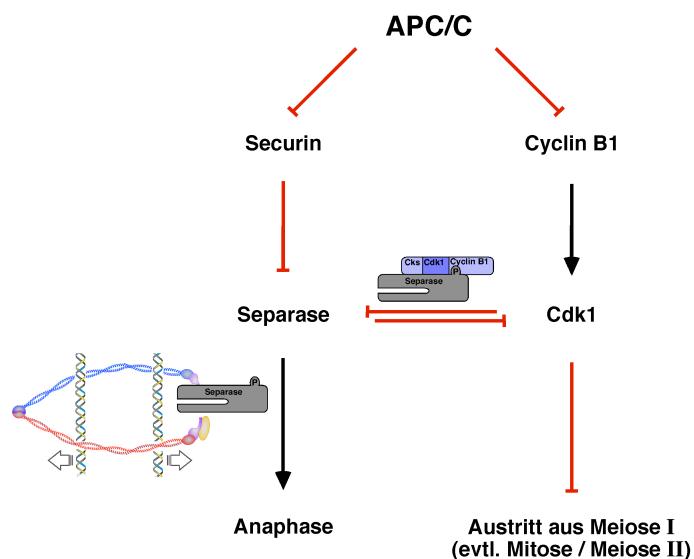


Abb. 26: Modell der doppelten Funktion von Vertebraten-Separase in Anaphase. In der Meiose I von Vertebraten erfüllt Separase zwei Funktionen nach ihrer Aktivierung durch den Abbau von Securin. Zum Einen spaltet sie in ihrer Funktion als Protease das an den Chromosomenarmen befindliche Kohäsin und steuert damit die Trennung der homologen Chromosomen. Zum Anderen bindet und inhibiert freie Separase, unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität, die Cdk1-Kinase und beteiligt sich so an einem vorübergehenden, teilweisen Abfall der Cdk1-Aktivität, infolgedessen der Übergang von MeioseI nach MeioseII stattfindet. Die Interaktion zwischen Separase und Cdk1 verbindet unterhalb des APC/C die Signalwege, die zu Anaphase und zum Mitose- bzw. Meioseaustritt führen (vgl. Abb. 5). Inhibitorische Effekte sind durch rote, aktivierende durch schwarze Pfeile illustriert.

Eukaryonten. Die bisher gängige Annahme, dass diese beiden Signalwege unterhalb des APC/C unabhängig voneinander ablaufen (vgl. Abb. 5), muss also revidiert und durch das in Abbildung 26 gezeigte, weiterentwickelte Modell ersetzt werden. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob Mutationen im menschlichen Genom, welche die

Separase-Cdk1 Komplexbildung einschränken, aufgrund der Funktion in der Meiose mit Unfruchtbarkeit und Trisomien assoziiert sind.

5 Materialien und Methoden

Hard- und Software

Die vorliegende Arbeit wurde auf einem Apple Macintosh iBook G3 mit der Software Microsoft Word 2001 (Microsoft Corp.) angefertigt. Die entwickelten Filme der Westernblots und Hefeplatten wurden mit einem ScanMaker i900 von Microtek digitalisiert. Die Weiterverarbeitung aller Graphiken erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.), die endgültige Darstellung durch das Programm Canvas 6.0 (Deneba Software Inc.). Für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA Star Inc.) benutzt. Literatur- und Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe des Internetservices des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

Chemische und biochemische Materialien

Für die vorliegende Arbeit wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Merck, Roth, Riedel de Haen, Pierce, Sigma, USB, Calbiochem, AppliChem, Biorad und Kodak verwendet. Die Restriktionsendonukleasen und andere biochemische Materialien stammen von den Firmen New England Biolabs (NEB), Serva, Fermentas, Promega, Roche und MBI.

Antikörper

Die Antikörper gegen humanes Securin und den N-Terminus von humaner Separase wurden beschrieben (Stemmann *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 1999). Der anti-Cks Antikörper aus Kaninchen wurde gegen das Peptid HYMIHEPEPHILLFRRPLPK (Bethyl) angefertigt. Andere Antikörper und Affinitätsmatrices waren wie folgt: Maus anti-hCdk1 (Santa Cruz-54), Maus anti-hCyclin B1 (Upstate 05-373), Kaninchen anti-hCyclin B1 (Santa Cruz-549), Kaninchen anti-Myc (Santa Cruz-789), anti-Flag-M2 Agarose (Sigma A2220), anti-HA Agarose (Roche 1815016) und IgG-Sepharose (4 Fast Flow, Amersham 17-0969-01). Der polyklonale Antikörper gegen *Xenopus* Cdk1 wurde mit freundlicher Genehmigung von J. Walter zur Verfügung gestellt. Die polyklonalen sekundären Antikörper waren mit Peroxidase gekoppelte anti-Maus- beziehungsweise anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Dianova).

5.1 Allgemeine mikrobiologische Techniken

***E. coli* Stämme und Medien**

XL1-Blue:	<i>sup</i> E44, <i>hsd</i> R17, <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A46, <i>thi</i> , <i>rel</i> A1, <i>lac</i> -, <i>F</i> [pro <i>AB</i> +, <i>lacI</i> q, <i>Lac</i> Z M15, <i>Tn</i> 10(<i>tet</i> r)], (Stratagene)
BL21(DE3)/RIL:	<i>E. coli</i> B <i>F</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> <sup+< sup=""> <i>Tet</i>^r <i>gal</i>ß (DE3) <i>EndA</i> <i>Hte</i></sup+<>
LB-Medium	1% Trypton (Difco) 0,5% Hefeextrakt (Difco) 1% NaCl sterilisiert durch Autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Agar

Die im Folgenden beschriebenen Methoden richten sich im wesentlichen nach Standardprotokollen (Ausubel *et al.*, 1998; Sambrook *et al.*, 1989) und nach den Angaben der Hersteller.

Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die *E. coli* Stämme wurden zur Amplifizierung eines Plasmids in LB-Flüssigmedium bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, LB- Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert. Die zur Selektion transformierter Bakterien zugefügte Menge an Antibiotika ins Wachstumsmedium betrug 100 µg/ml für Ampicillin und 30 µg/ml für Kanamycin. Die Dichte der *E. coli* Kulturen wurde mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Auf Agarplatten wurden *E. coli* Kolonien ca. zwei Wochen bei 4°C gelagert. Für die längerfristige Aufbewahrung der Bakterien wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerin (Endkonzentration 20%) versetzt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden chemisch-kompetente XL1-blue Bakterien verwendet. Zur Herstellung wurden 3 ml einer XL1-blue Übernachtkultur in 500 ml LB-Medium verdünnt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 geschüttelt und anschließend eine Stunde auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung vorgekühlter, steriler Gefäße und Lösungen. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge bei 3500 rpm 8 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 20 ml

einer eiskalten sterilen 0,1 M MgCl_2 -Lösung aufgenommen, wieder 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und in 40 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet schließlich in 4 ml einer eiskalten Lösung aus 0,1 M CaCl_2 und 15% Glycerin resuspendiert, schockgefroren und in Aliquots zu je 100 μl bei -80°C gelagert.

Transformation von Bakterien

Kurz vor der Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Für die Transformation der chemisch-kompetenten XL1-blue-Zellen wurden 25 μ l der Bakteriensuspension mit 1 μ l DNA oder 5 μ l eines Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s auf 42°C erwärmt (Hitzeschock). Nach 2 min auf Eis wurde die Suspension in 1 ml vorgewärmten LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Bakterien wuchsen meist über Nacht bei 37°C auf Selektionsagarplatten.

Saccharomyces cerevisiae Stämme

FC1975-7-2D-28 *MAT α ;CLB2 α db,ken;trp1::TRP1::GAL-SIC1(2X)*
(Archambault *et al.*, 2003)

S. cerevisiae Vektor und Medien

pRS425 2 μ , LEU2, Amp^R (Sikorski und Hieter, 1989)

YPGlc-Medium 1% Bacto Yeast Extract (Difco)
2% Bacto-Peptone (Difco)
2% D-(+)-Glukose

SC-Medium	2% D-(+)-Glukose
	0,67% Yeast Nitrogen Base (von Difco)
	30 µg/ml Lysin (Lys)
	30 µg/ml Leucin (Leu)
	20 µg/ml Histidin (His)
	20 µg/ml Tryptophan (Trp)
	20 µg/ml Uracil (Ura)

Agar-Platten zu den entsprechenden Medien wurde 2% Agarose (Endkonzentration) gegeben

Kultivierung und Lagerung von Hefen

Flüssighefekulturen und Agarplatten wurden, falls nicht anders angegeben bei 23°C-30°C inkubiert. Die Selektion auf transformierte Hefestämme erfolgte in SC-Medium ohne die entsprechende Markerkomponente. Hefestämme mit einem Gen unter der Kontrolle des Gal-Promoters wurden für eine Überexpression in YPGal-Medium inkubiert. Mit Hilfe des Photometers wurde die Zelldichte bei 600 nm bestimmt, woraus die Zellzahl berechnet werden konnte (1 OD₆₀₀ entspricht 3·10⁷ Zellen/ml). Die Lagerung der Hefen erfolgte kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -80°C, nachdem zu einer stationären Flüssigkultur Glycerin zugegeben wurde (Endkonzentration 17%, v/v).

Herstellung kompetenter Hefezellen

SORB	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 1 M Sorbitol sterilisiert durch Filtration (0,2 µm Porengröße)
------	---

Die Herstellung kompetenter Hefezellen erfolgte nach dem Protokoll von M. Knop (Knop *et al.*, 1999). Dabei wurden Hefezellen aus einer Übernachtkultur (RT) im Verhältnis von ca. 1:20 in YPGlc-Medium verdünnt. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation (500 g, 5 min, RT) geerntet und auf Eis einmal mit sterilem Wasser (0,1- 0,5 Vol.) und einmal mit 0,1-0,2 Vol. SORB gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 360 µl SORB je 50 ml Zellkultur resuspendiert, mit 40 µl Träger-DNA (10 mg/ml Lachssperma-DNA von Invitrogen, denaturiert bei 95°C für 10 min) versetzt und in Aliquots zu je 50 µl bei -80°C eingefroren.

Transformation von kompetenten Hefezellen

PEG	100 mM LiOAc 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 40% PEG3350 (Sigma) sterilisiert durch Filtration, Lagerung bei 4°C
-----	--

10 μ l kompetente Hefezellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l Plasmid-DNA (50-500 ng/ μ l) versetzt. Dieser Ansatz wurde im 6fachen Volumen PEG aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von DMSO (Endkonzentration 10%) wurde die Suspension für 10 min bei 42°C inkubiert, danach abzentrifugiert (2-3 min bei 400 g), in 150 μ l Wasser aufgenommen und auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

Das verwendete Hefeplasmid ist ein „Shuttle“-Plasmid, das einerseits in *S. cerevisiae*, andererseits in *E. coli* repliziert werden kann. Dazu enthält es neben chromosomalen Elementen aus Hefe auch Bestandteile wie Antibiotikaresistenzen für die Amplifikation in Bakterien.

Serielle Verdünnungsreihe

Für den phänotypischen Vergleich mutanter Hefestämme wurden serielle Verdünnungsreihen auf Testmedien getüpfelt. Diese Methode erlaubt eine relative Quantifizierung von Wachstumsdefekten. Für die serielle Verdünnungsreihe wurde eine Hefeübernachtkultur in bidest. H₂O auf eine OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht etwa 6 x 10⁶ Zellen) verdünnt. Diese und vier weitere Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 wurden auf Agarplatten aufgetragen. Dazu wurden 4 μ l der Verdünnungen nebeneinander auf ein Raster getüpfelt und unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert.

5.2 Molekularbiologische Methoden

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wässriger Lösungen wurde mit Hilfe des Photometers (ND-1000 Spectrophotometer der Firma Peqlab) bei 260 nm bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit den Säulen der Firma Qiagen. Dabei wurden die Plasmide nach der alkalischen Lyse von *E. coli* einer 4 ml Übernachtkultur (Mini Präparation für bis zu 20 μ g DNA) über Anionenaustauschersäulen nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen Plasmid Handbuch) gereinigt. Größere Mengen an DNA (500-800 μ g) zur Transfektion in humane Zellen wurden aus

einer 200 ml Kultur mit dem Qiagen Maxi-Kit oder dem Genelute HP Plasmid Maxiprep Kit (Sigma) nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll isoliert.

Restriktionsverdau von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften durchgeführt (vgl. Sambrook *et al.*, 1989). Die Restriktionsbedingungen wurden nach den Angaben des Herstellers der Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, NEB) eingestellt. Für die Einhaltung der günstigsten Salz- und pH-Bedingungen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Der Restriktionsverdau wurde in der Regel eine Stunde bei 37°C inkubiert und durch Hitzeinaktivierung der Enzyme abgestoppt. Die Umklonierung eines Genes in andere Vektoren erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen FseI und AscI.

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei Klonierungen eine Religation des geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des Plasmides dephosphoryliert. Dazu wurde der Verdau mit 0,1 U Phosphatase (Roche, *shrimp alkaline phosphatase*, SAP) versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Der für die Reaktion notwendige alkalische pH-Wert wurde durch Zugabe von 0,1 µl Tris Base zu einem 30 µl Ansatz gewährleistet.

Ligation von DNA

Für eine Ligation wurden in einem 10 µl Ansatz das einzufügende Fragment und der Vektor (ca. 100 ng) in einem molaren Mengenverhältnis von etwa 2:1 eingesetzt. Die Menge wurde aus Agarosegelen abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde mit 1 µl (4 U) T4 DNA-Ligase (NEB) und mit der entsprechenden Menge (nach Herstellerangaben) des mitgelieferten Puffers versetzt und in der Regel bei 16°C über Nacht inkubiert.

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
DNA-Ladepuffer (5x)	0,5% SDS 0,25% Orange G 25% Glycerin 25 mM EDTA, pH 8,0

Die Analyse, Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Gelelektrophorese. Verwendet wurden meist 1%ige (w/v) Agarosegele. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml) versetzt. Als Laupuffer in den Gelkammern wurde TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Lösungen mit 0,2 Vol. 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Im angelegten Spannungsfeld von ungefähr 10 V/cm Gellänge wurden die DNA-Fragmente größenspezifisch aufgetrennt. Parallel dazu wurde ein Größenmarker (O'GeneRuler 1kb oder 100 bp DNA-Ladder, Fermentas) aufgetragen, der Rückschlüsse auf die Länge der Fragmente zuließ. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid konnten die einzelnen DNA-Banden auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und photographiert werden.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

TE-Puffer	5 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA sterilisiert durch Autoklavieren
-----------	--

Die Bande mit der zu isolierenden DNA wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde dann aus dem Gelstück mit Hilfe des QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Das DNA-Fragment wurde zum Schluss entweder in sterilem bidest. H₂O oder in TE-Puffer gelöst.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungs-PCR und die anschließende Probenaufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit von der Firma Amersham-Pharmacia. Der Ansatz enthielt ca. 1 μ g der zu sequenzierten DNA (Plasmid-DNA) und 20 pmol Sequenzierprimer. Die fertigen Proben wurden im Haus auf einem AbiPrism 377 DNA-Sequencer der Firma Perkin Elmer sequenziert. Andere Sequenzierungen wurden bei der Firma MWG Biotech in Auftrag gegeben.

Zielgerichtete *in vitro* Punktmutagenese

Der gezielte Austausch einzelner Basen in Gensequenzen wurde über eine Oligonukleotid-basierte Methode unter Verwendung des GeneEditor *in vitro* Site-

Directed Mutagenesis Systems der Firma Promega nach deren Angaben vorgenommen. Das Prinzip dabei ist, dass ein Oligonukleotid mit der gewünschten Punktmutation und ein Oligonukleotid, welches eine Mutation in das Ampicillingen einführt und somit eine Resistenz der transformierten Bakterien gegen das „GeneEditor“-Antibiotikum vermittelt, an das gewünschte denaturierte Plasmid hybridisiert werden. Durch PCR wird der Strang vervollständigt. Das doppelsträngige Plasmid wird dann in Bakterien transformiert und auf „GeneEditor“-Agarplatten ausgestrichen. Die eingefügten Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft.

mRNA-Herstellung

Die mRNA der *Xenopus* Separasefragmente wurde mit dem mMessage mMachine T7 Ultra Kit der Firma Ambion (#1345) synthetisiert und über MEGAclear Säulen (Ambion #1908) gereinigt. Vor ihrer Verwendung in Mikroinjektionsexperimenten in einer Konzentration von 150 ng/µl wurde die mRNA durch Agarosegelektrophorese und *in vitro* Translation überprüft.

5.3 Zellbiologische Techniken

Zelllinien und der verwendete Expressionsvektor

293T	humane embryonale Nierenzellen, mit SV40 large T Antigen transformiertes Derivat der 293-Zelllinie
HeLa	Humane Zervix-Adenokarzinomzellen
BW 5147	Zelllinie aus dem B-Zelllymphom einer Maus
Sf9	Zelllinie aus dem Ovariumgewebe der Puppe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Heerwurm)
pCS2	CMV-Promoter zur Überexpression (Turner und Weintraub, 1994)

Kultivierung der Zellen

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 sterilisiert durch Autoklavieren
-----	---

Alle Vertebraten-Zelllinien wurden in Zellkulturschalen (Falcon) bei 37°C, 5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO)

kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom) und einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (GIBCO, 1:100) supplementiert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von ca. 80-100% wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO) pro 10 cm Schale zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit Medium verdünnt und für 6 min bei 800 g (RT) abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischen Kulturschalen ausgebracht. Insektenzellen (Sf9) wurden bei 27°C und 96% Luftfeuchtigkeit in TC-100 Medium (GIBCO) kultiviert, welchem vorher 10% FCS, Penicillin/Streptomycin (GIBCO, 1:100) und Fungizon (GIBCO, 1:100) zugesetzt worden waren. Die Ablösung vom Schalenboden erfolgte durch Abspülen der Zellen mit der Pipette. Die Ermittlung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte durch Auszählen in einer Neubauerzählkammer.

Transfektion und Infektion von Zellen

2x HBS (für 50 ml)	800 mg NaCl 37 mg KCl 10,65 mg Na ₂ HPO ₄ 100 mg Glukose 500 mg HEPES pH 7,05 mit NaOH, filtrieren, Lagerung bei -20°C
--------------------	---

293T-Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden 3x10⁶ Zellen pro 10 cm Schale ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Kurz vor der Transfektion wurde dem Medium, der zu transfizierenden Zellen, Chloroquin in einer Endkonzentration von 25 µM zugegeben. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 12-16 µg Plasmid-DNA mit 99,2 µl 2 M CaCl₂-Lösung gemischt und mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt. Dann wurden 800 µl 2x HBS-Lösung langsam am Rand des Gefäßes zugegeben, durch Schütteln gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde tropfenweise gleichmäßig auf dem Medium der vorbereiteten Zellen verteilt. Nach 12 Stunden wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und das Medium gewechselt. Da die meisten Proteine unter mitotischen Bedingungen untersucht werden sollten, wurde 24 bis 48 Stunden nach der

Transfektion Nocodazol in einer Endkonzentration von 0,2 μ g/ml ins Medium der Zellen gegeben. Weitere 12 Stunden später wurden die in der Mitose arretierten, abgerundeten Zellen durch Abklopfen und Abspülen geerntet. HeLa-Zellen wurden mit TransPass D2 (New England Biolabs) nach Herstellerangaben transfiziert und ansonsten behandelt wie für die 293T-Zellen beschrieben. Sf9-Zellen wurden mit verschiedenen Baculoviren coinfiziert, indem jeweils 1 ml der verschiedenen Virenlösungen in eine 15 cm^2 Kulturschale (Durchmesser) mit 24 ml Medium getropft wurden. Nach drei Tagen wurden die Zellen noch vor ihrer Lyse durch Abspülen geerntet.

Lagerung von Säugerzellen

Zur Langzeitlagerung wurden lebende Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen bei ca. 80% Konfluenz wie oben beschrieben abgeerntet, in Einfriermedium (10% DMSO, 20% FCS in DMEM) resuspendiert und in Cryovials (Nalgene) aliquotiert. Die Zellsuspension wurde in einem vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Cryoeinfriergefäß (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren. Nach zwei Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen spülte man die Zellen mit vorgewärmtem Medium aus den Cryogefäßen und brachte sie auf einer 10 cm Platte (Durchmesser) aus. Zum Entfernen des DMSO wurde nach dem Anwachsen der Zellen das Nährmedium gewechselt (10 bis 12 Stunden nach dem Ausbringen).

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Allgemeine Protokolle

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

7x Bis-Tris/HCl	2,5 M Bis-Tris
	1,5 M HCl
	pH 6,5
6%ige Gellösung	42,2 ml H ₂ O
	13 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
	9,3 ml 7x Bis-Tris/HCl
	163 μ l 20% SDS (w/v)
	54,2 μ l TEMED
	325 μ l 10% APS (w/v)

15%ige Gellösung	16,5 ml H ₂ O 4,6 ml 2,5 M Saccharose 30 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 8,6 ml 7x Bis-Tris/HCl 150 μ l 20% SDS 25 μ l TEMED 300 μ l 10% APS
MOPS-Laupuffer	50 mM MOPS 1 mM EDTA 0,1% SDS 50 mM Tris Base

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem NuPAGE-System von Invitrogen. Für die Auftrennung von Separase sowie der Kinaseuntereinheiten wurden 6-15%ige Gradientengele verwendet. Bei diesem Geltyp ermöglicht der niedrigprozentige Teil des Geles eine Konzentrierung der Proben, wodurch auf ein spezielles Sammelgel verzichtet werden kann. Die 6%igen und 15%igen Gellösungen wurden sofort nach dem Untermischen von APS in zwei gekühlte, getrennte Kammern eines Gradientenmischers gefüllt. Nach dem Öffnen des Verbindungskanals wurden die Gele dann unter Rühren der vorderen (6%) Kammer mit einer Peristaltikpumpe von unten in die Gelform gegossen, wobei die Geltaschen mit einem geeigneten Teflonkamm gesteckt wurden. Nach der Polymerisation wurden die Gele in mit 1x Bis-Tris-Lösung befeuchteten Tüchern eingeschlagen und in einer Plastiktüte für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert. Proteinproben wurden in Probenpuffer (siehe unten) aufgenommen, durch Erhitzen (3 min bei 95°C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA in 1x MOPS-Laupuffer aufgetrennt. Parallel wurde ein Molekulargewichtstandard aufgetragen (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas). Der verwendete 4x Probenpuffer wurde wie folgt hergestellt: Zu 10 ml H₂O wurden 37,6 mg Coomassie G250 und 256 μ l HCl (rauchend, 37%, 12,08 M) gegeben. Nach 5-minütigem Rühren wurden 3,42 μ l Tris Base, 204 μ l EDTA (0,5 M) und optional 4 ml β -Mercaptoethanol (14,33 M) zugesetzt und erneut 5 Minuten gerührt. Es folgten 28,3 g Glycerin (87%) und 5 Minuten Rühren. Danach wurden 8 g SDS langsam unter Rühren zugegeben und in der Wärme gelöst. Mit H₂O wurde auf 50 ml aufgefüllt.

Immunblot (Westernblot)

Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,01% SDS
TBS-w	25 mM Tris, pH 7,5 137 mM NaCl 2,6 mM KCl 0,05% Tween-20 (v/v)

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in einer so genannten „semi-dry“ Blotapparatur (Biorad) aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon, Millipore) überführt (Tovey und Baldo, 1989). Die Membran wurde vorher mit 100% Methanol benetzt, welcher dann mit Wasser unter Schütteln auf 5% verdünnt wurde. Der Proteintransfer erfolgte zwischen 6 Whatman-Papieren bei RT für 30 min in Blotpuffer bei einer konstanten Spannung von 15 Volt. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurden die unspezifischen Bindestellen durch Inkubation der Membran für 1 Stunde bei RT in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-w blockiert. Nach einmaligem, kurzem Waschen in TBS-w erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-w. Die Membran wurde dreimal für 5 min in TBS-w gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei RT mit einem Meerrettichperoxidase-(HRP) gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus oder anti-Kaninchen IgG, Dianova) in einer Verdünnung von 1:7500 in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-w inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen in TBS-w wurden gebundene Antikörper mittels Chemolumineszenz (ECL-Western Kit, Amersham) nach Herstellerangaben auf einem ECL- („enhanced chemoluminescent“) Hyperfilm (Amersham) oder mit einer CCD-Kamera (LAS-1000, Fuji) sichtbar gemacht.

Autoradiographie

Nach dem Auftrennen von radioaktiv markierten Proteinen über SDS-PAGE wurde das Gel in 30% MeOH (technisch) und 7% HAc für mindestens eine Stunde fixiert. Nach Waschen mit Wasser wurde das Gel unter Vakuum mit Hilfe eines Geltrockners auf ein Whatman-Papier getrocknet, bevor ein Film (BioMax MR Film, Kodak) aufgelegt wurde. Zur quantitativen Auswertung wurden die Signale des getrockneten Geles mit

einem Phosphoimager (BAS-2500, Fuji) ausgelesen und mit der Image Gauge Software V 3.01 (Fuji) analysiert.

Blumsche Silberfärbung

Um die Gesamtproteine einer Probe sichtbar zu machen, wurde das SDS-Gel mit Silbernitrat gefärbt. Dazu wurde das Gel zuerst in 50% MeOH, 12% HAc und 0,0175% CH₂O für mindestens 45 Minuten fixiert. Danach wurde es 10 min in 50% EtOH und 10 min in 30% EtOH geschwenkt. Nach 1-minütiger Inkubation in einer Na₂S₂O₃* 5H₂O-Lösung (0,22 mg/ml) und 3-maligem Waschen (je 20 s) mit bidest. H₂O wurde das Gel in 0,1% AgNO₃, 0,026% CH₂O transferiert und für mindestens 20 Minuten gefärbt. Es wurde 2 x 20 s mit bidest. H₂O gewaschen bevor das Gel in den Entwickler (6 g Na₂CO₃, 50 µl CH₂O (35%), 20 µl Na₂S₂O₃ * 5 H₂O (2 mg/ml) in 100 ml H₂O) gegeben wurde. Die Reaktion wurde nach dem Sichtbarwerden der Banden durch 5% Essigsäure gestoppt. Die kurzzeitige Lagerung des Geles erfolgte in bidest. H₂O.

Coomassiefärbung

Eine weitere Methode zur quantitativen Färbung der Proteinbanden im SDS-Gel ist die Coomassiefärbung. Dazu wurde das fertige Gel in einer Coomassielösung (0,4% Coomassie Brilliant Blue R250, 0,4% Coomassie Brilliant Blue G250, 40% MeOH (technisch) und 10% HAc) für mindestens 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die Entfärbelösung (30% MeOH (technisch), 7% HAc) transferiert. Der Entfärbler wurde einige Male gewechselt und konnte nach Filtration durch Aktivkohle wieder verwendet werden.

Die silber- und coomassiegefärbten Gele wurden zur Langzeitaufbewahrung entweder unter Vakuum auf Whatman-Papier getrocknet oder unter Verwendung des Hoefer Easy Breeze Systems zwischen zwei Cellophanfolien (Amersham) eingespannt und getrocknet.

Massenspektrometrie

Die Proteine wurden im Gel mit Trypsin verdaut und durch MALDI-TOF (Bruker, Reflex III) analysiert wie beschrieben (Shevchenko *et al.*, 1996). Identifiziert wurden sie durch den Abgleich der Peptidmassen gegen die MSDB Datenbank mit Hilfe der MASCOT Suchmaschine.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Proteinassay nach Bradford (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde gegen eine Verdünnungsreihe von BSA in bekannter Konzentration abgeglichen. Abhängig vom Lagerungspuffer der Proteine wurde zuweilen auch der D_C-Proteinassay nach Lowry (Bio-Rad) nach den Richtlinien des Herstellers verwendet.

5.4.2 Expression und Reinigung von Proteinen

Die zur Expression von Proteinen verwendeten Konstrukte wurden hergestellt und verwendet wie beschrieben (Gorr *et al.*, 2005; Stemmann *et al.*, 2001). Das Konstrukt für die His₆-Securin Δ90 Expression stammt von Hui Zou.

Separase und Separase-Securin Komplexe aus 293T-Zellen

Lysepuffer II	20 mM Tris/HCl, pH 7,7 100 mM NaCl 10 mM NaF 20 mM β-Glycerophosphat 5 mM MgCl ₂ 0,1% Triton X100 5% Glycerin 1 mM EGTA + complete protease inhibitor mix/EDTA (Roche)
TEV-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,7 50 mM NaCl 25 mM NaF 1 mM EGTA 20% Glycerin
Spaltpuffer	30 mM HEPES/KOH, pH 7,7 30% Glycerin 25 mM NaF 25 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1,5 mM ATP 1 mM EGTA
Spermienlagerungspuffer	5 mM HEPES/KOH, pH 7,7 100 mM KCl 150 mM Saccharose 1 mM MgCl ₂

XB-Puffer	100 mM KCl 0,1 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES/KOH, pH 7,7 50 mM Saccharose pH 7,7 mit KOH
-----------	---

ZZ-Tev₄- oder HA₃-Epitop markierte Separase wurde zusammen mit Securin vom pCS2-Vektor in 293T-Zellen exprimiert. Zur Synchronisation in der Mitose wurde 36 Stunden nach der Transfektion in DMSO gelöstes Nocodazol in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zum Medium der Zellen gegeben. Nach weiteren 12 Stunden wurden die Zellen schließlich geerntet. Die Lyse der Zellen erfolgte im 10fachen Volumen des Zellpellets an Lysepuffer II mit einem Glas-Zellhomogenisator nach Dounce. Nach 30 Minuten auf Eis wurde das Lysat bei 50000 g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde je nach Epitopmarkierung des zu reinigenden Proteins entweder mit IgG-Sepharose (Amersham) oder mit anti-HA Agarose (Klon 3F10, Roche) für 3 Stunden oder ÜN inkubiert. Typischerweise wurde das Lysat einer konfluenten 10 cm Platte transfizierter Zellen (ca. 15 µg Separase) mit 10 µl Matrix versetzt. Die pelletierte Matrix wurde anschließend mit Lysepuffer II gewaschen.

Zur Verwendung des Separase-Securin Komplexes im *Xenopus* Extrakt wurde die Matrix an dieser Stelle mit Spermienlagerungspuffer gewaschen und anschließend wurde der Komplex durch Inkubation für 45 min bei RT mit 0,33 Volumen TEV-Protease (2 mg/ml in Spermienlagerungspuffer) vom ZZ-Epitop getrennt. Spermienlagerungspuffer (2 Volumen) wurde zugegeben und das Eluat wurde durch Zentrifugation der Suspension durch kleine Säulchen (MoBiTec) gewonnen. Der Separase-Securin Komplex wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Um Securin-freie Separase (aktiv oder inaktiv) zu erhalten, wurde der immobilisierte ZZ-Tev₄-Separase-Securin Komplex mit XB-Puffer gewaschen und in verschiedenen *Xenopus* Eiextrakten (CSF, Niedrig-Δ90 Extrakt oder Hoch-Δ90 Extrakt, siehe *Xenopus* Protokolle) für eine Stunde bei 18°C inkubiert. Die Matrix wurde noch viermal in XB-Puffer (in manchen Fällen mit zusätzlichem NaCl) und zweimal in TEV-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution der Separase durch Inkubation mit 0,33 Volumen TEV-Protease (2 mg/ml in TEV-Puffer) für 45 min bei RT. Spaltpuffer (2 Volumen) wurde zugegeben und das Eluat wurde durch Zentrifugation der Suspension

durch MoBiTec-Säulchen von der Matrix getrennt. Die Separase wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Cdk1-Kinase aus Sf9-Zellen

Kinaselysepuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 5 mM β -Mercaptoethanol 0,5% NP40 5 mM NaF 5 mM β -Glycerophosphat 10 mM Imidazol 1 μ M Microcystin-LR + complete protease inhibitor mix/EDTA (Roche)
Q_A -Puffer	30 mM Tris/HCl, pH 8,5 80 mM NaCl 3 mM DTT
Q_B -Puffer	30 mM Tris/HCl, pH 8,5 1 M NaCl 3 mM DTT
Kinaselagerungspuffer	30 mM HEPES/KOH, pH 7,7 30% Glycerin 80 mM KCl 1 mM DTT

Es wurden Baculoviren für die Expression von Cdk1 (WT oder KD), 2xHis₆-Tev₂-CyclinB1 \square 90 und Cks1/2 nach den Angaben von Invitrogen für das Bac-to-Bac System hergestellt. Mit den drei Viren coinfizierte Sf9-Zellen wurden nach drei Tagen geerntet und in Kinaselysepuffer aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation bei 50000 g wurde der Extrakt mit Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) inkubiert. Die Cdk1-Kinase wurde nach dem Waschen der Matrix durch 250 mM Imidazol in Kinaselysepuffer eluiert, gegen den Q_A -Puffer dialysiert und auf einer MonoQ-Säule (0,1 ml) unter Verwendung des P-905 Ettan LC-Systems (Amersham Biosciences) fraktioniert. Schließlich wurde der Kinasekomplex gegen Kinaselagerungspuffer dialysiert und in einer Konzentration von 15,5 ng/ μ l schockgefroren.

MBP-Tev₂-Cyclin B1 Δ90 aus *E. coli*

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Δ90-Lysepuffer	1x PBS 300 mM NaCl 10 mM DTT 1 mM EDTA
Waschpuffer	30 mM HEPES/KOH, pH 7,7 30% Glycerin 80 mM KCl 1 mM DTT
Elutions- und Lagerungspuffer	30 mM HEPES/KOH, pH 7,7 30% Glycerin 80 mM KCl 1 mM DTT 50 mM Maltose

MBP-Tev₂-Cyclin B1 Δ90 wurde in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) bei Anwesenheit von 0,2% Glukose vom pMAL-Plasmid nach den Richtlinien für das pMAL System (New England Biolabs (NEB)) exprimiert und aufgereinigt. Im Einzelnen wurden die geernteten Bakterien in Δ90-Lysepuffer resuspendiert und in einem EmulsiFlex-C5 Homogenisator (Avestin) durch abwechselnden Hoch- und Niedrigdruck lysiert. Nach Zentrifugation (50000 g) wurde der Rohextrakt mit einer Amylosematrix (NEB) inkubiert. Die Matrix wurde isoliert und mit Waschpuffer gewaschen, bevor sie durch die im Elutionspuffer enthaltene Maltose eluiert wurde. Nach der Konzentrierung auf 12 µg/µl durch Ultrazentrifugation (Millipore) wurde das Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Xenopus His₆-Securin Δ90 aus *E. coli*

<i>E. coli</i> -Lysepuffer	500 mM NaCl 50 mM NaPi, pH 7,4 5 mM β-Mercaptoethanol 10 mM Imidazol + complete protease inhibitor mix/EDTA (Roche)
----------------------------	---

Ni-NTA-Reinigungspuffer	500 mM NaCl 50 mM NaPi, pH 7,4 5 mM β -Mercaptoethanol 15 mM Imidazol
Ni-NTA-Elutionspuffer	500 mM NaCl 50 mM NaPi, pH 7,4 5 mM β -Mercaptoethanol 1 mM EDTA 250 mM Imidazol (pH überprüft)
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 200 mM NaCl 10 mM β -Mercaptoethanol 1 mM EDTA
xSec.-Lagerungspuffer (entspricht Spermienlagerungspuffer)	5 mM HEPES/KOH, pH 7,7 100 mM KCl 150 mM Saccharose 1 mM MgCl ₂

Das His₆-Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) vom pET28a-Vektor (Novagen) für 3 Stunden bei 37°C exprimiert, wobei die Expression erst bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert wurde. Die Qualität der Expression wurde durch gleiche Mengen (OD₆₀₀ von 0,02) von in Probenpuffer aufgekochten Bakterien vor und nach der Induktion auf einem Coomassiegel überprüft. Die abgeernteten Zellen wurden im 10fachen Volumen des Feuchtgewichtes (1 g entspricht 10 ml) *E. coli*-Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels EmulsiFlex-Homogenisator und Ultraschallbehandlung (Sonopuls HD2200, Bandelin) aufgeschlossen und Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 30000 rpm im Ti45-Rotor (Beckmann) bei 4°C entfernt. Das Lysat wurde mit Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) über Nacht bei 4°C rotiert. Gebundene Proteine wurden nach gründlichem Waschen mit Ni-NTA-Reinigungspuffer mit dem zweifachen Säulenvolumen Ni-NTA-Elutionspuffer eluiert. Durch Gelfiltration auf einer Superdex 75-Säule (Amersham, 320 ml Gesamtvolumen) unter Verwendung eines FPLC-Systems (Pharmacia) wurde das filtrierte (0,22 μ m) Eluat mit dem Gelfiltrationspuffer als Laufpuffer weiter aufgetrennt. Fraktionen bei ca. 150 μ l Durchflussvolumen enthielten xSecurin. Das Protein wurde durch Ultrazentrifugation (Millipore) konzentriert, gegen den xSec.-Lagerungspuffer dialysiert und anschließend in einer Konzentration von 3,7 mg/ml schockgefroren.

Nach dem gleichen Protokoll wurde wildtypisches, humanes Securin gereinigt, mit dem Unterschied, dass es im Gelfiltrationspuffer schockgefroren wurde und erst vor der Anwendung gegen einen geeigneten Puffer dialysiert wurde.

GST-Fusionsproteine

GST-Fusionsproteine wurden vom pGEX-Vektor (Amersham) in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene), wie unter xSecurin beschrieben, exprimiert und anschließend mittels einer Glutathion-Sepharose Säule (Amersham) aufgereinigt wie von Amersham empfohlen. Die Lagerung der Proteine erfolgte an der Matrix in CSF-XB (siehe *Xenopus* Protokolle) mit 10 mM DTT bei 4°C.

Antikörperreinigung aus Kaninchenserum

Für die Herstellung der beiden anti-xSeparase Antikörper zur Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten wurden die Peptide CETRDLLKAPESPTATS in Kombination mit SLEKNLPQFLSHTQDC oder CYNEESPVPEVLPRAPRRRKTR in Kombination mit CTVLKVDNFNSDLEVADNSEWE an das Maleimid-aktivierte Trägerprotein mcKLH nach den Angaben des Herstellers (Pierce) gekoppelt. Die Konjugate wurden anschließend über eine HiTrap Desalting Säule (Amersham Biosciences) in PBS umgepuffert und gereinigt. Je ca. 400 µg der gekoppelten Peptide wurden mit Titer Max Gold Adjuvant (Sigma) mittels Discofix (B. Braun AG) gemischt und in zwei Neuseelandkaninchen injiziert. Nach zwei weiteren Injektionen wurde der Antikörper aus dem gewonnenen Serum affinitätsgereinigt. Dazu wurden die beiden Peptidkombinationen je an ein SulfoLink Coupling Gel (Pierce) gekoppelt und mit dem Serum nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Vor der Mikroinjektion wurden die beiden Antikörper gegen 80 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,5 dialysiert, durch Ultrazentrifugation (Millipore, UFV5BGC25) auf 8 mg/ml aufkonzentriert und im Verhältnis 1:1 (w/w) gemischt. Die Antikörper gegen die zwei Cdk1-Bindedomänen in mSeparase wurden gegen ein Gemisch der Peptide CSSPVLTKPPPNNPGF und CTPKPPGRARQAGPR (Eurogentec) hergestellt und an einer SulfoLink-Säule wie oben beschrieben aufgereinigt. Das Antikörpermisch wurde gegen 120 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4 dialysiert und durch Ultrazentrifugation auf 1 mg/ml konzentriert.

In vitro Translation (IVT)

Als System für die gekoppelte Transkription und Translation von Plasmid-DNA *in vitro* wurde das TNT Reticulocytenlysat (Kaninchen) mit SP6-RNA Polymerase verwendet (TNT Quick, Promega). Wenn das translatierte Protein radioaktiv markiert werden sollte, wurde dem Ansatz statt nicht markiertem Methionin ^{35}S -markiertes Methionin (Amersham Pharmacia) zugesetzt.

5.4.3 Aktivitäts- und Bindestudien

Separaseaktivitätstest

Die Aktivität von Separase wurde anhand der Spaltung von *in vitro* translatiertem ^{35}S -Kohäsin^{hScc1(WT)} wie bereits beschrieben ermittelt (Stemmann *et al.*, 2001). Üblicherweise wurde 1 μl der zu untersuchenden Separase mit 1 μl *in vitro* translatiertem ^{35}S -Scc1 gemischt. 0,5 μl Aliquots davon wurden nach 12 und 35 Minuten in Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE/Autoradiographie analysiert. Für die Rekonstitution der Inhibition von Separase mit gereinigten Komponenten wurden 0,5 μl einer BSA-Lösung (100 mg/ml in Spermienlagerungspuffer, siehe *Xenopus* Protokolle) und 1 μl TEV-eluierte aktive Separase (ca. 5 ng) mit 5 μl Cdk1-Kinase oder Cyclin B1 Δ 90 in verschiedenen Verdünnungen 15 Minuten bei RT inkubiert, bevor 1 μl ^{35}S -Scc1 (IVT) zugegeben wurde. Unphosphorylierte Separase wurde erzeugt, indem 1 μl gereinigte Separase (ca. 5 ng) mit 0,5 μl D -Phosphatase (0,5 mg/ml, NEB) oder als Kontrolle dem spezifischen Referenzpuffer für 30 Minuten bei RT inkubiert wurde, bevor 25 ng KD- oder WT-Cdk1 und ATP/Mg $^{2+}$ (1 mM) zugegeben wurden. Nach weiteren 20 Minuten bei RT wurde die Aktivität der Separase wie oben beschrieben analysiert.

Histon H1 Kinaseaktivitätstest

EB-Puffer	20 mM β -Glycerophosphat
	3 mM MgCl ₂
	4 mM EGTA
	0,025% NP-40

Um die Kinaseaktivität eines *Xenopus* Eiextraktes zu bestimmen, wurde die Phosphorylierung von Histon H1 betrachtet, einem Modellsubstrat für die Cdk1-Kinase.

Dazu wurden 2 μ l Extrakt mit 16,5 μ l EB-Puffer verdünnt und mit 8,25 μ l eines Prämixes bestehend aus 16,2 μ l EB-Puffer, 0,065 μ l ATP (4 mM), 0,65 μ l [33 P]-ATP (10 mCi/ml, Amersham Pharmacia) und 1,62 μ l Histon H1 (5 mg/ml, Sigma) kombiniert. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 10 μ l Proteinprobenpuffer (4x) gestoppt. Nach dem Aufkochen wurden die Proben wie beschrieben über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Um die Aktivität von gereinigter Cdk1-Kinase zu bestimmen, wurden 2,5 μ l der die Kinase enthaltenden Lösung mit einem Prämix aus 16,69 μ l EB-Puffer, 0,313 μ l ATP (4 mM), 0,5 μ l [33 P]-ATP (10 mCi/ml, Amersham Pharmacia) und 5 μ l Histon H1 (5 μ g/ml) gemischt. 5 μ l Aliquots dieser Reaktion wurden nach null, 5 und 15 Minuten mit 5 μ l Probenpuffer (2x) versetzt und wie beschrieben analysiert. Für die Inhibition der Cdk1-Kinase mit freier Separase wurden 10 μ l von entweder WT- oder PM-Separase (ungefähr 50 ng) oder Referenzpuffer mit 1 μ l Cdk1 (0,6 ng/ μ l) kombiniert und für 20 Minuten bei RT inkubiert bevor mit einem 2,5 μ l Aliquot ein Histon H1 Kinaseaktivitätstest durchgeführt wurde.

Pulldownexperimente

In den Cdk1-Elutionsexperimenten wurden jeweils 5 μ l Separasematrix (ungefähr 2,5 μ g Protein) aus Hoch- Δ 90 Extrakten reisoliert und mit 15 μ l CSF-XB (siehe *Xenopus* Protokolle) oder 15 μ l CSF-XB mit 15 μ g humanem Securin inkubiert. Die Matrix wurde mit CSF-XB gewaschen bevor die Separase mit TEV-Protease (in CSF-XB) eluiert wurde.

Die Bindung von Cdk1 an den wildtypischen oder mutagenisierten Cdc6 N-Terminus wurde untersucht, indem 30 μ g GST-Fusionsprotein an 10 μ l Glutathionsepharose (Amersham) in 0,1 ml Niedrig- Δ 90 Extrakt inkubiert wurden. Die Matrix wurde mit CSF-XB, 0,01% Tween-20 und 300 mM NaCl gewaschen und mit SDS eluiert.

Für Immunpräzipitationen (IPs) wurden 5 μ l Protein G-Sepharose (Amersham), gekoppelt mit 2,5 μ g Antikörper, oder je 5 μ l anti-Flag-M2 Agarose (Sigma), anti-HA Agarose (Roche) oder IgG-Sepharose (Amersham) mit 0,5 ml eines 50000 g Extraktes aus 1×10^7 293T- oder HeLa-Zellen in Lysepuffer II (siehe unter Separase aus 293T-Zellen) inkubiert. Die Matrix wurde in CSF-XB mit 250 mM NaCl und 0,01% Triton-X100 gewaschen, bevor mit SDS oder TEV-Protease eluiert wurde. His₆-Epitop

markiertes $\Delta 90$ wurde über Ni^{2+} -NTA Agarose (Qiagen) im gleichen Puffer aber mit 6 mM Imidazol und 500 mM NaCl affinitätsgereinigt und mit 250 mM Imidazol eluiert.

5.5 *Xenopus* Protokolle

Protokolle zum *Xenopus* Oozytenextrakt

CSF-XB	100 mM KCl 0,1 mM CaCl_2 2 mM MgCl_2 10 mM HEPES/KOH, pH 7,7 50 mM Saccharose 5 mM EGTA/KOH, pH 8,0 pH 7,7 mit KOH
MMR (25x)	2,5 M NaCl 50 mM KCl 25 mM MgCl_2 50 mM CaCl_2 2,5 mM EDTA/NaOH, pH 8,0 125 mM HEPES/NaOH, pH 7,8 pH 7,8 mit NaOH
DAPI/Fix	48% Glycerin 11% Formaldehyd 1x MMR (siehe oben) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (Sigma B-2261) Lagerung bei -80°C
XB-Salz (20x):	2 M KCl 2 mM CaCl_2 20 mM MgCl_2
Cysteinlösung	2% (w/v) Cystein (free base) 0,5x XB-Salz pH 7,8 mit KOH
Spermienlagerungspuffer	5 mM HEPES/KOH, pH 7,7 100 mM KCl 150 mM Saccharose 1 mM MgCl_2

CSF-arretierte *Xenopus* Eiextrakte, CSF-XB Puffer und Spermienkerne wurden wie beschrieben präpariert (Murray, 1991). Vor der Extraktpräparation wurden alle Gefäße mit bidest. H_2O ausgewaschen um eine Kontamination mit Calcium zu vermeiden. Alle Arbeiten mit den Fröschen und den Oozyten wurden bei 18°C durchgeführt. Zur

Schonung der Extrakte wurden sie nur mit abgeschnittenen Spitzen pipettiert. Am Tag vor der Extraktpräparation wurden weiblichen Fröschen je 1 ml Choriongonadotropin-(human) Lösung (Sigma CG-10, 1000 U/ml H₂O) in den dorsalen Lymphsack injiziert. 16 Stunden später wurden die Frösche in 1x MMR-Puffer umgesetzt. Die Frösche legten 20-24 Stunden nach der Injektion reife Oozyten für bis zu 1 ml Extrakt pro Frosch. Die Gallerthüle der Eier (*Zona pellucida*) wurde durch Inkubation für maximal 10 min in einer Cysteinlösung entfernt. Die Eier wurden daraufhin intensiv mit CSF-XB gewaschen und apoptotische oder aktivierte Eier wurden aussortiert. Danach wurden die Eier in ein Zentrifugenröhren überführt, in das 1 ml CSF-XB und 10 µl einer Cytochalasin B-Lösung (10 mg/ml in DMSO) vorgelegt wurden. Durch Zentrifugation für 1 min bei 200 g und 1 min bei 600 g im JS 13.1 Ausschwingrotor (Beckman) wurden die Oozyten dicht gepackt und der überstehende Puffer wurde abgenommen. Die Lyse der Eier erfolgte im gleichen Rotor bei 13000 g. Die hellbraun gefärbte Zytoplasmafraktion wurde durch Punktieren des Röhrchens in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Blockierung der Aktinpolymerisation wurde dem Extrakt Cytochalasin B in einer Konzentration von 10 µg/ml untergemischt. Der Extrakt war in diesem Stadium in der Metaphase der Meiose II arretiert (CSF-Arrest). Zur Inhibition der Translation wurde dem Extrakt in manchen Fällen Cycloheximid (Calbiochem 239764, 10 mg/ml in H₂O, 1:100 v/v) zugegeben. Die weitere Lagerung des Extraktes erfolgte auf Eis. Der CSF-Block aller Extrakte wurde überprüft durch Inkubation mit Spermienkernen bei 28°C. Nach 35 Minuten wurden 2 µl dieses Extraktes auf 4 µl DAPI/Fix gebettet und unter dem Mikroskop auf dekondensiertes Chromatin hin überprüft. Um Niedrig- oder Hoch-Δ90 Extrakte herzustellen, wurden den CSF-Extrakten hCyclin B1Δ90 (3 mg/ml, His-Epitop, Sf9-exprimiert, Ni²⁺-NTA und MonoQ gereinigt, MW = 40,5 kDa; siehe Stemmann *et al.* 2001) in Konzentrationen von 55 nM oder 550 nM zugesetzt. Nach 15 min bei 18°C wurde Ca²⁺ (p.a., 15 mM Stocklösung in Spermienlagerungspuffer) in einer Endkonzentration von 0,6 mM zugegeben und der Extrakt weitere 15 min inkubiert, bevor ein Separase-Securin Komplex zugegeben wurde. Für die Herstellung eines membranfreien Extraktes (HSS = „high speed supernatant“) wurde der fertige CSF-Extrakt nochmals bei 100000 g für 1 Stunde (4°C) ultrazentrifugiert.

Für die Experimente zum Austritt aus der Mitose wurden einem CSF-arretierten Eiextrakt Cycloheximid (0,1 mg/ml Endkonzentration), Rhodamin-markiertes Tubulin (30 ng/µl, Cytoskeleton), Spermienkerne (10³/µl) und Δ90 (55 nM) zugesetzt, bevor der CSF-Arrest durch Zugabe von Ca²⁺ (0,6 mM Endkonzentration) aufgelöst wurde. Nach

20 Minuten wurden Separase-Securin Komplexe (42 nM) zugegeben (WT- oder PM-Separase) und Aliquots des Extraktes wurden unter dem Mikroskop auf die Bildung von mitotischen Astern oder Chromatindekondensation hin untersucht. Zusätzlich wurden in den jeweiligen Stadien des Experimentes 2 μ l Proben in flüssigem Stickstoff für spätere Kinaseaktivitätstests schockgefroren.

Alternativ wurde ein Extrakt, dem zuvor Cycloheximid, Rhodamin-markiertes Tubulin und Spermienkerne zugesetzt worden waren, mit *Xenopus* Securin \square 90 (0,75 mg/ml) oder Referenzpuffer versetzt, bevor 30 Minuten später der CSF-Block durch Ca^{2+} aufgehoben wurde. Die Kinetik des Extraktes beim Verlassen der Metaphase II wurde ermittelt durch die Analyse der Chromosomen sowie der Anwesenheit von mitotischen Astern in 4 min Intervallen.

Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten

OR1 (Oozyten Ringer 1)	5,0 mM HEPES 82,5 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl_2 1,0 mM Na_2HPO_4 pH 7,6 mit KOH
OR3 (Oozyten Ringer 3)	5,0 mM HEPES 82,5 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl_2 1,0 mM Na_2HPO_4 1,0 mM CaCl_2 100 U Penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin 0,11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Na-Pyruvat pH 7,6 mit KOH
HEPES/Fix	100 mM KCl 10 mM HEPES/KOH, pH 7,8 3 mM MgCl_2 0,1% Triton X100 0,1% Glutaraldehyd 3,7% Formaldehyd
HEPES/Hoechst	100 mM KCl 10 mM HEPES/KOH, pH 7,8 3 mM MgCl_2 20 ng/ml Hoechst 33258 (Sigma)

Vor der Biopsie wurde ein weiblicher Frosch für 10 min in einer 0,1%igen (w/v) Tricainlösung (Tricain in Aktivkohle-gefiltertem Leitungswasser) betäubt und auf Eis gelegt. Zur Lapratomie wurden die Lederhaut und das Peritoneum seitlich der Körperachse im caudalen Abdominalbereich durch zwei 7 mm lange Schnitte in Längsachse geöffnet. Ca. 4 ml des Ovars wurden entnommen und in OR1 überführt. Der Frosch wurde anschließend mit einem resorbierbaren Polyglykolsäurefaden (Syneture) durch insgesamt 4 Stiche zugenäht und in ein Aufwachbecken mit 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich der Kopf über Wasser befand. Das ovariale Gewebe wurde in Stücke zu ca. 50 Oozyten geschnitten und mit Kollagenase (Sigma C-6885, 140 U/ml in OR1) für 2 Stunden behandelt. Nach Waschen mit OR1 erholten sich die Eier über Nacht in OR3-Puffer. Stadium VI Oozyten ohne Follikelzellen und Vitellinschicht wurden mit 25 nl xSeparase-antikörpermix (8 mg/ml) oder unspezifischen Kaninchen-IgG der gleichen Konzentration in 80 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH, pH 7,5 unter Verwendung der P-100 Apparatur (Medical Systems Corp.) injiziert und anschließend durch Progesteronbehandlung (0,01 μ g/ml Endkonzentration, Sigma P8783) für 12 Stunden, gereift. Nach einer Stunde Fixierung in HEPES/Fix wurde das Chromatin der injizierten Oozyten durch Umsetzen der Eier in HEPES/Hoechst gefärbt. Die Eier wurden in 1x MMR mit 48% Glycerin gebettet und die Anwesenheit von Polkörpern wurde durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Alle Arbeitsschritte mit den Oozyten wurden bei 18°C durchgeführt.

6 Literatur

- Aguilar, C., Davidson, C., Dix, M., Stead, K., Zheng, K., Hartman, T., und Guacci, V. (2005). Topoisomerase II suppresses the temperature sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* pds5 mutants, but not the defect in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* 4, 1294-1304.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell, fourth edition edn (New York, Garland).
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M. A., und Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105, 459-472.
- Archambault, V., Li, C. X., Tackett, A. J., Wasch, R., Chait, B. T., Rout, M. P., und Cross, F. R. (2003). Genetic and biochemical evaluation of the importance of Cdc6 in regulating mitotic exit. *Mol Biol Cell* 14, 4592-4604.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (1998). Current protocols in molecular biology (New York, Greene publishing associates).
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T., und Dasso, M. (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *Embo J* 24, 2172-2182.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., und Dasso, M. (2003). SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* 163, 477-487.
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., und Elledge, S. J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* 9, 1169-1182.
- Bell, S. P., und Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., und Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 84, 863-874.
- Buonomo, S. B., Rabitsch, K. P., Fuchs, J., Gruber, S., Sullivan, M., Uhlmann, F., Petronczki, M., Toth, A., und Nasmyth, K. (2003). Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19. *Dev Cell* 4, 727-739.
- Chang, D. C., Xu, N., und Luo, K. Q. (2003). Degradation of cyclin B is required for the onset of anaphase in Mammalian cells. *J Biol Chem* 278, 37865-37873 Epub 32003 Jul 37814.
- Chestukhin, A., Pfeffer, C., Milligan, S., DeCaprio, J. A., und Pellman, D. (2003). Processing, localization, and requirement of human separase for normal anaphase progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4574-4579.

- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., und Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* 5, 243-254.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., und Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067-1076.
- Clute, P., und Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1, 82-87.
- D'Amours, D., und Amon, A. (2004). At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* 18, 2581-2595.
- D'Amours, D., Stegmeier, F., und Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117, 455-469.
- De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E. D., und Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15, 214-225.
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J. L., und Jong, A. (1996). Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Mol Biol Cell* 7, 1723-1735.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung (Leipzig, F. C. W. Vogel).
- Foley, E., O'Farrell, P. H., und Sprenger, F. (1999). Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr Biol* 9, 1392-1402.
- Funabiki, H., Kumada, K., und Yanagida, M. (1996). Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *Embo J* 15, 6617-6628.
- Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., und Gygi, S. P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6940-6945.
- Glotzer, M., Murray, A. W., und Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Gorr, I. H., Boos, D., und Stemmann, O. (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* 19, 135-141.

- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H. C., Waizenegger, I. C., Peters, J. M., und Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* 157, 1125-1137.
- Hamid, T., und Kakar, S. S. (2003). PTTG and cancer. *Histol Histopathol* 18, 245-251.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* 11, R431-435.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., und Peters, J. M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* 3, e69.
- Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., und McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat Cell Biol* 5, 1023-1025.
- Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., *et al.* (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430, 797-802.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 311-322.
- Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W., und Murray, A. W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73, 1393-1402.
- Hornig, N. C., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., und Uhlmann, F. (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* 12, 973-982.
- Huang, J., und Raff, J. W. (1999). The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in Drosophila cells. *Embo J* 18, 2184-2195.
- Huang, X., Hatcher, R., York, J. P., und Zhang, P. (2005). Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in Mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16, 4725-4732.
- Ivanov, D., und Nasmyth, K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122, 849-860.
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., und Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in Xenopus oocyte extracts. *Embo J* 19, 4513-4523.
- Jäger, H., Herzig, A., Lehner, C. F., und Heidmann, S. (2001). Drosophila separase is required for sister chromatid separation and binds to PIM and THR. *Genes Dev* 15, 2572-2584.

- Jager, H., Herzig, B., Herzig, A., Sticht, H., Lehner, C. F., und Heidmann, S. (2004). Structure predictions and interaction studies indicate homology of separase N-terminal regulatory domains and Drosophila THR. *Cell Cycle* 3, 182-188.
- Jäger, H., Herzig, B., Herzig, A., Sticht, H., Lehner, C. F., und Heidmann, S. (2004). Structure predictions and interaction studies indicate homology of separase N-terminal regulatory domains and Drosophila THR. *Cell Cycle* 3, 182-188.
- Jallepalli, P. V., und Lengauer, C. (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* 1, 109-117.
- Jensen, S., Segal, M., Clarke, D. J., und Reed, S. I. (2001). A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. *J Cell Biol* 152, 27-40.
- Kamieniecki, R. J., Liu, L., und Dawson, D. S. (2005). FEAR but not MEN genes are required for exit from meiosis I. *Cell Cycle* 4, 1093-1098.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., und Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5, 773-785.
- Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., Funabiki, H., Nakagawa, T., und Yanagida, M. (1998). Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr Biol* 8, 633-641.
- Kumada, K., Yao, R., Kawaguchi, T., Karasawa, M., Hoshikawa, Y., Ichikawa, K., Sugitani, Y., Imoto, I., Inazawa, J., Sugawara, M., *et al.* (2006). The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol* 172, 835-846.
- Labib, K., und Moreno, S. (1996). rum1: a CDK inhibitor regulating G1 progression in fission yeast. *Trends Cell Biol* 6, 62-66.
- Lahad, J. P., Mills, G. B., und Coombes, K. R. (2005). Stem cell-ness: a "magic marker" for cancer. *J Clin Invest* 115, 1463-1467.
- Landrieu, I., Odaert, B., Wieruszkeski, J. M., Drobecq, H., Rousselot-Pailley, P., Inze, D., und Lippens, G. (2001). p13(SUC1) and the WW domain of PIN1 bind to the same phosphothreonine-proline epitope. *J Biol Chem* 276, 1434-1438.
- Liu, X. J. (2006). Xenopus protocols : Cell biology and signal transduction., Vol 322 (New York, Humana Press).
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., und Darnell, J. (2004). molecular cell biology, fifth edn (New York, Freeman).

- Losada, A., Yokochi, T., und Hirano, T. (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 118, 2133-2141.
- Marston, A. L., Lee, B. H., und Amon, A. (2003). The Cdc14 phosphatase and the FEAR network control meiotic spindle disassembly and chromosome segregation. *Dev Cell* 4, 711-726.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K., und Moreno, S. (1996). B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *Embo J* 15, 839-849.
- Marx, J. (2002). Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 297, 544-546.
- McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M., und Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* 3, e86.
- Mei, J., Huang, X., und Zhang, P. (2001). Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Biol* 11, 1197-1201.
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., und Diffley, J. F. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431, 1118-1123.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., und Jentsch, S. (2006). Establishment of sister chromatid cohesion during S-Phase is controlled by PCNA and SUMO. *Mol Cell* in press.
- Murray, A. W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol* 36, 581-605.
- Nasmyth, K. (2005). How do so few control so many? *Cell* 120, 739-746.
- Nasmyth, K., und Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74, 595-648.
- Papi, M., Berdougo, E., Randall, C. L., Ganguly, S., und Jallepalli, P. V. (2005). Multiple roles for separase auto-cleavage during the G2/M transition. *Nat Cell Biol* 7, 1029-1035.
- Pei, L., und Melmed, S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 11, 433-441.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., und Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Pfleghaar, K., Heubes, S., Cox, J., Stemmann, O., und Speicher, M. R. (2005). Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol* 3, e416.

- Pickart, C. M., und Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 55-72.
- Pihan, G., und Doxsey, S. J. (2003). Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* *4*, 89-94.
- Pines, J. (1996). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* *6*, 1399-1402.
- Potapova, T. A., Daum, J. R., Pittman, B. D., Hudson, J. R., Jones, T. N., Satinover, D. L., Stukenberg, P. T., und Gorbsky, G. J. (2006). The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* *440*, 954-958.
- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., und Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* *125*, 719-732.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., und Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* *33*, 49-54.
- Rauh, N. R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A., und Mayer, T. U. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* *437*, 1048-1052.
- Sakahira, H., Enari, M., und Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* *391*, 96-99.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning (Cold Spring Harbor, *CSH Laboratory Press*).
- Scanlan, M. J., Gout, I., Gordon, C. M., Williamson, B., Stockert, E., Gure, A. O., Jager, D., Chen, Y. T., Mackay, A., O'Hare, M. J., und Old, L. J. (2001). Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun* *1*, 4.
- Schmidt, A., Duncan, P. I., Rauh, N. R., Sauer, G., Fry, A. M., Nigg, E. A., und Mayer, T. U. (2005). Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev* *19*, 502-513.
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., und Mayer, T. U. (2006). Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci* *119*, 1213-1218.
- Schule, B., Oviedo, A., Johnston, K., Pai, S., und Francke, U. (2005). Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* *77*, 1117-1128.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., und Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* *79*, 233-244.

- Shamu, C. E., und Murray, A. W. (1992). Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol* 117, 921-934.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., und Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Sikorski, R. S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P., und Guacci, V. (2003). Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol* 163, 729-741.
- Stegmeier, F., Visintin, R., und Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* 108, 207-220.
- Stemmann, O., Boos, D., und Gorr, I. H. (2005). Rephrasing anaphase: separase FEARs shugoshin. *Chromosoma* 113, 409-417.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., und Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107, 715-726.
- Strachan, T. (2005). Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 15, 258-264.
- Stratmann, R., und Lehner, C. F. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the *Drosophila* pimples product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* 84, 25-35.
- Strunnikov, A. V., Aravind, L., und Koonin, E. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158, 95-107.
- Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N. A., Mumby, M. C., und Yu, H. (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* 10, 575-585.
- Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J. M., und Verlhac, M. H. (2003). The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Curr Biol* 13, 1797-1802.
- Tonkin, E. T., Wang, T. J., Lisgo, S., Bamshad, M. J., und Strachan, T. (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet* 36, 636-641.

- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., und Nasmyth, K. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* 13, 320-333.
- Tovey, E. R., und Baldo, B. A. (1989). Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting. *J Biochem Biophys Methods* 19, 169-183.
- Toyoshima, H., und Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W., und Hieter, P. (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* 81, 261-268.
- Turner, D. L., und Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8, 1434-1447.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., und Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K., *et al.* (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 37, 468-470.
- Viadiu, H., Stemmann, O., Kirschner, M. W., und Walz, T. (2005). Domain structure of separase and its binding to securin as determined by EM. *Nat Struct Mol Biol* 12, 552-553.
- Waizenegger, I. C., Giménez-Abián, J. F., Wernic, D., und Peters, J. M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* 12, 1368-1378.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., und Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.
- Wakefield, J. G., Huang, J. Y., und Raff, J. W. (2000). Centrosomes have a role in regulating the destruction of cyclin B in early Drosophila embryos. *Curr Biol* 10, 1367-1370.
- Wang, T. L., Rago, C., Silliman, N., Ptak, J., Markowitz, S., Willson, J. K., Parmigiani, G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., und Velculescu, V. E. (2002). Prevalence of somatic alterations in the colorectal cancer cell genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3076-3080.
- Wasch, R., und Engelbert, D. (2005). Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene* 24, 1-10.

- Weinreich, M., Liang, C., Chen, H. H., und Stillman, B. (2001). Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11211-11217.
- Wheatley, S. P., Hinchcliffe, E. H., Glotzer, M., Hyman, A. A., Sluder, G., und Wang, Y. (1997). CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *J Cell Biol* 138, 385-393.
- Wirth, K. G., Wutz, G., Kudo, N. R., Desdouets, C., Zetterberg, A., Taghybeeglu, S., Seznec, J., Ducos, G. M., Ricci, R., Firnberg, N., *et al.* (2006). Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* 172, 847-860.
- Wolf, F., Wandke, C., Isenberg, N., und Geley, S. (2006). Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *Embo J* 25, 2802-2813.
- Yamamoto, A., Guacci, V., und Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 133, 85-97.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., und Fornace, A. J., Jr. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-2900.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., und Kirschner, M. W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285, 418-422.
- Zou, H., Stemman, O., Anderson, J., Mann, M., und Kirschner, M. (2002). Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett* 528, 246.
- Zur, A., und Brandeis, M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *Embo J* 20, 792-801.

7 Abkürzungen

Δ90	Durch eine N-terminale Deletion von 90 AS stabilisierte Form von Cyclin B1
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AS	Aminosäuren
amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillinresistenz
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome (E3-Ubiquitinligase)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	armadillo
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	filtriert (entspricht zweifach destilliert)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cdk1	cyclin dependent kinase 1
Cki	Cdk-Inhibitor
CLD	Cdc6-like domain, Bindemotiv in Separase für Cdk1
Coom.	Coomassie
CSA	Hühnerserumalbumin
CSF	Zytostatischer Faktor
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzym
E2	Ubiquitin-Konjugationsenzym
E3	Ubiquitin-Proteinligase
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N' - tetraessigsäure
Exp.	Exposition (Belichtungszeit)
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/sec ² oder Gramm
G	gauge (Breite)
GST	Glutathion S-Transferase
h	human
HA	Hämaggglutinin
HAc	Essigsäure
HEAT	Huntingtin, elongation factor 3, Proteinphosphatase 2A, target of rapamycin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Hoch-Δ90	<i>Xenopus</i> Oozytenextrakt mit hoher Δ90-Konzentration (550 nM)
HSS	high speed supernatant
IgG	Immunglobuline
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> Translation
kb	Kilobase(n)
KD	katalytisch inaktive Kinase
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LB	Luria-Bertani (<i>E. coli</i> -Medium)
m	Maus
M	Molar
mcKLH	mariculture keyhole limpet hemocyanin
mm	Millimeter
MMR	Marc's modifizierter Ringer
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
min	Minuten
MOPS	Morpholinoethansulfonsäure
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PM	Phosphomutante von Separase (S1126A, T1346A)
Puf.	Puffer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
Sec.	Securin
Sep.	Separase
sog.	so genannt
TBS	Tris gepufferte Saline
TBS-w	TBS mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TEV	Protease des Tobacco Etch Virus
Tev	Erkennungssequenz der TEV-Protease
Tricain	Ethyl 3-aminobenzoatmethansulfonatsalz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit
UBC	Ubiquitin-Konjugationsenzym
ÜN	über Nacht
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche

Vol.	Volumen
Vorink.	Vorinkubation
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
x	<i>Xenopus</i>
z.B.	zum Beispiel
ZZ	IgG-Bindedomäne von Protein A

Die Namen der Gene sowie aus dem Lateinischen übernommene Begriffe sind kursiv gesetzt.

Dank

Ich möchte mich an erster Stelle bei Olaf Stemmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Seine großzügige Unterstützung, seine Hilfe beim Erlernen vielfältiger Techniken sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Stefan Jentsch bedanke ich mich von Herzen für seine fortwährende, wertvolle Unterstützung und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein Dank gilt auch Frau Angelika Böttger für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dominik Boos, dessen Hilfe maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen hat und ohne den der Methodenteil nicht korrigiert worden wäre.

Alexander Straßer danke ich für seine stete Hilfe und dafür, dass er mir - immer in bester Laune - ein geduldiger Labornachbar war.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen aus der Abteilung Jentsch für das freundliche, kameradschaftliche und kooperative Arbeitsklima bedanken. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Christian Schuberth und Simone Heubes u.a. für das Lesen des Manuskriptes sowie Klara Schwander, Dirk Kempe und Massimo Bossi wegen ihrer ständigen Hilfsbereitschaft. Michael und Bernd danke ich für das Korrekturlesen.

Mit der Fußballgruppe vom Donnerstag hatte ich großen Spaß und ich danke Stefan Müller und Alex Buchberger, sowie Per, Markus, Andi, Domme und Boris, dass sie auch bei Regen (fast) nie gekniffen haben.

Mit Jenny, Nadine, Stefan und Andi aus dem Labor von Thomas Mayer bestand ein großzügiger Austausch von Reagenzien und mehr.

Alexandra Reis und Keith Jones danke ich für die produktive Kollaboration.

Meinen Eltern Ute v. Glinski und Joh. Peter Gorr sowie meiner Schwester Ragna und meinem Bruder Heiko danke ich für ihre geduldige Unterstützung in jeglicher Hinsicht und für gemütliche, gemeinsame Ausflüge.

Nicht zuletzt möchte ich hier meiner Freundin Marlene Pickl danken. Ohne ihre endlose Geduld, ihre Hilfsbereitschaft, ohne ihren Humor und ihr Lachen wäre alles nur der halbe Spaß gewesen.